ROBERTA FIGUEIROA DE SOUZA

ESTUDO DO EFEITO DO ANTI-TNFα NOS NEURÔNIOS ENTÉRICOS E CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS DE CAMUNDONGOS NA COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL

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

São Paulo

2021

ROBERTA FIGUEIROA DE SOUZA

ESTUDO DO EFEITO DO ANTI-TNFα NOS NEURÔNIOS ENTÉRICOS E CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS DE CAMUNDONGOS NA COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL

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

Área de concentração: Biologia Morfofuncional.

Orientador (a): Profª. Drª. Patrícia Castelucci.

Versão Original

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Figueiroa de Souza, Roberta
ESTUDO DO EFEITO DO ANTI-TNFa NOS NEURÔNIOS ENTÉRICOS E CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS DE CAMUNDONGOS NA COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL / Roberta Figueiroa de Souza; orientador Patrícia Castelucci. -- São Paulo, 2021.
78 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neurônio Entérico. 2. Célula Glial Entérica. 3. Colite Ulcerativa. 4. Anti-TNFa. 5. Adalimumabe. I. Castelucci, Patrícia , orientador. II. Título.

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

Candidato (a): Roberta Figueiroa de Souza.

Título da Dissertação: Estudo do efeito do anti-TNFα nos neurônios entéricos e células gliais entéricas de camundongos na colite ulcerativa experimental.

Orientador(a): Profª. Drª. Patrícia Castelucci.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizado em __/__/____ , considerou:

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Instituto de Ciências Biomédicas
ICB USP
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do efeito do adalimumabe nos neurônios entéricos e células gliais entéricas de camundongos na colite ulcerativa experimental ", protocolada sob o CEUA nº 7335180618, sob a responsabilidade de **Patricia Castelucci** *e equipe; Roberta Figueiroa de Souza* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 09/10/2018.

We certify that the proposal "Study of the effect of adalimumab on enteric neurons and enteric glial cells of mice on experimental ulcerative colitis", utilizing 50 Isogenics mice (50 males), protocol number CEUA 7335180618, under the responsibility of **Patricia Castelucci** *and team; Roberta Figueiroa de Souza* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 10/09/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 48 meses

Depto/Setor: Anatomia

Origem: Biotério Central FMUSP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

Idade ou peso: 2 a 3 meses

Linhagem: C57BL/6

N amostral: 50

São Paulo, 09 de outubro de 2018

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo primeiramente a Deus por toda a oportunidade, cuidado, saúde e forças que me sustentam para sempre seguir no caminho do aprimoramento moral e espiritual.

À minha família por ser meu apoio nos momentos mais felizes de minha vida, como aqueles momentos mais obscuros também.

Tenho um carinho em especial pela minha “mãe científica” a Profa. Dra. Patrícia Castelucci, que me “adotou” no laboratório e me fez me apaixonar cada vez mais pela disciplina de Anatomia, além de ser minha fonte de inspiração na docência.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual este projeto não seria desenvolvido.

À Coordenadoria de Pós-graduação por sempre estar à disposição.

Ao departamento de Anatomia ao qual eu pude desenvolver minhas habilidades ao qual sempre vou ser grata.

À equipe do Laboratório de Neurogastroenterologia pela boa companhia e motivação científica.

Aos amigos que fiz no departamento, dos quais destaca-se Tábatha Oliveira Silva, Wenddy Sougey, Bianca Baggio, Aline Parletta, Juliane Braga e Camilla Garcia, pelo orgulho de ver tantas meninas promovendo a ciência no Brasil #GirlsinScience. E em especial, tenho um grande carinho pelos “Sybrs”, grupo composto por Elia Vedda, Fernando Ribeiro e Geovana Freire, que foram minha válvula de escape e companheiros nos momentos mais difíceis, principalmente no cenário pandêmico no qual o país se encontra, obrigada pela paciência, apoio e carinho.

“Eu sei que estaria mais seguro se não colocasse a minha alma em tudo, mas essa é a forma mais sincera que encontrei de viver”.

- Diego Vinícius.

RESUMO

SOUZA, RF. **Estudo do efeito do anti-TNFα nos neurônios entéricos e células gliais entéricas de camundongos na colite ulcerativa experimental.** 2020. 78 p. Dissertação de Mestrado do Programa de Biologia de Sistemas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A colite ulcerativa e a Doença de Crohn fazem parte das doenças inflamatórias intestinais (DII) e apresentam processos patofisiológicos como a necrose do intestino e dos neurônios entéricos e glias entéricas. As DII tem como o principal mediador inflamatório o fator de necrose tumoral alfa (TNFα). Este projeto tem como objetivo estudar os efeitos do anti-TNFα, o Adalimumabe (ADA), no plexo mioentérico na colite ulcerativa experimental. Para isto, os animais C57BL/6 receberam 3% de sulfato de sódio dextran (DSS) dissolvido em água potável por 7 dias até que todos os camundongos dos grupos administrados (grupos DSS e DSS+ADA) desenvolvessem inflamação intestinal equivalente à de humanos. O grupo Sham recebeu água pelo mesmo período. O grupo (DSS+ADA) recebeu o anti-TNFα no 2º dia de ingestão do DSS. O grupo ADA recebeu água por todo o período e injeção de anti-TNFα no 2º dia. Foi avaliado o código químico, o número de neurônios por gânglio e a área dos neurônios entéricos imunorreativos a óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), colina acetil transferase (ChAT), pan neuronal PGP9.5 e o receptor TNFR2. Também foi feito dupla marcação do pan neuronal PGP9.5 com marcador glial (GFAP). Além disso, foi obtida a análise do perfil neuronal (µm²) dos neurônios NOSn-ir, ChAT-ir e PGP9.5 -ir. As análises qualitativas e quantitativas foram obtidas no microscópio de fluorescência Nikon 80i. Os resultados quantitativos mostram que a) o DSS foi um protocolo que induziu a colite ulcerativa, uma vez que os animais apresentaram alterações no peso com diarréia e sangramento; b) o receptor TNFR2 foi encontrado nos neurônios do plexo mioentérico nos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA; c) a colite ulcerativa experimental afetou os neurônios entéricos, pois houve diminuição dos neurônios imunorreativos a TNFR2, ChAT, NOSn e PGP9.5; d) a colite ulcerativa experimental afetou de maneira diferenciada as células gliais entéricas, com aumento nos grupos DSS e DSS+ADA; e) o grupo DSS+ADA dos neurônios NOSn-ir e ChAT-ir apresentaram recuperação do número de neurônios por gânglio; f) a colite ulcerativa experimental afetou o perfil neuronal com redução da área nos grupos DSS e DSS+ADA. Conclui-se que os neurônios do plexo mioentérico são imunorreativos ao receptor TNFR2, a inflamação pelo DSS causou alterações no plexo mioentérico e o tratamento com o anti-TNFα pareceu ser efetivo no tratamento da colite ulcerativa experimental.

Palavras chaves: Neurônio Entérico, Célula Glial Entérica, Colite Ulcerativa, Anti-TNFα Adalimumabe.

ABSTRACT

SOUZA, RF. **Effect of anti-TNFα on enteric neurons and enteric glial cells in experimental ulcerative colitis.** 2020. 78 p. Master's thesis of Systems Biology Program – Biomedical Sciences Institute, São Paulo University, São Paulo, 2020.

Ulcerative colitis and Crohn's disease are part of inflammatory bowel diseases (IBD) and have pathophysiological processes such as bowel necrosis and enteric neurons and enteric glia. Also, the main inflammatory mediator is tumor necrosis factor alpha (TNFα). This project aims to study the effects of anti-TNFα, Adalimumab (ADA), on the myenteric plexus in experimental ulcerative colitis. For this, C57BL / 6 animals received 3% dextran sodium sulfate (DSS) dissolved in drinking water for 7 days until all mice in the administered groups (DSS and DSS + ADA groups) developed intestinal inflammation equivalent to humans. The Sham group received water for the same period. The group (DSS + ADA) received anti-TNFα on the 2nd day of DSS intake. The ADA group received water for the entire period and anti-TNFα injection on the 2nd day. The chemical code, the number of neurons per ganglion, and the area of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS), choline acetyl transferase (ChAT), PGP9.5 neuronal pan and TNFR2 receptor immunoreactive enteric neurons were evaluated. Double labeling of PGP9.5 neuronal pan with glial marker (GFAP) was also performed. In addition, the neuronal profile analysis (µm²) of nNOS-ir, ChAT-ir and PGP9.5-ir neurons was performed. Qualitative and quantitative analyzes were obtained using the Nikon 80i fluorescence microscope. Quantitative results show that a) DSS was a protocol that induced ulcerative colitis, since the animals presented weight changes with diarrhea and bleeding; b) TNFR2 receptor was found in the myenteric plexus neurons in the Sham, ADA, DSS and DSS + ADA groups; c) Experimental ulcerative colitis affected the enteric neurons, as there was a decrease in the TNFR2, ChAT, nNOS and PGP9.5 immunoreactive neurons; d) experimental ulcerative colitis affected differently the enteric glial cells, with increase in the DSS and DSS + ADA groups; e) the DSS + ADA group of nNOS-ir and ChAT-ir neurons showed recovery of neurons per ganglia; f) experimental ulcerative colitis affected the neuronal profile with reduced area in the DSS and DSS + ADA groups. It is concluded that myenteric plexus neurons are immunoreactive to the TNFR2 receptor, DSS inflammation caused changes in the myenteric plexus and anti-TNFα treatment appeared to be effective in the treatment of experimental ulcerative colitis.

Keywords: Enteric Neuron, Enteric Glial Cell, Ulcerative Colitis, anti-TNFα Adalimumab.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do SNE 20

Figura 2– Representação das células gliais entéricas no SNE.....21

Figura 3 – Esquema de Sinalização do receptor TNFR2.....25

Gráfico 1 – Gráfico de linhas da variação da média do peso dos animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA antes da indução da colite até o 7º dia.....39

Gráfico 2 - Gráfico de linhas da variação da média do consumo de água dos animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA no início da colite até o 7º dia.....39

Gráfico 3 – Histograma da média do comprimento do intestino (colo distal+colo proximal) dos animais usados expressa em centímetros.....40

Gráfico 4 – Atribuição de pontos referentes à mudança de peso, consistência das fezes e abundância de sangramento dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.....44

Figura 4 – Dupla marcação de neurônios NOSn-ir e receptor TNFR2-ir no plexo mioentérico 46

Figura 5 – Dupla marcação de neurônios ChAT-ir e receptor TNFR2 no plexo mioentérico 47

Figura 6 – Dupla marcação de neurônios PGP9.5-ir e células gliais entéricas GFAP-ir no plexo mioentérico.....48

Figura 7 – Dupla marcação de neurônios PGP9.5-ir e receptor TNFR2-ir no plexo mioentérico.....49

Gráfico 5 – Histograma do número de neurônios imunorreativos a NOSn (A), ChAT (B) e TNFR2 (C) por gânglio dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.....53

Gráfico 6 – Histograma do número de neurônios imunorreativos a PGP9.5 (A) e células gliais entéricas imunorreativas a GFAP (B) por gânglio dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.....54

Gráfico 7 – Histograma da área do perfil celular de neurônios imunorreativos a NOSn (A), ChAT (B) e PGP9.5 (C) do plexo mioentérico do colo distal dos animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.....56

Gráfico 8 – Distribuição de frequência das áreas **(**μm^2) dos neurônios imunorreativos ao NOSn (A), ChAT (B) e PGP9.5 (C) no plexo mioentérico dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.....58

Figura 8 – Fotomicrografia demonstrando secções de colo distal de camundongos coradas em Hematoxilina & Eosina dos grupos Sham (A-B), ADA (C-D), DSS (E-F) e DSS+ADA (G-H).....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grau de lesão no colo distal com colite ulcerativa (análise macroscópica) 32

Tabela 2 – Grau de lesão no colo distal com colite ulcerativa (análise microscópica) 32

Tabela 3 – Grau de mudanças ocasionadas pela colite ulcerativa.....33

Tabela 4 – Características dos anticorpos primários 34

Tabela 5 – Características dos anticorpos secundários.....34

Tabela 6 – Atribuição de pontos referentes a Análise Macroscópica da Colite Ulcerativa.....41

Tabela 7 – Atribuição de pontos referentes a ulcerações, à edema na camada submucosa e à infiltração de células inflamatórias dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.....42

Tabela 8 – Colocalização dos neurônios imunorreativos a NOSn, ChAT, PGP9.5 e ao receptor TNFR2 e células gliais entéricas GFAP-ir nos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcento

°C – Grau Celsius

µl – Microlitro

µM - Micromolar

µm² - Micrômetro quadrado

Calb – Calbindina

Calr - Calretinina

CD 14 – Grupamento de diferenciação14

CD206 – Grupamento de diferenciação 206

CEUA – Comitê de ética no Uso de Animais

ChAT – Colina acetiltransferase

Cm² - Centímetro quadrado

DAPI – 2,6-diamidino-2-feniindole dicloridrato

DC – Doença de Crohn

DII – Doenças Inflamatórias Intestinais

DMSO - Dimetilsulfóxido

DSS – Sulfato de Sódio Dextran

EDTA – Ácido Etienodiamino Tetracético

FMUSP – Faculdades de Medicina da Universidade de São Paulo

g – Gramas

GFAP – Proteína fibrilar glial ácida

HE – Hematoxilina e Eosina

HO -1 – Heme oxigenasse 1

IAD – Índice de Atividade da Doença

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IgG1 – Imunoglobulina Humana 1

Il – Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzível

IPANs – Neurônios Aferentes Intrínseco Primários

IR – Imunorreativo (a)

KCl – Cloreto de potássio

Kg – Kilograma

M – Molaridade

mg – Miligramas

MgCl2 – Cloreto de Magnésio

MgSO4 – Sulfato de Magnésio

Ml – Mililitro

mM – Milimolar

Ms – Milissegundo

mTNF – Fator de necrose tumoral transmembranal

Na+ - Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NADH-diaforase – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NaH2PO4 – Fosfato de sódio monobásico

NaHCO3 – Bicabornato de sódio

NANC – Neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico

NOSn – Óxido Nítrico Sintase Neuronal

PAS – Ácido Periódico de Schiff

PBS – Tampão Salina Fosfato

PGP 9.5 – Produto do gene da proteína 9.5

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

S TNF – Fator de necrose tumoral solúvel

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

TCD4 – Grupo de diferenciação 4

TRAF2 – Receptor de Tnf associado ao fator 2

TH2 – Linfócito T helper 2

TNBS – 2, 4, 6 Trinitrobenzeno sulfônico

TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

TNFR1 – Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1

TNFR2 – Receptor de Fator de Necrose Tumoral 2

USP – Universidade de São Paulo

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....18

1.1 Sistema Nervoso Entérico.....19

1.2 Células Gliais Entéricas.....20

1.3 Inflamação Intestinal e Efeitos no SNE.....22

1.4 Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR).....23

1.5 Tratamento com anti-TNFα.....26

2- OBJETIVOS.....28

2.1 Objetivo Geral.....29

2.2 Objetivos Específicos.....29

3- MATERIAL E MÉTODOS.....30

3.1 Indução da Colite Ulcerativa.....31

3.1.1 ***Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Macroscópica)***.....32

3.1.2 ***Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Microscópica)***.....32

3.1.3 ***Índice de Atividade da Doença (IAD)***.....33

3.2 Preparação para Imuno-histoquímica.....33

3.3 Método de imunofluorescência indireta dos neurônios NOSn, ChAT, PGP 9.5 e GFAP 34

3.4 Métodos das Análises Quantitativas e Qualitativas de Imuno-histoquímica.....35

3.4.1 ***Análise das Triplas Marcações***.....35

3.4.2 ***Análise Neural/Glial por Gânglio***.....35

3.4.3 ***Análise Morfométrica***.....35

3.5 Análises Histológicas.....36

3.6 Análise Estatística 36

4- RESULTADOS.....37

4.1 Indução da Colite Ulcerativa.....39

4.1.1 Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Macroscópica).....41

4.1.2 Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Microscópica).....42

4.1.3 Índice da Atividade da Doença (IAD) 43

4.2 Análises Qualitativas……..…….....45

4.2.1 Imunorreatividade do receptor TNFR2 e células gliais entéricas GFAP à NOSn, ChAT, PGP9.5 nos neurônios do plexo mioentérico .....……...…….....45

4.3 Análises Quantitativas…….....50

4.3.1 Colocalização.....50

4.3.2 Neurônios e Glias por gânglio...…….……...…….....51

4.3.3 Área do Perfil Neuronal……..…...55

4.3.4 Distribuição dos neurônios imunorreativos a NOSn, ChAT, e PGP9.5 57

4.4 Análise Qualitativa Histológica na Colite Ulcerativa.....60

5– DISCUSSÃO …….....…….....62

5.1 Considerações sobre o Modelo de Colite Ulcerativa Experimental.....64

5.2 Considerações sobre o Código Químico e o Receptor TNFR2.....64

5.3 Considerações sobre Neurônios/Glias por Gânglio.....65

5.4 Considerações sobre o Perfil Nuronal.....66

6 – CONCLUSÃO……..…….....68

7 - REFERÊNCIAS…….....70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Nervoso Entérico

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é encontrado na parede intestinal com considerável complexidade estrutural e integridade funcional (FURNESS, 2006). O SNE está organizado em uma complexa estrutura que exerce a motilidade do trato gastrointestinal, controle da secreção de ácido gástrico, regulação do movimento de fluído através do epitélio, mudanças no fluxo sanguíneo local e interações com o sistema endócrino e imune do intestino (FURNESS, 2006, 2012). Esse sistema possui dois plexos ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (FURNESS, 2000, 2006) (Figura 1).

O plexo mioentérico (plexo de Auerbach) encontra-se entre a camada muscular longitudinal externa e a camada do músculo circular, localizado por todo trato digestório, do esôfago ao reto. O plexo mioentérico apresenta três componentes: um plexo primário, um plexo secundário e um plexo terciário. Este plexo está envolvido na regulação reflexa das atividades contráteis do músculo circular e longitudinal, justamente por estar mais próxima ao músculo (FURNESS, 2000, 2006; LOMAX et al., 2005).

O plexo submucoso (de Meissner) é encontrado predominante no intestino delgado e grosso, apresenta um gânglio menor e suas fibras interconectadas são mais finas quando comparadas ao plexo mioentérico (FURNESS, 2006, 2012). Tem papel direto no controle da secreção e absorção, através de neurônios motores que regulam a atividade secretomotora e vasomotora da mucosa (FURNESS, 2000; LOMAX et al., 2005).

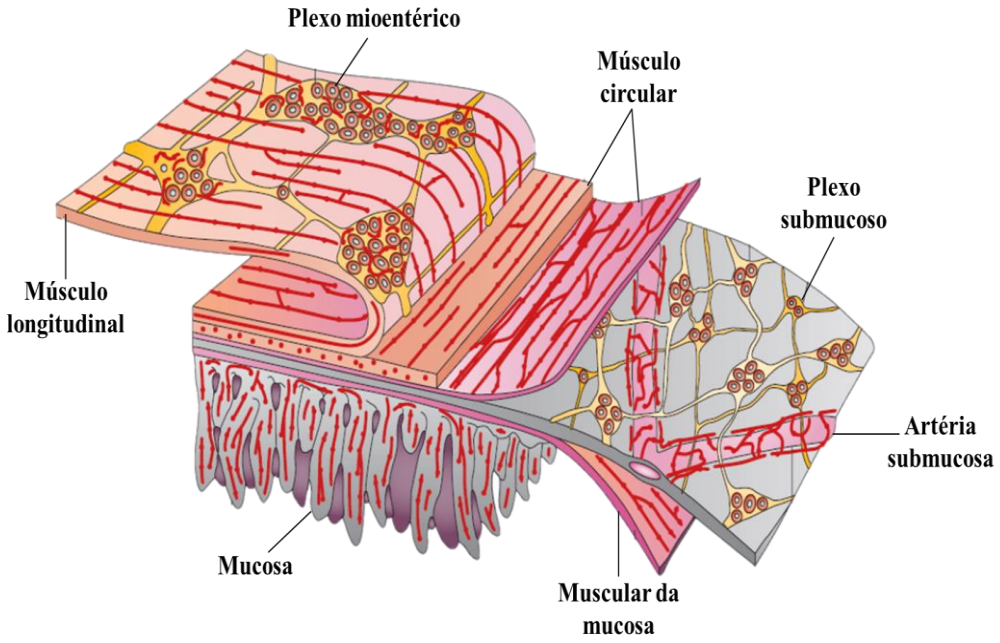
Os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório, todavia, diferenças quanto à densidade e o tamanho dos neurônios, bem como a forma dos gânglios, podem localizar-se no mesmo segmento do trato digestório dos animais da mesma espécie e com idades diferentes (MATINI et al., 1997; MCKEOWN et al., 2001; QU et al., 2008), ou expostos a condições experimentais como: desnutrição/renutrição (CASTELUCCI et al., 2002; GIROTTI et al., 2013; MISAWA et al., 2010), obesidade (MIZUNO et al., 2012; 2014) e isquemia/reperfusão (MAROSTI et al., 2015; MENDES et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013, 2019; PAULINO et al., 2011) e inflamação intestinal (DA SILVA et al., 2015, 2017).

Os neurônios entéricos podem ser reunidos em neurônios motores, interneurônios e intrínsecos aferentes primários (IPANs) (FURNESS, 2006). Os neurônios motores são divididos em neurônios excitatórios e neurônios inibitórios da musculatura lisa do intestino, e neurônios secretomotores/vasodilatadores. Os dois primeiros encontram-se no plexo mioentérico e estão implicados no controle da motilidade, já os neurônios secretomotores/vasodilatadores são

encontrados no plexo submucoso e são responsáveis pela inervação da mucosa e pela regulação da secreção, absorção e do fluxo sanguíneo (FURNESS, 2000, 2006, 2012).

Para estudar o código químico dos neurônios do plexo mioentérico, são usados para identificar os neurônios motores inibitórios, à enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOSn); para os IPANs a Calbindina (Calb); para neurônios motores colinérgicos a enzima acetil colina transferase (ChAT) e/ou Calretinina (Carl); o pan-neuronal é utilizado o marcador anti-HuC/D e/ou PGP 9.5 (FURNESS 2006, 2012).

Figura 1. Representação esquemática do SNE. Adaptado de FURNESS, 2012.



1.2 Células Gliais Entéricas

As células gliais entéricas são pequenas, com numerosos processos que não sintetizam mielina; assim, essas células apresentam semelhanças com os astrócitos do Sistema Nervoso Central (SNC) (MENDES et al., 2019). No SNE as células gliais são essenciais para a organização e funcionamento do SNE (GABELLA, 1970; KABOURIDIS et al., 2015; VERKHRATSHY; BUTT, 2007) (Figura 2). As glias entéricas apresentam um formato de estrela, com numerosas ramificações

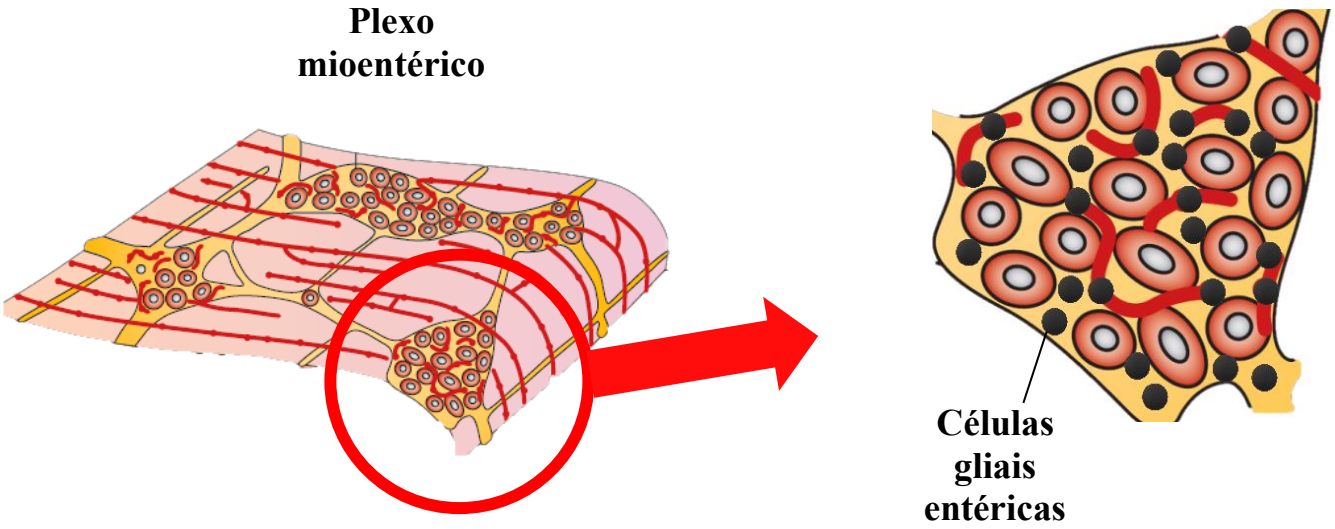
e processos que se misturam aos neurônios. Também, apresentam série de canais iônicos dependente de voltagem e são conectadas por junções “gap”, dando a impressão de um entrelaçamento íntimo e complexo de neurônios e células gliais. Além de seu papel de suporte aos neurônios, as células glias entéricas regulam a transmissão sináptica, liberam citocinas e, também medeia à comunicação entre o sistema nervoso e o imunológico (BASSOTTI et al., 2007; CLARKE; BARRES, 2013; GABELLA, 1971; JENSEN; MASSIE; DE KEYSER, 2013).

Para a identificação de células glias entéricas utilizam-se métodos imuno-histoquímicos como a marcação de células que expressam proteína fibrilar ácida glial (GFAP) e/ou proteína ligante de cálcio S100/S100β. As células gliais entéricas maduras expressam esses tipos de proteína (HAGSTROM; OLSSON, 2010; RUHL et al., 2004).

A expressão de GFAP é modulada por proliferação de células gliais entéricas, diferenciação e inflamação (CIRILLO et al., 2011). A S100 é uma proteína ligante de cálcio que pode ser encontrada no núcleo/citoplasma e têm funções, como a regulação da estrutura e função do citoesqueleto e a homeostase de cálcio no citoplasma das glias entéricas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2003; HSIEH et al., 2004; RÜHL, 2004).

Em condições inflamatórias, as células gliais entéricas podem adquirir novas propriedades funcionais, como os astrócitos no SNC, o que pode induzir mudanças na expressão de marcadores gliais. Estudos realizados com amostras de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn, mostraram que áreas inflamadas da mucosa exibiram um aumento da expressão de GFAP em comparação com áreas não inflamadas (POCHARD et al., 2018).

Figura 2. Representação das células gliais entéricas no plexo mioentérico. Adaptado por FURNESS, 2012.



1.3 Inflamação intestinal e efeitos no SNE

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são distúrbios que afetam o trato digestório, dentre estes problemas temos: a colite ulcerativa e a doença de Crohn (KAWADA et al., 2007). As reações inflamatórias na mucosa intestinal causam danos epiteliais, resultando no comprometimento da barreira intestinal (BEGUE et al., 2006). De origens desconhecidas, geralmente as DII são caracterizadas por uma complexa relação entre fatores genéticos, imunológicos, ambientais e da própria microbiota intestinal, resultam em um desequilíbrio entre citocinas anti e pró-inflamatórias levando a uma resposta imune exagerada e inadequada (ARGOLLO et al., 2017; AHMAD et al., 2001; FIOCCHI, 1997; POLI et al., 2001; TATIYA-APHIRADEE et al., 2018). Enfatiza-se que na colite, há alterações na população neuronal (LINDEN et al., 2005; NEUNLIST et al., 2003; POLI et al., 2001), já que na inflamação intestinal tem sido possível constatar desequilíbrios nas funções contráteis e secretoras do colo distal associado com diarreia (COLLINS et al., 1996; DA SILVA et al., 2015, 2017; GALEAZZI et al., 2000; JACOBSON et al., 1995; POLI et al., 2001).

A doença de Crohn é caracterizada por um distúrbio segmentar e transmural que pode afetar todo o trato gastrintestinal, e há o envolvimento de células T-auxiliares (TCD4) na patogênese da doença (UENO et al., 2015). Em contraste, a colite ulcerativa, é caracterizada por inflamação contínua do colo distal e uma modificação do perfil de citocinas proveniente de células Th2, envolvidas em padrões de resposta imunológica humoral (HELLER et al., 2005).

No Brasil, principalmente no Estado de São Paulo, as pesquisas demonstram que 91% dos casos de DII estão associados a pessoas de etnia branca e 90% dos casos aconteceram em áreas urbanas, mostrando que as incidências da doença podem estar relacionadas a mudanças no padrão de vida sofrida pelo homem nas últimas décadas (VICTORIA et al., 2009). O levantamento de dados sobre a ocorrência de DII aponta que no Brasil não se pode mais considerar essas doenças como raras, levando em conta o aumento gradual das suas frequências nos últimos anos, onde é chamada a atenção para os estados de São Paulo e Minas Gerais (SOUZA et al., 2002).

A literatura tem demonstrado que o SNE é acometido nas doenças inflamatórias intestinais, com necrose, apoptose e degeneração dos gânglios entéricos (GEBOES; COLLINS,1998; LOMAX et al., 2005). Similarmente foram notadas alterações nos neurotransmissores e neuropeptídios dos neurônios entéricos nestas patologias (BOYER et al., 2005; GULBRANSEN et al., 2012; SHARKEY; KROESE, 2001). Além disso, lesões no SNE resultam em ativação das células gliais entéricas (ENG et al., 1992; O'CALLAGHAN, 1993) e que o início e/ou progressão da DII (especialmente na doença de Crohn) pode ser atribuído a um dano imunomediado pela glia entérica

(BASSOTI et al., 2007). Essa ativação é apontada como um mecanismo de sinalização, resultando em morte neuronal subsequente (GIULIAN et al., 1994).

A diversidade de neurotransmissores e receptores encontrados no SNE possibilitou que o intestino se tornasse umas das principais escolhas de tecido para estudos de receptores de neurotransmissores em testes farmacológicos. Por sua vez, várias estratégias de tratamento relacionadas ao SNE foram exploradas para alterar a função intestinal em um esforço para melhorar os sintomas, que incluem medicamentos direcionados a receptores opióides, serotoninérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos (SPEAR & MAWE, 2019).

A indução de um modelo de colite experimental induzida por sulfato de sódio dextran (DSS) é amplamente utilizada na inflamação intestinal, resultando no desenvolvimento de pancolite em camundongos que é bem estudada em modelos de DII (KIESLER et al., 2015). Os sintomas iniciais se agravam em sintomas cada vez mais drásticos, incluindo o aumento da permeabilidade intestinal, sangramento grave e por fim, mortalidade (CHASSAING et al., 2011). Embora o mecanismo exato da colite induzida por DSS não seja bem compreendida, é amplamente aceito que a ruptura da monocamada epitelial resultando na exposição do sistema imunológico subjacente aos conteúdos intestinais contendo a microbiota e seus produtos metabólicos (PERSE & CERAR, 2012). A inflamação do colo distal induzida por DSS pode ser adaptada como modelo agudo, crônico ou redicivante de inflamação intestinal alterando a concentração, duração e ciclos de administração de DSS na água potável (DAS et al., 2015).

1.4 Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR)

No trato gastrointestinal, enzimas e citocinas específicas foram identificadas quando os tecidos são acometidos por lesões ou doenças e estão em desequilíbrio na DII, servindo como sinais significativos no aumento e perpetuação da colite ulcerativa. Elas são diretamente responsáveis pela lesão da mucosa e dano tecidual e, consequentemente, desencadeiam respostas imunológicas específicas à doença na colite ulcerativa (TATIYA-APHIRADEE et al., 2018). As citocinas incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNFα), o óxido nítrico sintase induzível (iNOS), várias interleucinas e citocinas, heme oxigenase 1 (HO-1), arginase-1 ou CD206, que estão elevadas e conduzem o enorme dano tecidual no intestino (CIPRIANI et al., 2016; FUSS et al., 1996; HOLTMANN et al., 2002; UENO et al., 2015).

O TNFα é um mediador em processos inflamatórios intestinais, sendo uma das principais citocinas envolvidas na patogênese de DII, os seus níveis quando dosados, estão presentes no soro de pacientes com DII (BILLMEIER et al., 2016; HOLTMANN et al., 2002). Desse modo, o TNFα

desempenha papéis na promoção da inflamação, como por exemplo, a produção de interleucinas (IL) tais como IL-1β e IL-6 (TATIYA-APHIRADEE et al., 2018; OSAWA et al., 2001; BOSANI et al., 2014).

No SNC, o TNFα exerce papéis homeostáticos regulando processos fisiológicos cruciais, como a plasticidade sináptica, aprendizado e memória, sono e ingestão de comida e água (OLMOS; LLADÓ, 2014). Além disso, pode estar envolvido na gliose e na remodelação de tecidos (RICHTER et al., 2014). Em condições patológicas, astrócitos e principalmente as micróglias liberam grande quantidade de TNFα, a produção desta citocina é um componente importante da resposta neuroinflamatória que está associada com vários distúrbios neurológicos como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (OLMOS; LLADÓ, 2014).

O TNFα opera significativamente na fase apoptótica, aumentando a expressão do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF, o TRAF2 (BEGUE et al., 2006). Além do mais, o TNFα ativa a proteína quinase ativada por mitógenos e fator nuclear NF-κβ, que contribuem para a diferenciação e proliferação celular e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TATIYA-APHIRADEE et al., 2018) (Figura 3).

O TNF apresenta-se em 2 formas: a forma precursora transmembranal (mTNF) homotrimérica com 26Kda, é clivada pela enzima conversora de TNFα, a matrixmetallo proteinase (TACE/Adam17) até sua próxima forma solúvel (sTNF) homotrimérica de 17Kda de monômeros (BRADLEY, 2008; SLEVIN; EGAN, 2015; TRACEY et al., 2008).

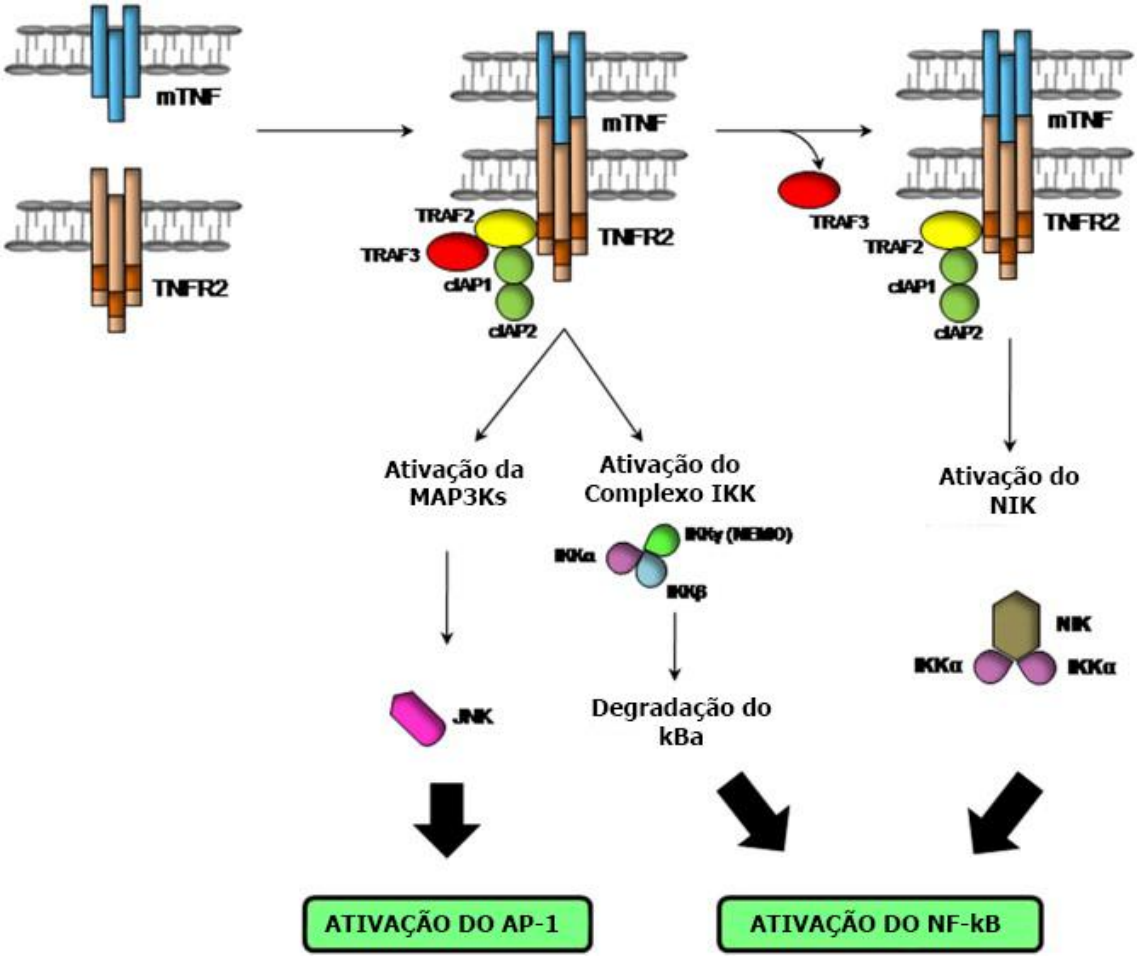
Ambas as formas de TNF são biologicamente ativas e são sinalizadas através de dois receptores distintos discutidos a seguir.

Há dois receptores para TNF sendo: o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1), com 75 Kda, expresso ubiquamente e possui domínio celular de morte e o receptor do fator de necrose tumoral 2 (TNFR2), com 55 Kda, tem sido encontrado em linfócitos e células endoteliais. Estão envolvidos na patogênese das DII e os seus receptores têm sido detectados nas DII e sua expressão está correlacionada com a atividade da doença (HADZISELIMOVIC et al., 1995; LOETSCHER et al., 1990; WALCZAK, 2011). A forma sTNF preferencialmente se liga ao receptor TNFR1 com maior afinidade, e sua ativação resulta em uma cascata de sinalização com efeitos como a apoptose, proliferação celular e secreção de citocinas (BILLMEIER et al., 2016; GRELL et al., 1998). Em contraste a forma mTNF se liga ao receptor TNFR2.

A via do TNFR2 não contém domínios de morte e sua estimulação pode resultar em proliferação, migração e produção de citocinas como IL-1 e IL-6. Este receptor, não ativa apenas uma via de sinalização intracelular, mas também pode resultar em sinalização inversa dentro da célula que expressa TNFα (EISSNER et al., 2004).

O TNFR2 também está envolvido em várias doenças autoimunes, desempenhando um papel protetor ou estando envolvido em seu desenvolvimento. Assim, sabe-se que o TNFR2 está envolvido em artrite reumatoide, doença de Crohn, lúpus sistêmico eritematoso, colite ulcerativa, esclerodermia entre outras (TATIYA-APHIRADEE et al., 2018). Desse modo, um aumento na expressão de TNFα pode causar defeitos na barreira da mucosa em pacientes com DII, exacerbando a inflamação (TATIYA-APHIRADEE et al., 2018). Contudo, somente uma parte do papel dos receptores de TNFα na patogênese de DII está compreendida.

Figura 3. Esquema de Sinalização do receptor TNFR2. Adaptado de CABAL-HIERRO, 2012.



1.5 Tratamento com anti-TNFα

A resposta imunológica tem um papel importante no início e durante a manutenção da colite ulcerativa. Citocinas desempenham papéis principais em processos inflamatórios, como direcionar moléculas de sinalização celular durante a inflamação e a patogênese da colite ulcerativa através de diferentes papéis, como a produção de mediadores inflamatórios e ativação de vias inflamatórias (AHMAD et al., 2001; HEAD; JURENKA, 2003; KAPLAN et al., 2017; SHOUVAL; RUFO, 2017; ZHANG et al., 2014).

Devido às citocinas estarem envolvidas em vários processos biológicos, como ativação celular, diferenciação e fatores centrais no processo de desenvolvimento da resposta inflamatória e imune, as citocinas são responsáveis pela lesão epitelial, e por consequência, lesão da barreira intestinal e dano tecidual (AHMAD et al., 2001; MOLDOVEANU et al., 2015).

A abordagem de tratamento no controle do tecido gastrintestinal inflamado na DII, incluindo condições clínicas, laboratoriais, remissão endoscópica e histológica por um período prolongado, desempenham um papel salutar em sua evolução e possivelmente alterando o decorrer natural da doença (ARGOLLO et al., 2017).

Estudos recentes sugeriram que o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNFα) é uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese das DII, já que os níveis de TNF estão presentes no soro de ambos pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (HOLTMANN et al., 2002).

Produtos biológicos intravenosos e subcutâneos direcionados ao TNFα revolucionaram o tratamento das DIIs, se tornando os melhores agentes disponíveis para induzir e manter a remissão das DIIs (GRIFFITHS et al., 2020).

A aplicação de anticorpos visando à neutralização do TNFα em pacientes com DII induzem resposta clínica satisfatória em até 60% dos pacientes, e induziu a manutenção a longo prazo da remissão da doença em grande parte dos pacientes (BILLMEIER et al, 2016; PANACCIONE et al., 2013; SCHREIBER et al., 2005; TARGAN et al., 1997).

Foi sugerido que os agentes anti-TNFα inativam a citocina pró-inflamatória TNFα por neutralização direta, resultando na supressão da inflamação. Porém, anticorpos anti-TNFα exercem funções mais complexas que um simples bloqueio (BILLMEIER et al., 2016).

O Adalimumabe (ADA) é um anticorpo monoclonal recombinante da imunoglobulina humana (IgG1), contendo apenas sequências humanas de peptídeos, e liga-se especificamente ao TNFα, neutralizando sua função biológica através do bloqueio de sua interação com os receptores de superfície de TNFα presentes na superfície celular (HUMIRA®). Foi o principal medicamento vendido em 2017, atingindo US$ 18,4 bilhões de dólares em vendas (GRIFFITHS et al., 2020).

O ADA foi aprovado no tratamento de colite ulcerativa e doença de Crohn. O ADA é um medicamento de uso crônico e, portanto, o tempo estimado para início da ação terapêutica não é relevante. Ele é administrado subcutâneamente e pode ser injetado pelo próprio paciente. No início da terapia, o ADA é administrado em doses de 160-80mg 2 vezes por semana. Para manutenção da remissão da doença, o ADA é administrado a cada duas semanas em uma dose de 40mg (BILLMEIER et al., 2016; HUMIRA®). O ADA também demonstrou eficácia e segurança no tratamento da colite ulcerativa moderada à grave e a remissão clínica foi observada em aproximadamente 40% dos pacientes na 8º e 26º semana, e em quase ¼ dos pacientes após um ano de acompanhamento (ZACHARIAS et al., 2017).

Tem sido demonstrado que colite ulcerativa experimental afeta neurônios entéricos (DA SILVA et al., 2015, 2017). A literatura demonstra que o uso do anticorpo monoclonal anti-TNFα em pacientes com colite ulcerativa leva a remissão da doença no mesmo (BILLMEIER et al., 2016). O presente trabalho analisou os efeitos da colite ulcerativa experimental em camundongos e o tratamento com anti- TNFα sobre as classes neuronais do plexo mioentérico que expressam o receptor TNFR2 e as células gliais entéricas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito do tratamento do anti-TNFα nas diferentes classes neuronais entéricas e células gliais entéricas que expressam o receptor TNFR2 no plexo mioentérico no modelo de colite ulcerativa experimental em camundongos C57BL/6.

2.2 Objetivos específicos

A) Avaliar as análises macroscópicas e microscópicas do grau de lesão da colite ulcerativa e o índice de atividade da doença induzida pelo DSS.

B) Analisar a colocalização do receptor TNFR2 com neurônios imunorreativos (ir) ao NOSn (marcador de neurônios inibitórios), ChAT (marcador de neurônios colinérgicos), PGP9.5 (pan-neuronal);

C) Analisar os neurônios e células gliais entéricas por gânglio imunorreativos ao receptor TNFR2, à NOSn, à ChAT, ao PGP9.5 e a das células gliais imunorreativas à GFAP;

D) Analisar as áreas dos perfis dos neurônios imunorreativos à NOSn, à ChAT, ao PGP9.5;

E) Avaliar a morfologia do colo distal pela técnica de histologia usando Hematoxilina & Eosina (HE).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Indução da Colite Ulcerativa

Foram utilizados 20 camundongos (*Mus Musculus*), machos, C57BL/6 com idade de 8 semanas e peso entre 20 e 25g, obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais ficaram alojados no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB/USP, e mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo de claro/escuro de 12 horas com livre acesso a comida e água.

A indução da colite foi feita da seguinte maneira: os camundongos receberam 3% (3g/100ml) de DSS dissolvido em água potável por 7 dias até que todos os camundongos dos grupos administrados desenvolvessem inflamação intestinal equivalente à de humanos (DE PAULA-SILVA et al., 2016). A água potável com 3% de DSS foi substituída a cada 48 horas. Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=5/grupo/por técnica) da seguinte maneira: grupo Sham (receberam água potável + injeção de salina subcutânea no 2º dia), grupo ADA (receberam água e injeção do anti-TNFα HUMIRA® (Adalimumabe) (subcutâneo, 50mg/Kg) no 2º dia), grupo DSS (DSS na água potável + injeção de salina subcutânea no 2º dia de ingestão do DSS), e grupo DSS +ADA (DSS na água potável e injetado o anti-TNFα HUMIRA® (subcutâneo, 50mg/Kg) no 2º dia, da ingestão do DSS) (DE PAULA-SILVA et al., 2016). Durante o período de 7 dias, foi avaliado o consumo de água (ml) e de água com DSS (ml) de todos os grupos. Foi colocado 10ml diariamente de água ou de água com DSS por animal. Os animais ficaram em gaiolas separadamente, e era coletado a água que ficava no recipiente, e a partir disto, tinha-se o valor consumido de água por animal. As medidas foram feitas no mesmo horário. Após o período de 7 dias, os animais foram eutanasiados para a obtenção do colo distal para uso de diversas técnicas. O projeto foi submetido e aprovado e protocolado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) sob o nº 7335180618.

3.1.1 Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Macroscópica)

Os intestinos grossos (colo proximal + distal) dos animais de todos os grupos foram medidos em centímetros (cm) após a coleta. Foi feita a classificação do grau da lesão da colite experimental foi feita segundo os autores Bell, Gall e Wallace, (1995) (Tabela 1).

Tabela 1 – Grau de lesão no colo distal com colite ulcerativa (análise macroscópica).

Tipo de Lesão	Pontuação
Ausência de Lesão;	0 pontos
Hiperemia, não úlceras;	1 ponto
Úlcera linear, sem inflamação significativa;	2 pontos
Úlcera linear com uma inflamação em um local;	3 pontos
Dois ou mais locais de ulceração/inflamação;	4 pontos
Dois ou mais locais maiores de ulceração e inflamação ou um local de ulceração/inflamação a se estender 1 cm do comprimento no colo distal;	5 pontos
Se o dano abranger 2 cm ao longo do comprimento do colo distal, a pontuação é aumentada 1 ponto a cada cm adicional de lesão;	6-10 pontos

3.1.2 Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Microscópica)

Seguindo o sistema adaptado de Erdogan et al. (2003) e Fabia et al. (1993), as pontuações foram classificadas de acordo com os parâmetros correspondentes, ulcerações (A), edema na camada submucosa (B) e infiltração de células inflamatórias (C) (Tabela 2).

Tabela 2 – Grau de lesão no colo distal com colite ulcerativa (análise microscópica).

Tipo de Lesão	Pontuação
Nenhuma Úlcera	0 pontos
A - Única ulceração não excedendo a lâmina muscular da mucosa	1 ponto
Ulcerações não excedendo a mucosa	2 pontos
Ulcerações que excedem a camada da mucosa	3 pontos
B - Nenhum edema na camada submucosa	0 pontos
Edema leve	1 ponto
Edema moderado	2 pontos
Edema severo	3 pontos
C - Sem infiltração de células inflamatórias	0 pontos
Infiltração leve	1 ponto
Infiltração moderada	2 pontos
Infiltração densa	3 pontos

3.1.3 Índice de Atividade da Doença (IAD)

O índice de atividade da doença remete à soma de pontuações atribuídas aos animais de cada grupo relacionados à mudança peso (A), consistência das fezes (B) e abundância de sangramento (C). As pontuações foram categorizadas segundo Cooper e colaborados, 1993 e Nooh e NourEldien, (2016) (Tabela 3).

Tabela 3 – Grau de mudanças ocasionadas pela colite ulcerativa.

Categorias	Pontuação
A – Mudança de peso (1%)	0 pontos
Mudança de peso (1-5%)	1 ponto
Mudança de peso (5-10%)	2 pontos
Mudança de peso (10-15%)	3 pontos
Mudança de peso (> 15%)	4 pontos
B – Fezes (Grânulos bem formados)	0 pontos
Fezes (Normais)	1 ponto
Fezes (Soltas e semi-formadas que não ficam no ânus)	2 pontos
Fezes (Soltas)	3 pontos
Fezes (Diarréia)	4 pontos
C - Sangramento (Ausência)	0 pontos
Sangramento (Oculto)	1 ponto
Sangramento (Oculto forte)	2 pontos
Sangramento (Oculto severo)	3 pontos
Sangramento (Grosseiro)	4 pontos

3.2 Preparação para Imuno-histoquímica

Foram coletados os colos distais, os tecidos foram limpos de seus conteúdos, abertos ao longo da borda mesentérica e fixados em balsas de madeira. Após, foram imersos no fixador com 4% de formaldeído em 0.1M tampão de fosfato de sódio, com ph 7,0 à 4ºC, durante uma noite. No dia seguinte, os tecidos foram retirados do fixador e clareados com 3 lavagens de 10 minutos cada, em dimetilsulfóxido (DMSO), seguido por 3 lavagens de 10 minutos cada, em PBS. Após este procedimento, os tecidos foram estocados em PBS contendo 0,1% sódio- ázida em 4ºC.

3.3 Método de imunofluorescência indireta dos neurônios NOSn, ChAT, PGP9.5 e GFAP

Após a fixação e o clareamento do colo, foram feitos os preparados de membranas, para tal, foram removidas as camadas mucosa, submucosa e as camadas circulares, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico. Foram usados 5 animais para cada grupo. Antes das preparações serem incubadas em anticorpos primários, elas foram imersas em 10% de solução soro normal de cavalo em 1,5% de Triton-X (Sigma) em PBS, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Após, foram incubadas em anticorpos primários e ficaram por 48 horas, a 4ºC e depois lavados em PBS por três vezes de 10 minutos cada. Após a incubação com anticorpo primário (Tabela 4), os tecidos foram lavados 3 vezes por 10 minutos cada, em PBS e incubados, em anticorpos secundários (Tabela 5), por uma hora, à temperatura ambiente. Após, foram incubados com 2,6-diamidino-2-fenilindole dicloridrato (DAPI) por 3 minutos e lavados em PBS 3x por 5 minutos e montados em glicerol tamponado com 0,5 M tampão carbonato de cálcio (pH 8.6).

Tabela 4 – Características dos anticorpos primários.

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
NOS	Carneiro	1:1000	Chemicon
ChAT	Cabra	1:100	Chemicon
PGP 9.5	Cobaia	1:200	Millipore
TNFαR2	Coelho	1:100	Abcam
GFAP	Coelho	1:400	Dako

Tabela 5 – Características dos anticorpos secundários.

Anticorpo	Diluição	Fonte
Burro anti-coelho IgG 488	1:300	Molecular Probes
Cabra anti- cobaia IgG 594	1:100	Molecular Probes
Burro anti-carneiro IgG 594	1:200/1:100	Molecular Probes

3.4 Métodos das Análises Quantitativas e Qualitativas de Imuno-histoquímica

3.4.1 Análise das Triplas Marcações

As análises quantitativas foram feitas através das triplas marcações dos preparados de membrana dos neurônios imunorreativos (ir) ao receptor TNFR2, NOSn, ChAT, PGP9.5 e glias GFAP-ir e DAPI no plexo mioentérico. Primeiro, os neurônios e células foram localizados pela presença de fluoróforo que marca um antígeno, então o filtro foi mudado para determinar se o neurônio/célula glial entérica era ou não marcado por um segundo antígeno, localizado por um segundo fluoróforo de diferente cor. Foram analisados 100 neurônios e 100 células gliais entéricas de cada preparado de membrana, de cada animal dos grupos Sham, DSS e DSS+ADA, totalizando 2000 neurônios e glias analisados.

3.4.2 Análise Neuronal/Glial por gânglio

A obtenção do número de neurônios entéricos por gânglio imunorreativos ao receptor TNFR2, NOSn, ChAT, PGP9.5 e glias entéricas GFAP-ir foi feita em aumento de 40x no microscópio de fluorescência Nikon 80i acoplado com filtros para discriminar entre a fluorescência 488 e Alexa 594. As contagens do número dos neurônios/glias foram feitas em 40 gânglios e por cada imunorreatividade, por cada animal (n=5 de cada grupo Sham, ADA, DSS e DSS+ADA). Um total de 200 gânglios por cada imunorreatividade foram analisados. Um total de 1000 gânglios por cada grupo foram analisados.

3.4.3 Análise Morfométrica

Para a obtenção da área do perfil do corpo celular (μm^2), foram fotografados 100 neurônios imunorreativos ao NOSn, ChAT, PGP9.5 de cada animal (n=5) dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA, totalizando 2000 neurônios fotografados e medidos. As imagens foram obtidas pelo programa NIS Elements (Nikon) e as imagens foram feitas no programa Image-Pro Plus 4.1.0.0.

3.5 Análises Histológicas

Foram coletados segmentos do colo distal dos animais (n=5) de cada animal dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS + ADA para análise histológica. Os tecidos foram lavados em PBS, abertos pela borda mesentérica, colocados em balsas de madeira com a mucosa virada para cima e fixados em formoldeído a 4%, por 48 horas. Os tecidos foram passados por uma série de concentrações crescentes de álcoois e diafanizados em baterias com concentrações crescentes de xilol em 3 séries, por 20 minutos cada e, em seguida, incluídos em parafina em 3 banhos de 30 minutos cada e inclusão no bloco. Em seguida, os tecidos foram cortados transversalmente em micrótomo, com uma espessura de 5µm e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (HE). Foram realizadas análises qualitativas da camada longitudinal, plexo mioentérico, camada circular, plexo submucoso, lâmina própria e vilosidades na coloração de HE.

Os fragmentos dos colos distais dos animais que foram utilizados para a análise histológica foram provenientes de colos distais dos animais que foram utilizados na imuno-histoquímica.

3.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA. Foi verificado as variáveis das triplas marcações (%), o número de neurônios/glias por gânglio e área do perfil celular (μm^2).

Os resultados obtidos são expressos em média ± erro-padrão da média. Os dados de todos os grupos foram analisados e a comparação foi feita através da análise de variância ANOVA de um fator, seguido do Teste de Tukey. Os testes foram realizados ao nível de significância $p<0,05$.

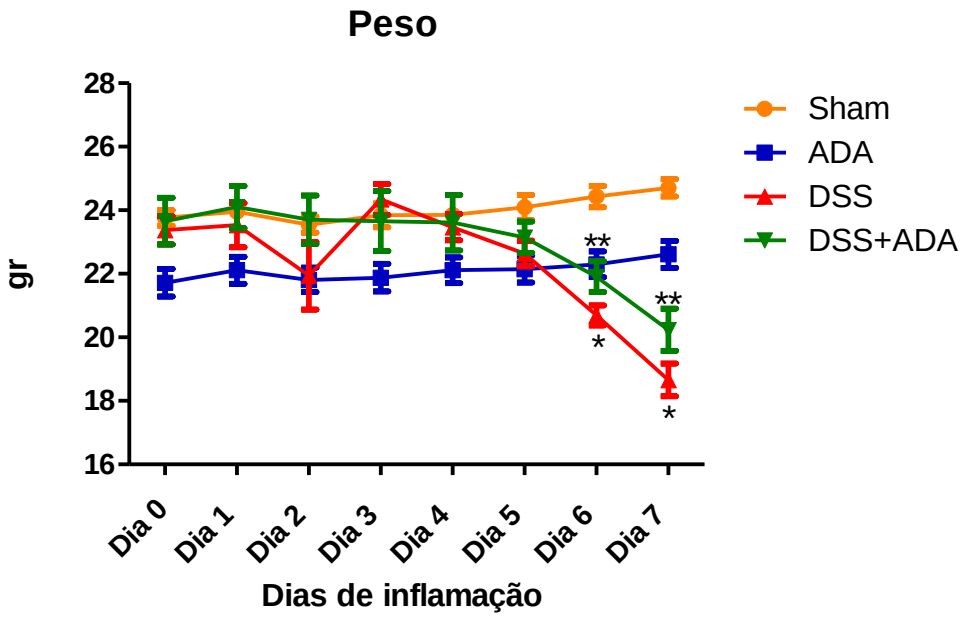
4. RESULTADOS

4.1 Indução da Colite Ulcerativa

Os resultados apresentados são dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA. Os animais foram pesados no dia da ingestão de DSS e, acompanhados por 7 dias consecutivos após a ingestão do mesmo. A pesagem ocorreu sempre no mesmo horário. Após 48h da ingestão de DSS os animais começaram apresentar perda de peso. Os animais dos grupos DSS e DSS+ADA perderam peso nos dias seguintes devido ao agravamento da colite ulcerativa experimental, no entanto, no grupo DSS+ADA a perda de peso foi menor comparada ao grupo DSS a partir do dia 6 (Gráfico 1).

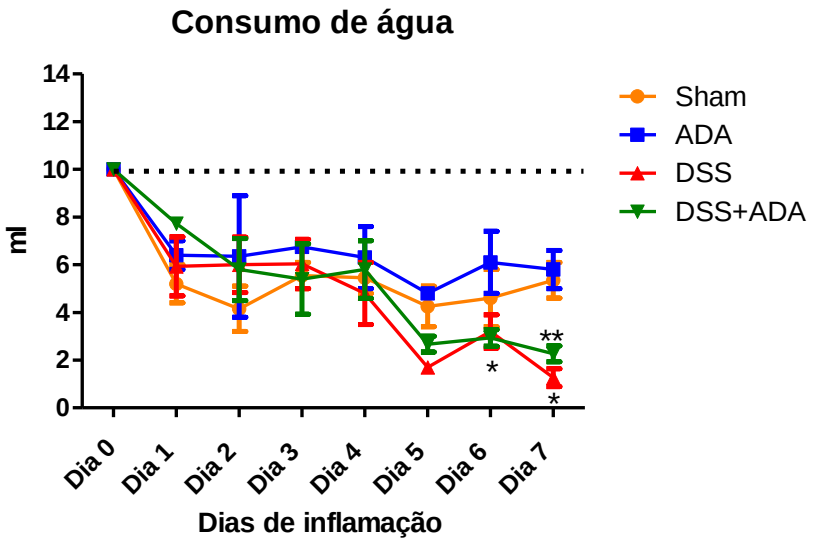
Foi realizada a coleta dos dados de consumo de água (ml) ou de água com DSS (ml) dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA. A análise demonstra que houve uma diminuição do consumo de água nos grupos DSS e DSS+ADA a partir do 5º dia, sendo que o grupo DSS+ADA houve uma melhora no consumo no 7º dia ($p<0.05$) (Gráfico 2).

Gráfico 1. Gráfico de linhas da variação da média do peso dos animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA antes da indução da colite até o 7º dia.



Os dados são expressos em média±erro padrão (n=5) para cada grupo. *grupo DSS comparado ao grupo Sham, ** grupo DSS+ADA comparado ao grupo DSS. * e ** p<0,05.

Gráfico 2. Gráfico de linhas da variação da média do consumo de água dos animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA no início da colite até o 7º dia.

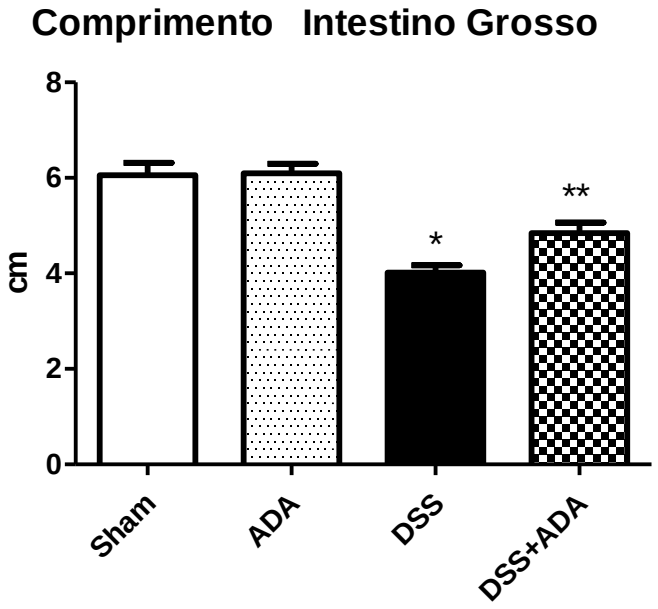


Os dados são expressos em média±erro padrão (n=5) para cada grupo. *grupo DSS comparado ao grupo Sham, ** grupo DSS+ADA comparado ao grupo DSS. * e ** p<0,05.

Após decorridos 7 dias, foi realizada a coleta do intestino grosso. Não foram observadas alterações de cor e morfologia no colo distal do intestino grosso dos camundongos dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.

Foram coletados e medidos os intestinos grossos dos animais de todos os grupos (colo proximal + distal). Os grupos DSS e DSS+ADA apresentaram intestinos com diminuição significante de 33,6% e 20,13%, respectivamente ($p<0,01$). Houve tendência de aumento de 20,4% no grupo DSS+ADA ao ser comparado ao grupo DSS, porém não significante. Não houve diferença significante entre os grupos Sham e ADA (Gráfico 3).

Gráfico 3. Histograma da média do comprimento do intestino (colo distal + colo proximal) dos animais usados expressa em centímetros.



Os dados são expressos em média ± erro padrão (n=5) para cada grupo. *grupo DSS comparado ao grupo Sham, ** grupo DSS+ADA comparado ao grupo Sham (* e ** $p<0,01$).

4. 1. 1 Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Macroscópica)

No 7º dia foi coletado os tecidos dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA e não foi identificado lesão, hiperemia ou ulcerações no colo distal dos animais dos grupos estudados, portanto atribuição de pontos é igual a zero para todos os grupos de todas as categorias (Tabela 6).

Tabela 6 – Atribuição de pontos referentes à Análise Macroscópica da Colite Ulcerativa.

	Ausência de Lesão	**Hiperemia**	**Úlcera Linear sem Inflamação**	**Úlcera Linear com Inflamação**	**Duas ou mais ulcerações**	**Ulcerações com 2cm ou mais**
Sham	0	0	0	0	0	0
ADA	0	0	0	0	0	0
DSS	0	0	0	0	0	0
DSS+ADA	0	0	0	0	0	0

Ausência de lesão (0 pontos); Hiperemia, não úlceras (1 ponto); Úlcera linear, sem inflamação significativa (2 pontos); Úlcera linear com uma inflamação em um local (3 pontos); Dois ou mais locais de ulceração/inflamação (4 pontos); Dois ou mais locais maiores de ulceração e inflamação ou um local de ulceração/inflamação a se estender 1 cm do comprimento do colo distal (5 pontos); Se o dano abranger 2 cm ao longo do comprimento do colo distal, a pontuação é aumentada 1 ponto a cada cm adicional da lesão (6-10 pontos). (BELL; GALL; WALLACE, 1995).

4. 1. 2 Avaliação da Colite Ulcerativa (Análise Microscópica)

Com relação a análise microscópica foi possível observada alterações principalmente no grupo DSS e recuperação no grupo DSS+ADA (Tabela 7).

Tabela 7 – Atribuição de pontos referentes a ulcerações, à edema na camada submucosa e à infiltração de células inflamatórias dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.

Referente a Ulceração	**Nenhuma Ulceração**	**Ulceração não excedendo a lâmina muscular da mucosa**	**Ulceração não excedendo a mucosa**	**Ulceração excedendo a mucosa**
Sham	0	0	0	0
ADA	0	0	0	0
DSS	0	0	0	0
DSS+ADA	0	0	0	0
Referente a Edema	**Nenhum edema**	**Edema leve**	**Edema moderado**	**Edema severo**
Sham	0	0	0	0
ADA	0	0	0	0
DSS	0	0	2	0
DSS+ADA	0	1	0	0
Referente a infiltração	**Sem infiltração**	**Infiltração leve**	**Infiltração moderada**	**Infiltração densa**
Sham	0	0	0	0
ADA	0	0	0	0
DSS	0	0	2	0
DSS+ADA	0	1	0	0

Atribuição de pontos referente à Análise Microscópica da Colite Ulcerativa. A – Ausência de lesão (0 pontos); Ulcerações não excedendo a lâmina muscular da mucosa (1 ponto); Ulcerações que excedem a camada da mucosa (2 pontos); Ulcerações que excedem a camada da mucosa (3 pontos); B – Nenhum edema na camada submucosa (0 pontos); Edema leve (1 ponto); Edema moderado (2 pontos); Edema severo (3 pontos); C – Sem infiltração de células inflamatórias (0 pontos); Infiltração leve (1 ponto); Infiltração moderada (2 pontos); Infiltração densa (3 pontos) Seguindo o sistema adaptado de Erdogan et al. (2003) e Fabia et al. (1993).

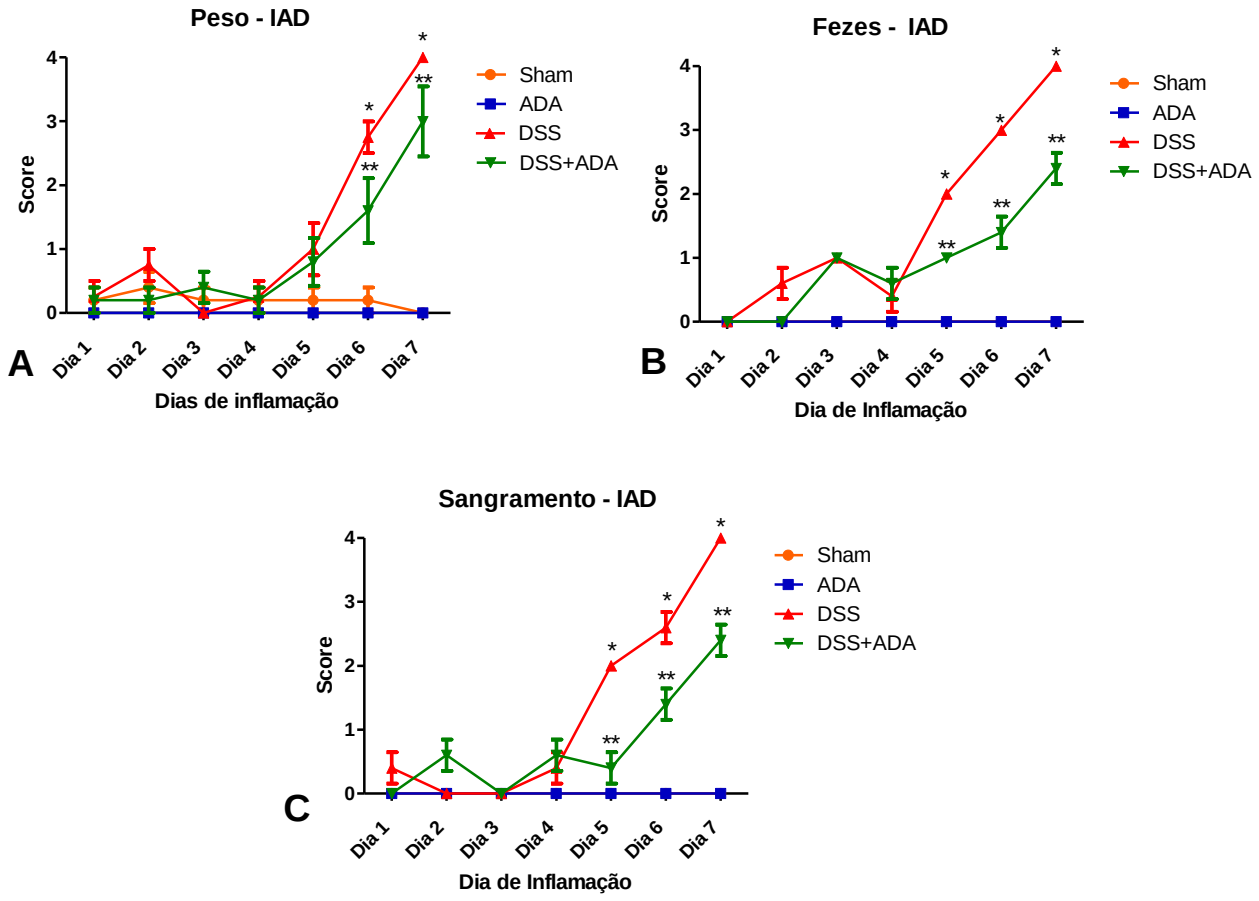
4.1.3 Índice de Atividade da Doença (IAD)

Em relação à variação do peso dos animais, os grupos Sham e ADA não apresentaram mudança de peso significativa em nenhum dos dias. Os grupos DSS e DSS+ADA começaram a perder peso a partir do sexto dia após a ingestão de DSS. O grupo DSS marcou 3 pontos de perda de peso (10-15%) e o grupo DSS+ADA marcou 2 pontos de perda de peso (5-10%). No sétimo dia, o grupo DSS marcou o score máximo de 4 pontos de perda de peso (>15%) e o grupo DSS+ADA marcou 3 pontos de perda de peso (10-15%). Houve diferença significante dos grupos DSS comparado ao Sham e do DSS+ADA comparado ao grupo DSS a partir do 6º dia ($p<0,05$) (Gráfico 4 A).

O grupo Sham e ADA apresentaram fezes com grânulos bem formados durante os 7 dias. Em relação à consistência das fezes, nenhum dos demais grupos sofreu alterações até o segundo dia após a ingestão do DSS. O grupo DSS apresentou fezes normais (1 ponto) no segundo dia após a indução da colite e no sétimo dia sofreu diarreia (4 pontos). O grupo DSS+ADA apresentou fezes normais no terceiro dia seguido de fezes semi-formadas no sétimo dia (2 pontos). Houve diferença significante dos grupos DSS comparado ao Sham e do DSS+ADA comparado ao grupo DSS a partir do 5º dia ($P<0,05$) (Gráfico 4 B).

Em relação ao sangramento, os grupos Sham e ADA não apresentaram sangramento em nenhum dos dias. O grupo DSS apresentou sangramento oculto forte (2 pontos) no quinto dia e sangramento grosseiro (4 pontos) no sétimo dia. O grupo DSS+ADA apresentou sangramento oculto (1 ponto) no segundo, quarto e quinto dia após a ingestão de DSS e sangramento oculto severo no sétimo dia. Houve diferença significante dos grupos DSS comparado ao Sham e do DSS+ADA comparado ao grupo DSS a partir do 5º dia ($p<0,05$) (Gráfico 4 C).

Gráfico 4. Atribuição de pontos referentes à mudança de peso, consistências das fezes e abundância de sangramento dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.



As pontuações são: Mudança de peso (A): 1% (0 pontos), 1-5% (1 ponto), 5-10% (2 pontos), 10-15% (3 pontos), >15% (4 pontos). Consistência das fezes (B): Grânulos bem formados (0 pontos), Normais (1 ponto), Soltas e semi-formadas que não ficam no ânus (2 pontos), Soltas (3 pontos), Diarreia (4 pontos). Abundância de sangramento (C): Ausência (0 pontos), Oculto (1 ponto), Oculto forte (2 pontos), Oculto severo (3 pontos), Grosseiro (4 pontos). Os dados são expressos em média ± erro padrão (n=5) para cada grupo. *grupo DSS comparado ao grupo Sham, ** grupo DSS+ADA comparado ao grupo DSS. * e ** $p<0,05$.

4.2 Análises Qualitativas

4.2.1 Imunorreatividade do receptor TNFR2 e células gliais entéricas GFAP à NOSn, ChAT e PGP9.5 nos Neurônios do Plexo Mioentérico

Foi observada a imunorreatividade do receptor TNFR2, NOSn, ChAT e PGP9.5 nos neurônios e de GFAP nas células gliais entéricas do plexo mioentérico do colo distal dos camundongos dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA. A marcação do receptor TNFR2 nos neurônios estava presente no citoplasma e na membrana plasmática nos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA (Figuras 4-7).

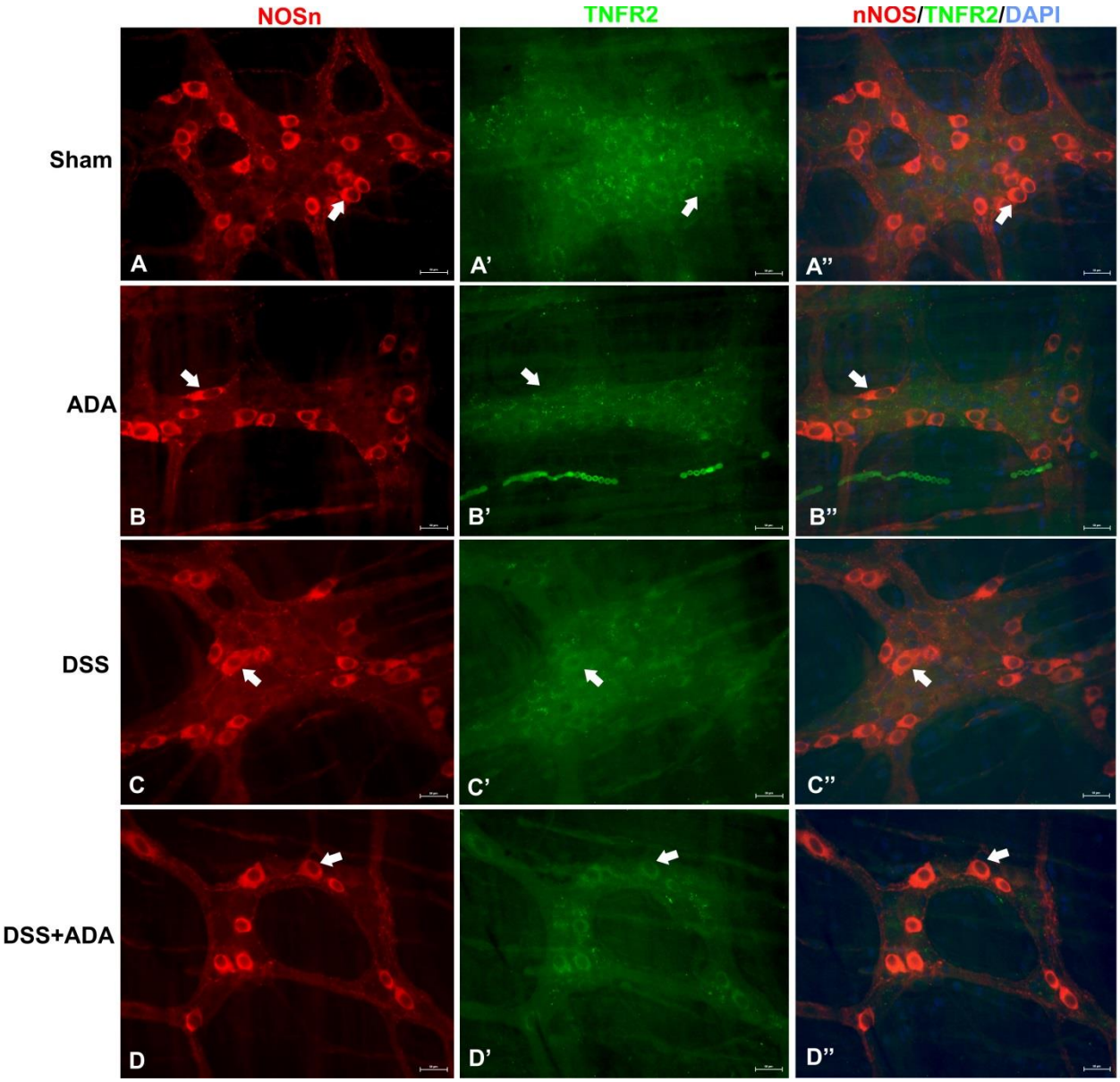
Os neurônios imunorreativos a NOSn não apresentaram diferenças nas marcações entre os grupos estudados referente à intensidade da marcação. Foi observada colocalização do receptor TNFR2 nos neurônios positivos a NOSn de todos os grupos (Figura 4).

Os neurônios imunorreativos ao ChAT não apresentaram diferenças nas marcações entre os grupos estudados referente à intensidade da marcação. Foi observada colocalização do receptor TNFR2 nos neurônios ChAT de todos os grupos (Figura 5), porém alguns neurônios ChAT-ir não são positivos para o TNFR2 (Tabela 8).

A marcação do pan-neuronal PGP9.5 foi evidenciada em todos os grupos estudados. A marcação nos neurônios foi evidenciada predominantemente no citoplasma e não houve diferença na marcação entre os grupos estudados (Figura 6 e 7). Assim como os neurônios ChAT-ir, nem todo neurônio PGP9.5-ir são positivos para o TNFR2 (Tabela 8).

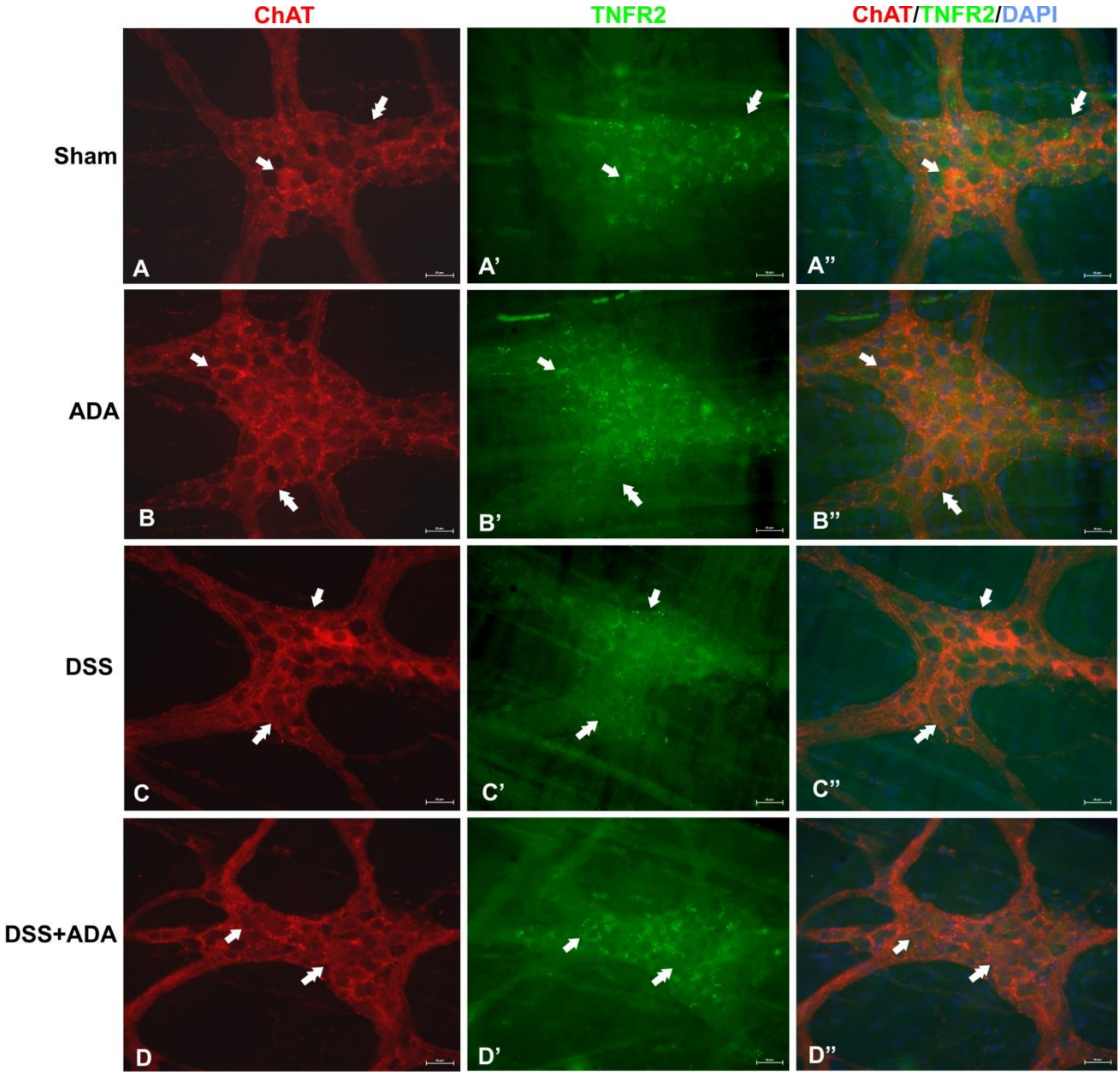
A marcação de células gliais entéricas imunorreativas ao GFAP foram estudadas em todos os grupos, não houve diferença na marcação, suas marcações foram evidenciadas no núcleo e mais intensamente nos filamentos, não houve colocalização de células gliais GFAP-ir com neurônios PGP9.5-ir (Figura 6).

Figura 4. Dupla marcação de neurônios NOSn-ir e receptor TNFR2-ir no plexo mioentérico.



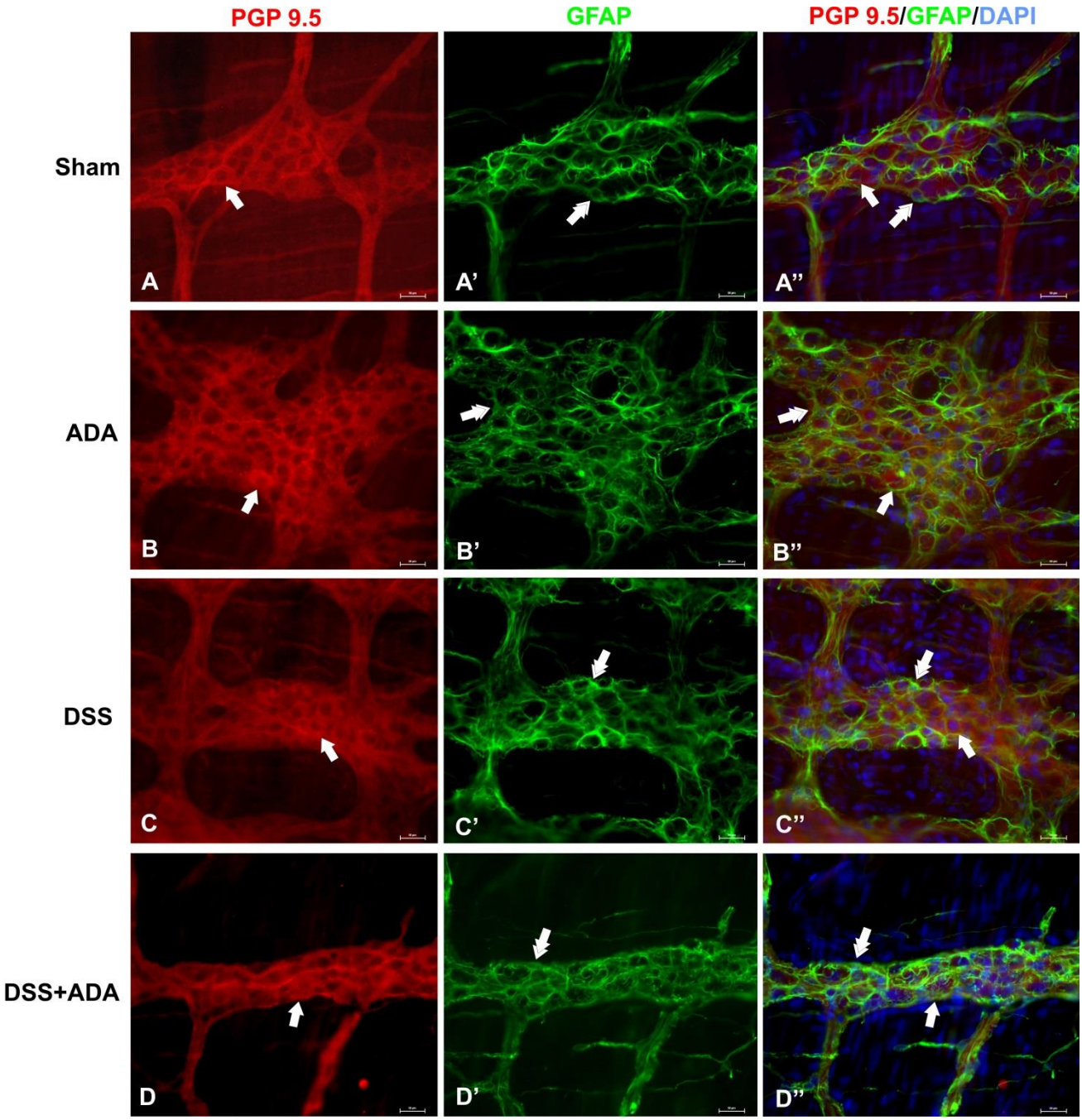
Neurônios imunorreativos a NOSn (vermelho) e ao receptor TNFR2 (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo) no plexo mioentérico do colo distal de camundongos Sham (A-A''), ADA (B-B''), DSS (C-C'') e DSS+ADA (D-D''). Setas simples indicam colocalização de neurônios a NOSn-ir (A-D) e ao receptor TNFR2-ir (A'-C'). (Barra de calibração: 50µm).

Figura 5. Dupla marcação de neurônios ChAT-ir e receptor TNFR2-ir no plexo mioentérico.



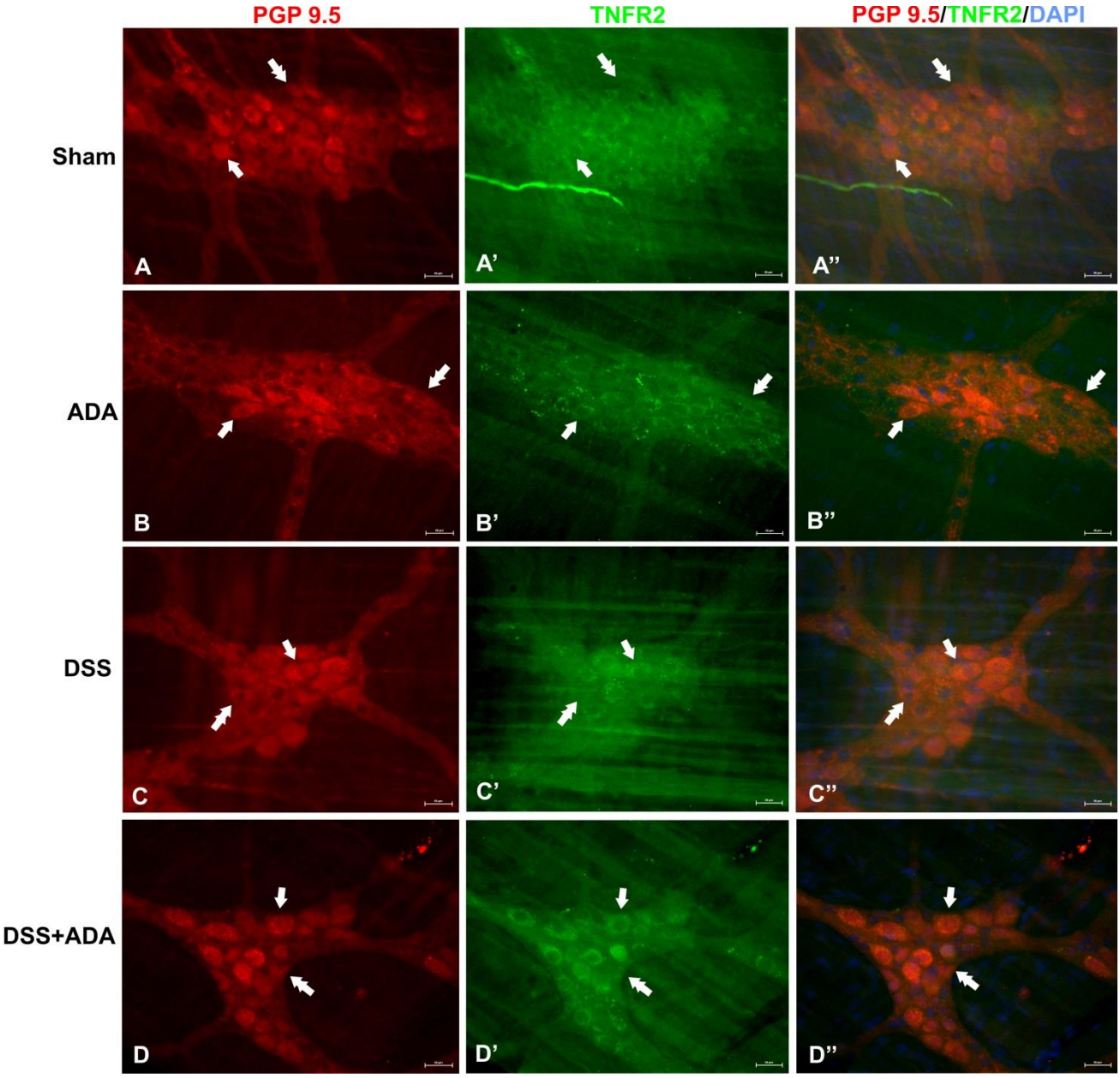
Neurônios imunorreativos a ChAT (vermelho) e ao receptor TNFR2 (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo) no plexo mioentérico do colo distal de camundongos Sham (A-A"), ADA (B, B', B"), DSS (C-C") e DSS+ADA (D-D"). Setas simples indicam colocalização de neurônios ChAT-ir (A-D) e TNFR2-ir (A'-D'). Setas duplas indicam neurônios ChAT-ir que não colocalizaram com neurônios TNFR2-ir. (Barra de calibração: 50 µm).

Figura 6. Dupla marcação de neurônios PGP9.5-ir e células gliais entéricas GFAP-ir no plexo mioentérico.



Neurônios imunorreativos ao PGP9.5 (vermelho) e células gliais entéricas imunorreativas a GFAP (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo) no plexo mioentérico do colo distal de camundongos Sham (A-A''), DSS (B-B'') e DSS+ADA (C-C''). Setas simples indicam marcação de neurônios PGP9.5-ir. Setas duplas indicam células gliais entéricas positivas a GFAP. (Barra de calibração: 50µm).

Figura 7. Dupla marcação de neurônios PGP9.5-ir e receptor TNFR2-ir no plexo mioentérico.



Neurônios imunorreativos ao PGP9.5 (vermelho) e ao receptor TNFR2 (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo) no plexo mioentérico do colo distal de camundongos Sham (A-A''), ADA (B-B''), DSS (C-C'') e DSS+ADA (D-D''). Setas simples indicam colocalização de neurônios PGP9.5-ir e TNFR2-ir. Setas duplas indicam neurônios ao PGP9.5-ir que não colocalizaram com o receptor TNFR2. (Barra de calibração: 50µm).

4.3 Análises Quantitativas

4.3.1 Colocalização

Foi realizado o estudo de dupla marcação do receptor TNFR2 dos neurônios imunorreativos ao NOSn, ChAT e PGP9.5. Também, foi feito estudo de colocalização de PGP9.5 com células gliais entéricas positivas ao GFAP no colo distal de animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.

Os neurônios imunorreativos a NOSn colocalizaram 100% com o receptor TNFR2 em todos os grupos estudados.

Os neurônios imunorreativos a ChAT colocalizaram ao redor de 83% com o receptor TNFR2 nos grupos Sham, DSS e DSS+ADA, no grupo ADA a colocalização foi de 78%.

Os neurônios positivos ao PGP9.5 colocalizaram ao redor de 89%, 85% e 88% nos grupos Sham, ADA e DSS+ADA, respectivamente. A colocalização no grupo DSS foi ao redor de 88%. Não houve colocalização dos neurônios PGP9.5-ir e células gliais entéricas GFAP-ir (Tabela 8).

Tabela 8 – Colocalização dos neurônios imunorreativos a NOSn, ChAT, PGP9.5 e ao receptor TNFR2 e células gliais entéricas GFAP-ir nos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.

	Sham	**ADA**	**DSS**	**DSS+ADA**
NOSn/TNFR2 (%)	100	100	100	100
NOSn/- (%)	0	0	0	0
ChAT/TNFR2 (%)	83,6±2,2	78,2 ±2,5	83,0±2,2	83,8±1,4
ChAT/- (%)	16,4±2,2	21,8±2,5	17,0±2,2	16,2±1,4
PGP9.5/TNFR2 (%)	89,2±1,4	85,4±1,4	88,6±1,0	88,6±1,6
PGP9.5/- (%)	10,8±1,4	14,6±1,4	11,4±1,0	11,4±1,6
PGP9.5/GFAP (%)	0	0	0	0
PGP9.5/- (%)	100	100	100	100

Os dados são expressos em média±erro padrão.

4.3.2 Neurônios e Glias por gânglio

O número de neurônios e glias/gânglio foi obtido através da contagem dos neurônios imunorreativos ao receptor TNFR2, NOSn, ChAT e PGP9.5 e glias GFAP-ir em 40 gânglios por animal de cada grupo, totalizando 200 gânglios para cada imunorreatividade.

Os neurônios NOSn-ir do grupo DSS apresentou diminuição significante de 28,7% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). O grupo DSS+ADA teve um aumento de 26,9% quando comparado ao grupo DSS ($p<0,01$). Não houve diferença significante entre os grupos Sham e ADA (Gráfico 5 A).

Os neurônios ChAT-ir dos grupos DSS e DSS+ADA apresentaram diminuição significante de 32,1% e 16,9% respectivamente, quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). O grupo ADA apresentou diminuição significante de 22,2% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). Houve

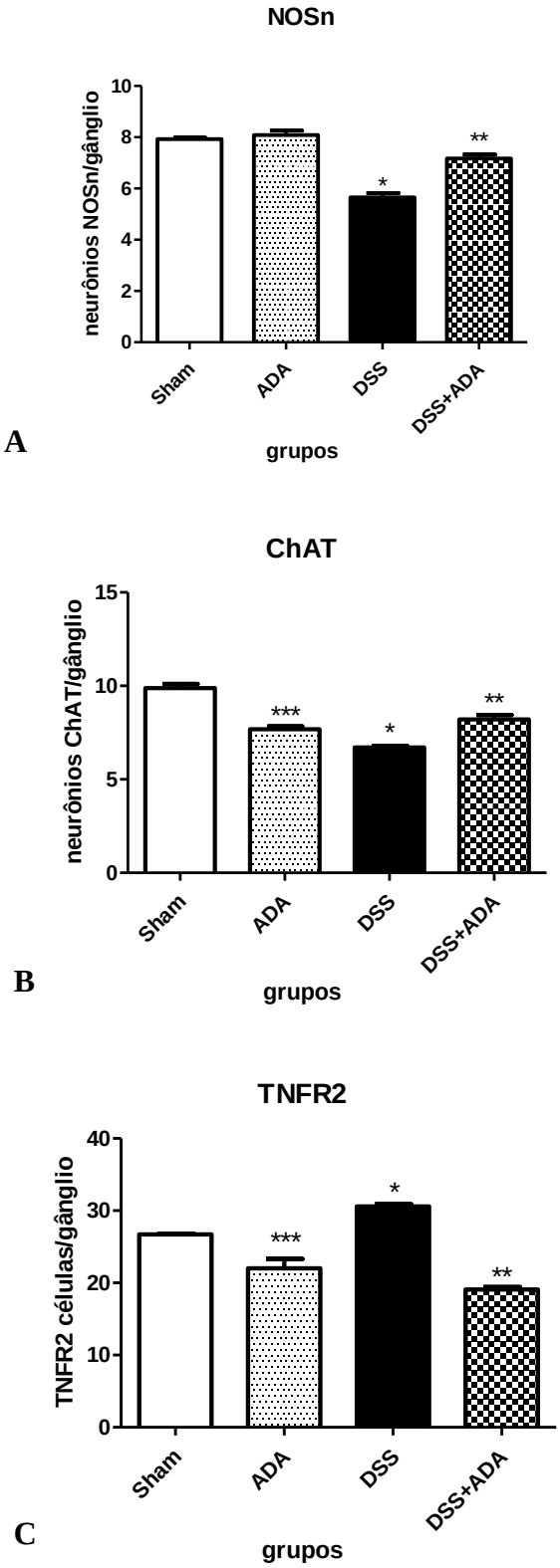
aumento significante de 22,4% do grupo DSS+ADA quando comparado ao grupo DSS ($p<0,01$) (Gráfico 5 B).

As células imunorreativas ao receptor TNFR2 do grupo DSS aumentaram 14,4% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). O grupo ADA apresentou uma diminuição significante de 17,6% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). Houve uma diminuição significante do grupo DSS+ADA de 37,5% quando comparado ao grupo DSS ($p<0,01$) (Gráfico 5 C).

Os neurônios PGP9.5-ir do grupo DSS apresentou diminuição significante de 21,7% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). O grupo ADA apresentou diminuição significante de 6,7% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). O grupo DSS+ADA demonstrou um aumento significante de 17,1% quando comparado ao grupo DSS ($p<0,01$) (Gráfico 6 A).

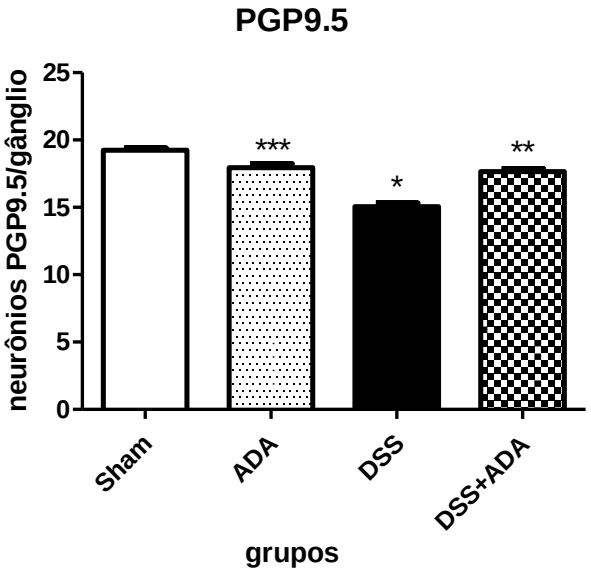
As células gliais entéricas GFAP-ir do grupo DSS apresentou um aumento significante de 14,4% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). O grupo ADA apresentou um aumento significante de 11,5% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). O grupo DSS+ADA apresentou uma diminuição significante de 8,2% quando comparado ao grupo DSS ($p<0,01$) (Gráfico 6 B).

Gráfico 5. Histograma do número de neurônios imunorreativos a NOSn (A), ChAT (B) e TNFR2 (C) por gânglio dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.

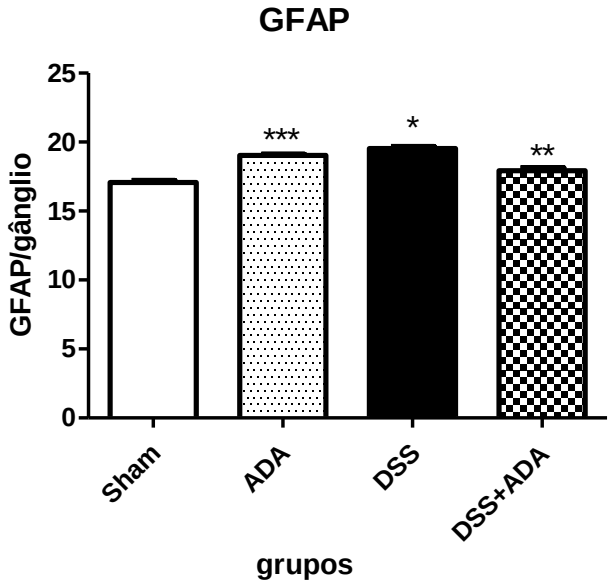


Os dados são expressos em média±erro padrão (n=5). *grupo DSS comparado ao grupo Sham; ** grupo DSS+ADA comparado ao grupo DSS; *** grupo ADA comparado ao grupo Sham. (*, ** e *** p<0,01).

Gráfico 6. Histograma do número de neurônios imunorreativos a PGP9.5 (A) e células gliais entéricas imunorreativas a GFAP (B) por gânglio dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.



A



B

Os dados são expressos em média ± erro padrão (n=5). *grupo DSS comparado ao grupo Sham; ** grupo DSS+ADA comparado ao grupo DSS; *** grupo ADA comparado ao grupo Sham. (*, ** e *** p<0,01).

4.3.3 Área do Perfil Neuronal

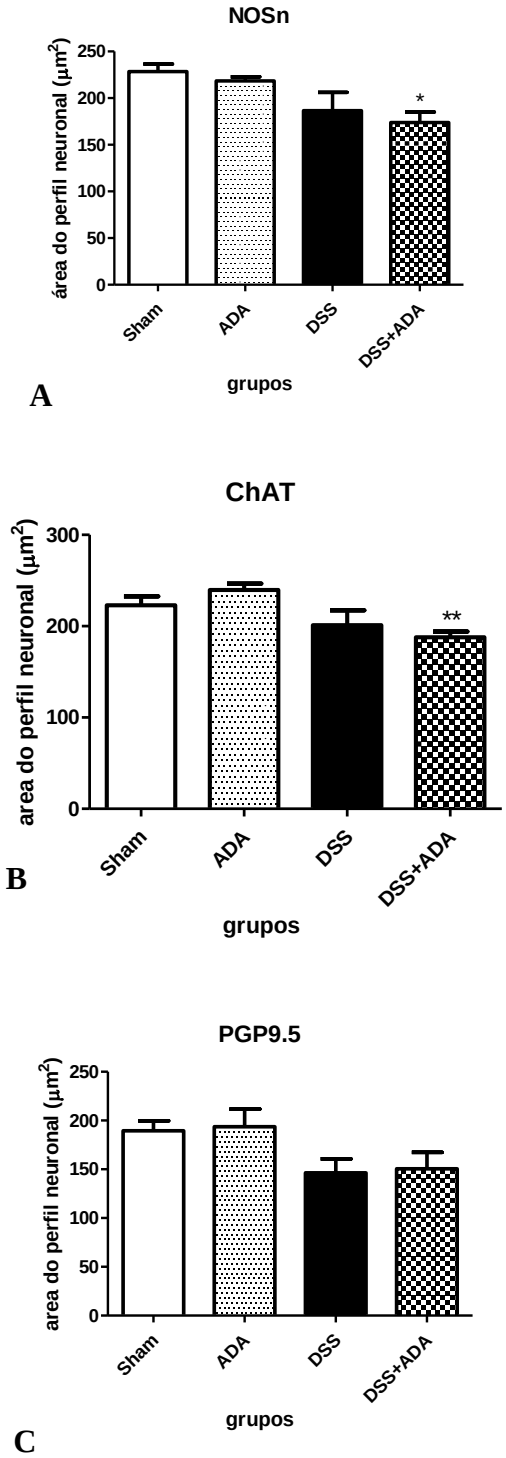
Foram analisadas as áreas dos perfis neuronais dos neurônios imunorreativos a NOSn, ChAT e PGP9.5 nos animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.

Os neurônios NOSn-ir do grupo DSS apresentaram uma tendência a diminuição de 18,4% quando comparado ao grupo Sham ($p>0,01$). O grupo DSS+ADA apresentou diminuição significante de 24,1% quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). Não houve diferença significante entre os grupos Sham e ADA. Não houve diferença significante entre os grupos DSS e DSS+ADA (Gráfico 7 A).

Os neurônios ChAT-ir do grupo DSS apresentou uma tendência a diminuição de 9,5% quando comparado ao grupo Sham ($p>0,05$). O grupo DSS+ADA apresentou uma diminuição significante de 21,7% comparado ao grupo ADA ($p<0,05$). Não houve diferença significante entre os grupos Sham e ADA. Não houve diferença significante entre os grupos DSS e DSS+ADA (Gráfico 7 B).

Não houve diferença significante entre os neurônios PGP9.5-ir dos grupos Sham e ADA, (Gráfico 7 C). Houve uma tendência à diminuição de 9,5% e 15,7% das áreas dos perfis neuronais dos grupos DSS e DSS+ADA comparados ao grupo Sham ($p>0,05$), respectivamente (Gráfico 7 C).

Gráfico 7. Histograma da área do perfil celular de neurônios imunorreativos a NOSn (A), ChAT (B) e PGP9.5 (C) do plexo mioentérico do colo distal dos animais dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.



Os dados são expressos em média ± erro padrão (n=5). *grupo DSS comparado ao grupo Sham; ** grupo DSS+ADA comparado ao grupo ADA (B) (* e ** p<0,01).

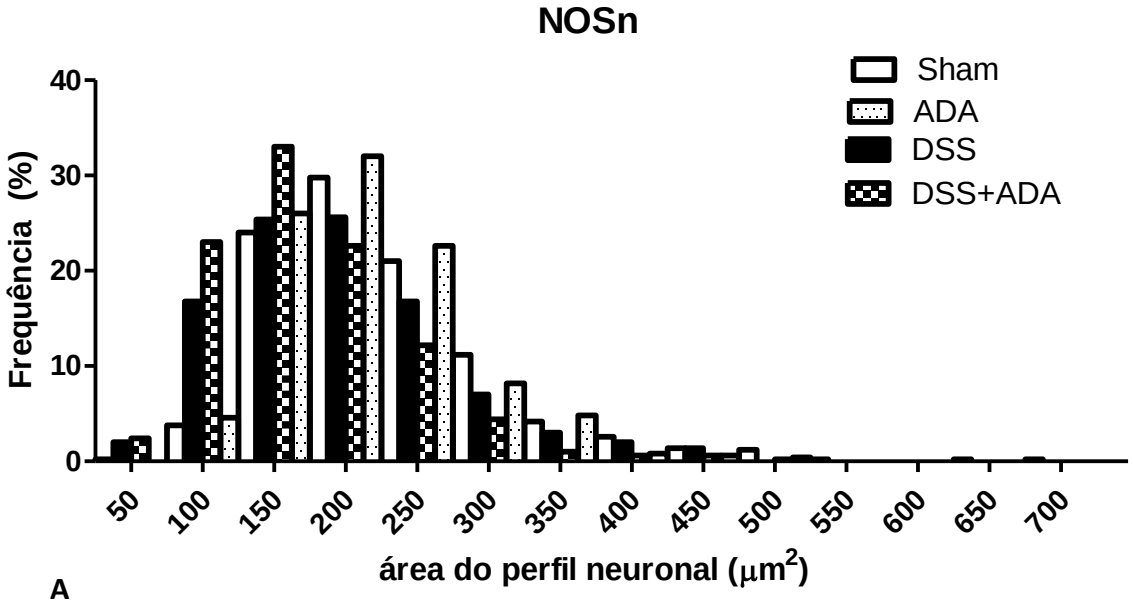
4.3.4 Distribuição dos neurônios imunorreativos a NOSn, ChAT e PGP9.5

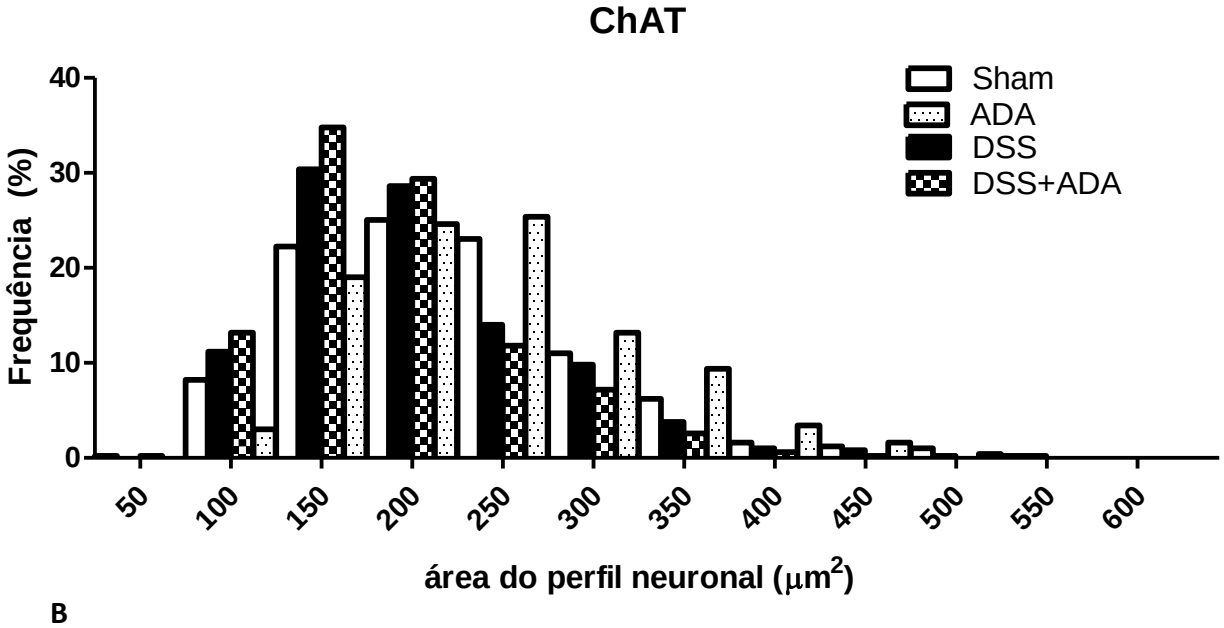
O histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou que a distribuição dos neurônios NOSn-ir possuem uma área entre 50 e 700 μm^2. No grupo Sham observou-se que 53% dos neurônios apresentaram uma área situada entre 150 a 200 μm^2. O grupo ADA demonstrou 58% dos neurônios estavam entre 150 a 200 μm^2. No grupo DSS os neurônios NOSn-ir tinham frequência de 50% entre 100 a 250 μm^2, porém 16% estavam com 100 μm^2. No grupo DSS+ADA a frequência do perfil neuronal esteve 58% entre 100 a 200 μm^2 (Gráfico 8 A).

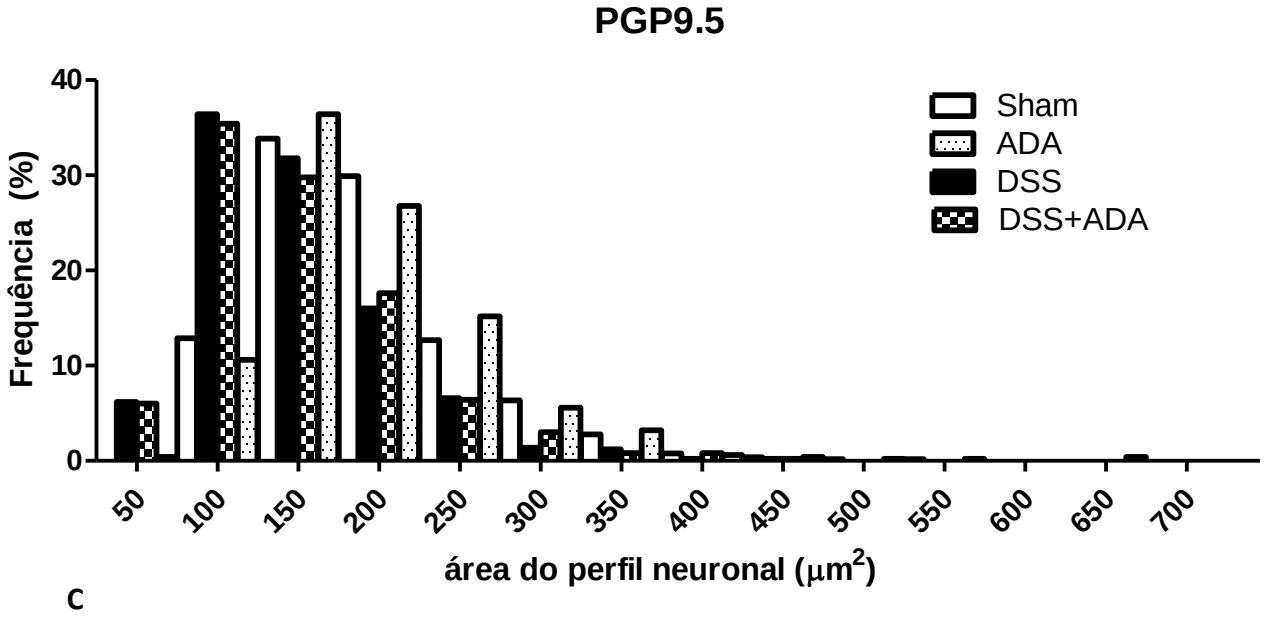
Na análise dos neurônios ChAT-ir, observou-se a variação de área entre 50 e 550 μm^2. No grupo Sham observou-se que 48% dos neurônios apresentaram uma área situada entre 200 a 250 μm^2. O grupo ADA apresentava 49% dos neurônios da área situada entre 200 a 250 μm^2. Já no grupo DSS, 58% dos neurônios apresentaram uma área situada entre 150 a 200 μm^2. No grupo DSS+ADA, 63% dos neurônios apresentaram uma área situada entre 150 a 200 μm^2 (Gráfico 8 B).

Na análise dos neurônios PGP9.5-ir observou-se a variação de área entre 50 e 650 μm^2. No grupo Sham, 62% dos neurônios apresentaram uma área situada entre 150 a 200 μm^2. O grupo ADA, observou que 62% dos neurônios estavam na área entre 150 a 200 μm^2. No grupo DSS, 67% dos neurônios apresentaram uma área situada entre 100 a 150 μm^2. No grupo DSS+ADA, 64% dos neurônios apresentaram uma área situada entre 100 a 150 μm^2 (Gráfico 8 C).

Gráfico 8. Distribuição de frequência das áreas **(**μm^2) dos neurônios imunorreativos ao NOSn (A), ChAT (B) e PGP9.5 (C) no plexo mioentérico dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.






PGP9.5
Sham
ADA
DSS
DSS+ADA
Frequência (%)
40
30
20
10
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
área do perfil neuronal (μm2)

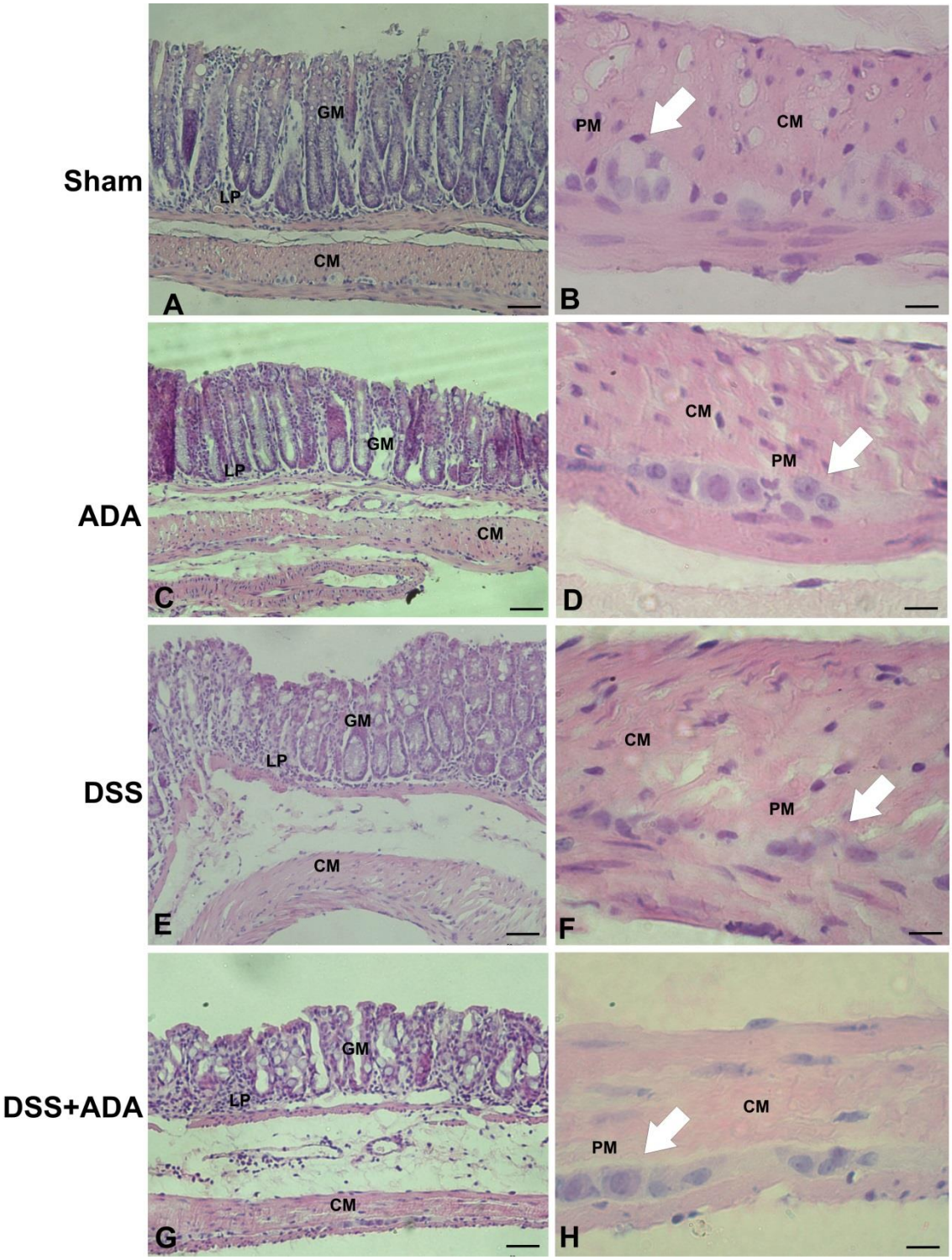
C

4.4. Análise Qualitativa Histológica na Colite Ulcerativa

A coloração de Hematoxilina & Eosina permite observar possíveis alterações morfológicas no colo distal dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA.

A Figura 8 demonstra o colo distal dos grupos Sham, ADA, DSS e DSS+ADA corados com H&E, as camadas do intestino parecem preservadas nos animais do grupo Sham. No grupo DSS as camadas do intestino estão edemaciadas frente à inflamação assim como no grupo DSS+ADA também.

Figura 8. Fotomicrografia demonstrando secções de colo distal de camundongos coradas em Hematoxilina & Eosina dos grupos Sham (A-B), ADA (C-D), DSS (E-F) e DSS+ADA (G-H).



GM – glândula da mucosa, LP – lâmina própria, CM – camada muscular (circular), PM – plexo mioentérico. Setas demonstram plexo mioentérico. Barras (A-C) 50µm, (A'-C') 100µm.

5. DISCUSSÃO

5.1 Considerações sobre o Modelo de Colite Ulcerativa Experimental

Entre os vários modelos experimentais para doenças inflamatórias intestinais por produtos químicos, a indução com o Dextran Sulfato de Sódio (DSS) é amplamente utilizada devido à sua rapidez, simplicidade reprodutibilidade e controlabilidade alcançados nos modelos de inflamação intestinal aguda, crônica e recidivante, modificando a concentração e a frequência da administração do DSS (CHASSAING, et. Al., 2015; DAS et al., 2015; DE PAULA-SILVA et al., 2016; OKAYASU, et.al., 1990).

No presente trabalho, a colite ulcerativa experimental foi efetiva pelo DSS na dosagem de 3% (3g/100ml) dissolvido em água potável por 7 dias. Chassaing et al. (2015) definiram a administração da dose de DSS para camundongos C57BL/6 entre 1,5% e 3%, como a mais adequada, monitorando parâmetros como o peso dos animais, sangue oculto e consistência das fezes, semelhantes à promoção de inflamação intestinal em humanos como a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa.

Em nosso trabalho, o modelo foi eficaz, induzindo nos animais uma inflamação intestinal equivalente à de humanos. Outras substâncias têm sido utilizadas para promover a inflamação intestinal semelhante à de humanos. Dentre elas destaca-se o 2, 4, 6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (DA SILVA, 2015; 2017; NEUNLIST et al., 2003; POLI et al., 2001; SHARKEY; KROESE, 2001).

Sobre as lesões teciduais causadas pelo processo inflamatório, existem várias escalas que são utilizadas para avaliações, entre elas a utilizada pelo presente trabalho foi a desenvolvida por Bell, Gall e Wallace (1989), entretanto, não foi possível observar diferenças macroscópicas no tecido alvo que pudessem ser categorizadas por essa escala. Segundo Wirtz et al. (2017) a inflamação na colite ulcerativa é observada principalmente nas camadas da mucosa e submucosa e a administração oral de DSS via água potável é caracterizada por perda de epitélio, células e infiltração com neutrófilos, corroborando com os dados do presente trabalho, onde houve lesões microscópicas de edema da camada submucosa e infiltração de neutrófilos leve no grupo DSS+ADA e moderada no grupo DSS.

O IAD proposto por Cooper e colaborados (1993) e Nooh e NourEldien (2016) demonstrou diarreia, sangramento e perda de peso principalmente nos animais DSS, cujo sintomas clínicos agudos se tornaram significativos no 5º dia. Os animais do grupo DSS+ADA demonstraram recuperação comparado ao grupo DSS. Os autores Cooper et al. (1993) demonstraram que animais tratados com 7 dias de DSS, seguido por 7 dias de água potável repetido por 3 ciclos desenvolvem colite crônica e o dano tecidual macroscópico e microscópico, que são áreas do colo com erosões e

inflamação. Entretanto, os tecidos do presente trabalho foram coletados 7 dias após a indução da colite, esse fato poderia explicar a ausência de lesões macroscópicas.

5.2 Considerações sobre o Código Químico e o Receptor TNFR2

O entendimento dos aspectos funcionais de cada neurônio entérico e do funcionamento do sistema gastrointestinal se deve ao estudo do código químico nos neurônios entéricos. Para a marcação de neurônios motores inibitórios no plexo mioentérico, utilizou-se o NOSn, para neurônios motores excitatórios, utilizou-se o ChAT e para o pan-neuronal o PGP9.5 (FURNESS 2012, 2006, 2000).

Quanto a avaliação da dupla marcação dos neurônios NOSn-ir, ChAT-ir e PGP9.5, os neurônios NOSn-ir colocalizaram 100% para o receptor TNFR2, diferentemente dos neurônios ChAT-ir e PGP9.5 que colocalizaram cerca de 80% e 90% com o receptor, isto demonstra que nem todos neurônios colinérgicos são ativados pelo TNFR2. Quanto ao receptor TNFR2, sabe-se que o mesmo é expresso em alguns tipos celulares, como por exemplo, em linfócitos e células endoteliais (HADZISELIMOVIC et al., 1995; LOETSCHER et al., 1990; WALCZAK, 2011), sabe-se que no SNC há existência do TNFR2 em neurônios do córtex cerebral (RICHTER et al., 2014), mas nenhum dado na literatura comprova a existência do TNFR2 em neurônios entéricos. Mas conseguimos provar que as classes neuronais do plexo mioentérico também expressam o receptor TNFR2 em todos os grupos estudados.

Porém, observamos um aumento de células/gânglio que expressam o receptor no grupo DSS, nossa hipótese é de que devido a inflamação causada no colo distal dos animais deste grupo, outras células podem estar ativadas, como por exemplo as glias entéricas, pelas citocinas e interleucinas pró inflamatórias liberadas, tais como o próprio TNFα, e IL-1, IL-6 e IL-1β (BILLMEIER, 2016; EISSNER, 2004).

Nas glias (astrócitos) imunorreativas a GFAP do SNC não há colocalização com o TNFR2 (RICHTER et al., 2014). O estudo da colocalização do TNFR2 nas glias entéricas pode ser útil para comprovar se os dados do SNE serão similares aos encontrados no SNC. Não foi observada alterações da intensidade do receptor nos grupos analisados.

Sobre a administração do anti-TNFα no grupo ADA, houve a diminuição do número de neurônios por gânglio da classe neuronal ChAT-ir quando comparado ao grupo Sham. Segundo o

autor Billmeier (2016), a indução de apoptose por anticorpos anti-TNFα pode ser direta ou indireta como efeito da sinalização de TNFα, envolvendo o sistema complemento, ou células natural killers, ou pode ser uma consequência da ativação do TNFα por ligação de anticorpo (BILLMEIER et al., 2016), ou seja, o medicamento por si só já causa apoptose, e o fato de causar apoptose talvez possa estar contribuindo para a diminuição de neurônios ChAT-ir. Investigar os mecanismos de ação dessa classe neuronal combinado com técnicas que possam afirmar se houve morte neuronal poderia elucidar melhor tal achado.

5.3 Considerações sobre Neurônios/Glias por gânglio

A ingestão do DSS resultou na diminuição do número de neurônios/gânglio de todas as classes (NOSn, ChAT e PGP9.5). Para afirmar se houve morte neuronal, há a necessidade da utilização de outras técnicas como, por exemplo, a marcação de Caspase-3, que pode estar ativada, levando à proteólise de proteínas e como consequência à morte celular (KOZLOWSKA et al., 2018) e/ou marcação pelo TUNEL que detecta terminações3'-hidroxila características da apoptose (OTSUKI; LI; SHIBATA, 2003).

Frente ao tratamento com o anti-TNFα, Adalimumabe, as classes neuronais NOSn, ChAT e PGP9.5 do grupo DSS+ADA se recuperaram quando comparadas ao grupo DSS, bem como uma significativa redução da marcação do receptor TNFR2 nas classes neuronais. Sugere-se então que a neutralização da sinalização do receptor foi bem sucedida pelo anti-TNFα no presente trabalho.

Com relação ao receptor TNFR2, foi observado aumento nos grupos DSS e retorno no grupo DSS+ADA. O TNFα é uma citocina multifuncional produzida a partir de células mononucleares que desempenham papéis na promoção da inflamação, assim, um aumento desta citocina pode causar defeitos na função da barreira da mucosa em pacientes com colite ulcerativa, exacerbando a inflamação (TATIYA-APHIRADEE et al., 2018), corroborando com o resultado do presente trabalho.

Foi observado o número de neurônios/gânglio nos neurônios NOSn-ir uma diminuição significante de 28% no grupo DSS quando comparado com o grupo Sham. Nos neurônios ChAT-ir foi observado comportamento similar ao dos neurônios NOSn-ir, com redução de 32% no grupo DSS quando comparado ao grupo Sham. Resultados semelhantes foi encontrado por Da Silva et al. (2015) em animais com colite por TNBS com redução na densidade dos neurônios NOSn-ir e ChAT-ir. O pan-neuronal PGP9.5 foi usado para quantificar o número total de neurônios do plexo mioentérico do

colo distal de camundongos. Houve redução de 21% no grupo DSS quando comparado ao grupo Sham. Em um estudo cujo protocolo de indução de colite era com TNBS houve redução de 15% em animais com períodos de 12h e 24h (LINDEN et al., 2005). O tratamento com o anti-TNFα recuperou a o número de neurônios/gânglio NOSn-ir, ChAT-i e PGP9.5-ir.

Em nosso trabalho, ao analisar a população de células gliais entéricas por gânglio do grupo DSS marcadas com GFAP no plexo mioentérico houve um aumento de 14% quando comparado ao grupo Sham. Segundo Cirillo et al. (2011) as células gliais entéricas são ativadas por citocinas e estímulos pró-inflamatórios e são capazes de produzir mediadores inflamatórios próprios juntamente com um aumento da marcação de fatores específicos derivados da glia entérica, como por exemplo as proteínas S100B e GFAP. A indução de colite experimental por DSS foi aguda, insultando o intestino por 7 dias, basicamente seu comportamento de defesa foi baseado em uma das suas prioridades funcionais que é a manutenção da homeostase dos neurônios entéricos (BASSOTI et al., 2007). No qual as células glias entéricas reagiram aumentando sua marcação à proteína GFAP por gânglio e aumentando a "arborização'' de suas projeções ao redor dos neurônios entéricos, respondendo ativamente à inflamação.

5.4 Considerações sobre Perfil Neuronal

Mudanças na medida da área do perfil celular têm sido estudadas em diversos protocolos experimentais, como na desnutrição e renutrição, obesidade, isquemia e reperfusão e inflamação intestinal (DA SILVA et al., 2015;2017; GIROTTI; MISAWA et al., 2013; MIZUNO et al 2012; PALOMBIT et al., 2019; PAULINO et al., 2011).

Quando avaliamos o perfil neuronal das classes de neurônios NOSn, ChAT e PGP9.5 na ingestão de DSS, os neurônios de ambas as classes apresentaram uma diminuição do seu perfil neuronal, o que corrobora com outros trabalhos do laboratório (DA SILVA et al., 2015, 2017) e quando tratado com o anti-TNFα as classes neuronais não conseguiram recuperar sua área. Talvez tal achado se deve ao fato do protocolo de indução de colite ulcerativa ser diferente dos protocolos anteriores do laboratório, feitos com o ácido 2, 4, 6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS, Sigma) administrado no lúmen do colo distal dos animais, e também a relação do tempo para a progressão da doença que com a ingestão de DSS é 7 dias, porém, modelos de inflamação intestinal podem ser alcançados modificando a concentração de DSS e a frequência de administração (CHASSAING, et.

al., 2015; DAS et al., 2015), assim como com TNBS pode-se ter grupos de dias variáveis sendo comum grupos de 24 horas (DA SILVA et al., 2015, 2017).

No presente trabalho a análise da área dos neurônios nitrégicos do grupo DSS apresentaram uma diminuição significante de 18% quando comparado ao grupo Sham. Da Silva e colaboradores (2015) ao analisar a área dos neurônios nitrérgicos observou redução no tamanho dos neurônios de animais com colite 24h induzida pelo TNBS. Em nosso trabalho não houve tendência ao aumento dos neurônios do grupo tratado com o anti-TNFα em relação ao grupo DSS. Talvez tal resultado se deva ao fato de que os tecidos foram coletados 7 dias após contínua lesão por DSS e o protocolo de indução ser diferente, o que talvez fez com que os neurônios NOSn–ir não tivessem tempo de recuperar sua área.

A importância deste trabalho está em demonstrar que a colite ulcerativa experimental pelo DSS afeta de maneira diferenciada as diferentes classes neuronais, que expressam o receptor TNFR2. Além disso, o tratamento com ADA demonstrou ser efetivo na recuperação dos neurônios mioentéricos e glias entéricas, sendo assim, demonstra que o anti-TNFα é um alvo terapêutico no tratamento da colite ulcerativa experimental.

6. CONCLUSÃO

1. O DSS foi um protocolo eficaz para induzir a colite ulcerativa, uma vez que os animais apresentaram alterações no peso com diarreia e sangramento.
2. O uso do tratamento com anti-TNFα, adalimumabe, pareceu ser eficaz, pois houve recuperação do IAD dos animais assim como dos neurônios entéricos.
3. O receptor TNFR2 estava presente nos neurônios do plexo mioentérico e houve colocalização com os neurônios imunorreativos a NOSn, ChAT, PGP9.5.
4. A colite ulcerativa experimental afetou os neurônios entéricos, pois houve diminuição diferenciada dos neurônios imunorreativos a TNFR2, ChAT, NOSn e PGP9.5 e houve recuperação destes neurônios nos grupos ADA.
5. A colite ulcerativa experimental afetou de maneira diferenciada as células gliais entéricas, com aumento no grupo DSS, houve recuperação das glias entéricas no grupo ADA.
6. A colite ulcerativa experimental afetou o perfil neuronal com redução da área nos grupos DSS e DSS+ADA.
7. A morfologia do colo distal foi afetada no grupo DSS e houve recuperação no grupo ADA.

REFERÊNCIAS

AHMAD, T.; SATSANGI, J.; MCGOVERN, D.; BUNCE, M., JEWELL, D.P. The genetics of inflammatory bowel disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**., v. 15, n. 6, p. 731-748, 2001.

ARGOLLO, M.; FIORINO, G.; HINDRYCKX, P.; PEYRIN-BIROULET, L.; DANESE, S. Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. **Journal of Autoimmunity,** v.85, p. 103-116, 2017.

BASSOTI, G.; VILLANACCI, V.; FISOGNI, S.; ROSSI, E.; BARONIO, P.; CLERICI, C.; MAURER, C.A.; CATHOMAS, G.; ANTONELLI, E. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: Introducing the neuro-gliopathies. **World J. Gastroenterol**., v.13, n. 30, p. 4035-4041, 2007.

BEGUE, B.; WAJANT, H.; BAMBOU, J.C.; DUBUQUOY, L.; SIEGMUND, D.; BEAULIEU, J.F.; SCHMITZ, J. Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. **Gastroenterology.,** v.130, n.7, p.1962-1974, 2006.

BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am J Physiol**., v. 268, p. G622 - G630, 1995.

BILLMEIER, U.; DIETERICH, W.; NEURATH, M.F.; ATREYA, R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol.,** v. 22, n. 42, p. 9300-9313, 2016.

BOSANI, M.; ARDIZZONE, S.; PORRO, G. B. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases [Retraction]. **Biologics: Targets and Therapy**., v. 8, p. 39, 2014.

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

BRADLEY, S.M. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**., v. 214, p. 149-160, 2008.

CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P. S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cellular signalling**, v. 24(6), p. 1297-1305, 2012.

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, 2002.

CIPRIANI, G.; GIBBONS, S.J.; KASHYAP, P.C.; FARRUGIA, G. Intrinsic gastrointestinal macrophages: their phenotype and role in gastrointestinal motility. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**., v. 2, n.2, p. 120-130, 2016.

CIRILLO, C.; SARNELLI, G.; TURCO, F.; MANGO, A.; GROSSO, M.; APREA, G.; MASONE, S.; CUOMO, R. Proinflamatory stimuli activates human-derived enteroglial cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterol. Motil**., v. 23, p. 372-382, 2011.

CLARKE, L.E.; BARRES, B.A. Glia keep synapse distribution under wraps. **Cell**., v. 152, n. 2, p. 267, 2013.

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

COOPER, H.S.; MURTHY, S.N.; SHAH, R.S.; SEDERGRAN, D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab. Invest**., v. 69, n. 2, p. 238–249, 1993.

DA SILVA, M.V.; MAROSTI A.R.; MENDES, C.E. Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression in enteric neurons. **Histochem. Cell Biology**., v.143, p.171-184, 2015.

DA SILVA, M.V.; MAROSTI A.R.; MENDES, C.E.; PALOMBIT, K.; CASTELUCCI, P. Submucosal neurons and enteric glial cells expressing the P2X7 receptor in rat experimental colitis. **Acta Histochemica**., v.119, p, 481-494, 2017.

DAS, S., RACHAGANI, S., SHEININ, Y., SMITH, L. M., GURUMURTHY, C. B., ROY, H. K. AND BATRA, S. K. Mice lacking Muc4 are more resistant to experimental colitis and colitis-associated colorectal cancer. **Oncogene**., v. 35, n. 20, p. 2645-2654, 2015.

DE PAULA-SILVA, M.: BARRIOS, B. E.; MACCIÓ-MARETTO, L.; SENA, A. A.; FARSKY, S. H. P.; CORREA, S. G.; OLIANI, S. M. Role of the protein annexin A1 on the efficacy of anti-TNF treatment in a murine model of acute colitis. **Biochemical pharmacology.**, v.115, p, 104-113, 2016.

EISSNER, G.; KOLCH, W.; SCHEURICH, P. Ligands working as receptors: reverse signaling by member of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. **Cytokine Growth Factor Rev**., v. 15, p. 352-366, 2004.

ENG, L.F.; YU, A.C.; LEE, Y.L. Astrocytic response to injury. **Prog. Brain Res**., v. 94, p. 353-365, 1992.

ERDOGAN, B., ISIKSOY, S., DUNDAR, E., PASAOGLU, O., BAL, C. The effects of sodium phosphate and polyethylene glycol-electrolyte bowel preparation solutions on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. **Exp. Toxicol. Pathol**., v. 55, p.213–220, 2003.

FABIA, R., AR'RAJAB, A., JOHANSSON, M.L., WILLÉN, R., ANDERSSON, R., MOLIN, G., BENGMARK, S. The effect of exogenous administration of Lactobacillus reuteri R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. **Scand. J. Gastroenterol**., v. 28, p. 155–162, 1993.

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

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

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

FURNESS, J.B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J. Auton. Nerv. Syst**., v.81, p.87-86, 2000.

FUSS, IJ.; NEURATH, M.; BOIRIVANT, M.; KLEIN, J.S.; DE LA MOTTE, C.; STRONG, S.A.; FIOCCHI, C.; STROBER, W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. **Immunol.** v. 157, p. 1261-1270, 1996.

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

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.

GALEAZZI, F.; HAAPALA, E.M.; VAN ROOJEN, N.; VALLANCE, B.; COLLINS, S.M. Inflammation-induced impairment of nerve fuction in nematode-infected mice is macrophage dependent. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.,** v. 78, n.2, p. 259-265, 2000.

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

GIROTTI, A.P.; MISAWA, R.; PALOMBIT, K.; MENDES, C.E.; BITTENCOURT, C.J.; CASTELUCCI, P. Differential effects of undernourishment on the differentiation 5 and maturation of rat enteric neurons. **Cell Tissue Res**., v.353 n. 8, p. 367-380, 2013.

GIULIAN, D.; LI, J.; LEARA, B.; KEENEN, C. Phagocytic microglia release cytokines cytotoxins that regulate the survival of astrocytes neurons in culture. **Neurochem Int.,** v. 25, n. 3, p. 227-233, 1994.

GONZALES-MARTINEZ, P.; PEREZ-PIÑERA, P.; DÍAZ-ESNAL, B.; VEJA, J.A. S100 proteins in the human peripheral nervous system. **Microscopy Research and Technique**., v.60, p. 633-638, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev. Immunol**., v.5, p.953-964, 2005.

GRELL, M.; DOUNI, E.; WAJANT, H.; LÖHDEN, M.; CLAUSS, M.; MAXEINER, B.; GEORGOPOULOS, S.; LESSLAUER, W.; KOLLIAS, G.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 Kda tumor necrosis factor receptor. **Cell.** v. 83, p. 793-802, 1995.

GRELL, M.; WAJANT, H.; ZIMMERMANN, G.; SCHEURICH, P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. **Proc Natl Acad Sci USA**., v. 95, p. 570-575, 1998.

GULBRANSEN, B.D.; SHARKEY, K.A. Novel functional roles of enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nat. Ver. Gastroenterol. Hepatol**., v.9, n.11, p.625-632, 2012.

HADZISELIMOVIC, F.; EMMONS, L.R.; GALLATI, H. Souluble tumor necrosis factor receptors p55 and p75 in the urine monitor disease activity and the efficacy of treatment of inflammatory bowel disease. **Gut.**, v. 37, p. 260-263,1995.

HAGSTROM, C.; OLSSON, C. Glial cells revealed by GFAP immunoreactivity in fish gut. **Cell Tissue Res**., v.341, p. 73-81, 2010.

HARRY, G. J.; LEFEBVRE D'HELLENCOURT, C.; MCPHERSON, C. A.; FUNK, J. A.; AOYAMA, M.; WINE, R. N. Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons. **Journal of neurochemistry**, v.106, n.1, p. 281-298, 2008.

HEAD, K.A.; JURENKA, J.S. Inflammatory bowel disease part I: ulcerative colitis–pathophysiology and conventional and alternative treatment options. **Alter med rev**, v. 8, n. 3, p. 247-283, 2003.

HELLER, F.; FLORIAN, P.; BOJARSKI, C.; RICHTER, J.; CHRIST, M.; HILLENBRAND, B.; MANKERTZ, J., GITTER, A.H.; BURGEL, N.; FROMM, M.; ZEITZ, M.; FUSS, I., STROBER, W., SCHULZKE, J.D. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight Junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**., v. 129, p. 550-564, 2005.

HOLTMANN, M.H.; SCHÜTZ, M.; GALLE, P.R.; NEURATH, M.F. Functional relevance of sluble TNF-alpha, transmembrane TNF-alpha and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases. **Z Gastroenterol**., v. 40, p. 587-600, 2002.

HSIEH, H.L.; SCHÄFER, B.W.; WEIGLER, B.; HEIZMANN, C.W. S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**., v. 316, p. 949-959, 2004.

HUMIRA®: ADALIMUMABE. **Abbvie Farmacêutica LTDA.** Farm. Resp.: Carlos E.A. Thomazini – CRF-SP 24762. Bula de remédio.

JENSEN, C.J.; MASSIE, A.; DE KEYSER, J. Immune players in the CNS: the astrocyte. **J. Neroimmune Pharmacol**., v.8, n. 4, p. 824-839, 2013.

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.

KABOURIDIS, P.S.; LASRADO, R.; MCCALLUM, S.; CHNG, S.H.; SNIPPERT, H.J.; CLEVERS, H.; PETTERSSON, S.; PACHNIS, V. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. **Neuron**., v.85, n.2, p. 289 – 295, 2015.

KAPLAN, G.G.; NG, S.C. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.,** v. 152, n. 2, p. 313-321. e2, 2017.

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. 558-5593, 2007.

KAYMAKCALAN, Z.; SAKORAFAS, P.; BOSE, S.; SCESNEY, S.; XIONG, L.; HANZATIAN, D.K.; SALFELD, J.; SASSO, E.H. Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. **Clin Immunol**., v. 131, p. 308-316, 2009.

KHOR, B.; GARDER, A.; XAVIER, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**., v. 473, n. 7351, p. 307-317, 2011.

KIESLER, P.; FUSS, I.J.; STROBER, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**., v. 1, n. 2, p. 154-170, 2015.

KOZŁOWSKA, A., KOZERA, P., MAJEWSKI, M., GODLEWSKI, J. Co-expression of caspase-3 or caspase-8 with galanin in the human stomach section affected by carcinoma. **Apoptosis.,**v. 23 (9-10), p. 484-491, 2018.

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.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR; the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**., v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOETSCHER, H.; SCHLAEGER, E.J.; LAHM, H.W.; PAN, Y.C.; LESSLAUER, W.; BROCKHAUS, M. Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors from HL60 cells. **J Biol Chem**., v. 265, p. 20131-20138, 1990.

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.

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.

MAROSTI, A.R.; DA SILVA, M.V.; PALOMBIT, K.; MENDES, C.E.; TAVARES DA SILVA, W.; CASTELUCCI, P. Differential effects of intestinal ischemia and reperfusion in rat enteric neurons and glial cells expressing P2X2 receptors. **Histology and Histopathol**., v. 30, n. 4, p. 489-501, 2015.

MARTINEZ, F.O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**., v.6, n.13, 2014.

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

MATTEOLI, G.; GOMEZ- PINILLA, P.J.; NEMETHOVA, A.; DIGIOVANGLIO.; CAILOTTO, C.; VANBREE, S.H., ET AL. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. **Gut.,** v.63, p. 938-948, 2014.

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

MENDES, C. E., PALOMBIT, K., TAVARES-DE-LIMA, W., CASTELUCCI, P. Enteric glial cells immunoreactive for P2X7 receptor are affected in the ileum following ischemia and reperfusion. **Acta histochemical.**, v. 161, p. 667-679, 2019.

MENDES, C.E. Estudo do efeito dos antagonistas do receptor P2X7 e Panexina-1 nas células gliais entéricas no protocolo de isquemia e reperfusão intestinal. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais). **Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017. Orientação: Prof Dra Patricia Castelucci.**

MENDES, C.E.; PALOMBIT, K.; VIEIRA, C. The effect of ischemia and Reperfusion on Enteric Glia Cells and Contractile Activity in the Ileum. **Dig. DisSci**., v.60, p.2677-2689, 2015.

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 J. of Gastroenterol.,** v. 16, n. 29, p. 3651- 3663, 2010.

MIZUNO, M.S.; CRISMA, A.R.; BORELLI, P.; CASTELUCCI, P. Expression of the P2X(2) receptor in diferent classes of ileum myenteric neurons in the female obese ob/ob mouse. **World J. Gastroenterol.,** v.18, p. 4693-703, 2012.

MOLDOVEANU, A.C.; DICULESCU, M.; BRATICEVICI, C.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Rom J Intern Med**., v. 53, p. 118-127, 2015.

MORRIS, G.O.; BECK, P.L.; HERRIDGE, M.S.; DEPEW, W.T.; SZEWCZUK, M.R.; WALLACE, D.A. Qualification 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.

MULLER, P.A.; KOSCSÓ, B.; RAIANI, G.M.; STEVANOVICK, K.; BERRES, M.L.; HASHIMOTO, D., ET AL. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. **Cell.,** v.158, p. 300-313, 2014.

MURRAY, P.J.; ALLEN. J.E.; BISWAS, S.K. ET AL. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**., v.41, p. 14-20, 2014.

NEUNLIST, M.; AUBERT, D.; TOQUET, C.; ORESHKOVA, T.; BAROUK, J.; SHEMANN, M. Changes in chemical coding of myenteric neurons in ulcerative colitis. **Gut**., v.52, p.84-90, 2002.

NOOH, H.Z., NOUR-ELDIEN, N.M. The dual anti-inflammatory and antioxidant activities of natural honey promote cell proliferation and neural regeneration in a rat model of colitis**. Acta Histochem.,** v. 118, p. 588–595, 2016.

O'CALLAGHAN, J.P. Quantitative features of reactive gliosis following toxicant-induced damage of the CNS. **Ann N Y Acad Sci.,** v.679, p. 195-210, 1993.

OLMOS, G.; LLADÓ, J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators of inflammation**., v. 2014, 2014.

OSAWA, Y.; BANNO, Y.; NAGAKI, M.; BRENNER, D.A.; NAIKI, T.; NOZAWA, Y.; MORIWAKI, H. TNF-α-induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. **The Journal of Immunology**., v.167, n.1, p.173-180, 2001.

OTSUKI, Y.; LI, Z.; SHIBATA, M. A. Apoptotic detection methods—from morphology to gene. **Progress in histochemistry and cytochemistry.**, v. 38, n.3, p. 275-339, 2003.

PALOMBIT, K.; MENDES, C.E.; TAVARES DE LIMA, W.; BARRETO CHAVES, M.L.; CASTELUCCI, P. Blockage of the P2X7 receptor attenuates harmful changes produced by ischemia and reperfusion in the myenteric plexus. **Digestive Diseases and Sciences**., v.64, p. 1-15, 2019.

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

PANACCIONE, R.; COLOMBEL, J.F.; SANDBORN, W.J.; D'HAENS, G.; ZHOU, Q.; POLLACK, P.F.; THAKKAR, R.B.; ROBINSON, A.M. Adalimumab maintains remission of Crohn's disease after up to 4 years of treatment: data from CHARM and ADHERE. **Aliment Pharmacol Ther.,** v. 38, p. 1236-1247, 2013.

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.

PERSE, M. AND CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **J Biomed Biotechnol**., 718617, 2012.

POCHARD, C.; COQUENLORGE, S.; FREYSSINET, M.; NAVEILHAN, P.; BOURREILLE, A.; NEUNLIST, M.; ROLLI-DERKINDEREN, M. The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy?. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.315(1), p. G1-G11, 2018.

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.

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 the enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. **Virchows Archi.,** v. 454, p.1-11, 2009.

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 imune cell infiltration of the enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. **Virchows Archi**., v. 454, p.1-11, 2009.

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

RICHTER, F.; LÜTZ, W.; EITNER, A.; LEUCHTWEIS, J.; LEHMENKÜHLER, A.; SCHAIBLE, H. G. Tumor necrosis factor reduces the amplitude of rat cortical spreading depression in vivo. **Annals of neurology**., v. 76, n.1, p. 43-53, 2014.

RÜHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K.A. Enteric glia. **Neurogastroenterology**., v.16, p. 44-49, 2004.

RUTGEERTS, P.; VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology.,** v.136, p. 1182-1197, 2009.

SCHREIBER, S.; RUTGEERTS, P.; FEDORAK, R.N.; KHALIQ-KAREEMI, M.; KAMM, M.A.; BOIVIN, M.; BERNSTEIN, C.N.; STAUN, M.; THOMSEM, O.O.; INNES, A. A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. **Gastroenterology.,** v.129, p. 807-818, 2005.

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.

SHEALY, D.J.; CAI, A.; STAQUET, K.; BAKER, A.; LACY, E.R.; JOHNS, L.; VAFA, O.; GUNN, G.; TAM, S.; SAGUE, S.; WANG, D.; BRIGHAM-BURKE, M.; DALMONTE, P.; EMMELL, E.; PIKOUNIS, B.; BUGELSKI, P.J.; ZHOU, H.; SCALLON, B.J.; GILES KOMAR, J. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis fator α. **Mabs.,** v. 2, p. 428-439, 2010.

SHOUVAL, D.S.; RUFO, P.A. The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: A Review. **JAMA pediatrics**., v. 171, n. 10, p. 999-1005, 2017.

SISU, A.M.; PETRESCU, C.I.; CEBZAN, C.C.; NICULESCU, M.C.; NICULESCU, V.; MATUSZ, P.L.; RUSU, M.C. Enteric nervous system development in cavitary viscera allocated to the celiac plexus. **Romanian Journal of Morphology and Embryol.,** v.49, n.1, p. 63-67, 2008.

SLEVIN, S.M.; EGAN, L.J. New insights into the mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 21, p. 2909-2920, 2015.

SPEAR, E. T.; MAWE, G. M. Enteric neuroplasticity and dysmotility in inflammatory disease: key players and possible therapeutic targets. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**., v. 317, n 6, p. 853-861, 2019.

TARGAN, S.R.; HANAUER, S.B.; VAN DEVENTER, S.J.; MAYER, L.; PRESENT, D.H.; BRAAKMAN, T.; DEWOODY, K.L.; SCHAIBLE, T.F.; RUTGEERTS, P.J. A shortterm study of chimeric monoclonal antibody Ca2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. **N Engl J Med.,** v. 337, p. 1029-1035, 1997.

TATIYA-APHIRADEE, N.; CHATUPHONPRASERT, W.; JARUKAMJORN, K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology.**, v.30, n.1, p. 1-10, 2018.

TRACEY, D.; KLARESGOG, L.; SASSO, E.H.; SALFELD, J.G.; TAK, P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacol Ther**., v. 117, p. 244-279, 2008.

UENO, A.; GHOSH, A.; HUNG, D.; LI, J.; JIJON, H. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**., v. 2, p. 12283-12295, 2015.

VAN DEN BRANDE, J.M.; BRAAT, H.; VAN DEN BRINK, G.R., ET AL. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn´s disease. **Gastroenterology.,** v.124, p. 1774-1785, 2003.

VASINA, V.; BARBARA, G.; TALAMONTI, L.; STANGHELLINI, V.; CORINALDESI, R.; TONONI, M.; DE PONTI, F.; DE GIORGIO, R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. **Autonomic Neuroscince: Basic and Clinical**, v. 126-127, p.264-272, 2006.

VERKHRATSKY A.; BUTT A.M. Glial Neurobiology: a textbook. **John Wiley &Sons; Chichester, UK**., 214p, 2007.

VOS, A.C.; WILDENBERG, M.E.; DUIJVESTEIN, M,. ET AL. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner. **Gastroenterology.,** v.140, p. 221-230, 2011.

WALCZAK, H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. **Immunol Rev**., v. 244, p. 9-28, 2011.

WIRTZ, S.; POPP, V.; KINDERMANN, M.; GERLACH, K.; WEIGMANN, B.; FICHTNER-FEIGL, S.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. **Nature protocols**., v.12-7, p.1295, 2017.

ZACHARIAS, P.; DAMIÃO, A.O.M.C.; MORAES, A.C.; TEIXEIRA, F.V.; LUDVIG, J.C.; NONES, R. B.; OLANDOSKI, M. Adalimumab for ulcerative colitis: results of a Brazilian multicenter observational study. **Arquivos de gastroenterologia**., v.54, n.4, p.321-327, 2017.

ZHANG, S.; ZHAO, X.; ZHANG, D. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. **Cell Mol Immunol.,** v.30, n. 1, p. 35-40, 2014.