

CRISTINA EUSÉBIO MENDES

**ESTUDO DAS CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS IMUNORREATIVAS AOS
RECEPTORES P2X₂ E P2X₇ DO ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E
REPERFUSÃO INTESTINAL**

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

São Paulo
2013

CRISTINA EUSÉBIO MENDES

**ESTUDO DAS CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS IMUNORREATIVAS AOS
RECEPTORES P2X₂ E P2X₇ DO ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E
REPERFUSÃO INTESTINAL**

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Castelucci

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Mendes, Cristina Eusébio.

Estudo das células gliais entéricas imunorreativas aos receptores P2X₂ e P2X₇ do íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal / Cristina Eusébio Mendes. -- São Paulo, 2013.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Castelucci.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Estudo dos efeitos da isquemia/reperfusão, inflamação, obesidade e desnutrição no sistema nervoso entérico, receptores P2X (purinérgico) e sistema gastrointestinal.

Versão do título para o inglês: Study of enteric glial cells immunoreactive for P2X₂ and P2X₇ receptors in the ileum of rats subjected to ischemia and reperfusion.

1. Isquemia intestinal 2. Reperfusão 3. Células gliais entéricas
4. Receptores purinérgicos 5. Sistema nervoso entérico 6. S100
I. Castelucci, Profa. Dra. Patrícia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB074/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristina Eusébio Mendes.

Título da Dissertação: Estudo das células gliais entéricas imunorreativas aos receptores P2X₂ e P2X₇ do íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.

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

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° **126** nas fls. **93** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Patricia Castelucci, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo do efeito da isquemia e reperfusão intestinal sobre o receptor purina P2x7 e o sistema nervoso entérico do íleo de ratos** do qual participam o(s) alunos **Kelly Palombit, Cristina Eusébo Mendes e o pesquisador Wothan Tavares de Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **25.10.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 27 de outubro de 2010.

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

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

*Aos meus heróis, Pedro e Teresa Mendes.
E a minha amada irmã Claudia.*

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por me dar força e amparo nos momentos difíceis e guiar o meu caminho.

Aos meus heróis, exemplo de caráter, bondade e lealdade, que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos. Meus queridos e amados pais, *Pedro e Teresa Mendes*.

À minha querida irmã, *Claudia Eusébio Mendes Moreira* pelo companheirismo, paciência, carinho e por estar sempre ao meu lado. Te Amo!

Ao meu querido cunhado *José Roberto Ferreira Moreira*, que sempre me incentivou, és muito mais que cunhando és um irmão.

À Profa. Dra. *Patrícia Castelucci*, pela dedicada orientação, presença constante, oportunidade e toda confiança depositada.

A Profa. Dra. *Maria Luiza Morais Barreto de Chaves*, Coordenadora da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos membros da banca do exame de seleção para a entrada no programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Profa. Dra. *Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira* e Prof. Dr. *Newton Sabino Canteras*.

Aos membros da banca do exame de qualificação Profa. Dra. *Laura Beatriz Mesiano Maifrin*, Prof. Dr. *Ii-Sei Watanabe* e Profa. Dra. *Silvia Lacchini*, pelas importantes sugestões.

Ao Prof. Dr. *Wothan Tavares de Lima*, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade no ensino do modelo experimental de Isquemia e Reperusão Intestinal.

À Profa. Dra. *Claudimara Ferini Pacicco Lotfi*, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e seu aluno *Pedro Omori Mendonça*, pelo auxílio na aquisição e utilização do DAPI.

Aos demais Professores do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelos auxílios prestados.

Ao quarteto mais que fantástico, *Barbara Schäfer*, *Kelly Palombit* (Minha inseparável Dupla) e *Mariana Póvoa*, muitíssimo obrigada por todo carinho, amizade, sorrisos, conselhos, cumplicidade, por tornarem os dias mais agradáveis.

Aos colegas e amigos de laboratório (os que estão e os que já passaram) *Agnes Curto*, *Aline Marosti Bobna*, *Álvaro M. B. Junior*, *Amanda C. Carlos*, *Ariane Paulino*, *Camila J. Piva*, *Cíntia T. Lima*, *Flávio H. Scordamai Rodrigues*, *Isabelle Meloni*, *Jaqueline I. Jurjuck*, *Kátia A. S. Viegas*, *Nara B. Rabechi*, *Renata H. Gerez*, e *Thais C. de Souza*, pelo convívio e boa disposição.

Em especial aos amigos *Cristina Freira*, *Cristiane C. Costa*, *Fernando do Vale*, *Gabriele E. Mattos*, *Gisele M. Martins*, *Luíz Eduardo Gratton-Santos*, *Manuela Miranda*, *Márcia Mizuno*, *Marcos V. da Silva*, *Marília Bianca Teixeira*, *Simone Motta*, *Wagner Fernandes*, pela amizade, motivação, brincadeiras e ótimas e produtivas conversas.

Aos Colegas e Amigos da Pós-Graduação *Aline Carolina Giardini*, *Amanda Teixeira Rodrigues*, *Ana Paula Takano*, *André Bento Chaves*, *Bruno José Silva Melo*, *Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle*, *Caroline Antunes Lino*, *Daniel de Oliveira Martins*, *Daniella Batagello*, *Débora Nunes Martins Bueno*, *Elaine Silveira*, *Fabio Martinez dos Santos*, *Fernando José Dias*, *Helder Cravo Costa*, *Ivson Bezerra da Silva*, *João Guilherme de Oliveira Silvestre*, *Kátia Maria Sampaio Gomes*, *Leila Maria G. Campos*, *Marcelo Gomes Pereira*, *Marina Augusto Silveira*, *Marlene Aparecida F. Pinto*, *Miguel Antonio Xavier de Lima*, *Miguel José Rangel Junior*, *Mike Yoshio Hamasaki*, *Milena Fernandes Freitas*, *Monica Malheiros França*, *Mayara Pereira de Abreu*, *Renata Juliana da Silva*, *Silvia Honda Tanaka*, *Tabata Leal Nascimento*, *Vanessa Morais Lima* e *Vitor Yanamine Lee*, pelos bandejões da vida e boas risadas e conversas no corredor.

Ao Prof. Dr. *Paulo Correia-de-Sá* do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia da Universidade do Porto - Portugal, pela oportunidade de conhecer e trabalhar com o seu grupo (malta) e por toda disponibilidade técnica e científica para a realização do meu estágio. O meu muito Obrigada!

Ao “Grupo Farmacol” (Portugal), Professoras Doutoradas *Adelina Costa, Ana Patrícia Fontes Sousa, Graça Lobo, Laura Oliveira e Margarida Duarte-Araujo*, as técnicas *Belmira Silva e Helena Costa e Silva, Dra. Alexandrina Timóteo, Dra. Teresa Magalhães-Cardoso, Ana Rita Pinheiro, Aurora Barbosa, Bernado Matos (Beleza), Bruno Bragança, Catarina B. Moreira, Cristina Costa, Fátima Ferrerinha, Helena Lima, Juliana Leite, Miguel Cordeiro, Miguel Faria, Milaydis Napolskij, Nadia Monteiro, Patrícia Marques, Ricardo Viais, Silvia Marques, Sónia Gomes (Princesa) e Dona Rosa*. Meus “tchutchucos e tchutchucas”, muito obrigada por terem me recebido tão bem, pela preocupação com o meu bem estar, bom ânimo para organizar almoços/jantares, passeios e principalmente por me fazerem sentir integrante do grupo.

Em especial a *Cátia Vieira e Isabel Silva*, pela disponibilidade e paciência em ensinar as técnicas, por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho e pela amizade, cumplicidade, carinho que foram construídos e estão se consolidando mesmo com a distância. Obrigada por tudo que fizeram por mim!!!

Ao Rabugento (*Diogo Paramos de Carvalho*), que se faz presente mesmo tendo um oceano a nos separar, obrigada pelo carinho e amizade. “Pessoas espetaculares atraem pessoas espetaculares”.

Aos “agregados” do grupo farmacol *Carlos Santos, Mafalda Correia-de-Sá, Manuela Correia-de-Sá, Miguel Correia-de-Sá, e Rui Vaz Pinto* pela atenção e carinho.

Aos meus “velhos” e queridos amigos, a turma de sempre, sempre.... *André Barros, Adriano Souza Santos, Alexandre Baboni, Bruna Wolni, Cristiane Martins, Danielle Gouveia, Denis Morais (tchutchuquiiiiinho), Paola dos Santos, Sheila Tatiane dos Santos, Rafael Fernandes*, vocês são essenciais na minha vida, tenho imensa alegria em ter vocês ao meu lado.

Aos Meus ilustríssimos amigos *Bruno César de Oliveira* (irmão e amigo de alma) e *Cleber Xavier*, que torcem e vibram por cada conquista e em todos os momentos estão à disposição para dar uma palavra amiga, um abraço ou simplesmente ficar em silêncio ao meu lado. Tenho muito orgulho de ser amiga de vocês.

À querida Sra. *Rosana Duarte Prisco*, do Setor de Estatística do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por me ajudar a resolver os meus “problemas estatísticos”, paciência, dedicação e amizade.

Ao Sr. *Roberto Cabado*, do Laboratório de Microscopia Confocal de Varredura a Laser, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelas descontraídas manhãs, dedicação e paciência para obtermos as melhores imagens.

À Sra. *Joelcimar Martins da Silva* (Jô), por estar sempre a disposição, para tirar dúvidas de reagentes, de como fazer alguma técnica ou até mesmo para fazer contas matemáticas.

As Secretárias do Departamento de Anatomia *Cristiane Vitor Pinheiro*, *Luciana Monteiro Silva* e *Patrícia Rodrigues de Campos Rocha* pela gentileza e apoio administrativo prestado.

Aos Funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, *Alessandro Rodrigo Martins*, *Fábio França Luiz*, *Renivaldo de Souza* e *Ricardo Bandeira* pelo trabalho desempenhado.

Aos Funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela gentileza e colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio pesquisa e pelo apoio na concessão da Bolsa de Estudos.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização dessa Dissertação de Mestrado.

Muitíssimo obrigada, a todos!!!

"O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino."

Antoine de Saint-Exupery

RESUMO

MENDES, C. E. **Estudo das células glias entéricas imunorreativas aos receptores P2X₂ e P2X₇ do íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.** 2013. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A resposta do sistema nervoso entérico a diversas lesões acarreta a ativação das células glias entéricas. Essa ativação tem sido sugerida como um mecanismo de sinalização precoce, responsável pela degeneração neuronal subsequente. Este trabalho tem como objetivo analisar o efeito da isquemia e reperfusão intestinal (I/R-i) sobre as células glias entéricas, neurônios e receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇. A isquemia intestinal foi obtida pela obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais no período de 35 minutos, seguida pelos períodos de reperfusão de 0 hora (h), 24 h e 14 dias. Os tecidos foram preparados por métodos imunohistoquímicos de duplas marcações dos receptores P2X₂ e P2X₇ com Hu (pan-neuronal) e S100 (marcador glial), e marcações de Hu com proteína fibrilar ácida glial (GFAP marcador glial)/DAPI (marcador nuclear) e S100 com GFAP/DAPI. As análises qualitativas e quantitativas das contagens de duplas marcações, densidades, área dos perfis e proliferação celular foram obtidas dos microscópios de fluorescência e de Confocal de Varredura à Laser. Os resultados quantitativos demonstraram: a) os neurônios e células glias do plexo mioentérico foram imunorreativos (-IR) aos receptores P2X₂ e P2X₇; b) houve diminuição nas densidades das células aos receptores P2X₂-IR e P2X₇-IR, neurônios Hu-IR nos grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias; c) houve aumento na densidade das células glias entéricas S100-IR e GFAP-IR; d) na área do perfil de neurônios Hu-IR não apresentaram diferenças significantes, no entanto a área do perfil das células glias S100-IR apresentaram uma diminuição nos grupos I/R-i; e) foi detectado proliferação de células glias entéricas S100-IR e GFAP-IR nos grupos I/R-i 0 h e 24 h. O presente estudo demonstrou que a I/R-i está associada com a perda significativa de neurônios, alterações da expressão de receptores purinérgicos e aumento de células glias entéricas e estas alterações podem contribuir para disfunções na motilidade intestinal.

Palavras-chave: Isquemia intestinal. Reperfusão. Células glias entéricas. Receptores purinérgicos. Sistema nervoso entérico.

ABSTRACT

MENDES, C. E. **Study of enteric glial cells immunoreactive for P2X₂ and P2X₇ receptors in the ileum of rats subjected to ischemia and reperfusion.** 2013. 114 p. Master thesis (Morphofunctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The enteric nervous system response to various injuries involves the activation of enteric glial cells. This activation has been suggested as an early signaling mechanism precise, responsible for the subsequent neuronal degeneration. The aim of the work was to analyze the effect of ischemia and reperfusion (I/R-i) on enteric glial cells, neurons and purinergic P2X₂ and P2X₇ receptors. Intestinal ischemia was obtained by the obstruction of blood flow in the vessels ileal period of 35 minutes followed by reperfusion periods of 0 hour (h), 24 h and 14 days. Tissues were prepared by immunohistochemical methods of double labeling of P2X₂ and P2X₇ with Hu (pan-neuronal) and S100 (glial marker); and Hu with glial fibrillary acidic protein (GFAP glial marker) / DAPI (nuclear marker) and S100 with GFAP / DAPI. The qualitative and quantitative analyzes of colocalization, density, profiles area and cell proliferation were obtained from fluorescence microscopes and the Confocal Scanning Laser. Quantitative results have shown: a) neurons and glial cells were immunoreactive to P2X₂ and P2X₇; b) a decrease in density of cells immunoreactive (-IR) P2X₂ and P2X₇ receptors, as well as Hu-IR neurons in the Groups I/R-i 0 h, 24 h and 14 days; c) an increase in the density of enteric glial cell S100-IR and GFAP-IR; d) in the profile area of Hu-IR neurons showed no significant differences, however the area profile glial cells S100-IR showed a decrease in Groups I/R-I; e) detected enteric glial cell proliferation S100-IR and GFAP-IR in Groups I/R-i 0 h and 24 h. This study showed that I/R-i is associated with significant loss of neurons, alteration of the expression of purinergic receptors and increased enteric glial cells and these changes may contribute to intestinal motility disorders.

Keywords: Intestinal ischemia. Reperfusion. Enteric glial cells. Purinergic receptors. Enteric nervous system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcento

°C - grau Celsius

µg - Micrograma

µl - Microlitro

µm² - Micrômetro quadrado

A₁ - Receptor da adenosina do subtipo A₁

A_{2A} - Receptor da adenosina do subtipo A_{2A}

A_{2B} - Receptor da adenosina do subtipo A_{2B}

A₃ - Receptor da adenosina do subtipo A₃

ADP - Adenosina difosfato

AH - Pós-Hiperpolarizante

AMP - Adenosina monofosfato

AMS - Artéria mesentérica superior

ATP - Adenosina 5' trifosfato

BrdU - Timidina - 5 - bromo - 2' - desoxiuridina

Ca²⁺ - Cálcio

ChAT - Colina acetiltransferase

cm² - Centímetro quadrado

DAPI - 2, 6-diamidino-2-fenilindole dicloridrato

DMáx - Diâmetro máximo

DMín - Diâmetro mínimo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EOA - Espécies ativas do oxigênio

g - Gramas

GDNF- Fator neurotrófico derivado de célula glial

GFAP - Proteína fibrilar ácida glial

GS - Glutamina sintetase

h - Horas

I/R - Isquemia com reperfusão

I/R-i - Isquemia intestinal com reperfusão

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

IGLEs - Terminações nervosas laminares intra-ganglionares

Ils - Interleucinas

IPANs - Neurônios aferentes intrínsecos primários

-IR - Imunorreativo (a)

K⁺ - Potássio

Kg - Kilograma

M - Molaridade

mg - Miligramas

ml - Mililitro

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

ms - Milissegundo

Na⁺ - Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

nm - Nanômetro

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NPY - Neuropeptídeo Y

P1 - Receptor purinérgico ativado pela adenosina

P2 - Receptor purinérgico ativado pelo ATP

P2X - Receptores ionotrópicos

P2Y - Receptores metabotrópicos

PBS - Tampão Salina Fosfato

RNS - Espécie reativa de nitrogênio

ROS - Espécie reativa de oxigênio

S - Sináptico

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SP - Substância P

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

USP - Universidade de São Paulo

VIP - Peptídeo intestinal vasoativo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.....	44
Tabela 2 - Características dos anticorpos secundários.....	45
Tabela 3 - Componentes do EDU Click-iT.....	46
Tabela 4 - Peso dos animais (antes da cirurgia e após reperfusão).....	50
Tabela 5 - Dupla marcação dos neurônios Hu-IR e receptor P2X ₂ -IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h 24 h e 14 dias.....	65
Tabela 6 - Dupla marcação dos neurônios Hu-IR e receptor P2X ₇ -IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	66
Tabela 7 - Dupla marcação das células gliais entéricas S100-IR e receptor P2X ₂ -IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	67
Tabela 8 - Dupla marcação das células gliais entéricas S100-IR e receptor P2X ₇ -IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	68
Tabela 9 - Marcação de células gliais entéricas S100-IR, GFAP-IR e marcadas para o DAPI, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	69
Tabela 10 - Marcação dos neurônios (Hu), células gliais entéricas (GFAP) e núcleo (DAPI), nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	69
Tabela 11 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios Hu-IR dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	76
Tabela 12 - Valores do DMáx e do DMín das células gliais entéricas S100-IR dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	77
Tabela 13 - Dupla marcação das células gliais entéricas imunorreativas a S100 ou GFAP e ao EDU nos grupos Controle, Sham e I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da distribuição dos plexos ganglionares.....	26
Figura 2 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.....	27
Figura 3 - Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE.....	29
Figura 4 - Distribuição das células gliais entéricas no SNE.....	31
Figura 5 - Esquema da arquitetura geral das subunidades dos receptores P2X e P2X ₇	34
Figura 6 - Obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais.....	43
Figura 7 - Esquema das duplas e triplas marcações.....	44
Figura 8 - Dupla marcação de neurônios Hu-IR, ao receptor P2X ₂ -IR, ao receptor P2X ₇ -IR e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle.....	52
Figura 9 - Dupla marcação de neurônios Hu-IR e receptor P2X ₂ -IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	53
Figura 10 - Dupla Marcação de neurônios Hu-IR e receptor P2X ₇ -IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	54
Figura 11 - Dupla marcação de células gliais entéricas S100-IR, receptores P2X ₂ -IR, P2X ₇ -IR e GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle.....	55
Figura 12 - Dupla marcação de células gliais entéricas S100-IR e ao receptor P2X ₂ -IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	56
Figura 13 - Dupla marcação de células gliais entéricas S100-IR e receptor P2X ₇ -IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	57
Figura 14 - Dupla marcação de células gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	58
Figura 15 - Tripla Marcação de células gliais entéricas S100-IR, GFAP-IR e DAPI no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	59
Figura 16 - Marcação de neurônios Hu-IR e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	60

Figura 17 - Marcação de neurônios Hu-IR, células gliais entéricas GFAP-IR e DAPI no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	61
Figura 18 - Marcação de proliferação celular pelo EDU Click-iT no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle.....	62
Figura 19 - Marcação de proliferação celular pelo EDU Click-iT e células gliais entéricas S100-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	63
Figura 20 - Marcação de proliferação celular pelo EDU Click-iT e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....	64
Figura 21 - Densidade das células imunorreativas ao receptor P2X ₂ dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	70
Figura 22 - Densidade das células imunorreativas ao receptor P2X ₇ dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	71
Figura 23 - Densidade dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	72
Figura 24 - Densidade das células gliais entéricas imunorreativas a S100 dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	73
Figura 25 - Densidade das células gliais entéricas imunorreativas a GFAP dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	74
Figura 26 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	75
Figura 27 - Área do perfil do corpo celular das células gliais entéricas imunorreativas a S100 dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	77
Figura 28 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios Hu-IR no íleo de ratos dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	79
Figura 29 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) das células gliais entéricas S100-IR no íleo de ratos dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.....	81
Figura 30 - Esquema de tecido lesado após isquemia.....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Isquemia e Reperfusão Intestinal (I/R-i)	22
1.2 Sistema Nervoso Entérico	26
1.3 Células Gliais Entéricas	30
1.4 Receptores Purinérgicos	33
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Animais	41
3.2 Grupos Experimentais	41
3.3 Indução da Isquemia/Reperfusão – Intestinal (I/R-i)	42
3.4 Preparação do Material para Imunohistoquímica	43
3.5 Método de Duplas/Tripas Marcações com Imunofluorescência	43
3.6 Método de Proliferação	45
3.7 Métodos das Análises Qualitativas	46
3.8 Métodos das Análises Quantitativas	47
3.8.1 Análise das Duplas/Tripas Marcações	47
3.8.2 Análise da Densidade Neuronal e Glial	47
3.8.3 Análise Morfométrica	48
3.8.4 Análise de Proliferação Celular	48
3.9 Análise Estatística	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Observações Gerais	50
4.2 Análises dos Pesos dos Animais	50
4.3 Análises Qualitativas da Imunorreatividade dos Receptores P2X₂ e P2X₇, Hu, S100 e GFAP do Plexo Mioentérico	50
4.4 Análises Quantitativas das Duplas/Tripas Marcações, Densidades, e Morfometria das Células Imunorreativas aos Receptores P2X₂ e P2X₇, Hu, S100 e GFAP	65
4.4.1 Duplas Marcações	65
4.4.1.1 Dupla Marcação dos Receptores P2X₂ e P2X₇ com Neurônios Hu-IR	65

4.4.1.2 Dupla Marcação dos Receptores P2X ₂ e P2X ₇ com Células Gliais Entéricas Imunorreativas a S100.....	66
4.4.1.3 Tripla marcação de Células Gliais Entéricas Imunorreativas a S100, GFAP e DAPI.....	68
4.4.1.4 Marcação de Células Gliais Entéricas (GFAP), Neurônios (Hu) e DAPI.....	69
4.4.2 Densidade Neuronal e Glial.....	70
4.4.2.1 Receptor P2X ₂	70
4.4.2.2 Receptor P2X ₇	71
4.4.2.3 Neurônios Hu-IR.....	72
4.4.2.4 Célula Glial Entérica S100-IR.....	73
4.4.2.5 Célula Glial Entérica GFAP-IR.....	74
4.4.3 Análise Morfométrica (área do perfil celular).....	75
4.4.4 Distribuição dos Neurônios Mioentéricos Imunorreativos ao Hu de acordo com a Área do Perfil.....	78
4.4.5 Distribuição das Células Gliais Entéricas Imunorreativas a S100 de acordo com a Área do Perfil.....	80
4.4.6 Proliferação Celular.....	82
5 DISCUSSÃO.....	83
5.1 Considerações sobre a Isquemia Intestinal com Reperfusão.....	84
5.2 Considerações Sobre a Expressão dos Receptores P2X₂ e P2X₇, Hu, S100 e GFAP.....	85
5.3 Considerações Sobre a Densidade Neuronal e Glial.....	90
5.4 Considerações Sobre o Perfil Neuronal e Glial.....	93
5.5 Considerações Finais.....	94
6 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 Isquemia e Reperusão Intestinal (I/R-i)

A isquemia é uma condição de interrupção no suprimento de oxigênio e nutrientes para uma determinada área durante um período, devido a uma deficiência de fornecimento de sangue, o que pode acarretar a morte tecidual (SANTOS; PONTES; GOMES, 2006). A isquemia pode ser classificada como total ou parcial. Quando é total apresenta fluxo arterial insuficiente para manter a vida celular e tecidual, quando parcial, mantém a viabilidade celular, porém com o risco de evoluir para morte celular, dependendo do tipo de tecido lesado e do tempo de isquemia (D´ALECY; ZELENOCK, 1990).

A isquemia intestinal é uma emergência abdominal com risco de vida, e seu prognóstico dependente crucialmente de um diagnóstico e tratamento rápido para prevenir um enfarte substancial do intestino. A taxa de mortalidade manteve-se elevada ao longo da última década variando entre 60%-80% e as incidências vêm aumentando consideravelmente (VOLLMAR; MENGER, 2011).

I/R-i desempenha um papel fundamental em muitas doenças associadas com elevada taxa de mortalidade e de morbidade, tais como transplante, trombose mesentérica aguda venosa ou arterial, embolismo e obstrução intestinal (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; MASSBERG; MESSMER, 1998; SOYDAN et al., 2009).

Doenças intestinais inflamatórias frequentemente podem levar a episódios de isquemia, como a Doença de Crohn e isquemia aguda mesentérica (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; THORNTON; SOLOMON, 2002). Além disso, I/R-i de vasos intestinais são recorrentes em pacientes hospitalizados, especialmente aqueles que estão nas unidades de terapias intensivas (OLDENBURG et al., 2004).

A isquemia aguda representa o primeiro nível de dano, por causa da diminuição dos níveis de oxigênio nos tecido que provoca um acúmulo de lactato e com isso leva a uma diminuição do pH celular. Com transporte da membrana celular prejudicado causa influxo de cálcio (Ca^{2+}) para o meio intracelular, que provoca ativação de enzimas e acúmulo de mediadores pró-inflamatórios (MARRETA et al., 2012). Outros mecanismos podem ocorrer e sujeitar o intestino a um aumento de estresse oxidativo, com ativação subsequente de espécie reativa de oxigênio (ROS) e espécie reativa de nitrogênio (RNS) (CAMPOLO et al., 2013). Diversos outros mecanismos também podem acontecer como: lesão da mucosa intestinal, aumento da permeabilidade microvascular, perda de fluidos na luz intestinal, liberação de hidrolases lisossômicas e aumento de proteólise (RIBEIRO; YOSHIDA, 2005).

As células endoteliais e os leucócitos, elementos fundamentais na lesão de reperfusão, já são afetados na isquemia, sofrendo alterações que se intensificarão na reperfusão. A relevância dessas alterações torna-se ainda maior pelo fato dessas células estarem presentes em todos os tecidos, tornando-os vulneráveis à lesão de reperfusão. Quando expostas à hipóxia, as células endoteliais alteram seus citoesqueletos e suas formas, gerando pequenos poros intercelulares. A presença destes poros determina um aumento da permeabilidade do endotélio, com formação de edema tecidual (OGAWA et al., 1990).

Os resultados da isquemia estão associados às alterações morfológicas e funcionais derivadas da necrose tecidual. Nas últimas décadas têm-se estudado também os aspectos de morte celular programada. As alterações provocadas pela falta de suprimento sanguíneo desencadeiam processos metabólicos celulares que induzem a célula a sua autodestruição sem a característica reação inflamatória, conhecido como fenômeno de apoptose. Portanto, a necrose e apoptose celular podem ser utilizadas como indicadores das alterações de tecidos submetidos à isquemia (HENGARTNER, 2000; JONES; GORES, 1997; LOCKSHIN; ZACHERI, 2002).

Morfologicamente, necrose diferencia-se de apoptose, pois na necrose a célula aumenta seu volume, a membrana plasmática colapsa e a célula é lesada. Durante a apoptose a célula diminui o seu perfil celular, seu núcleo condensa e há uma desintegração e forma-se um “corpo apoptótico”. Na apoptose são observados aspectos bioquímicos como a ativação de proteases (caspases) e a fragmentação oligonucleosomal do DNA, na necrose estes eventos usualmente não estão presentes (HUPPERTZ; FRANK; KAUFMANN, 1999; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003).

Segundo alguns autores (CAMELO et al., 1996; GARCIA-CRIADO et al., 1998) o período de reperfusão que é o restabelecimento do fluxo sanguíneo é, na realidade, tão ou mais deletério que o período isquêmico, pois causa a geração e liberação para a circulação portal e sistêmica de uma série de mediadores químicos como por exemplo, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas (ILs) 1, 6 e 10 e o óxido nítrico (NO) que afetam o metabolismo localmente, no intestino e em órgãos distantes (CORNEJO et al., 2002; HARWARD et al., 1993).

Vários são os mecanismos propostos para explicar o dano induzido ao órgão ou tecido pelo fenômeno isquemia com reperfusão (I/R), entre os quais, podem ser incluídos anóxia, o influxo celular de Ca^{2+} , a depleção de adenosina 5' trifosfato (ATP), a disfunção mitocondrial, a liberação de espécies ativas do oxigênio (EAO) durante a reperfusão, o acúmulo de neutrófilos e outros elementos celulares leucocitários e não leucocitários, com

subsequente liberação adicional de EAO e enzimas líticas (BONVENTRE, 1993; CAMELO et al., 1996; CHAN et al., 1999; DEFRAIGNE et al., 1994).

Alguns estudos vêm demonstrando quão agressivo é o processo de reperfusão. Os autores Parks et al. (1982) observaram que 3 horas de isquemia seguida por uma hora de reperfusão causava maiores danos na mucosa intestinal do que quatro horas seguidas de isquemia.

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

A I/R-i têm consequências funcionais onde incluem o comprometimento de absorção de nutrientes, déficit na motilidade e mudanças nos circuitos neurais entéricos (GIARONI et al., 2012).

Estudos sobre a I/R-i têm sido realizados no sistema nervoso entérico, Lindeström e Ekblad (2004) analisaram mudanças estruturais nos neurônios entéricos do íleo de ratos submetidos a I/R. Nesses estudos foram observadas alterações nos números de neurônios acidófilos. Foi observado processo de morte celular nos neurônios dos plexos submucoso e mioentérico, porém não foram estudadas as classes dos neurônios afetadas e seu código químico. Também, os autores Piao et al. (1999) verificaram por microscopia óptica e eletrônica alterações nos neurônios mioentéricos de ratos com isquemia de 4 horas, porém não foi determinado o código químico.

Calcina et al. (2005) verificaram que uma isquemia seguida por uma reperfusão de 24 horas, levou a um aumento significativo no número de neurônios mioentéricos imunorreativos ao VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e à NOS (óxido nítrico sintase). Rivera et al. (2009), demonstraram que após 24 horas de I/R-i em cobaias ocorreu edemaciamento dos neurônios do plexo mioentérico imunorreativos à NOS e uma diminuição na área do perfil celular dos neurônios imunorreativos à calbindina. Em outro trabalho Rivera et al. (2012) observaram em camundongos *knoukout* para à NOS que após a I/R-i danos na mucosa e músculo foram mais severos, que ocorreu maior infiltração de neutrófilos nas primeiras 24 horas, dados imunohistoquímico mostraram que houve uma perda significativa da proteína contrátil, α -actina e a parte funcional mostrou que houve uma redução maior da atividade contrátil basal do músculo longitudinal e respostas contráteis a estimulação dos nervos ou com um agonista muscarínico, nesses animais.

Milano et al. (2008) observaram que a I/R-i aumentava a expressão do mRNA dos receptores purinérgicos P2X₇ e P2Y₂ em diferentes órgãos, como os rins e pulmões. No

entanto, não foi verificada alteração com diferença significativa no intestino. Isto pode ter ocorrido porque os autores utilizaram o intestino como um todo e não foi analisada a presença dos receptores nas diversas partes, como no sistema nervoso entérico, camadas musculares e vilosidades.

Paulino et al. (2011) demonstram que a isquemia da artéria mesentérica superior (AMS) com 4 horas de reperfusão acarreta alterações morfológicas nos neurônios do plexo mioentérico que expressam o receptor P2X₂ e resultados de isquemia de ramos da artéria ileal demonstraram alterações nos neurônios que expressam o receptor P2X₇ (PALOMBIT et al., 2013).

A ativação de receptores purinérgicos como o P2X₇ por ATP exógeno pode ser outro mecanismo de estímulo para a morte celular. Em determinadas células, o ATP pode induzir a formação de poros na membrana plasmática, por ativação do receptor P2X₇, levando a um aumento de íons dentro da célula, com desencadeamento de necrose e/ou apoptose e consequentemente morte celular (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003).

A função neural deste receptor está tendo uma grande importância, devido sua presença no sistema nervoso. Dados indicam o envolvimento deste receptor na regulação de diversas funções neurais, como a modulação de liberação de neurotransmissores e a ativação da microglia e astrogliia. Além disso, há indícios que o receptor P2X₇ possa ter um potencial terapêutico em locais de desordens no sistema nervoso, como na I/R, na doença de Alzheimer e na dor neuropática (SPERLÁGH et al., 2006; SPERLÁGH; KOFALVI; DEUCHARS, 2002).

Sabendo que as purinas são os mediadores mais onipresentes de comunicação neurônio-glia, e ativar os nervos entéricos provoca liberação de ATP e posterior ativação de receptores P2 em vários paradigmas experimentais, evidências sugerem que células gliais entéricas só respondem a liberação de ATP a partir de nervos entéricos de populações distintas e em circunstâncias específicas de comunicação neurônio-glia (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012).

Mendes et al. (2013) observaram no modelo de I/R-i, que no gânglio entérico há presença de células imunorreativas somente ao receptor P2X₂ que não possuíam características neuronais, sendo possivelmente células gliais entéricas.

Evidências indicam que doenças intestinais inflamatórias são caracterizadas por mudanças que afetam não só células epiteliais e imunológicas, mas também outros

componentes celulares como as células gliais entéricas (BRADLEY; PARR; SHARKEY, 1997; CIRILLO et al., 2011).

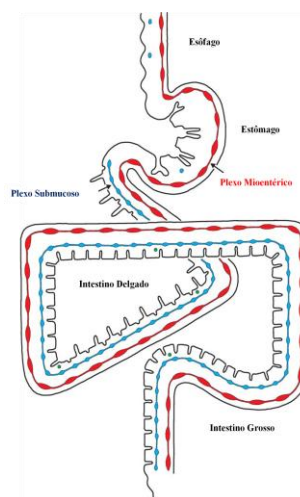
Alguns estudos demonstram que as células gliais entéricas respondem a estímulos exógenos pró-inflamatórios e a mediadores liberados por células do sistema imunológico, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a Il-6. Estes dados sugerem que as células gliais entéricas, participam ativamente do surgimento e desenvolvimento de inflamações intestinais (CIRILLO et al., 2011; VON BOYEN; STEINKAMP, 2011).

1.2 Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso autônomo (SNA) possui três divisões: simpático, parassimpático e sistema nervoso entérico (SNE). O SNE é a parte mais complexa e diferencia-se tanto estruturalmente como funcionalmente de qualquer outro componente do SNA, por ser considerado um sistema comparável ao sistema nervoso central (SNC). Ele tem a capacidade de mediar atividades de forma independente do SNC, e inclui uma série de redes neurais, necessárias para um circuito reflexo completo (CABARROCAS; SAVIDGE; LIBLAU, 2003; FURNESS, 2006; FURNESS, 2012; LARANJEIRA; PACHNIS, 2009).

Este sistema consiste de feixes nervosos interconectados e gânglios que estão localizados na parede do tubo digestório, pâncreas e sistema biliar. O mesmo é constituído por um vasto número de neurônios com diversas morfologias e fenótipos neuroquímicos, e células gliais, que estão organizados em dois plexos ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (Figura 1) (FURNESS, 2006; FURNESS, 2012; PHILLIPS et al., 2004).

Figura 1 - Representação esquemática da distribuição dos plexos ganglionares.

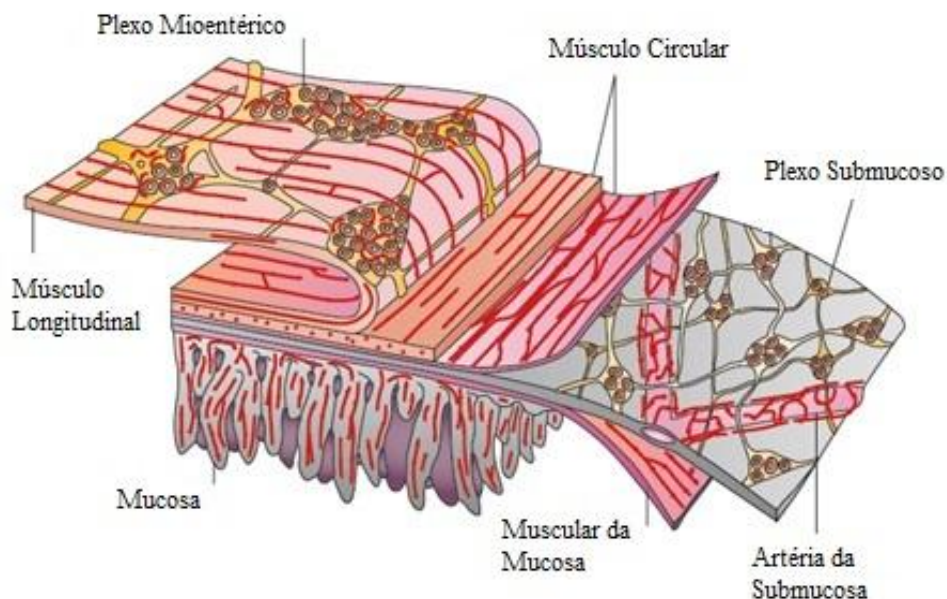


Fonte: Adaptado de Furness, 2006.

O plexo mioentérico (plexo de Auerbach) localiza-se entre a camada muscular longitudinal externa e a camada do músculo circular, presente por todo trato digestório, do esôfago ao reto. O plexo mioentérico é constituído essencialmente por três plexos: o plexo primário, que é uma estrutura grosseira, suas malhas variam de tamanho e formas, mas exhibe um arranjo longitudinal; o plexo secundário que é composto de feixes de fibras nervosas mais delgadas e estão intimamente ligados ao plexo primário, estes dois plexos encontram-se entre a camada muscular circular e longitudinal; e o plexo terciário tem malhas de fibras muito finas e está relacionado com o plexo secundário, e encontra-se dentro da camada muscular circular (FURNESS, 2006; SISU et al., 2008).

O plexo submucoso é proeminente no intestino delgado e grosso e divide-se em plexo submucoso interno (plexo de Meissner) abaixo da mucosa, plexo submucoso externo (plexo de Schabadash ou de Henle) junto à camada circular do músculo e o plexo intermediário posicionado entre os plexos submucoso e externo (Figura 2). Suas malhas são menores que o plexo mioentérico, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor. Este plexo localiza-se ao longo do intestino, sendo que um plexo fica próximo do músculo e o outro próximo da mucosa (FURNESS, 2006; FURNESS, 2012).

Figura 2 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.



Fonte: Adaptado de Furness, 2012.

Nesses dois plexos ganglionares podem ser encontrados diferentes tipos de neurônios como: neurônios motores, interneurônios, e neurônios aferentes primários intrínsecos que são fundamentais para controlar as funções gastrintestinais (FURNESS, 2000; SAYEGH; RITTER, 2003). A rede neural do plexo mioentérico está envolvida na regulação reflexa das atividades contráteis da musculatura externa, enquanto que a rede neural do plexo submucoso tem um papel direto no controle de secreção e absorção, através dos neurônios motores que regulam a atividade secretomotora e vasomotora da mucosa (LOMAX; FURNESS, 2000; SONG; COSTA; BROOKES, 1998).

Os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório, porém diferenças quanto à densidade e ao tamanho dos neurônios, bem como a forma dos gânglios, podem ser encontrados no mesmo segmento do trato gastrintestinal dos animais de mesma espécie e com diferentes idades (MATINI; MAYER; PELLEGRANI, 1997; MCKEOWN; CHOW; YOUNG, 2001; QU et al., 2008) ou submetidos a diferentes condições experimentais, como a inflamação ou desnutrição (BOYER et al., 2005; CASTELUCCI et al., 2002b; DE GIORGIO et al., 2004; GIROTTI et al., 2013; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010; PONTELL et al., 2009), isquemia intestinal (BOBNA, 2011; PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011; RIVERA et al., 2009), obesidade (MIZUNO et al., 2012) e colite ulcerativa (DA SILVA, 2011).

A identificação dos neurônios entéricos é imprescindível para compreender o seu papel fisiológico (FURNESS, 2012). Essa identificação pode ser feita por métodos imunohistoquímicos, morfológicos, eletrofisiológicos, farmacológicos e técnica de traçadores retrógrados (BREHMER et al., 2004; HENS et al., 2001; SAYEFH; RITTER, 2003).

Aliando esses diferentes métodos, Furness (2000) descreveu dezessete tipos de neurônios entéricos, quatorze destes encontrados no intestino delgado de cobaia. Há diferenças desses neurônios quanto ao código químico, morfologia, projeções e identificações fisiológicas. Dependendo da região do trato gastrintestinal onde se situam, os neurônios podem controlar a motilidade, o transporte de fluidos da mucosa e do fluxo sanguíneo local (FURNESS, 2006; 2012).

Os diferentes tipos de neurônios entéricos podem ser classificados em: neurônios motores (4, 5, 6, 7), interneurônios (1, 8, 9, 10) e neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs) (2, 11), neurônios secretomotores e vasomotores do plexo submucoso (12, 13, 14, 15) (Figura 3) (FURNESS, 2000).

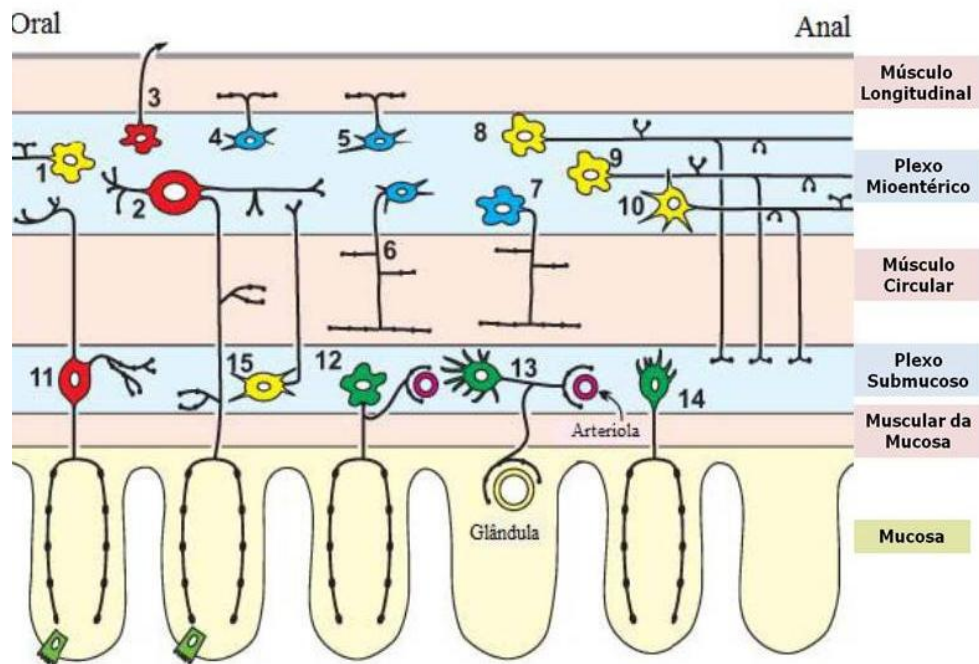
Os neurônios motores são divididos em: neurônios excitatórios e neurônios inibitórios da musculatura lisa do intestino, estes podem ser encontrados no plexo mioentérico e estão

envolvidos na motilidade e neurônios secretomotores/ vasodilatadores que 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).

Os interneurônios são identificados por neurônios, com direção oral (ascendente), que são neurônios colinérgicos e estão relacionados com os reflexos propulsivos no intestino e três tipos de neurônios com direção anal (descendentes), não colinérgicos, que estão envolvidos com a motilidade reflexa local (FURNESS, 2000; 2006; LOMAX; ZHANG; FURNESS, 2000).

Os IPANs são neurônios sensoriais, com morfologia Dogiel tipo II (corpos celulares grandes com superfície lisa), com propriedades eletrofisiológicas de neurônios AH, que são identificados pela hiperpolarização seguida pelo potencial de ação. Enquanto os neurônios motores e interneurônios apresentam a morfologia Dogiel Tipo I (corpos celulares pequenos com múltiplos e curtos dendritos e com um axônio) e com padrão eletrofisiológico de neurônios S que são células que apresentam impulsos sinápticos rápidos (BREHMER et al., 1999; BROOKES et al., 1995; FURNESS, 2000; 2006; FURNESS; COSTA, 1987; LOMAX; ZHANG; FURNESS, 2000).

Figura 3 - Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE.



Fonte: Adaptado de Furness, 2006.

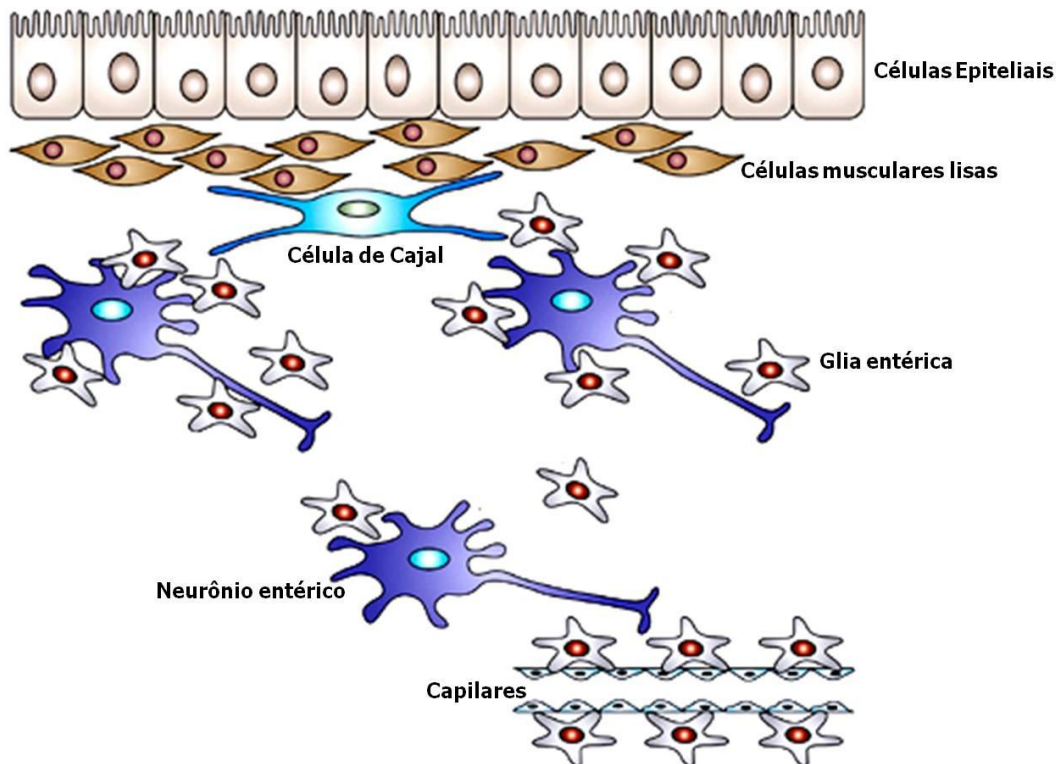
1.3 Células Gliais Entéricas

No SNE as informações sobre as células gliais entéricas ainda são escassas, os plexos nervosos do trato gastrointestinal são supridos com células gliais entéricas e estes gânglios apresentam-se como uma estrutura compacta, circundada por uma membrana e isolada de tecido conectivo, onde todos os espaços são ocupados por neurônios e estruturas gliais (GABELLA, 1970).

Essas células gliais são pequenas, apresentam-se com formato de estrela com numerosos processos e formas, não sintetizam mielina e exibem semelhanças morfológicas e moleculares com os astrócitos do SNC (CABARROCAS; SAVIDGE; LIBLAU, 2003; HAGSTRÖN; OLSSON, 2010).

Por muito tempo acreditava-se que a única função das células gliais entéricas era proporcionar suporte aos neurônios entéricos (Figura 4). Com o passar dos anos estudos vêm demonstrando que as células gliais entéricas têm papel neuroprotetor (LAKHAN; KIRCHGESSNER, 2010), capacidade de comunicação com os neurônios (enviar e responder sinais). Esta comunicação bi-direcional (neurônio-glia/ glia-neurônio) é essencial para o bom funcionamento do sistema nervoso durante o seu desenvolvimento e ao longo da vida (GOMES et al., 2009) e também têm funções importantes para o controle das funções gastrintestinais (ABDO et al., 2010; GULBRANSEN; SHARKEY, 2012; KIMBALL; MULHOLLAND, 1995).

Figura 4 - Distribuição das células glias entéricas no SNE.



Fonte: Adaptado de Bassoti, 2007.

Essas diferentes funções das células glias entéricas no trato gastrointestinal incluem:

- Proporcionar estabilidade a esse sistema, por responder ativamente ao estímulo mecânico e podendo ajustar-se estruturalmente e metabolicamente ao stress mecânico que a parede intestinal sofre (RÜHL, 2005; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004);
- Criar um microambiente protetor, por meio de tamponamento do meio extracelular, via absorção de cátions (RÜHL, 2005; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004);
- Regulação da barreira intestinal, devido à aproximação das células glias entéricas com as células epiteliais do intestino e aos vasos sanguíneos do plexo submucoso, permitem que as mesmas mantenham a integridade da mucosa, permeabilidade intestinal e inibição de proliferação de células epiteliais intestinais (FLAMANT et al., 2011; SAVIDGE et al., 2007);
- Liberação de fatores tróficos como, fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF), que está relacionada com o desenvolvimento e sobrevivência de neurônios entéricos (BASSOTTI et al., 2007b; RODRIGUES et al., 2011);
- Estão relacionadas com a neurotransmissão, devido à expressão de Glutamina sintetase (GS), que tem um papel na sinalização glutamatérgica e L-arginina (um importante precursor de óxido nítrico), que tem um papel na sinalização nitrérgica e expressão de

purinoreceptores como, P2Y₄, e P2X₇ (BASSOTTI, et al., 2007; KASZAKI et al., 2012; VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003);

- Homeostase neuronal, a perda de células gliais entéricas podem causar alterações neuroquímicas dos neurônios e, além disso, elas se distribuem nos gânglios de forma que um déficit de sua função poderia afetar a organização neuronal, como a coordenação da sua função (BASSOTTI et al., 2007b; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

As células gliais entéricas maduras expressam proteína fibrilar ácida glial (GFAP), vimentina e S100 e para sua identificação utiliza-se frequentemente métodos imunohistoquímicos como a marcação de células que expressam GFAP e S100 (HAGSTRÖM; OLSSON, 2010; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

No SNE a GFAP é considerada um marcador de células gliais entéricas e sua expressão é modulada por proliferação de células gliais entéricas, diferenciação e inflamação (CIRILLO et al., 2011). O aumento dos níveis de GFAP em processos inflamatórios tem sido relatado e essas observações indicam que a expressão de GFAP é dinamicamente regulada e reflete o estado funcional de uma célula glial entérica, mas são necessários mais estudos para compreender melhor suas funções (RÜHL, 2005; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

A S100 é uma proteína ligante de cálcio que pode ser encontrada no citoplasma/núcleo. É o marcador que tem sido mais utilizado, é considerado um pan-glial no SNE, e tem algumas funções, como a regulação da estrutura e função do citoesqueleto e a homeostase de cálcio no citoplasma das células gliais entéricas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2003; HSIEH et al., 2004; RÜHL, 2005).

A resposta do sistema nervoso para diversas lesões acarreta na ativação das células gliais entéricas (LOPACHIN; ASCHNER, 1993; O'CALLAGHAN, 1993). Essa ativação tem sido sugerida como um mecanismo de sinalização precoce, responsável pela degeneração neuronal subsequente (GIULIAN; LI; KEENEN, 1994). Estudos têm demonstrado que as anormalidades estruturais ou bioquímicas das próprias células gliais entéricas poderiam contribuir nas desordens gastrintestinais, e que isto poderia atrair células imunes para o SNE e com isso, levar a uma neurodegeneração (CABARROCAS; SAVIDGE; LIBLAU, 2003). Como se sabe, as células gliais entéricas interagem com as células endoteliais e imunes e que, problemas nesta interação poderiam contribuir para a etiopatogenia de doenças intestinais inflamatórias (DE GIORGIO et al., 2004; SAVIDGE et al., 2007; VASINA et al., 2006).

Além disso, vêm sendo mostrado que as células gliais entéricas protegem os neurônios entéricos do stress oxidativo e estão envolvidas no controle do fenótipo neuronal entérico e nas funções motora do SNE. Trabalhos recentes indicam que as células gliais entéricas têm

potencial neurogênico e são capazes de gerar neurônios entéricos em resposta a lesões (BOESMANS et al., 2012).

1.4 Receptores Purinérgicos

O conceito para neurotransmissão purinérgica foi proposto em 1972, depois que o ATP foi identificado como um neurotransmissor liberado pelos neurônios não adrenérgicos e não colinérgicos inibitórios do intestino (BURNSTOCK, 2008).

O ATP é uma molécula biológica que tem como papel intracelular ser fonte de energia e extracelular ser uma molécula sinalizadora (BURNSTOCK, 2008). O ATP é liberado pelas células sendo rapidamente hidrolisado pelas ecto-nucleotidases existentes na fenda sináptica, dando origem a produtos biologicamente ativos, como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e a adenosina (OLIVEIRA; COUTINHO-SILVA; SILVA, 2013; ZIMMERMANN, 2000).

Têm sido descritas elevadas concentrações de ATP em subpopulações de neurônios mioentéricos de diferentes regiões do intestino. Após um estímulo adequado, o ATP é liberado dos neurônios entéricos, com consequente ativação de receptores específicos existentes nos neurônios entéricos e no músculo liso, que podem promover a excitação ou inibição da atividade muscular (GIARONI et al., 2002; ZIZZO; MULÉ; SERIO, 2007).

Embora o catabolismo extracelular do ATP pela via das ecto-nucleotidases contribua parcialmente para a concentração de nucleotídeos no plexo mioentérico (CORREIA-DE-SÁ et al., 2006), este pode ser importante em diversas situações patológicas como a isquemia intestinal, inflamação, quando os níveis de ATP extracelular estão aumentados (DUARTE-ARAÚJO et al., 2009).

A partir de estudos farmacológicos foi definida em 1978 a primeira divisão dos receptores purinérgicos em P1 e P2 que são ativados pela adenosina e ATP, respectivamente (BURNSTOCK, 1978).

Os receptores P1 são subdivididos de acordo com suas características moleculares, farmacológicas e bioquímicas em quatro subtipos A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Os receptores A_1 são abundantemente expressos no plexo mioentérico do trato gastrointestinal e têm um papel importante sobre o controle da motilidade (CHRISTOFI et al., 2001).

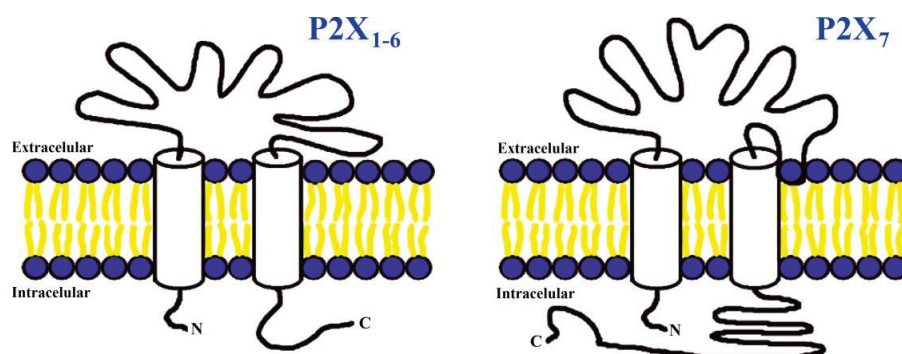
Os receptores P2 subdividem-se em receptores P2X que são canais iônicos e P2Y que são receptores acoplados a proteína G (ABBRACHIO et al., 2009; FREDHOLM et al., 1997; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P2Y são compostos por sete domínios hidrofóbicos transmembranares, com cadeias amino-terminal (extracelular) e carboxi-terminal (intracelular) curtas. Na família dos receptores P2Y existem 8 subtipos diferentes (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}), que são aceitos na literatura como P2Y funcionalmente expressos em mamíferos (ABBRACCHIO et al., 2003; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; GITTERMAN; EVANS, 2000; MARTEU et al., 2003).

Os receptores P2X são receptores ionotrópicos permeáveis a cátions (Na⁺, K⁺ e Ca²⁺) cuja velocidade de abertura é de aproximadamente 10 ms (NORTH; SURPRENANT, 2000), possuem duas regiões transmembrana, com terminais amino e carboxi localizados intracelular, sendo que a maior porção da proteína é extracelular (DI VIRGILIO et al., 1998) (Figura 5). Atualmente foram clonados, caracterizados farmacologicamente e aceitos como válidos sete tipos diferentes na família dos receptores P2X (P2X_{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}). Os receptores P2X são encontrados em células musculares lisas, neurônios, células gliais e apresentam um papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida nos SNC e sistema nervoso periférico (SNP) (ABBRACCHIO et al., 2009; COLLO et al., 1996; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

A unidade funcional do receptor P2X, assim como outros canais iônicos, é uma proteína oligomérica composta por mais de uma subunidade. Evidências funcionais e bioquímicas mostram que as subunidades dos receptores P2X podem formar complexos monoméricos e heteroméricos, como P2X₂/P2X₃, P2X₁/P2X₅ e P2X₄/P2X₆ (NORTH; SURPRENANT, 2000) e a combinação dos diferentes subtipos de receptores podem ter diferentes características dos receptores e aumentar a diversidade para a seletividade com os antagonistas e agonistas, transmissão de sinalização, propriedades dos canais e dessensibilização (VOLONTÉ; D'AMBROSI, 2009).

Figura 5 - Esquema da arquitetura geral das subunidades dos receptores P2X e P2X₇



Fonte: Di Virgilio et al., 1998.

O receptor P2X₂ está distribuído amplamente no SNC e SNP e tem demonstrado um papel na transmissão da dor, mediação das respostas ventilatórias à hipóxia e o peristaltismo do intestino delgado (TITTLE; HUME, 2008). A sua caracterização também pode ser descrita por causa da seletividade e permeabilização para cátions, sensibilidade ao ATP, modulação de prótons e propagação cinética (DING; SACHS, 1999; NORTH; SURPRENANT, 2000).

Componentes purinérgicos de potencial pós-sináptico excitatório rápido mediado por receptor P2X₂ são observados em neurônios entéricos do íleo e cólon, com maior proporção de transmissão purinérgica encontrada no íleo de cobaias. No íleo a transmissão sináptica purinérgica é rápida e está presente principalmente em vias descendentes, incluindo a transmissão para interneurônios e neurônios motores inibitórios (ROBERTS et al., 2012).

No SNE, Castelucci et al. (2002) demonstraram pela primeira vez que apenas 25% dos neurônios do plexo mioentérico do íleo de cobaias são imunorreativos para o receptor P2X₂; esta imunorreatividade foi observada em neurônios específicos, tais como neurônios motores inibitórios e IPANs no gânglio mioentérico imunorreativos à NOS e a calbindina. Outra subunidade localizada é o tipo P2X₃, tendo sido esta reportada em neurônios mioentéricos de cobaias (POOLE et al., 2002) e do cólon de humanos (YIANGOU et al., 2001); esta subunidade ocorre em associação com o P2X₂ nos gânglios da raiz dorsal, trigeminal, inferior do nervo vago e no SNE (CHEN et al., 1995; COLLO et al., 1996; LEWIS et al., 1995; XIANG; BURNSTOCK, 2004).

A imunorreatividade ao receptor purinérgico P2X₂ também foi observada por Castelucci, Robbins e Furness (2003), em terminações nervosas laminares intra-ganglionares (IGLEs) associados aos gânglios mioentéricos por todo o trato gastrointestinal de camundongos. As IGLEs são terminações mecano-sensoriais especializadas de neurônios aferentes do nervo vago que consiste em um grande número de lamelas semelhantes a pequenas placas. As IGLES têm origem de um simples axônio, interconectado com outro e formam uma cobertura descontínua de partes do gânglio entérico (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000; POWLEY et al., 1994; ZAGORODNYUK; BROOKES, 2000).

Estudos têm demonstrado alterações no código químico do receptor P2X₂ de animais desnutridos e renutridos no íleo (MISAWA et al., 2010) e cólon distal (GIROTTI et al., 2013), de camundongos obesos (MIZUNO et al., 2012), isquemia/reperfusão intestinal (BOBNA, 2011; PALOMBIT et al., 2013) e colite ulcerativa (DA SILVA, 2011).

O receptor P2X₇ é um membro da família P2X que possui várias características que o diferenciam de outros membros da família dos receptores P2X (KIM et al., 2001; STAGG; SMYTH 2010). A ativação do receptor homomérico requer concentrações de ATP que são

mais ou menos de 10-100 vezes maiores do que as necessárias para ativar os outros receptores P2X, sua ativação plena é atingida em concentrações de ordem milimolar de ATP (KIM et al., 2001; VERKHRATSKY et al., 2009). Além disso, este receptor possui uma cauda carboxi-terminal maior do que os outros P2X e uma série de polimorfismos (STAGG; SMYTH, 2010).

Baixas concentrações de ATP ativam os canais iônicos do receptor P2X₇ para tornar-se permeável aos íons de pequeno porte, enquanto que, quando exposto a altas concentrações de ATP ou, durante um longo período, pode ter seu canal iônico convertido em um grande poro transmembrana não-seletivo que permite a passagem não só de cátions, mas também de moléculas pequenas de até 900 daltons de tamanho, que em última análise, causa a morte celular (BURNSTOCK et al., 2006; STAGG; SMYTH, 2010).

Este receptor participa na regulação da permeabilidade celular, liberação das citocinas ou na apoptose. É expresso em células lineares hematopoiéticas, monócitos, macrófagos e na microglia. Inicia apoptose em vários tipos celulares que podem ser modificados durante a gravidez e o envelhecimento (COUTINHO-SILVA et al., 1999; SCHULZE-LOHOFF et al., 1998; SLATER; BARDEN; MURPH, 2000a, b). Além disso, está envolvido nas interações neuro-imunes e influencia na produção das citocinas (FERRARI et al., 2000; SOLLE et al., 2001). A ativação do receptor P2X₇ conduz a mudanças rápidas nas concentrações intracelulares de cálcio, liberação das citocinas pró-inflamatórias e interleucinas. Dados recentes sobre esse receptor sugerem também um papel específico em estados inflamatórios, neuropáticos da dor e na sinalização nociceptiva em estados crônicos da dor e seu potencial terapêutico (DONNELLY-ROBERTS et al., 2007).

As mudanças na expressão dos receptores purinérgicos P2X₁₋₇ são frequentemente observados nos diferentes tipos celulares e tecidos, não somente como uma consequência da maturação neuronal e diferenciação, mas também das várias condições patológicas como: após diferentes espécies de injúrias agudas no SNC. Os mecanismos purinérgicos podem estar envolvidos nas etiopatogênias de muitas condições neurodegenerativas, especialmente por causa da grande liberação extracelular de ATP, adenosina e outros neurotransmissores (BURNSTOCK et al., 2011; FRANKE et al., 2004; FRANKE; ILLES, 2006).

Com relação à marcação de receptores nas células gliais entéricas, foram observados em condições normais do intestino delgado e grosso de ratos e cobaias a presença de receptores purinérgicos P2X₇ e P2Y₄ (GULBRANSEN; SHARKEY, 2009; VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003; VAN NASSAUW et al., 2006)

e em condições experimentais como isquemia/reperfusão e colite ulcerativa foram observados a presença de receptores P2X₂ e P2X₇ (BOBNA, 2011; DA SILVA, 2011).

A presença de receptores purinérgicos em células gliais no SNA tem sido relatada anteriormente: o ATP afeta as células de Schwann no nervo vago isolado de ratos (IRNICH et al., 2001); os receptores P2X₇ funcionais estão presentes em culturas de células de Schwann de camundongos (COLOMAR; AMEDEE, 2001), e os resultados de Vanderwinden, Timmermans e Schiffmann (2003) foram os primeiros a mostrar a presença de um receptor purinérgico em células gliais entéricas. Estes autores demonstraram que cada célula glial imunorreativa a S100 identificada individualmente apresentou imunorreatividade para o receptor P2X₇.

A importância deste trabalho esta em contribuir de maneira original, para o entendimento dos efeitos da isquemia com diferentes períodos de reperfusão sobre as células gliais entéricas imunorreativas a S100 e GFAP e aos receptores P2X₂ e P2X₇.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito da isquemia e reperfusão intestinal sobre as células gliais entéricas e receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho visa analisar nos neurônios e células gliais entéricas do plexo mioentérico do íleo de animais submetidos à isquemia intestinal com diferentes períodos de reperfusão (0 hora, 24 horas e 14 dias):

- a) A distribuição e a expressão dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇;
- b) A dupla marcação do pan-neuronal Hu com os receptores P2X₂ e P2X₇;
- c) A dupla marcação de células gliais entéricas imunorreativas a S100 com os receptores P2X₂ e P2X₇;
- d) A tripla marcação de células gliais entéricas imunorreativas a S100 com GFAP e DAPI;
- e) A densidade das células imunorreativas aos receptores P2X₂ e P2X₇;
- f) A densidade dos neurônios imunorreativos ao Hu;
- g) A densidade das células gliais entéricas imunorreativas a S100 e GFAP;
- h) A área do perfil, diâmetro máximo e diâmetro mínimo, dos neurônios imunorreativos ao Hu e das células gliais entéricas imunorreativas a S100;
- i) A proliferação das células gliais entéricas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

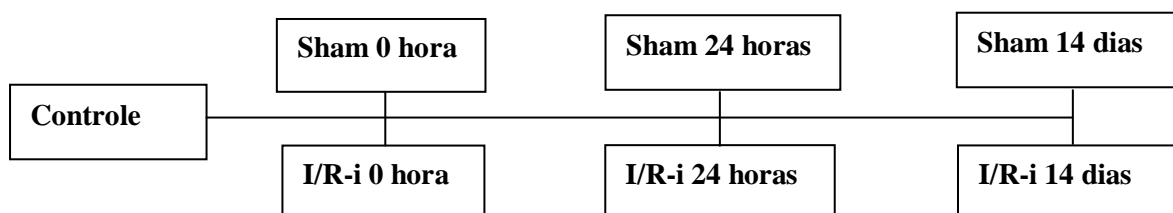
3.1 Animais

Foram utilizados 56 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, Wistar com idade de 2 meses e peso entre 250 e 300 g, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e alojados no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB-USP. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo de claro-escuro de 12 horas, sem restrições a água e alimentação.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com o protocolo n° 126/2010.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais:



Com relação às características dos grupos experimentais, o grupo Controle não sofreu nenhuma intervenção cirúrgica. Os grupos falsos operados (Sham) sofreram intervenção cirúrgica, porém não ocorreu a oclusão dos vasos ileais e, foram sacrificados após 0 hora (h), 24 horas (h) e 14 dias. Os grupos isquêmicos sofreram intervenção cirúrgica, com a oclusão dos vasos ileais por 35 minutos e foram sacrificados com os períodos de 0 h, 24 h e 14 dias de reperfusão.

Os períodos de reperfusão escolhidos são justificados da seguinte forma: o grupo I/R-i 0 h foi para verificar se somente a isquemia causaria lesões aos tecidos; o grupo I/R-i 24 h representa uma fase inicial de reperfusão e o grupo I/R-i 14 dias representa fase tardia de reperfusão.

Foram utilizados para a técnica de imunohistoquímica 5 animais/grupo e para a técnica de proliferação celular 3 animais/grupo.

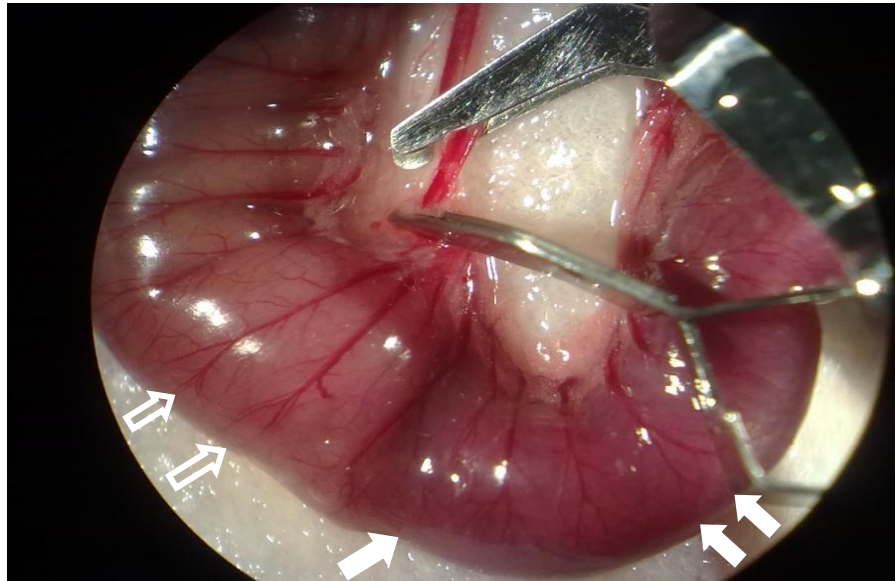
3.3 Indução da Isquemia/Reperusão – Intestinal (I/R-i)

Os ratos foram anestesiados via subcutânea, com uma mistura de xilazina (10 mg/Kg), cetamina (50 mg/Kg) e acepromazina (2 mg/Kg). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal numa prancha, com quatro alças elásticas que prenderam as porções distais dos membros anteriores e posteriores. Em seguida, os ratos foram submetidos à laparotomia mediana com exposição das alças intestinais. As alças da região do íleo distal (próxima ao ceco) foram exteriorizadas para o lado direito do corpo do animal, para realização da obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais (ramos da AMS) com cliques microcirúrgicos removíveis (Figura 6). Os cliques utilizados para a indução da isquemia intestinal são cliques de aço confeccionados manualmente, que são utilizados em cirurgias de vascularização.

A oclusão foi realizada pelo período de 35 minutos. Durante o período de isquemia, nas regiões expostas do intestino foi colocado Tampão Fosfato Salina (PBS 0,15M NaCl 0,01M tampão fosfato de sódio, pH 7,2) aquecido ($\pm 37^\circ\text{C}$) e em seguida as vísceras foram cobertas com plástico transparente, com objetivo de prevenir a perda de calor gerada pela exposição das alças (VON BAHTEN et al., 2006). Decorrido o tempo de isquemia, os cliques vasculares foram retirados e a reperusão estabelecida, neste momento foi possível observar que a cor do íleo voltou ao normal. Em seguida a incisão mediana foi fechada com sutura contínua, em dois planos, com fio de *nylon* monofilamentar ou de algodão. Durante os períodos de 24 h e 14 dias de reperusão, todos os animais foram acompanhados diariamente, e após, foram sacrificados com uma dose excessiva de anestésico.

Após a eutanásia dos animais, a cavidade abdominal foi aberta novamente, e o segmento da região do íleo distal que sofreu isquemia foi coletado. Nos animais dos grupos Controle e Sham segmentos similares foram coletados.

Figura 6 - Obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais.



Oclusão dos vasos ileais de rato por cliques vasculares. Setas simples indicam o local da isquemia. Setas vazadas indicam a área que não sofreu isquemia.

3.4 Preparação do Material para Imunohistoquímica

Os íleos foram obtidos de animais submetidos aos tratamentos descritos no item 3.3. Os segmentos do íleo foram colocados em PBS, foram limpos de seus conteúdos, abertos ao longo da borda mesentérica e colocados em balsas de madeira (9 cm de comprimento e 2 cm de largura) com a mucosa para baixo, e esticados por meio de alfinetes. Em seguida, foram imersos no fixador com 4% de paraformaldeído em 0.1M tampão fosfato de sódio, com pH 7,0 à 4 °C, durante uma noite. No dia seguinte, os tecidos foram retirados do fixador e clareados com 3 lavagens de 10 minutos cada, em dimetilsulfóxido, seguido por 3 lavagens de 10 minutos cada, em PBS. Após, os tecidos fixados foram armazenados em PBS contendo sódio-azida (0,1%), em 4 °C, para sua conservação.

3.5 Método de Duplas/Tripas Marcações com Imunofluorescência

Depois da fixação e o clareamento dos tecidos, com auxílio do Microscópio estereoscópico ZM800 Nikon, o íleo de cada animal foi seccionado em cerca de 1 cm² com uma lâmina de bisturi n.15, e utilizou-se para dissecação, uma placa de Petri para apoiar o tecido, duas pinças de ponta fina e um bisturi. Para a obtenção dos preparados de membrana, com auxílio da Lupa, os tecidos foram dissecados em camadas. A mucosa, a submucosa e a

camada muscular circular foram removidas, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico.

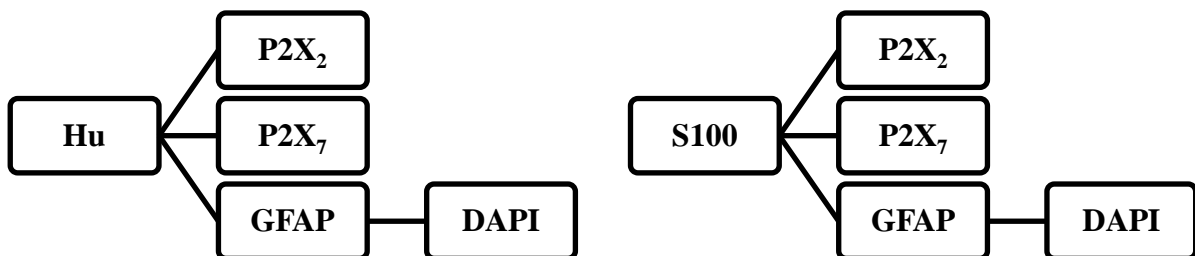
Antes das preparações serem incubadas em anticorpos primários, elas foram imersas em 10% de solução de soro normal de cavalo, 1,5% de Triton-X (Sigma) em PBS, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em anticorpos primários descritos na Tabela 1 e permaneceram por 48 h, à 4 °C. Passado o tempo de incubação, os preparados de membrana foram lavados em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada.

As duplas marcações foram obtidas, usando as combinações de anticorpos primários dos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇ com Hu (pan-neuronal, marcador de neurônios do plexo mioentérico) e S100 (marcador de células glias entéricas) (Tabela 1). Também, foram feitos experimentos de triplas marcações do anticorpo Hu com GFAP (marcador de células glias entéricas) e 4, 6-diamidino-2-fenilindole dicloridrato (DAPI) (marcador fluorescente de núcleo) e S100 com GFAP e DAPI. A utilização da marcação dos núcleos pelo DAPI foi necessária para distinguir o núcleo das células glias marcadas pelo GFAP (Figura 7).

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
Receptor P2X ₂	Coelho	1:120	Chemicon
Receptor P2X ₇	Coelho	1:250	Chemicon
S100	Camundongo	1:300	Chemicon
GFAP	Coelho	1:400	Abcam
Hu	Camundongo	1:100	Molecular probes

Figura 7 - Esquema das duplas e triplas marcações.



Após a incubação do anticorpo primário, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e em seguida incubados em anticorpos secundários, por uma hora, à temperatura ambiente (Tabela 2). Para finalizar, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e montados em lâmina com glicerol tamponado com 0.5M tampão carbonato de cálcio (pH 8,6).

Tabela 2 - Características dos anticorpos secundários.

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

Para a identificação do núcleo das células, após a incubação do anticorpo secundário, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e em seguida colocados em 15 µl de DAPI (Sigma 5 µg/ml) sobre cada preparado de membrana e incubado por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após, os tecidos foram lavados 3 vezes de 5 minutos cada, em PBS e montados em lâmina com glicerol tamponado com 0.5M tampão carbonato de cálcio (pH 8,6).

3.6 Método de Proliferação

O método de proliferação celular foi utilizado, devido os resultados obtidos após avaliar a densidade glial (glia/cm²) onde demonstraram aumento em sua densidade. Sendo assim, decidiu-se investigar se haveria proliferação celular destas células. Para tanto, foi realizado a técnica de proliferação usando o método EDU Click-iT (Invitrogen, USA). Foi injetado 50 mg/Kg via peritoneal do EDU Click-iT, em cada rato, 12 h antes da cirurgia de isquemia (CHEHREHASA et al., 2009). Nos animais Controle e Sham foram feitos os mesmos procedimentos.

Após o término do período de 0 h, 24 h e 14 dias de reperfusão, todos os animais foram sacrificados com uma dose excessiva de anestésico. O segmento da região do íleo distal que sofreu isquemia foi coletado conforme o item 3.4, porém não foram feitas 3 lavagens de dimetilsulfóxido.

Para a obtenção dos preparados de membrana, com auxílio da Lupa, os tecidos foram dissecados em camadas. A mucosa, a submucosa e a camada muscular circular foram removidas, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico.

Os preparados de membrana foram imersos em 10% de solução normal de cavalo, 1,5% triton-X (Sigma) em PBS, por 45 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram incubados conforme tabela 3 por 30 minutos, decorrido esse tempo, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e incubados novamente em 10% de solução normal de cavalo, 1,5% triton-X (Sigma) em PBS, por 45 minutos em temperatura ambiente. Após, foram incubados em anticorpos primários (Tabela 1) e permaneceram por 24 h à 4 °C.

Após a incubação do anticorpo primário, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e em seguida incubados em anticorpos secundários, por uma hora, à temperatura ambiente (Tabela 2). Após a incubação do anticorpo secundário, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e em seguida foi colocado 15 µl de DAPI (Sigma 5 µg/ml) sobre cada preparado de membrana e incubado por 5 minutos, à temperatura ambiente. Para finalizar, os tecidos foram lavados 3 vezes de 5 minutos cada, em PBS e montados em lâmina com glicerol tamponado com 0.5M tampão carbonato de cálcio (pH 8,6).

Tabela 3 - Componentes do EDU Click-iT.

Componentes do Coquetel	Quantidade Utilizada
1X Click-iT™	430 µl
CuSO ₄	20 µl
Alexia Fluor ^R azida	1,2 µl
Tampão de reação aditivo	50 µl

3.7 Métodos das Análises Qualitativas

As análises qualitativas das células imunorreativas (-IR) aos receptores P2X₂-IR, P2X₇-IR, ao Hu-IR e as células gliais entéricas imunorreativas (-IR) a S100-IR e GFAP-IR do plexo mioentérico, foram realizados em microscópio de fluorescência Nikon 80i, equipado com filtros para discriminar entre as fluorescências 488 (verde) e 594 (vermelho), acoplado ao analisador de imagem. Este microscópio de fluorescência utiliza o filtro 10 para 488 (450-490 nm de filtro de excitação e 515-565 nm para emissão), e filtro 00 para 594 (530-585 nm de filtro de excitação e 615 nm de filtro para emissão). As marcações com DAPI foram

analisadas no microscópio de fluorescência Nikon 80i com filtro UV. As imagens foram capturadas e analisadas pelo programa NIS Elements.

As preparações também foram analisadas pelo microscópio Confocal de Varredura à Laser do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do ICB/USP, o LSM 510 da Zeiss, equipado com três lasers; Argônio 458, 488 e 514 nm; Hélio/Neônio 543 nm e Hélio/Neônio 633 nm. O sistema tem um laser krypton/argon para visualização diferencial de fluoróforo usando 488 nm de filtro de excitação e 522/535 nm de filtro de emissão para 488 e 568 nm de filtro de excitação e 605/632 nm de filtro de emissão para 594. As imagens estão em 512x512 pixels em uma espessura de secção óptica de 0.5 mm e foram processadas usando os programas de software LSM 5.0 (Zeiss) Corel Phot Paint e Corel versão 11.

3.8 Métodos das Análises Quantitativas

3.8.1 Análise das Duplas/Triplas Marcações

As análises quantitativas foram feitas das células imunorreativas aos receptores P2X₂ e P2X₇, duplamente marcados com Hu e, das células gliais entéricas-IR aos receptores P2X₂ e P2X₇, duplamente marcados com S100. As análises de tripla marcação foram feitas das células gliais entéricas-IR a S100, GFAP e DAPI e dos neurônios Hu-IR, glia GFAP-IR e DAPI no plexo mioentérico.

As análises foram feitas através das duplas/triplas marcações dos preparados de membrana. Primeiro, as células foram localizadas pela presença do 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. No caso da tripla marcação foi utilizado o DAPI. Foram analisados 100 neurônios e 100 células gliais entéricas de cada preparado de membrana, de cada animal dos grupos Controle, Sham e I/R-i Os dados das duplas/triplas marcações são expressos com média \pm desvio padrão, n= número de preparações.

3.8.2 Análise da Densidade Neuronal e Glial

A obtenção das densidades das células (células/cm²) receptores P2X₂-IR, P2X₇-IR, dos neurônios Hu-IR (neurônios/cm²) e células gliais entéricas S100-IR, GFAP-IR (células gliais entéricas/cm²) foram feitas em aumento de 100X no microscópio de fluorescência Nikon 80i (área do campo microscópico 0,000379 cm²) acoplado com filtros para discriminar entre a

fluorescência 488 e Alexa 594. Foram feitas contagens do número de neurônios e células gliais entéricas em 40 campos, em dois preparados de membrana de cada um dos 5 animais, dos grupos Controle, Sham e I/R-i.

3.8.3 Análise Morfométrica

Para a obtenção da área do perfil do corpo celular (μm^2), diâmetro máximo (DMáx - μm) e diâmetro mínimo (DMín - μm), foram fotografados 100 neurônios imunorreativos ao Hu e 100 células gliais entéricas-IR a S100, de cada animal dos grupos Controle, Sham e I/R-i. As imagens foram obtidas pelo programa NIS Elements (Nikon) e as análises morfométricas foram feitas no programa Image-Pro Plus 4.1.0.0.

3.8.4 Análise de Proliferação Celular

As análises foram feitas através de duplas marcações dos preparados de membrana. Primeiro, as células foram localizadas pela presença do fluoróforo que marca um antígeno, então o filtro foi mudado para determinar se a célula glial entérica era ou não localizado por um segundo fluoróforo de diferente cor. Foram analisados 100 células de cada preparado de membrana, de cada animal dos grupos Controle, Sham e I/R-i. Os dados são expressos com média \pm desvio padrão, n= número de preparações.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos Controle, Sham e I/R-i e os diferentes períodos de reperfusão, verificando as variáveis das duplas/triplas marcações (%), densidades neuronais e de células gliais entéricas (cm^2), e área do perfil celular (μm^2).

Os dados foram comparados estatisticamente através da análise de variância Two-way Anova, tempo e tratamento, seguido pelo Teste de Tukey. Os testes foram realizados com nível de significância $p < 0,05$.

4.1 Observações Gerais

Durante o período de oclusão de 35 minutos, a região intestinal desprovida de fluxo sanguíneo mudou de cor e tornou-se vermelho escuro. Ao ser restabelecido o fluxo sanguíneo, o tecido retomou a sua coloração original. Após a cirurgia os animais foram acompanhados diariamente e retornaram a atividade normal. As regiões do íleo submetidas à isquemia e reperfusão demonstraram aparência normal na análise macroscópica.

4.2 Análises dos Pesos dos Animais

Os ratos submetidos à isquemia intestinal não demonstraram diferenças de peso corporal antes da cirurgia e após os períodos de reperfusão, quando comparados aos seus respectivos grupos Sham (Tabela 4).

Tabela 4 - Peso dos animais (antes da cirurgia e após reperfusão).

<i>Grupos</i>	<i>Controle</i>	<i>Sham</i>		<i>Isquêmico</i>	
		<i>Antes/Cirurgia</i>	<i>Pós/reperfusão</i>	<i>Antes/Cirurgia</i>	<i>Pós/reperfusão</i>
Controle	266,8±11,7 g	-	-	-	-
0 h	-	277,4±11,7 g	277,4±11,7 g	282,3±9,4 g	282,3±9,4 g
24 h	-	284,0±11,8 g	267,6±13,2 g	291,5±32,0 g	283,1±34,0 g
14 dias	-	262,5±38,0 g	302,4±18,4 g	247,8±14,0 g	288,9±19,0 g

Os dados são de n=5 e expressos em Média±desvio padrão.

4.3 Análises Qualitativas da Imunorreatividade dos Receptores P2X₂ e P2X₇, Hu, S100 e GFAP do Plexo Mioentérico

De maneira geral, a imunomarcção dos receptores P2X₂ e P2X₇ foi observada nos neurônios Hu-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Controle, Sham, I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias (Figuras 8, 9 e 10).

Nos gânglios mioentéricos foram observados neurônios Hu-IR, com marcação no citoplasma e nos núcleos. Esta imunomarcção evidenciou neurônios de diversos tamanhos. Houve dupla marcação dos neurônios Hu-IR com os receptores P2X₂ e P2X₇, no entanto, houve presença de células imunorreativas somente aos receptores que não colocalizam com neurônios Hu-IR (Figuras 9 e 10).

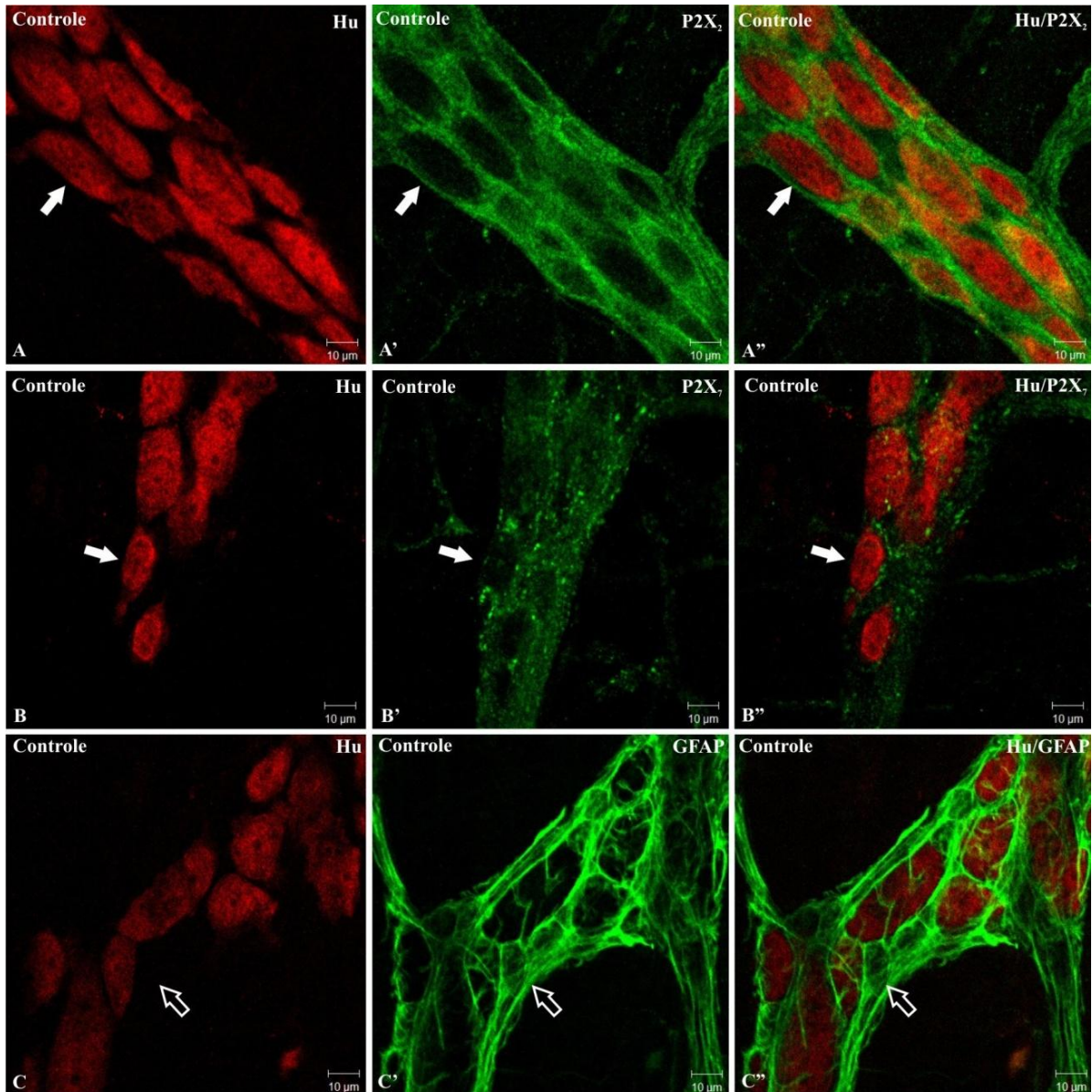
Devido a este resultado, foi investigada a dupla marcação desses receptores com as células gliais entéricas, utilizando o marcador S100 (marcador de células gliais entéricas). Ao realizar dupla marcação dos receptores P2X₂ e P2X₇ com S100, confirmou-se que as células gliais entéricas-IR a S100 expressam receptores purinérgicos. Algumas células dos grupos I/R-i pareceram ter aumentada a intensidade da marcação de S100 (Figuras 11, 12 e 13).

Nas figuras 14 e 15 observa-se tripla marcação de S100/GFAP/DAPI, nesta análise há presença de células gliais entéricas GFAP-IR, que não eram S100-IR, sugerindo que células gliais entéricas poderiam ter fenótipos diferentes. As células gliais entéricas S100-IR estavam presentes nos gânglios entéricos, tendo marcação no citoplasma e no núcleo.

Nas figuras 16 e 17 visualizam-se as triplas marcações de Hu/GFAP/DAPI, onde se observa que não há colocalização dos neurônios Hu-IR com GFAP e, positivas ao DAPI. A marcação de GFAP estava presente nas células gliais entéricas, sendo que nos grupos I/R-i possivelmente há aumento dos prolongamentos GFAP-IR.

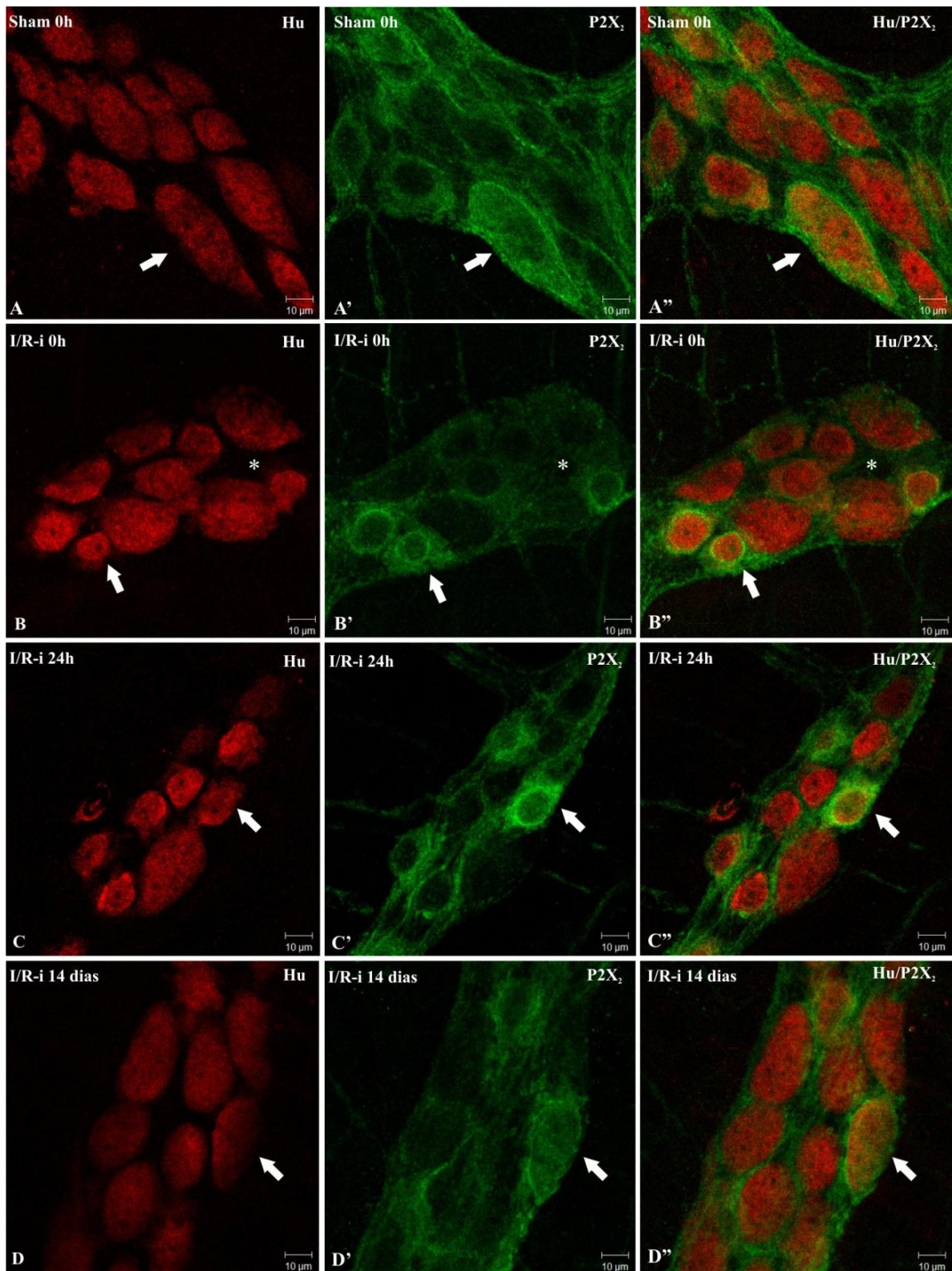
A marcação de proliferação com EDU demonstrou que nos grupos Controle e Sham não há proliferação celular, no entanto nos grupos I/R-i 0 h e 24 h algumas células gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR são positivas para o EDU, isto pode indicar proliferação de células gliais entéricas (Figura 18, 19 e 20).

Figura 8 - Dupla marcação de neurônios Hu-IR, ao receptor P2X₂-IR, ao receptor P2X₇-IR e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle.



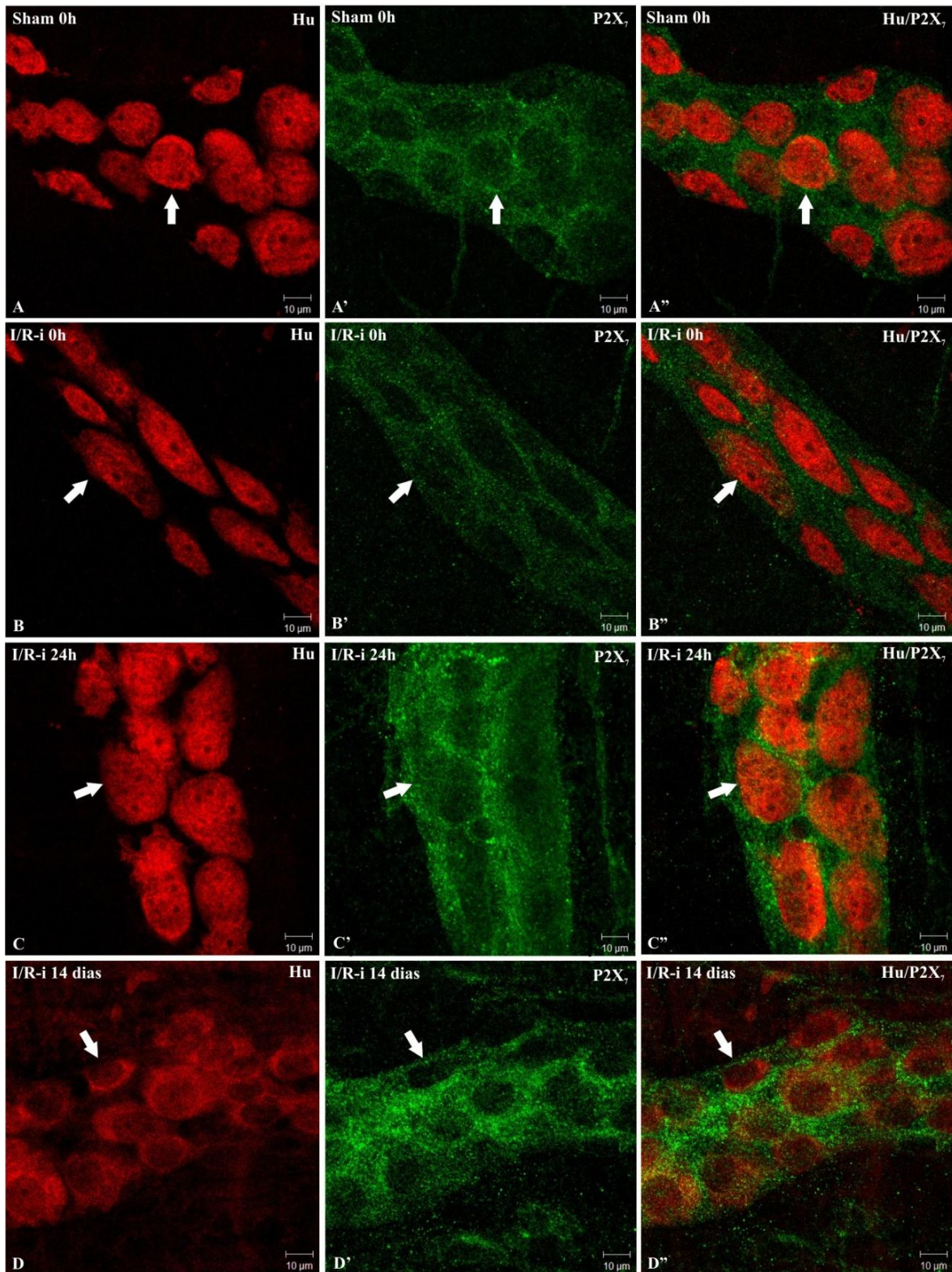
Neurônios imunorreativos ao Hu (A-C), ao receptor P2X₂ (A'-A''), ao receptor P2X₇ (B'-B'') e células gliais entéricas imunorreativas a GFAP (C'-C'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle. Setas simples indicam dupla marcação de Hu com os receptores P2X₂ e P2X₇. Setas vazadas indicam neurônios imunorreativos ao Hu que não colocalizam com células gliais entéricas imunorreativas a GFAP (Barra: 10 µm).

Figura 9 - Dupla marcação de neurônios Hu-IR e receptor P2X₂-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



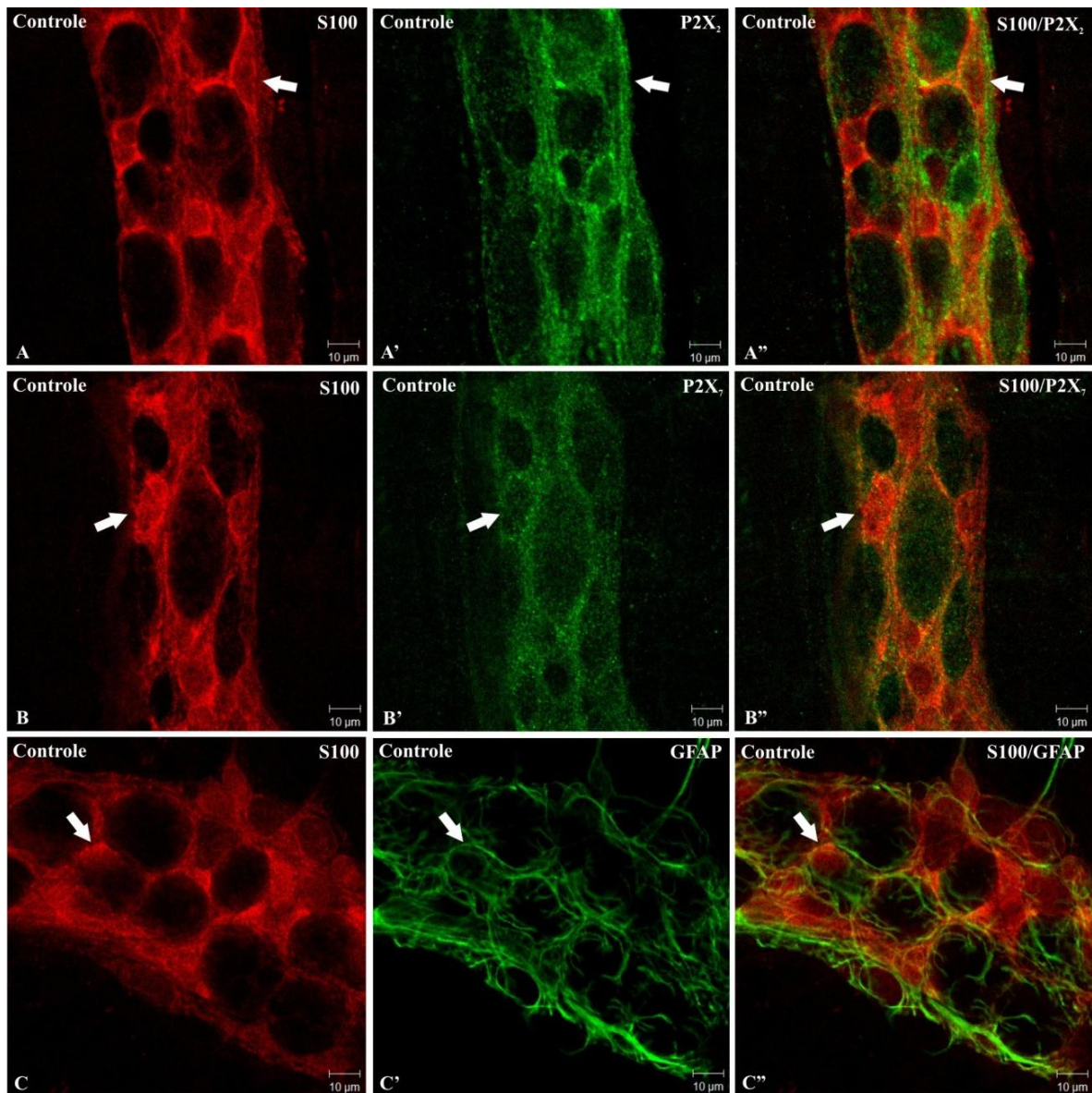
Neurônios imunorreativos ao Hu (A-D), células imunorreativas ao receptor P2X₂ (A'-D') e A''-D'' dupla marcação de neurônios e receptores no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao Hu e P2X₂; *indica receptor P2X₂ que não é imunorreativo ao Hu (Barra: 10 μm).

Figura 10 - Dupla Marcação de neurônios Hu-IR e receptor P2X₇-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



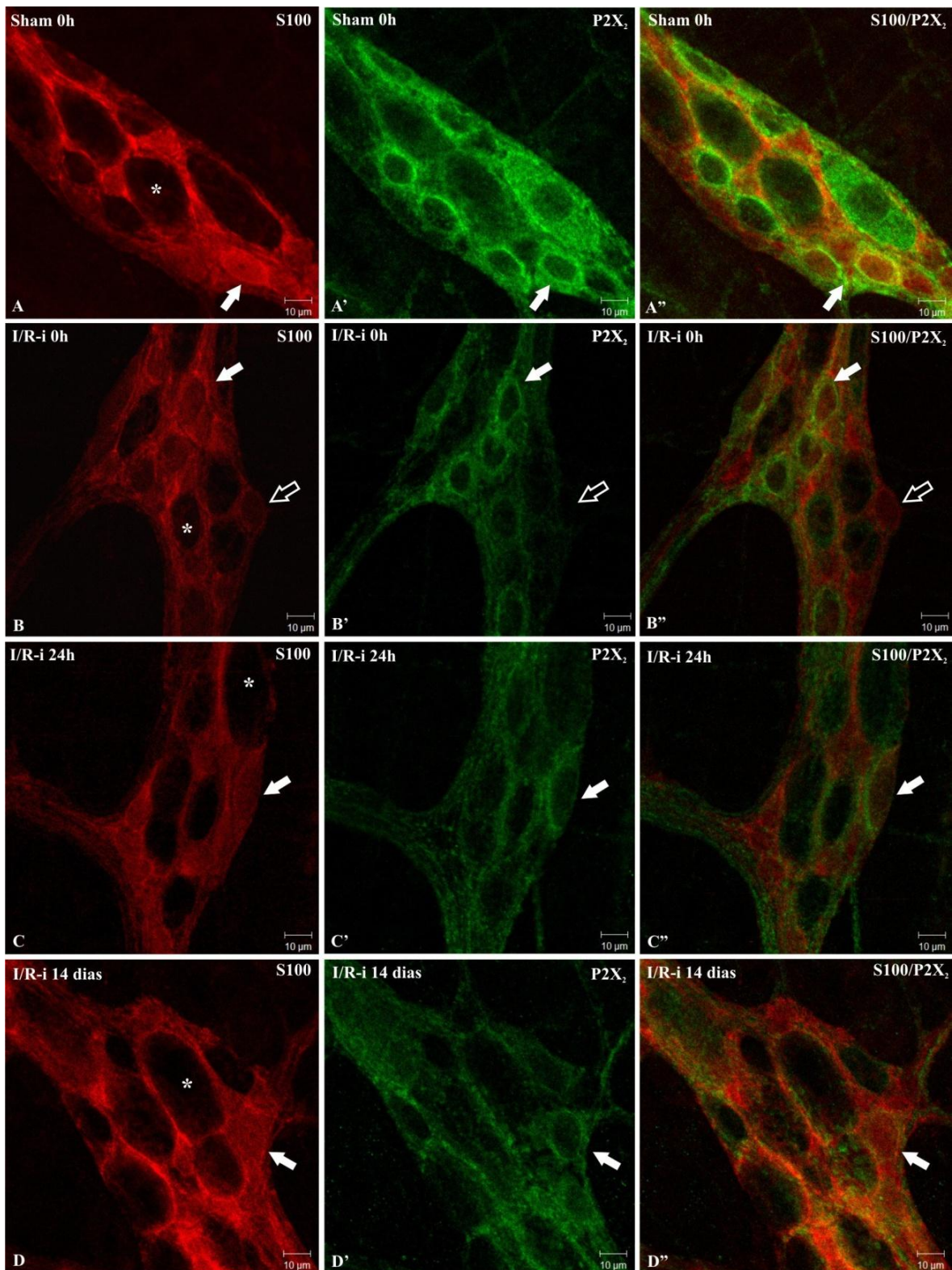
Neurônios imunorreativos ao Hu (A-D), células imunorreativas ao receptor P2X₇ (A'-D') e A''-D'' dupla marcação de neurônios e receptores no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao Hu e P2X₇ (Barra:10 μm).

Figura 11 - Dupla marcação de células glias entéricas S100-IR, receptores P2X₂-IR, P2X₇-IR e GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle.



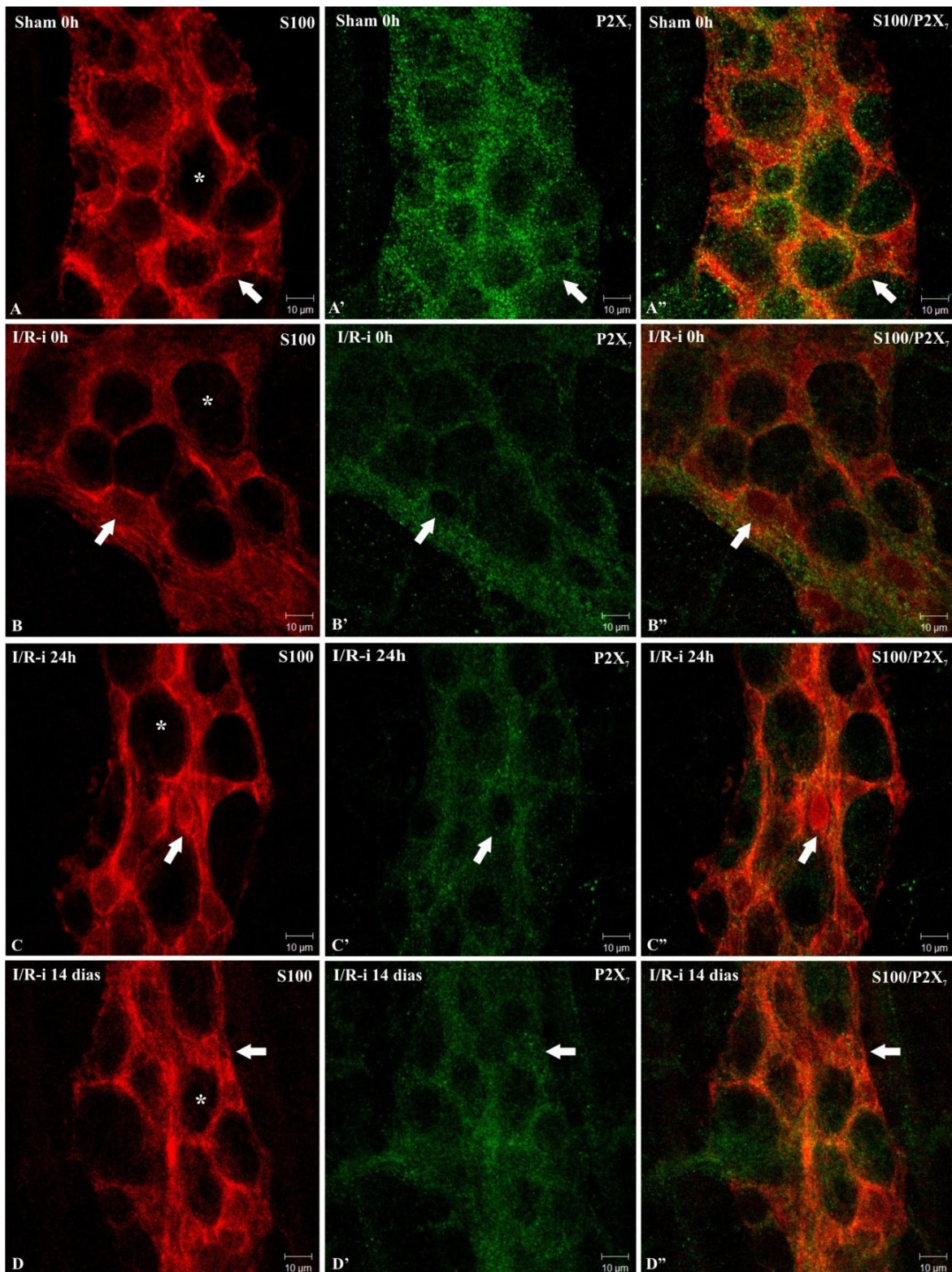
Células glias entéricas imunorreativas a S100 (A-C), ao receptor P2X₂ (A'-A''), ao receptor P2X₇ (B'-B'') e a GFAP (C'-C'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle. Setas simples indicam dupla marcação (Barra:10 μ m).

Figura 12- Dupla marcação de células glias entéricas S100-IR e receptor P2X₂-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



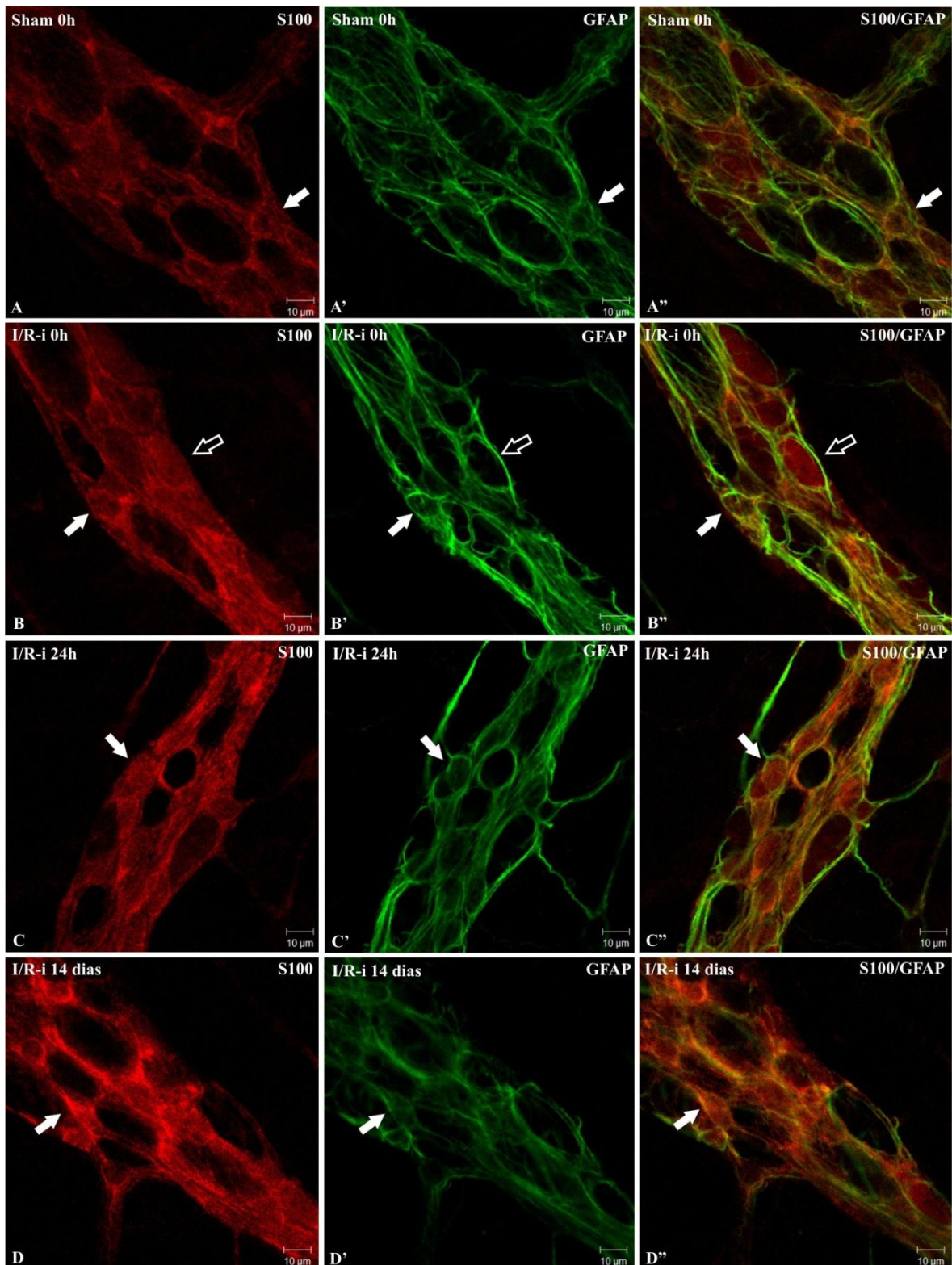
Células glias entéricas imunorreativas a S100 (A-D) e ao receptor P2X₂ (A'-D') do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam dupla marcação das células glias entéricas com receptor P2X₂, *indicam a localização dos neurônios entéricos. Setas vazadas indicam células glias entéricas imunorreativas somente a S100 (Barra: 10 µm).

Figura 13 - Dupla marcação de células glias entéricas S100-IR e receptor P2X₇-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



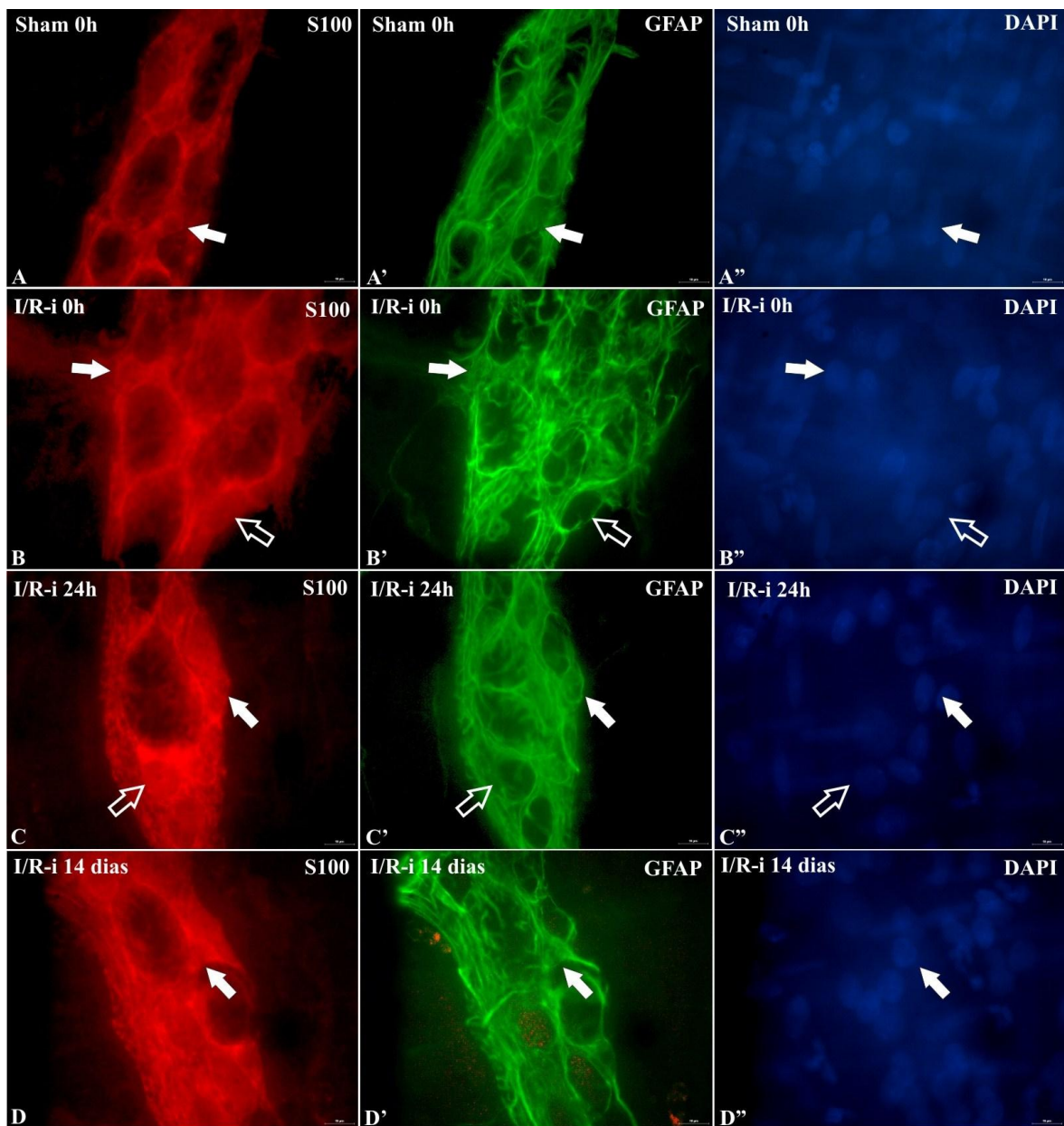
Células glias entéricas imunorreativas a S100 (A-D) e ao receptor P2X₇ (A'-D') do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam dupla marcação das células glias entéricas imunorreativas ao receptor P2X₇, *indicam a localização dos neurônios entéricos. (Barra: 10 μm).

Figura 14 - Dupla marcação de células glias entéricas S100-IR e GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



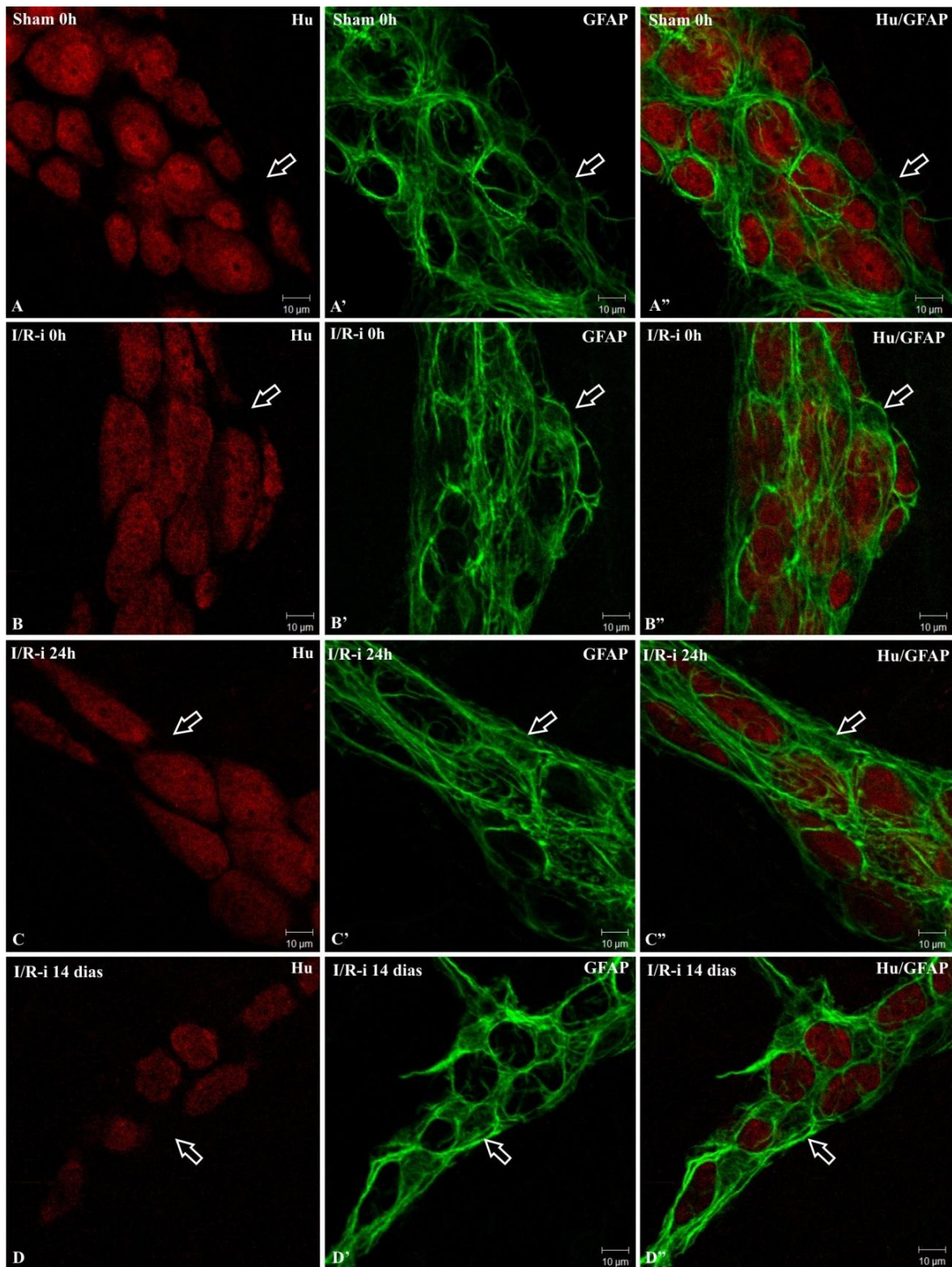
Células glias entéricas imunorreativas a S100 (A-D) e a GFAP (A'-D') no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam dupla marcação das células glias entéricas imunorreativas a S100 e GFAP. Setas vazadas indicam células glias entéricas imunorreativas somente a S100 (Barra: 10 μm).

Figura 15 - Tripla Marcação de células glias entéricas S100-IR, GFAP-IR e DAPI no plexo mioentérico do íleo de ratos.



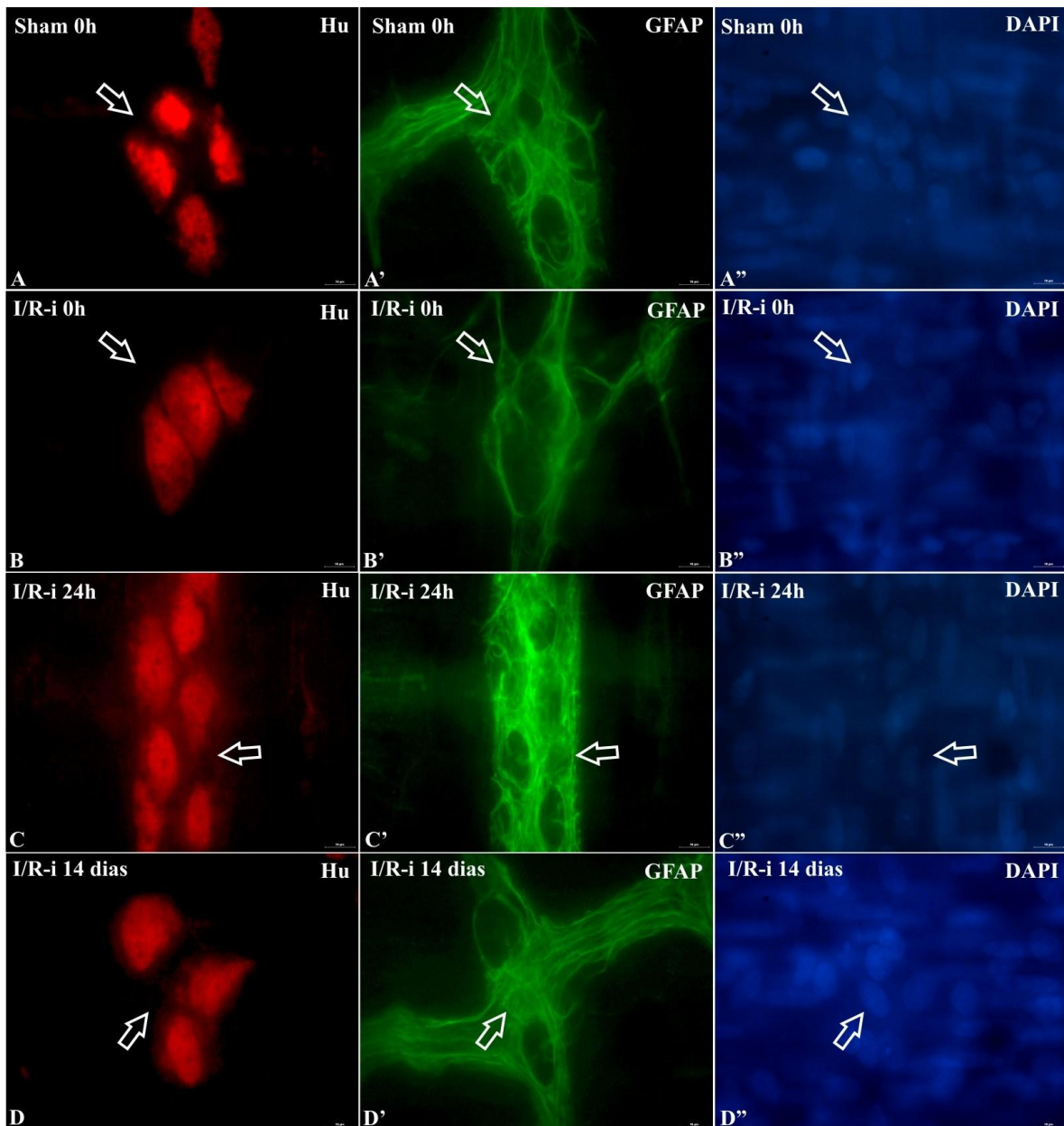
Células glias entéricas imunorreativas a S100 (A-D), GFAP (A'-D') e núcleos positivos ao DAPI (A''-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam marcação das células glias entéricas imunorreativas a S100, GFAP e DAPI. Setas vazadas indicam células glias entéricas imunorreativas somente a S100/DAPI (Barra:10 μ m).

Figura 16 - Marcação de neurônios Hu-IR e células glias entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



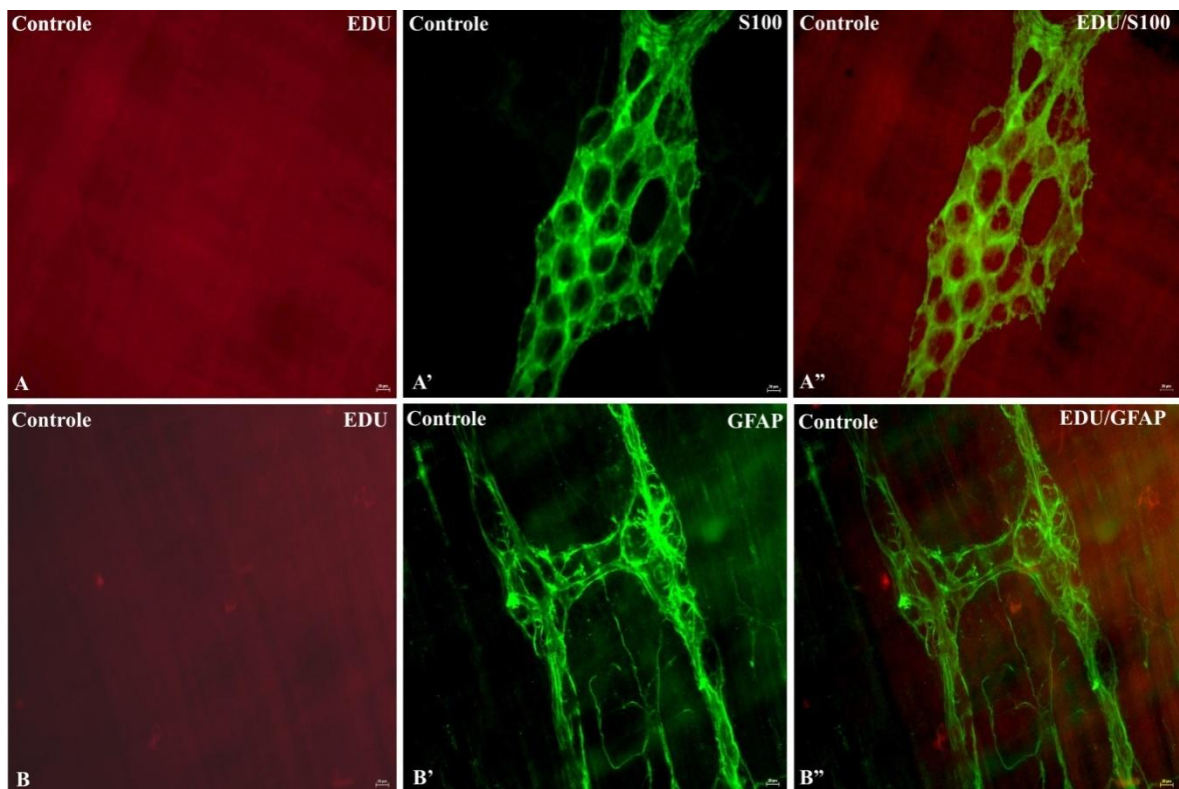
Neurônios imunorreativos ao Hu (A-D), células glias entéricas imunorreativas a GFAP (A'-D') e A''-D'' colocalização das fotos A-D' do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas vazadas indicam neurônios imunorreativos ao Hu que não colocalizam com células glias entéricas imunorreativas a GFAP (Barra: 10 μm).

Figura 17 - Marcação de neurônios Hu-IR, células glias entéricas GFAP-IR e DAPI no plexo mioentérico do íleo de ratos.



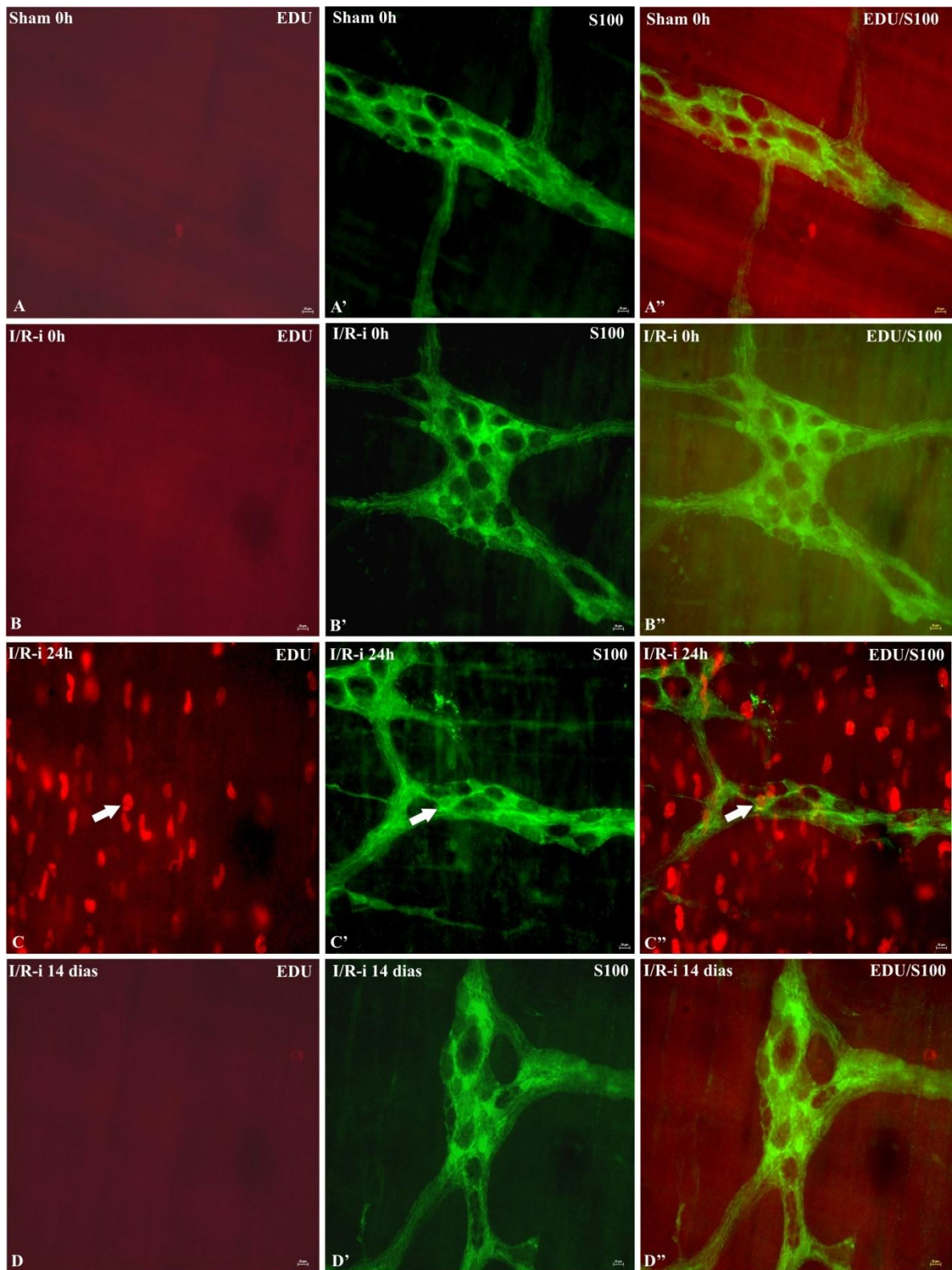
Neurônios imunorreativos ao Hu (A-D), células glias entéricas imunorreativas a GFAP (A'-D') e núcleos positivos ao DAPI (A''-D'') do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 0 h (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas vazadas indicam neurônios imunorreativos ao Hu, que não colocalizam com células glias entéricas imunorreativas a GFAP (Barra: 10 μ m).

Figura 18 - Marcação de proliferação celular pelo EDU Click-iT no plexo mioentérico do íleo de ratos Controle.



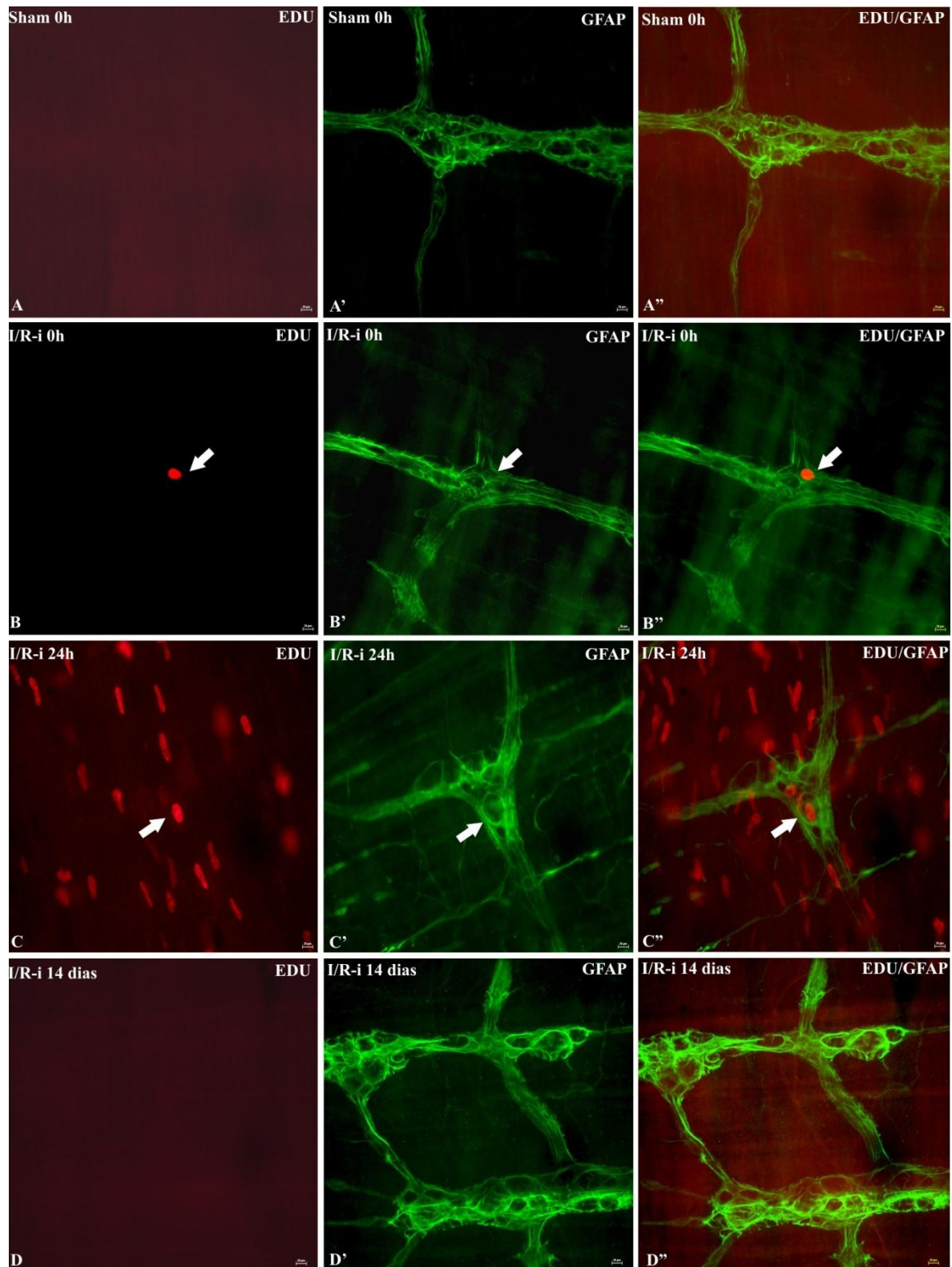
Marcação de EDU (A-B), células glias entéricas imunorreativas a S100 (A') e GFAP (B'). A''-B'' demonstra colocalização das fotos A-B' do plexo mioentérico do íleo de rato do grupo Controle. No grupo Controle não há células positivas para EDU (A-B), portanto não há proliferação de células glias entéricas imunorreativas a S100 (A') e GFAP (B') (Barra: 20 μ m).

Figura 19 - Marcação de proliferação celular pelo EDU Click-iT e células glias entéricas S100-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Marcação de EDU (A-D), células glias entéricas imunorreativas a S100 (A'-D') e A''-D'' demonstra colocalização das fotos A-D' do plexo mioentérico do íleo de rato dos grupos Sham 0 h, (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam colocalização de células glias entéricas com núcleo positivo ao EDU, o que indica proliferação de células glias entéricas (Barra:20 µm).

Figura 20 - Marcação de proliferação celular pelo EDU Click-iT e células glias entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Marcação de EDU (A-D), células glias entéricas imunorreativas a GFAP (A'-D') e A''-D'' demonstra colocalização das fotos A-D' do plexo mioentérico do íleo de rato dos grupos Sham 0 h, (A-A''), I/R-i 0 h (B-B''), I/R-i 24 h (C-C'') e I/R-i 14 dias (D-D''). Setas simples indicam colocalização de células glias entéricas com núcleo positivo ao EDU, o que indica proliferação de células glias entéricas (Barra:20 μ m).

4.4 Análises Quantitativas das Duplas/Triplas Marcações, Densidades, e Morfometria das Células Imunorreativas aos Receptores P2X₂ e P2X₇, Hu, S100 e GFAP

4.4.1 Duplas Marcações

4.4.1.1 Dupla Marcação dos Receptores P2X₂ e P2X₇ com Neurônios Hu-IR

Foram realizadas análises das duplas marcações dos neurônios Hu-IR com os receptores P2X₂ e P2X₇, no íleo dos animais Controle, Sham e submetidos à isquemia intestinal, com períodos de 0 h, 24 h e 14 dias de reperfusão. Os resultados são demonstrados nas tabelas 5 e 6.

As duplas marcações dos neurônios Hu-IR e receptor P2X₂-IR apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 12%, 8% e 8% nos grupos Sham de 0 h, 24 h e 14 dias respectivamente, quando comparados ao grupo Controle (Tabela 5).

Os grupos I/R-i 0 h, I/R-i 24 h e I/R-i 14 dias apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) de 8%, 11% e 4% respectivamente quando comparados aos seus respectivos grupos Sham (Tabela 5).

Considerando o fator tempo o grupo 24 h apresentou um aumento ($p < 0,05$) de 10% quando comparado ao grupo 0 h (Tabela 5). Ao analisar o receptor P2X₂ nos neurônios, observou-se que houve um aumento de 4% dos grupos Sham de 24 h e 14 dias respectivamente, quando comparado ao grupo Controle (Tabela 5). A análise comparativa entre os grupos Sham e Isquêmico, e entre os diferentes períodos de reperfusão, não mostrou diferenças significativas nas duplas marcações do receptor P2X₂ com Hu (Tabela 5).

Tabela 5 - Dupla marcação dos neurônios Hu-IR e receptor P2X₂-IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h 24 h e 14 dias.

Grupos	Hu/P2X ₂	Hu/-	P2X ₂ /Hu	P2X ₂ /-
Controle	75,8±3,8%	24,2±3,8%	87,9±1,3%	12,1±1,3%
Sham 0 h	67,0±4,7% ^π	33,0±4,7%	90,6±0,4%	9,3±0,4%
I/R-i 0 h	72,2±4,3% ^{**}	27,8±4,3%	91,0±1,0%	9,0±1,0%
Sham 24 h	69,7±1,6% ^π	30,3±1,6%	91,5±1,8% ^π	8,5±1,8 %
I/R-i 24 h	77,2±1,9% ^{**}	22,8±1,9%	88,9±1,5%	11,1±1,5%
Sham 14 dias	70,0±2,0% ^π	30,0±2,0%	91,4±2,0% ^π	8,6±2,0%
I/R-i 14 dias	72,8±1,9% ^{**}	27,2±1,9%	90,4±1,8%	9,6±1,8%

Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (^π comparação entre grupos Controle e Sham $p < 0,05$; ^{**} comparação entre grupos Sham e I/R-i $p < 0,001$).

As duplas marcações dos neurônios Hu-IR e receptor P2X₇-IR foram de 100% em todos os grupos estudados (Tabela 6).

Na Tabela 6, a análise inversa das duplas marcações do receptor P2X₇ com Hu, demonstra que nos grupos Controle e Sham de 0 h, 24 h e 14 dias, os valores são de 83,8±1,9%, 84,4±3,0%, 85,8±3,0% e 84,8±2,2%, respectivamente ($p>0,05$); e nos grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias, os valores são de 83,2±3,7%, 83,4±3,3% e 85,0±2,2%, respectivamente ($p>0,05$) (Tabela 6).

Esses resultados de dupla marcação não apresentaram diferença significativa entre os grupos Controle, Sham e I/R-i com diferentes períodos de reperfusão.

Tabela 6 - Dupla marcação dos neurônios Hu-IR e receptor P2X₇-IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.

Grupos	Hu/P2X ₇	Hu/-	P2X ₇ /Hu	P2X ₇ /-
Controle	100%	0%	83,8±1,9%	16,2±1,9%
Sham 0 h	100%	0%	84,4±3,0%	15,6±3,0%
I/R-i 0 h	100%	0%	83,2±3,7%	16,8±3,7%
Sham 24 h	100%	0%	85,8±3,0%	14,2±3,0 %
I/R-i 24 h	100%	0%	83,4±3,3%	16,6±3,3%
Sham 14 dias	100%	0%	84,8±2,2%	15,2±2,2%
I/R-i 14 dias	100%	0%	85,0±2,2%	15,0±2,2%

Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão.

4.4.1.2 Dupla Marcação dos Receptores P2X₂ e P2X₇ com Células Gliais Entéricas Imunorreativas a S100

Foi realizado o estudo de dupla marcação das células gliais entéricas S100-IR com os receptores P2X₂ e P2X₇ no íleo dos grupos Controle, Sham e I/R-i, nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias de reperfusão. Os resultados são demonstrados nas tabelas 7 e 8.

As duplas marcações das células gliais entéricas S100-IR com o receptor P2X₂ apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,05$) de 15%, 18% e 16% nos grupos Sham de 0 h, 24 h e 14 dias, respectivamente, quando comparados ao grupo Controle (Tabela 7). Considerando o fator grupo (Sham X Isquêmico), somente o grupo 0 h apresentou diferença significativa, com diminuição de 15% do grupo I/R-i ao ser comparado com o seu respectivo

Sham ($p<0,05$). Esses resultados indicam efeito de interação entre Tempo x Tratamento (Tabela 7).

Ao realizar a análise inversa, a dupla marcação do receptor P2X₂-IR nas células glias entéricas S100-IR, apresentou diminuição significativa nos grupos Sham de 18% (0 h), 22% (24 h) e 19% (14 dias), quando comparado ao grupo Controle ($p<0,05$) (Tabela 7). Os grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias apresentaram um aumento significativo de 21%, 17% e 9%, respectivamente, quando comparado aos seus respectivos Sham ($p<0,05$). Porém, não foi observada diferença significativa no fator tempo e efeito de interação (Tabela 7).

Tabela 7 - Dupla marcação das células glias entéricas S100-IR e receptor P2X₂-IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.

Grupos	S100/P2X ₂	S100/-	P2X ₂ /S100	P2X ₂ /-
Controle	87,8±1,7%	12,2±1,7%	38,2±3,0%	61,8±3,0%
Sham 0 h	74,4±2,8% ^π	25,5±2,8%	31,3±1,6% ^π	68,7±1,6%
I/R-i 0 h	62,8±2,8% [*]	37,2±2,8%	37,8±1,5% [*]	62,2±1,5%
Sham 24 h	72,2±3,9% ^π	27,8±3,9%	29,6±4,2% ^π	70,4±4,2%
I/R-i 24 h	69,2±1,6%	30,8±1,6%	34,7±5,2% [*]	65,3±5,2%
Sham 14 dias	73,5±4,5% ^π	26,5±4,5%	30,8±2,8% ^π	69,2±2,8%
I/R-i 14 dias	67,9±4,8%	32,1±4,8%	33,6±3,4% [*]	66,4±3,4%

Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (^π comparação entre grupos Controle e Sham $p<0,05$; ^{*} comparação entre grupos Sham e I/R-i $p<0,05$).

As células glias entéricas S100-IR foram 100% imunorreativas ao receptor P2X₇ nos grupos estudados (Tabela 8). A análise inversa do receptor P2X₇ nas células glias entéricas, demonstrou uma diminuição significativa, nos grupos Sham de 0 h (3%), 24 h (16%) e 14 dias (14%), quando comparado ao grupo Controle ($p<0,001$) (Tabela 8). Os grupos I/R-i de 0 h, 24 h e 14 dias apresentaram um aumento significativo de 6%, 10% e 12% respectivamente, quando comparado com os respectivos Sham ($p<0,001$) (Tabela 8).

Considerando o fator tempo, o grupo de 0 h apresentou um aumento significativo ($p<0,001$) de 12% e 9% quando comparado com os grupos 24 h e 14 dias respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Dupla marcação das células gliais entéricas S100-IR e receptor P2X₇-IR, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.

Grupos	S100/P2X ₇	S100/-	P2X ₇ /S100	P2X ₇ /-
Controle	100%	0%	38,8±1,5%	61,2±1,5%
Sham 0 h	100%	0%	37,6±2,1% [#]	62,4±2,1%
I/R-i 0 h	100%	0%	40,0±1,6% ^{**}	60,0±1,6%
Sham 24 h	100%	0%	32,3±1,3% [#]	67,7±1,3%
I/R-i 24 h	100%	0%	35,7±1,6% ^{**}	64,3±1,6%
Sham 14 dias	100%	0%	33,4±1,4% [#]	66,6±1,4%
I/R-i 14 dias	100%	0%	37,5±1,8% ^{**}	62,5±1,8%

Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. ([#] comparação entre grupos Controle e Sham $p<0,001$; ^{**} comparação entre grupos Sham e I/R-i $p<0,001$).

4.4.1.3 Tripla marcação de Células Gliais Entéricas Imunorreativas a S100, GFAP e DAPI

Foram realizadas análises das marcações de S100, GFAP e DAPI, no íleo dos animais dos grupos Controle, Sham e submetidos à isquemia intestinal, com períodos de 0 h, 24 h e 14 dias de reperfusão. Os resultados são demonstrados na tabela 9.

As células gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR foram de 71,9±1,9% (grupo Controle) e com média de 72% (grupos Sham de 0 h, 24 h e 14 dias), $p>0,05$ (Tabela 9).

Considerado fator grupo (Sham X Isquêmico), não houve diferença significativa. No entanto, em relação ao fator tempo, os grupos I/R-i 24 h e I/R-i 14 dias apresentaram diminuição significativa ($p<0,05$) de 8% e 6% respectivamente, quando comparados ao grupo I/R-i 0 h. Esses resultados mostram efeito de interação Tratamento x Tempo (Tabela 9).

Ao analisar inversamente células gliais entéricas GFAP-IR e S100-IR, observou-se aumento significativo nos grupos Sham de 24 h e 14 dias de 4% respectivamente quando comparados ao grupo Controle ($p<0,05$) (Tabela 9).

Considerando os fatores grupo (Sham X Isquêmico) e tempo não foi detectada diferença significativa.

Tabela 9 - Marcação de células glias entéricas S100-IR, GFAP-IR e marcadas para o DAPI, nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>S100/GFAP/DAPI</i>	<i>S100/-</i>	<i>GFAP/S100/DAPI</i>	<i>GFAP/-</i>
Controle	71,9±1,9%	28,1±1,9%	67,7±1,5%	32,3±1,5%
Sham 0 h	72,4±2,3%	27,6±2,3%	69,0±1,0%	31,0±1,0%
I/R-i 0 h	75,2±1,9%	24,8±1,9%	70,2±1,5%	29,8±1,5%
Sham 24 h	72,3±1,5%	27,7±1,5%	70,8±2,5%*	29,2±2,5%
I/R-i 24 h	69,5±1,7%	30,5±1,7%	69,8±3,3%	30,2±3,3%
Sham 14 dias	72,5±1,5%	27,5±1,5%	70,9±2,2%*	29,1±2,2%
I/R-i 14 dias	70,7±1,9%	29,3±1,9%	70,5±1,8%	29,5±1,8%

Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (*comparação entre grupos Controle e Sham $p<0,05$).

4.4.1.4 Marcação de Células Glias Entéricas (GFAP), Neurônios (Hu) e DAPI

Foram realizadas análises das marcações de Hu, GFAP e DAPI, na porção do íleo dos animais dos grupos Controle, Sham e submetidos à isquemia intestinal, com períodos de 0 h, 24 h e 14 dias de reperusão. Os resultados são demonstrados na tabela 10.

A marcação do Hu com GFAP e DAPI, demonstrou que 100% dos neurônios não eram imunorreativos a GFAP, ou seja, neurônio não colocalizou com células glias entéricas. Inversamente pode-se observar que 100% das células glias entéricas GFAP-IR não colocalizam com Hu, mas foram positivas para o DAPI (Tabela 10).

Tabela 10 - Marcação dos neurônios (Hu), células glias entéricas (GFAP) e núcleo (DAPI), nos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>Hu/GFAP/DAPI</i>	<i>Hu/-</i>	<i>GFAP/Hu/DAPI</i>	<i>GFAP/-</i>
Controle	0%	100%	0%	100%
Sham 0 h	0%	100%	0%	100%
I/R-i 0 h	0%	100%	0%	100%
Sham 24 h	0%	100%	0%	100%
I/R-i 24 h	0%	100%	0%	100%
Sham 14 dias	0%	100%	0%	100%
I/R-i 14 dias	0%	100%	0%	100%

Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão.

4.4.2 Densidade Neuronal e Glial

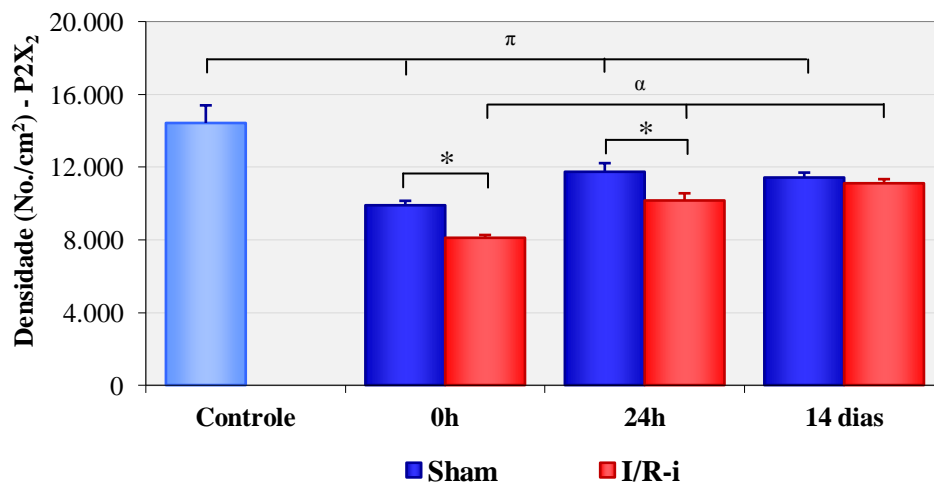
A densidade neuronal ou glial (células/cm²) foi obtida a partir da contagem de células imunorreativas aos receptores P2X₂ e P2X₇, Hu, S100 e GFAP em 40 campos (área do campo microscópico 0,000379 cm²) com o aumento de 100X.

4.4.2.1 Receptor P2X₂

A densidade das células imunorreativas ao receptor P2X₂ dos grupos Sham com 0 h, 24 h e 14 dias apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) de 31%, 19% e 21% respectivamente, quando comparados ao grupo Controle (Figura 21).

Os grupos I/R-i 0 h e 24 h apresentaram uma diminuição significativa de 18% e 13% respectivamente, quando comparados aos seus respectivos grupos Sham ($p<0,05$). O grupo I/R-i 14 dias não apresentou diferença significativa quando comparado ao seu grupo Sham (Figura 21). Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre os grupos Sham e I/R-i. Com os resultados descritos acima, pode-se observar que houve diferença significativa ($p<0,05$) no fator grupo (Sham X Isquêmico). Considerando o fator tempo, observou-se que o grupo I/R-i 0 h apresentou uma diminuição significativa de 11% e 15% quando comparado com os grupos I/R-i de 24 h e 14 dias respectivamente ($p<0,05$). Esses resultados indicam interação entre Tempo X Tratamento (Figura 21).

Figura 21 - Densidade das células imunorreativas ao receptor P2X₂ dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



Os dados são de $n=5$ e expressos em Média \pm desvio padrão. (π comparação entre grupos Controle e Sham $p<0,05$; * comparação entre grupos Sham e I/R-i $p<0,05$; α comparação entre grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias com relação ao tempo $p<0,05$).

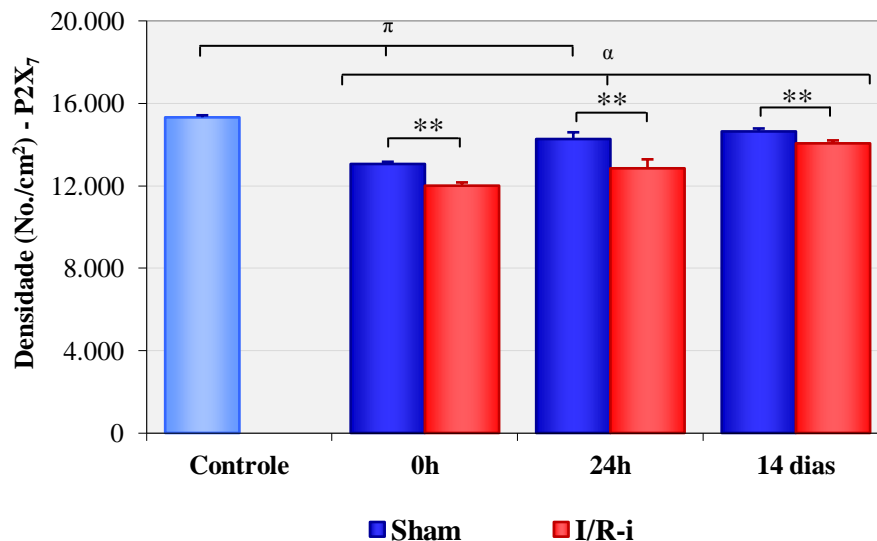
4.4.2.2 Receptor P2X₇

A densidade das células imunorreativas ao receptor P2X₇ dos grupos Sham 0 h (15%) e 24 h (7%) apresentaram diminuição significativa quando comparado ao grupo Controle ($p<0,05$). O grupo Sham de 14 dias não apresentou diferença quando comparado ao grupo Controle (Figura 22).

As células imunorreativas ao receptor P2X₇ dos grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias apresentaram diminuição significativa de 8%, 10% e 4%, respectivamente ($p<0,001$), quando comparadas aos seus respectivos grupos Sham (Figura 22).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre os grupos Sham e Isquêmico. Com os resultados descritos acima, pode-se observar que houve diferença significativa ($p<0,001$) no fator grupo (Sham X Isquêmico). Considerando o fator tempo, o grupo 24 h apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) de 4% quando comparado ao grupo 0 h, no entanto o grupo de 14 dias apresentou um aumento de 7% e 3% quando comparado aos grupos 0 h e 24 h, respectivamente ($p<0,05$). (Figura 22).

Figura 22 - Densidade das células imunorreativas ao receptor P2X₇ dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



Os dados são de $n=5$ e expressos em Média \pm desvio padrão. (π comparação entre grupos Controle e Sham $p<0,05$; ** comparação entre grupos Sham e I/R-i $p<0,001$; α comparação entre grupos 0 h, 24 h e 14 dias com relação ao tempo $p<0,05$).

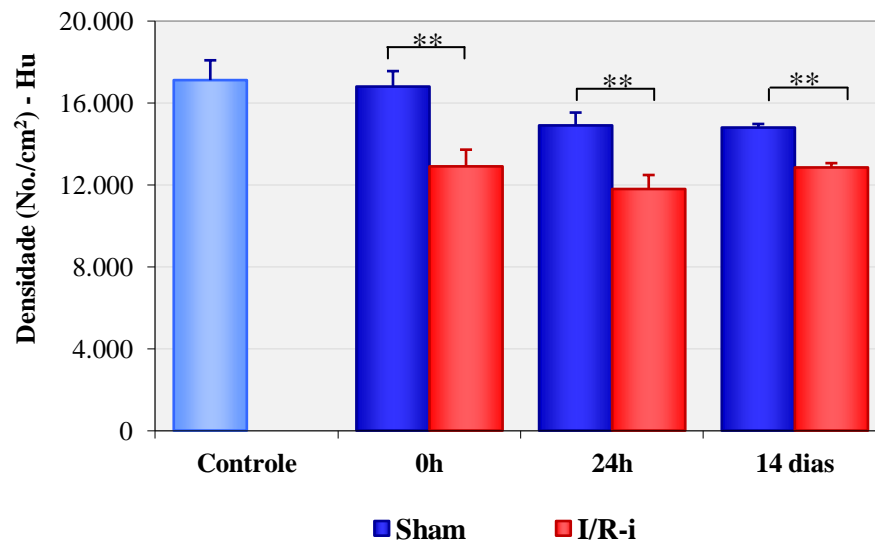
4.4.2.3 Neurônios Hu-IR

A análise da densidade dos neurônios Hu-IR dos grupos Sham não apresentou diferenças significantes quando comparados ao grupo Controle.

A densidade dos neurônios Hu-IR dos grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias apresentou uma diminuição de 23%, 21% e 13% respectivamente, quando comparados aos seus respectivos grupos Sham ($p < 0,001$) (Figura 23).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre os grupos Sham e Isquêmicos. A análise demonstra que houve diferença significativa ($p < 0,001$) no fator grupo (Sham x Isquêmico). E quando consideramos o fator tempo, não obtivemos diferenças significantes entre os diferentes grupos (Figura 23).

Figura 23 - Densidade dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



Os dados são de $n=5$ e expressos em Média \pm desvio padrão. (**comparação entre grupos Sham e I/R-i, $p < 0,001$).

4.4.2.4 Célula Glial Entérica S100-IR

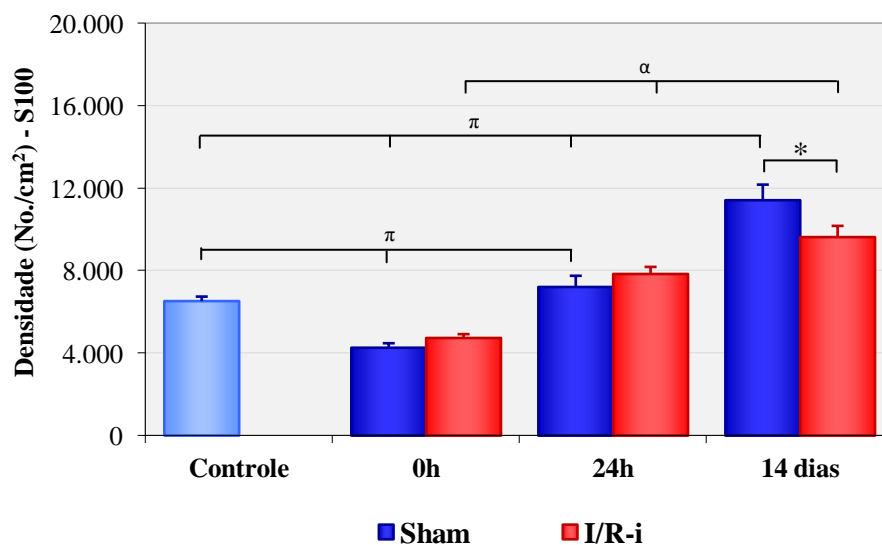
A densidade das células glias entéricas S100-IR do grupo Sham 0 h apresentou uma diminuição de 34% e 69% quando comparado ao grupo Controle e Sham 24 h, respectivamente ($p<0,05$) (Figura 24).

A densidade das células entéricas S100-IR do grupo Sham com 14 dias apresentou um aumento de 42% ($p<0,05$) quando comparado ao grupo Controle e um aumento de 62% e 36% quando comparado com os grupos Sham de 0 h e 24 h, respectivamente ($p<0,05$) (Figura 24).

A densidade de células S100-IR dos grupos I/R-i 0 h e 24 h não apresentaram diferenças significantes quando comparada aos seus respectivos grupos Sham. O grupo I/R-i 14 dias apresentou uma diminuição de 15% quando comparado com o seu grupo Sham ($p<0,05$) (Figura 24).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre os grupos Sham e Isquêmicos. Pela análise dos resultados, observa-se que houve diferença significativa ($p<0,05$) no fator grupo (Sham x Isquêmico). Levando em consideração o fator tempo, pode-se observar que o grupo I/R-i de 14 dias apresentou um aumento significativo de 50% e 19% quando comparado aos grupos I/R-i 0 h e I/R-i 24 h, respectivamente ($p<0,05$) (Figura 24).

Figura 24 - Densidade das células glias entéricas imunorreativas a S100 dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



Os dados são de $n=5$ e expressos em Média \pm desvio padrão. (π comparação entre grupos Controle e Sham $p<0,05$; * comparação entre grupos Sham e I/R-i $p<0,05$; α comparação entre grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias com relação ao tempo $p<0,05$).

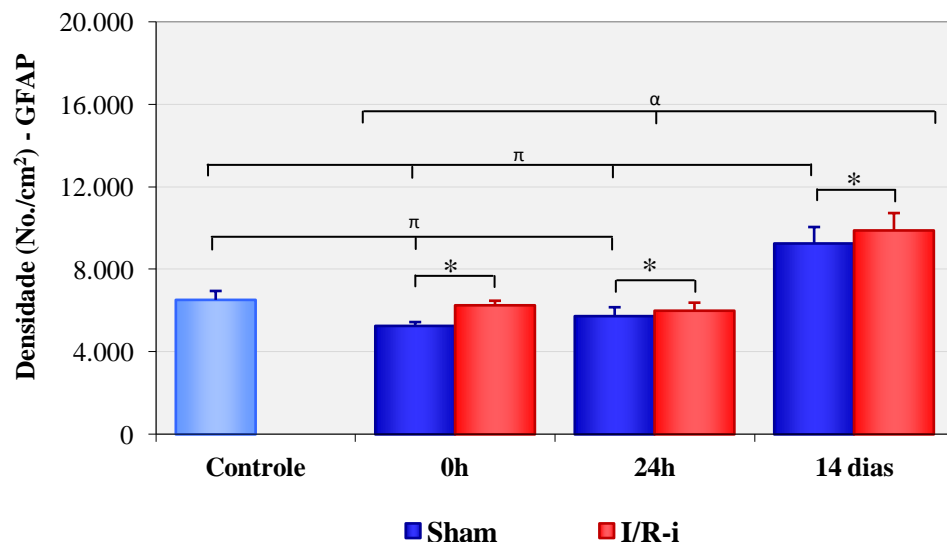
4.4.2.5 Célula Glial Entérica GFAP-IR

A densidade das células glias entéricas GFAP-IR do grupo Sham com 0 h apresentou uma diminuição significativa de 19% quando comparado ao grupo Controle ($p<0,05$). O grupo Sham 24 h não apresentou diferença significativa, quando comparado ao grupo Controle (Figura 25). O grupo Sham 14 dias apresentou um aumento de 29%, quando comparado ao grupo Controle ($p<0,05$), e um aumento de 43% e 38%, quando comparado aos grupos Sham 0 h e 24 h, respectivamente ($p<0,05$) (Figura 25).

Os grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias apresentaram um aumento de 19%, 5% e 7% respectivamente, quando comparada aos seus respectivos grupos Sham ($p<0,05$) (Figura 25).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre os grupos Sham e Isquêmicos. Pela análise, pode-se observar diferença significativa ($p<0,05$) no fator grupo (Sham x Isquêmico). Na análise do fator tempo, observou-se que o grupo 14 dias apresentou um aumento significativo de 23% e 22% quando comparado com os grupos 0 h e 24 h, respectivamente ($p<0,05$) (Figura 25).

Figura 25 - Densidade das células glias entéricas imunorreativas a GFAP dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



Os dados são de $n=5$ e expressos em Média \pm desvio padrão. (π comparação entre grupos Controle e Sham $p<0,05$; * comparação entre grupos Sham e I/R-i $p<0,05$; α comparação entre grupos 0 h, 24 h e 14 dias com relação ao tempo $p<0,05$).

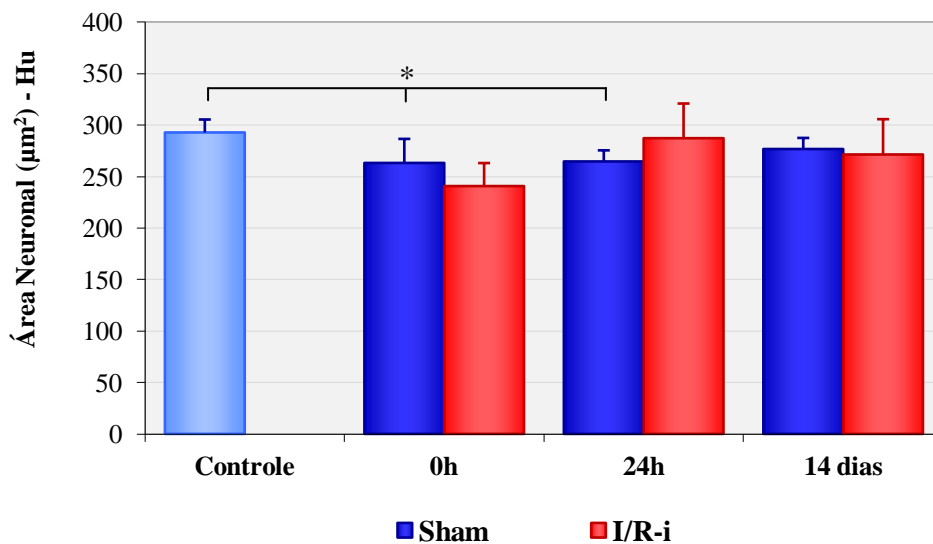
4.4.3 Análise Morfométrica (área do perfil celular)

Foram avaliados a área do perfil do corpo celular (μm^2), o diâmetro máximo (DMáx - μm) e o diâmetro mínimo (DMín - μm) das células Hu-IR e a S100-IR.

A análise da área do perfil dos neurônios Hu-IR demonstrou diminuição significativa de 10% e 9%, dos grupos Sham 0 h e 24 h ao ser comparado ao grupo Controle, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 26). Em relação aos valores de DMáx e DMín não foi detectada diferença significativa (Tabela 11).

A análise da área do perfil, DMáx e DMín dos neurônios Hu-IR não demonstrou diferença significativa entre os grupos Sham e I/R-i (Figura 26, Tabela 11).

Figura 26 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



Os dados são de $n=5$ e expressos em Média \pm desvio padrão. (* comparação entre grupos Controle e Sham $p < 0,05$).

Tabela 11 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios Hu-IR dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>DMáx (μm)</i>	<i>DMín (μm)</i>
Controle	26,3±2,1	13,3±0,5
Sham 0 h	24,0±1,5	12,9±0,5
I/R-i 0 h	23,5±1,1	12,3±1,6
Sham 24 h	25,1±1,5	12,5±0,7
I/R-i 24 h	25,5±3,0	13,4±0,4
Sham 14 dias	24,1±1,7	13,4±0,8
I/R-i 14 dias	26,8±1,2	12,2±0,9

Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão.

A análise das células gliais entéricas S100-IR (área do perfil, DMáx e DMín) não demonstrou diferença significativa entre o grupo Controle e os grupos Sham (Figura 27, Tabela 12).

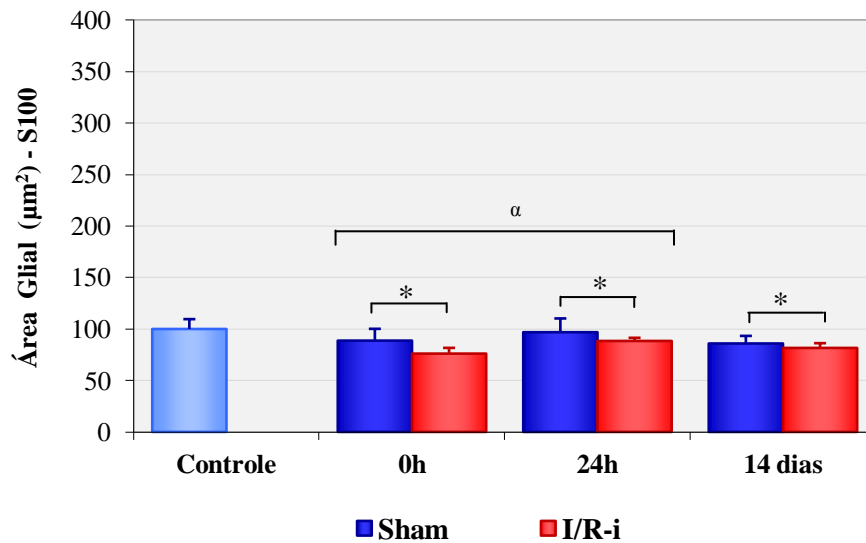
Os grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias apresentaram uma diminuição de 14%, 9% e 5%, respectivamente, quando comparados aos seus grupos Sham ($p<0,05$). Ao ser considerado o fator tempo, pode-se observar que o grupo 24 h apresentou um aumento de 12% ao ser comparado com o grupo 0 h (Figura 27).

Em relação ao DMáx observou-se que os grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias apresentaram uma diminuição significativa de 8%, 5% e 2% respectivamente quando comparado aos seus grupos Sham ($p<0,05$), no fator tempo não foi detectado nenhuma diferença significativa (Tabela 12).

Os valores do DMín dos grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias apresentaram uma diminuição de 5%, 3% e 5%, respectivamente quando comparados aos seus respectivos grupos Sham ($p<0,05$). Considerando o fator tempo, pode-se observar que o grupo 24 h apresentou um aumento de 8% quando comparado ao grupo 0 h ($p<0,05$) (Tabela 12).

Com relação às células gliais entéricas GFAP-IR, não foi possível obter medidas da área do perfil, a impossibilidade dessa análise se dá pela dificuldade de delimitar o corpo celular dessas células, visto que há grande quantidade de filamentos.

Figura 27 - Área do perfil do corpo celular das células gliais entéricas imunorreativas a S100 dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



Os dados são de n=5 e expressos em Média \pm desvio padrão. (* comparação entre grupos Sham e I/R-i $p < 0,05$; ^α comparação entre grupos 0 h e 24 h com relação ao tempo $p < 0,05$).

Tabela 12 - Valores do DMáx e do DMín das células gliais entéricas S100-IR dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias .

<i>Grupos</i>	<i>DMáx (µm)</i>	<i>DMín (µm)</i>
Controle	14,2 \pm 0,6	8,2 \pm 0,4
Sham 0 h	13,5 \pm 1,2	7,6 \pm 0,4
I/R-i 0 h	12,4 \pm 0,2*	7,2 \pm 0,5*
Sham 24 h	13,9 \pm 1,3	8,2 \pm 0,4
I/R-i 24 h	13,2 \pm 0,2*	7,8 \pm 0,3*
Sham 14 dias	13,0 \pm 0,6	7,8 \pm 0,3
I/R-i 14 dias	12,8 \pm 0,5*	7,5 \pm 0,4*

Os dados são de n=5 e expressos em Média \pm desvio padrão. (* comparação entre grupos Sham e I/R-i $p < 0,05$).

4.4.4 Distribuição dos Neurônios Mioentéricos Imunorreativos ao Hu de acordo com a Área do Perfil

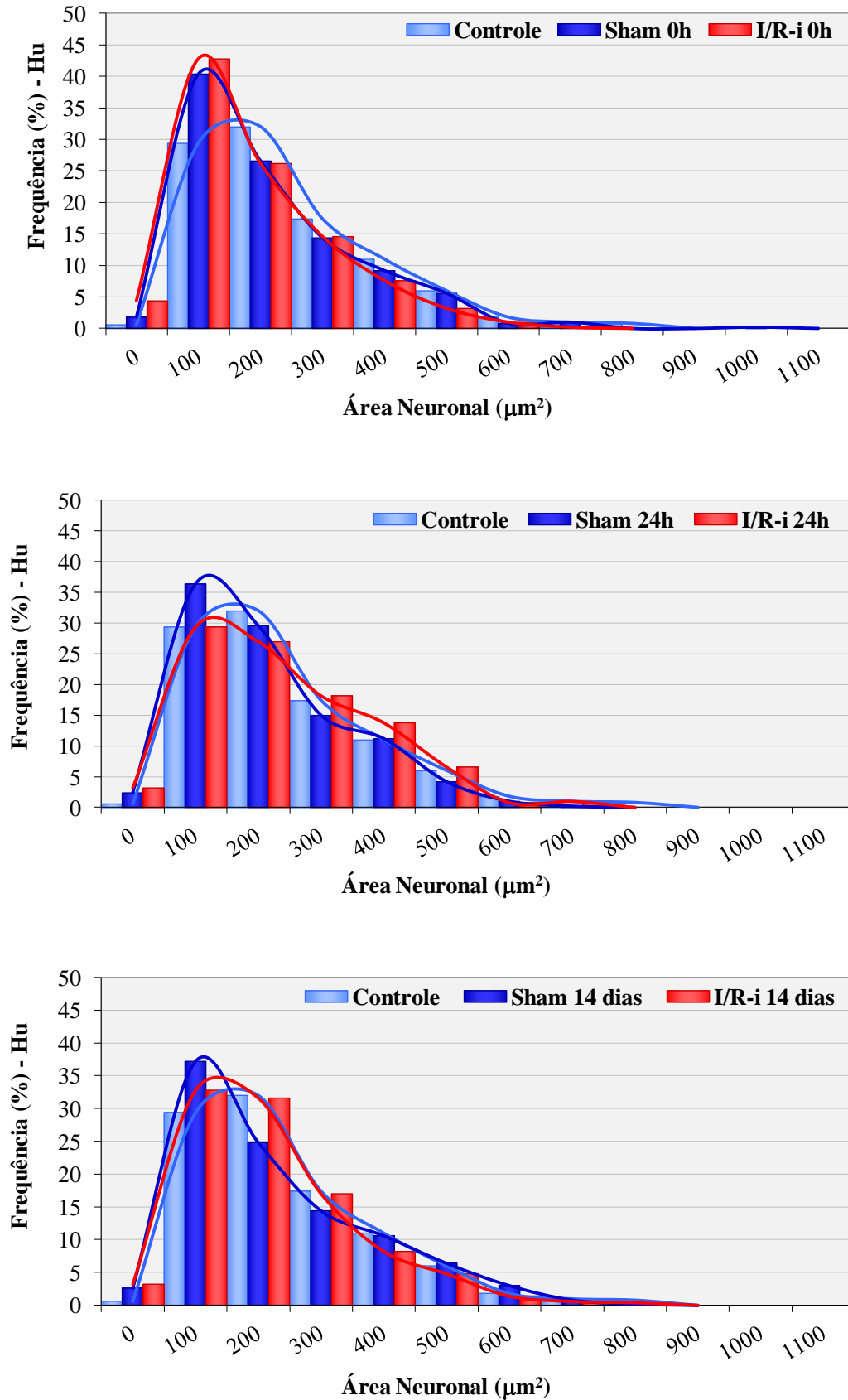
Na análise dos neurônios Hu-IR, observou-se que no grupo Controle a área do perfil obteve uma variabilidade de 100 a 900 μm^2 , sendo que 61% dos neurônios estavam entre 100 e 300 μm^2 (Figura 28).

No grupo 0 h a área dos neurônios variou de 100 a 1100 μm^2 . No grupo Sham 0 h 80% dos neurônios estavam entre 100 e 400 μm^2 e no grupo I/R-i 0 h 82% dos neurônios estavam entre 100 e 400 μm^2 (Figura 28).

No grupo 24 h a área dos neurônios variou de 100 a 800 μm^2 . No grupo Sham 24 h 91% dos neurônios estavam entre 100 e 500 μm^2 e no grupo I/R-i 24 h 93% estavam entre 100 e 600 μm^2 (Figura 28).

No grupo 14 dias a área do perfil variou de 100 a 900 μm^2 . No grupo Sham 14 dias 91% dos neurônios estavam entre 100 e 600 μm^2 e no grupo I/R-i 14 dias 92% dos neurônios estavam entre 100 e 600 μm^2 (Figura 28).

Figura 28 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios Hu-IR no íleo de ratos dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



4.4.5 Distribuição das Células Gliais Entéricas Imunorreativas a S100 de Acordo com a Área do Perfil

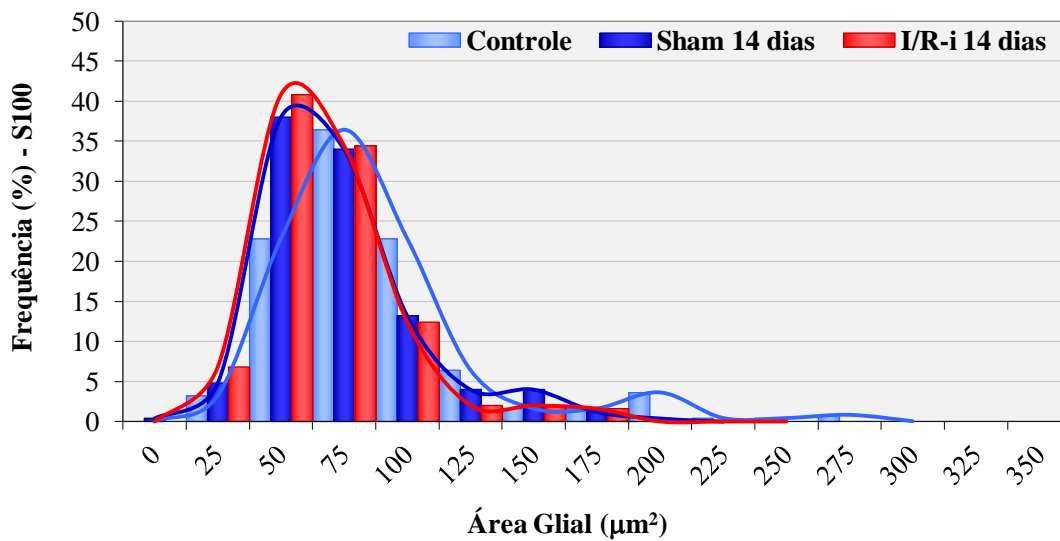
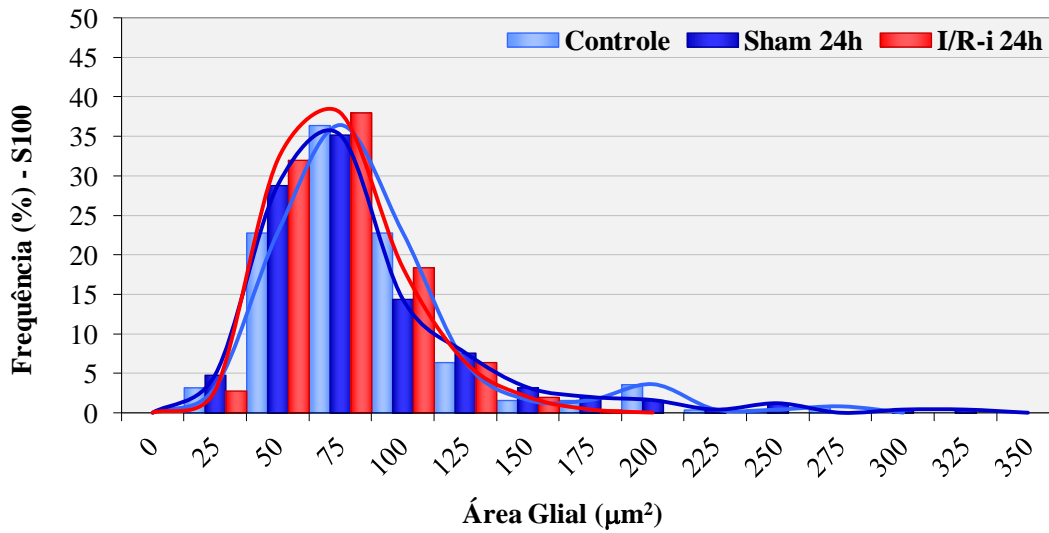
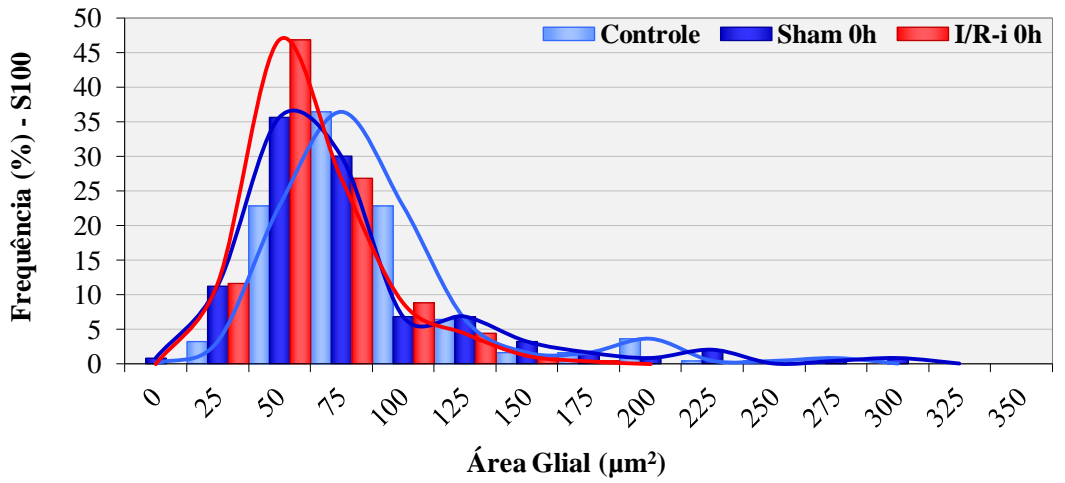
Na análise das células gliais entéricas a S100-IR, no grupo Controle a área do perfil variou de 25 a 300 μm^2 , sendo que 86% das células gliais entéricas estavam entre 50 e 150 μm^2 (Figura 29)

No grupo 0 h a área variou de 25 a 325 μm^2 . No grupo Sham 0 h 88% das células gliais estavam entre 25 e 150 μm^2 e, no grupo I/R-i 0 h 91% das células gliais estavam entre 25 e 125 μm^2 (Figura 29).

No grupo 24 h a área do perfil das células gliais entéricas variou de 25 a 350 μm^2 . No grupo Sham 88% das células gliais entéricas estavam entre 25 e 150 μm^2 e no grupo I/R-i 94% estavam entre 50 e 150 μm^2 (Figura 29).

No grupo 14 dias a área do perfil variou de 25 a 225 μm^2 . No grupo Sham 85% das células gliais entéricas estavam entre 50 e 125 μm^2 e, no grupo I/R-i 86% das células gliais entéricas estavam entre 50 e 125 μm^2 (Figura 29).

Figura 29 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) das células glias entéricas S100-IR no fêlo de ratos dos grupos Controle, Sham e I/R-i nos períodos de 0 h, 24 h e 14 dias.



4.4.6 Proliferação Celular

A análise de proliferação celular foi obtida a partir da contagem de dupla marcação de células gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR marcadas com células positivas ao EDU, no íleo dos animais Controle, Sham e submetidos à isquemia intestinal, com período de 0 h, 24 h e 14 dias de reperfusão.

Os grupos Controle e Sham de 0 h, 24 h e 14 dias, não apresentaram proliferação de células gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR.

O grupo I/R-i 0 h não mostrou proliferação de células gliais entéricas imunorreativas a S100, no entanto obteve-se proliferação com células gliais entéricas imunorreativas a GFAP ($0,7 \pm 0,6\%$) (Tabela 13).

No entanto há proliferação de células gliais entéricas imunorreativas a S100 ($1 \pm 0\%$) e GFAP ($0,3 \pm 0,6\%$) no grupo I/R-i 24 h.

Com relação ao grupo I/R-i 14 dias, não há proliferação de células gliais entéricas imunorreativas a S100 e GFAP.

Tabela 13 - Dupla marcação das células gliais entéricas imunorreativas a S100 ou GFAP e ao EDU nos grupos Controle, Sham e I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>S100/EDU</i>	<i>S100/-</i>	<i>GFAP/EDU</i>	<i>GFAP/-</i>
Controle	0%	100%	0%	100%
Sham 0 h	0%	100%	0% [#]	100%
I/R-i 0 h	0%	100%	$0,7 \pm 0,6\%$	$99,3 \pm 0,6\%$
Sham 24 h	0%	0%	0%	100 %
I/R-i 24 h	$1 \pm 0\%$	$99 \pm 0\%$	$0,3 \pm 0,6\%$	$99,7 \pm 0,6\%$
Sham 14 dias	0%	100%	0%	100%
I/R-i 14 dias	0%	100%	0%	100%

Os dados são de n=3 e expressos em Média \pm desvio padrão.

5.1 Considerações sobre a Isquemia Intestinal com Reperusão

O comprometimento vascular do intestino é responsável por aproximadamente 0,1% de todas as internações hospitalares e 1,0% das internações para um caso de abdome agudo. Em unidades de terapia intensiva o desenvolvimento de isquemia intestinal acarreta um índice de mortalidade de 67%-80% (EVENNT et al., 2009; ROMANO; ROMANO; GRASSI, 2007; TENDLER, 2003). Ocorre principalmente na população idosa, entre a décima sexta e a décima sétima década de vida. A idade de início depende da etiologia da isquemia e do gênero do paciente (CLAVIEN; DURING; HARDER, 1988; GORE et., 2008).

Existem diversos modelos na literatura de fenômenos de isquemia e reperusão. A isquemia pode ser total ou parcial e, pode haver comprometimento arterial isoladamente ou, em conjunto com componente venoso. A interrupção do fluxo arterial ou artério-venoso pode ser mantida durante todo o experimento ou, pode se estabelecer períodos variáveis de isquemia e reperusão (DOCKENDORF et al., 1993; GRANGER et al., 1980; IKEDA et al., 1998).

A isquemia induzida neste trabalho foi de 35 minutos e neste período a porção do íleo tornou-se vermelho escuro, e ao final da isquemia, quando os clips vasculares foram retirados, o tecido retornou a sua coloração normal, vários autores relatam estas alterações no intestino durante e após a isquemia (RIVERA et al., 2012; YURDAKAN et al., 2011).

Estudos demonstram que o ato da cirurgia e da manipulação podem levar alterações ao trato gastrointestinal. O intestino delgado está em estado constante de auto-regeneração e, é provavelmente o órgão mais sensível a lesões internas (GENG et al., 2013). No trabalho de Simmy et al. (2001) foi observado em ratos Wistar submetidos a cirurgia abdominal com manipulação intestinal, alterações no epitélio intestinal com diminuição da viabilidade celular e o rendimento nas células da cripta, com alterações na fisiologia gastrointestinal. Outro trabalho indica que o fato de se fazer laparotomia, é suficiente para causar stress oxidativo nos enterócitos e levar a alterações funcionais do intestino (ANUP; SUSAMA; BALASUBRAMA, 2000).

Neste trabalho, o animal escolhido para os experimentos foi o rato Wistar, por apresentar facilidade de trabalho e manejo, adequabilidade ao protocolo e disponibilidade. É um animal resistente à anestesia tanto inalatória quanto intravenosa e subcutânea, apresenta porte pequeno, de fácil manuseio cirúrgico e baixo custo (RIBEIRO; YOSHIDA, 2005). Outro fator importante é que esse animal simula alterações bioquímicas e estruturais, além de

provocar distúrbio hemodinâmico e fisiopatológico da restauração vascular pós-isquemia no intestino (AOKI, 1988; MYERS; HERNANDEZ, 1992).

Estudos demonstram que a oclusão de artérias e veias ileais apresentam danos muito mais acentuados aos plexos entéricos (CALCINA et al., 2005; LINDESTROM; EKBLAD, 2004; PALOMBIT et al., 2013; PIAO et al., 1999; RIVERA et al., 2009; VENTURA-MARTINEZ, 2008). Resultados do presente trabalho corroboram com os resultados da literatura.

5.2 Considerações Sobre a Expressão dos Receptores P2X₂ e P2X₇, Hu, S100 e GFAP

A demonstração imunohistoquímica da presença ou ausência de substâncias neurais dentro de células nervosas tem sido importante para o entendimento dos aspectos morfofuncionais de cada neurônio entérico e do funcionamento do sistema gastrointestinal (FURNESS, 2006; TAN; BORNSTEIN; ANDERSON, 2010).

No presente trabalho foram usados os seguintes imunomarcadores: receptor P2X₂, receptor P2X₇, o pan-neuronal Hu e para as células gliais entéricas S100 e GFAP. A presença de receptores P2X em neurônios entéricos e células gliais entéricas têm sido descrita através de métodos imunohistoquímicos (CASTELUCCI et al., 2002a; RATHBONE et al., 1999; VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003; VULCHANOVA et al., 1996). Foi evidenciado o código químico dos neurônios entéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ (CASTELUCCI et al., 2002a), ao receptor P2X₃ (POOLE et al., 2002) e ao receptor P2X₇ (HU et al., 2001). No entanto, nas células gliais entéricas têm-se descrito a presença dos receptores P2X₂ (MENDES et al., 2013), P2X₆ (VAN CROMBRUGGEN et al., 2007) e P2X₇ (VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003).

No presente trabalho, foi identificado a marcação de receptor P2X₂, na membrana citoplasmática e citoplasma dos neurônios e células gliais entéricas no plexo mioentérico do íleo dos animais Controle, Sham e I/R-i. Esses resultados estão de acordo com a literatura (BOBNA, 2011; CASTELUCI et al., 2002b; MISAWA et al., 2010; MIZUNO et al., 2012; PAULINO et al., 2011; XIANG; BURNSTOCK, 2004).

Com relação ao receptor P2X₇, o presente trabalho confirmou a presença desse receptor nos neurônios e células gliais entéricas do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Controle, Sham e I/R-i e sua marcação foi observada na membrana citoplasmática e citoplasma. Os autores Hu et al. (2001) demonstraram em seu trabalho padrão similar de distribuição do receptor P2X₇ em neurônios no intestino de cobaias. Os autores Vanderwiden,

Timmermans, Schiffmann, (2003) e Van Crombruggen et al. (2007), constataram a presença deste receptor em células gliais entéricas no intestino de ratos.

A neurotransmissão sináptica no plexo mioentérico contém componentes purinérgicos. No entanto, não se tem definida a função do receptor P2X₇ nas células gliais entéricas, há indícios que o receptor P2X₇ possa fazer recrutamento de células gliais entéricas, resultando na modulação da sinalização neuronal (GULBRANSEN; SHARKEY, 2009; JAMES; BUTT, 2002). Resultados de Gulbransen e Sharkey (2009) sugerem que ATP liberado por neurônios ativa células gliais entéricas, mas sem descartar a possibilidade que outros neurotransmissores possam fazer o mesmo.

Alguns estudos demonstram alterações na expressão do receptor P2X₇ no plexo mioentérico nos protocolos de desnutrição e renutrição (GIRROTTI et al., 2013), na I/R-i (PALOMBIT et al., 2013) e na colite ulcerativa (DA SILVA 2011).

Os autores Milano et al. (2008) estudaram as alterações da expressão do receptor purinérgico na I/R-i, eles observaram que o receptor P2X₇ foi detectado no pulmão, rins e intestino. No entanto, não houve mudanças significativas na expressão em nenhum dos três tecidos e, nem entre os grupos Controle e I/R-i. A discrepância dos resultados apresentados por Milano et al. (2008) e do presente trabalho, pode ser devido aos métodos utilizados. No trabalho de Milano et al. (2008) as análises da expressão foram feitas no intestino total, ou seja, com vilosidades, neurônios do plexo submucoso e mioentérico, musculatura circular e longitudinal. Neste trabalho as observações do receptor P2X₇ foram feitas nos neurônios e células gliais entéricas.

Em situações de doença intestinal inflamatória, os autores Yiangou et al. (2001) verificaram aumento da expressão do receptor purinérgico P2X₃, sugerindo que mudanças no receptor possam ocasionar alterações na motilidade e na dor.

Mecanismos purinérgicos podem estar envolvidos nas etiopatogênias de muitas condições neurodegenerativas, especialmente devido a grande liberação extracelular de ATP, e outros neurotransmissores que poderiam causar alterações na expressão de receptores (FRANKE; ILLES, 2006; FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006). Além disso, é possível que cada receptor tenha uma função diferenciada nos neurônios que quando ativados podem alterar a sua expressão. Experimentos demonstraram que os receptores purinérgicos têm um papel fisiológico na transmissão no SNE (BIAN et al., 2000; SPENCER et al., 2000).

Com relação ao estudo das duplas marcações, a presença do receptor P2X₂ nos neurônios entéricos foi demonstrado nos trabalhos de Castelucci et al. (2002a) e Misawa et al. (2010) onde observaram a dupla marcação deste receptor com neurônios NOSn-IR,

calbindina-IR, calretinina-IR em cobaias e ratos, respectivamente. Os autores Hu et al. (2001) demonstraram a dupla marcação de neurônios NOSn-IR, SP-IR (Substância P), NPY-IR (Neuropeptídeo Y), calbindina-IR, calretinina-IR e Hu-IR com receptor P2X₇ em cobaias e Palombit et al. (2013) em ratos.

Para a identificação dos neurônios foi utilizado um marcador pan-neuronal Hu, este é usado para analisar a população total de neurônios do SNE em diferentes espécies, como por exemplo, em ratos, cobaias, humanos e equinos (FREYTAG et al., 2008; GANNIS et al., 2006; LIN et al., 2002; PHILLIPS et al., 2004). A proteína Hu pertence à família de proteínas ligantes de RNA-ELAV (*embryonic lethal abnormal visual*) (NABORS; FURNEAUX; KING, 1998). Neste trabalho os neurônios entéricos Hu-IR apresentaram marcação do corpo celular e núcleo em todos os grupos estudados, resultados semelhantes foram descritos no SNE de equinos (FREYTAG et al., 2008), camundongos (QU et al., 2008) e ratos (PALOMBIT et al., 2013).

No presente trabalho foi feita análise quantitativa, da dupla marcação de neurônios Hu-IR com os receptores P2X₂ e P2X₇ no plexo mioentérico de ratos Controle, Sham e I/R-i. Os resultados demonstraram que o receptor P2X₂ estava presente em 75% dos neurônios e o receptor P2X₇ estava presente em 100% dos neurônios nos grupos estudados. Bobna (2011) descreve que quase a totalidade dos neurônios Hu-IR colocalizaram com o receptor P2X₂ e os autores Da Silva (2011) e Palombit et al. (2013) descrevem que 100% dos neurônios colocalizam com o receptor P2X₇.

No entanto a análise inversa da dupla marcação dos receptores P2X₂ e P2X₇ com neurônios Hu-IR, mostrou que havia em torno de 10% de células-IR somente ao receptor P2X₂ e 15% de células-IR somente ao receptor P2X₇, nos grupos estudados. Isto sugere que os receptores P2X₂ e P2X₇ estavam localizados em outras células que não eram neurônios, e que poderiam ser células gliais entéricas. Trabalhos de Bobna (2011) e Mendes et al. (2013) mostraram em protocolos de I/R-i que ao redor de 18% e 8% de células receptor P2X₂-IR não colocalizavam com neurônios. Os autores Da Silva (2011) e Palombit et al., (2013) descreveram que 20% e 15% de células receptor P2X₇-IR não eram imunorreativos ao Hu, em protocolos de colite ulcerativa e I/R-i (íleo), respectivamente.

Com a hipótese de que os receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇ possam estar presentes em outros tipos celulares, neste trabalho investigou a presença desses receptores em células gliais entéricas. Na literatura não se têm muitos trabalhos descrevendo a imunorreatividade do receptor P2X₂ em células gliais entéricas.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o receptor P2X₂ estava presente ao redor de 74% e o P2X₇ 100% nas células gliais entéricas. Resultados da literatura corroboram com o presente trabalho, como os autores Bobna (2011) e Mendes et al. (2013) descreveram a presença do receptor P2X₂ em células gliais entéricas do plexo mioentérico de ratos em protocolos de I/R-i. Com relação ao receptor P2X₇, Da Silva (2011) identificou a presença de 100% deste receptor em células gliais entéricas no plexo mioentérico do cólon distal de ratos.

A expressão do receptor P2X₇ em células gliais entéricas tem sido descrita, assim como a alteração da sua expressão em condições neuropatológicas (BASSOTTI et al., 2008; VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003). No SNC, patologia de células gliais tem sido relacionada a vários receptores purinérgicos. O ATP atua no receptor P2X₇ que é essencialmente expresso na microglia ativa, e associa-se ao processo inflamatório mediado por citocinas e neurodegeneração (COLLO et al., 1997; LE FEUVRE; BROUGH; KAUFMANN, 2002).

A presença do receptor P2X₇ em células gliais no SNA tem sido relatada em cultura de células de Schwann (COLOMAR; AMEDEE, 2001). Outros autores reportaram a presença deste mesmo receptor em células gliais no SNE (VAN CROMBRUGGEN et al., 2007; VANDERWINDEN et al., 2003). Na literatura se têm descrito a imunorreatividade de células gliais entéricas para outros receptores P2 como: P2X₆ (VAN CROMBRUGGEN et al., 2007); P2Y₄ (GULBRANSEN; SHARKEY, 2009; VAN NASSAUW et al., 2006), P2Y₆ (VAN CROMBRUGGEN et al., 2007) e P2Y₁₁ (GULBRANSEN; SHARKEY, 2009; VAN CROMBRUGGEN et al., 2007).

O ATP liberado pela glia e a adenosina gerada da hidrólise do ATP podem influenciar a função neuronal entérica via receptores P2 e P1, respectivamente. Modulação da atividade sináptica pela glia entérica pode, portanto ser um componente necessário para a sinalização neuronal entérica e motilidade (AUBÉ et al., 2006; BASSOTTI et al., 2008; GULBRANSEN; SHARKEY, 2009).

Estudos mostram que a sinalização purinérgica possibilita a intervenção glial na transmissão sináptica, através da comunicação intercelular mediada pelo ATP, e o envolvimento do mesmo, na regulação da transmissão sináptica através de receptores purinérgicos nas membranas pré e pós-sináptica (FIELDS; BURNSTOCK, 2006; GULBRANSEN, SHARKEY, 2012).

As populações de células gliais entéricas residem dentro dos gânglios mioentérico e submucoso (intraganglionar), dentro de feixes intraganglionares, fibras nervosas, abaixo das

células epiteliais da mucosa (subepitelial) e estão associadas com fibras nervosas intercaladas entre as células do músculo liso (intramuscular). Apesar de todas as células gliais parecerem ser derivadas a partir de uma base comum de células progenitoras da crista-neural, são os microambientes únicos da parede do intestino que irão definir o fenótipo final dessas células. Portanto, as células gliais entéricas representam morfologicamente e funcionalmente, subtipos específicos dependendo da sua localização na parede intestinal (DULAC et al., 1991; GULKBRANSEN, SHARKEY, 2012; LARANJEIRA et al., 2009).

Para a identificação das células gliais entéricas foram usados dois marcadores S100 e GFAP. A família S100 foi, originalmente, caracterizada como um grupo de pequenas proteínas citosólicas diméricas do tipo ligadora de cálcio, existe em variadas formas, dependendo de sua estrutura de cadeias α e β , e estão em abundância em tecido nervoso (OLIVEIRA; IKUTA; REGNER, 2008).

Atualmente, está descrito que S100 é uma família multigênica de proteínas ligantes de cálcio com 25 membros já discriminados, exclusivamente expressos em vertebrados, que estão implicados nas mais variadas funções, tanto intracelulares como extracelulares (DONATO, 2007; SORCI et al., 2010). De acordo com Donato (2003), intracelularmente as proteínas S100 têm sido implicadas na regulação de fosforilação de proteínas, na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, na homeostase de Ca^{2+} , na atividade enzimática, nos fatores de transcrição, crescimento e diferenciação celular, e na resposta inflamatória.

GFAP é uma proteína estrutural, da classe dos filamentos intermediários. Os filamentos intermediários compreendem um grupo de filamentos que têm estruturas semelhantes e espessura de 8 a 10 nm. Na maioria das células, uma extensa rede de filamentos intermediários envolve o núcleo e se estende até a periferia, aonde se liga à membrana plasmática. Filamentos intermediários são particularmente concentrados em células submetidas a estresse mecânico, como as epiteliais e as musculares (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000).

A fosforilação de GFAP regula o equilíbrio dinâmico entre seu estado polimerizado e despolimerizado, desempenhando importante papel na mitose. Fatores como a ausência ou presença de alguns cátions, pH, disponibilidade de ATP e força iônica do meio podem influenciar sua polimerização (RODNIGHT et al., 1997).

As células gliais entéricas imunorreativas a S100 apresentaram marcação de núcleo e citoplasma em todos os grupos estudados, sendo que algumas células apareceram aumentar a intensidade de S100 nos grupos I/R-i. As células GFAP-IR apresentam marcação mais intensa nos grupos I/R-i. Adicionalmente o aumento ou redução da expressão das proteínas S100 e

GFAP nas células gliais, pode ser indicativo de envelhecimento ou do surgimento de algumas patofisiologias intestinais (RÜHL, 2005). Em estudos com ratos em processo de envelhecimento foi observada uma perda de células gliais positivas para S100 do plexo mioentérico. Por outro lado o aumento da expressão de GFAP por células gliais entéricas é observado em tecidos coletados de pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Crohn (KIMELBERG; NOREMBERG, 1989; PHILLIPS et al., 2004).

No presente trabalho para estudar a alteração do fenótipo das células gliais entéricas na I/R-i, de maneira original, foi feito a dupla marcação de S100 com GFAP. Os resultados demonstraram que houve colocalização de 70% de células gliais entérica-IR a S100 e GFAP, sendo que 30% das gliais entéricas eram IR somente a um único tipo de marcador S100 ou GFAP nos grupos estudados. Estes dados podem sugerir que as células gliais entéricas no SNE possam ter fenótipos distintos, mas para esta comprovação há a necessidade de futuros estudos.

5.3 Considerações Sobre a Densidade Neuronal e Glial

Avaliações na densidade neuronal do plexo mioentérico, submetidos a diferentes técnicas de neuromarcação, têm sido realizado em várias partes do trato gastrintestinal, com diferentes protocolos como desnutrição/renutrição (CASTELUCCI et al., 2002b; GIROTTI et al., 2013; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010), isquemia/reperfusão (PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011) e obesidade (MIZUNO et al., 2012) e colite ulcerativa (DA SILVA, 2011).

A densidade do Hu apresentou uma diminuição significativa nos grupos isquêmicos quando comparados aos grupos Sham e Controle, sugerindo morte neuronal. Os autores Bobna (2011) e Palombit et al. (2013) também registraram diminuição de neurônios Hu-IR nos diferentes períodos de I/R-i. Lindeström e Ekblad (2004) demonstraram uma diminuição no número total de neurônios entéricos na isquemia, nos plexos mioentérico e submucoso, porém, não identificaram as classes de neurônios afetadas e seus códigos químicos.

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia e necrose (CASTEDO et al., 2004; DIMRI, 2005; OKADA; MAK, 2004). Porém para afirmar que houve morte neural, há a necessidade da utilização de outras técnicas como, por exemplo, a marcação pelo TUNEL. Uma característica típica da destruição celular por apoptose é a ativação de nucleases que eventualmente degradam o DNA nuclear em fragmentos. A detecção desses

fragmentos pode ser feita pela técnica de imunohistoquímica TUNEL (marcação de terminações dUTP pela deoxinucleotidil tranferase terminal) que detecta terminações 3'-hidroxila características da apoptose (MATSUO et al., 2013; OTSUKI; LI; SHIBATA, 2003).

Com relação à densidade das células receptores P2X₂-IR e P2X₇-IR, foi encontrada uma diminuição significativa nos grupos I/R-i 0 h e 24 h (receptor P2X₂), e dos grupos I/R-i 0 h, 24 h e 14 dias (receptor P2X₇) quando comparado aos grupos Sham e Controle. Os autores Paulino et al. (2011) analisaram os neurônios mioentéricos do íleo de ratos submetidos à isquemia de 40 minutos da AMS com reperfusão de 4 horas, e observaram uma diminuição da densidade dos neurônios mioentéricos receptor P2X₂-IR, NOS-IR, calbindina-IR e a ChAT-IR (Colina acetiltransferase).

Os dados de Palombit et al. (2013) mostraram que os neurônios imunorreativos ao receptor P2X₇ tiveram uma diminuição significativa na densidade nos grupos isquêmicos com 6, 24, 72 horas e 1 semana de reperfusão. Estes dados são similares aos resultados encontrados no presente trabalho, onde foi verificado que a densidade do receptor P2X₇ sofreu uma diminuição nos grupos isquêmicos.

Ao analisar as células gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR, foi observado certo aumento na densidade glial nos períodos de I/R-i. Estes resultados foram inversos quando comparado aos neurônios. Dados similares foram encontrados por Thacker et al. (2011), onde observaram na isquemia intestinal, diminuição no número de neurônios, do plexo mioentérico com células gliais distorcidas. O aumento das células gliais poderia ser justificado pela ação protetiva das células gliais entéricas sobre os neurônios em injúrias no SNE.

Na doença inflamatória intestinal, a célula glial entérica aparentemente realiza um papel central no controle da inflamação (GEBUES et al., 1992; RUHL, 2005). É conhecido que as células gliais no SNC reagem com aumento de secreção de citocinas, aumento de expressão de GFAP e proliferação quando sofre insultos inflamatórios. No entanto, a expressão de GFAP foi descrita como sendo mais elevada no SNE, em comparação com a glia do SNC, pois o trato gastrointestinal está mais exposto a uma variedade de estímulos (RUHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

Bush et al. (1998), utilizaram camundongos adultos transgênicos para depletar as células imunorreativas a GFAP, para avaliar a importância das mesmas na fisiologia intestinal e observaram que, em apenas duas semanas, todos os animais morreram devido a um quadro de jejunoileíte fulminante. Esse quadro foi independente de processos infecciosos, sendo o mesmo caracterizado por degeneração de neurônios mioentéricos e hemorragia intestinal.

Esses dados confirmam o papel das células gliais entéricas como mantenedora da integridade intestinal.

Von Boyen et al. (2004) demonstraram que, sob influência de citocinas pró-inflamatórias, células gliais entéricas que não eram IR a GFAP podem se tornar GFAP positivas. O aumento da expressão de GFAP por células gliais é também observado em tecidos coletados de pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Crohn.

Devido ao aumento da densidade de células gliais entéricas no presente trabalho, surgiu à hipótese de proliferação celular. Para confirmar esta hipótese investigou-se a proliferação dessas células com o uso da técnica de marcação do EDU. Os resultados demonstraram que houve colocalização de S100 e GFAP nos grupos I/R-i 0 h e 24 h com células positivas ao EDU, com estes resultados sugere-se que possa ter proliferação das células gliais entéricas nos grupos com I/R-i.

Resumidamente o ciclo celular é coordenado por meio de eventos que possibilitam que as células duplicam (replicam) seu material genético (DNA) e, posteriormente entrem em divisão (mitose). Concluída a mitose as células neo-formadas podem continuar a se dividir, passando por todas as fases do ciclo ou então sair do ciclo, tornando-se células em estado de repouso (G0). Estas células podem reentrar no ciclo por meio de fatores de crescimento (SCHAFER, 1998). A replicação de DNA nuclear acontece somente na fase S (período de síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G1, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase G2. G1 e G2 proporcionam um tempo adicional para o crescimento celular (SHERR; McCORMICK, 2002).

Alguns marcadores são utilizados para análise do ciclo celular, o mais conhecido é a incorporação do análogo de timidina 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), em células que estão na fase S. O BrdU é detectado, com um anticorpo específico ao BrdU (TANG et al., 2007). No entanto, apesar de ser muito usado na literatura, a marcação da proliferação pelo BrdU pode apresentar alguns problemas na imunohistoquímica. Para revelar o epítipo, há intensas condições de desnaturação de DNA, que poderia introduzir uma significativa variabilidade na marcação dentro e entre experimentos (CHEHREHASA et al., 2009). Além disto, o BrdU é uma substância tóxica e mutagênica que induz diversos efeitos colaterais ao animal quando injetado para a marcação das células na fase S (TAUPIN, 2007).

Para evitar tais problemas, se tem a alternativa de usar o análogo de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EDU), no qual o grupo metilo terminal é substituído por um grupo Alcino, o qual permite a detecção utilizando um azida fluorescente que se liga covalentemente ao grupo

Alcino, em uma reação conhecida como “clique química”. Este método de detecção é rápido, específico e sem a necessidade de desnaturação de DNA (CAPPELLA et al., 2008; CHEHREHASA et al., 2009).

Os resultados de proliferação celular deste trabalho mostraram uma pequena quantidade de células gliais entéricas em proliferação, o que pode indicar que outros mecanismos possam estar ocorrendo paralelamente, para justificar o aumento da densidade das células gliais entéricas, como a diferenciação celular. No entanto, há a necessidade de outros estudos futuros para a comprovação.

5.4 Considerações Sobre o Perfil Neuronal e Glial

A avaliação morfométrica (medida da área do perfil celular) tem sido muito estudada em diferentes protocolos experimentais. Como exemplo, a morfometria realizada nos neurônios mioentéricos de ratos submetidos à dieta autoclavada (GONÇALEZ et al., 2011). Gonzalez et al. (2011) mostraram que a utilização de uma dieta autoclavada durante a gravidez, lactação e pós-desmame não altera a quantidade de neurônios reativos a NADH-diaforase no jejuno, mas interfere com a área do corpo celular, impedindo que o corpo da célula neuronal atinja dimensões semelhantes às observadas em animais com dieta não autoclavada, sugerindo uma atividade metabólica mais baixa para os neurônios.

Em protocolos de desnutrição e renutrição, os neurônios mioentéricos imunorreativos ao NADH-diaforase do intestino grosso de ratos sofreram redução em 15% da área (CASTELUCCI et al., 2002b). Nos protocolos de I/R-i, a isquemia da AMS com 4 h de reperfusão, os neurônios mioentéricos NOS-IR, ChAT-IR e calretinina-IR demonstraram redução da área (PAULINO et al., 2011). Por outro lado, a isquemia de aa. ileais acarretou aumento na área do perfil dos neurônios NOS-IR com 6 h e 24 h de reperfusão e aumento na área do perfil dos neurônios ChAT-IR com 1 semana de reperfusão (PALOMBIT et al., 2013).

No presente trabalho não foi possível detectar alterações na área do perfil, DM_{ax} e DM_{ín} dos neurônios Hu-IR, isso pode ser justificado, devido ao Hu marcar todas as classes neuronais. Ao ser obtido a área do perfil neuronal, foi encontrada uma ampla variedade de tamanhos de neurônios, entre pequenos e grandes e assim tornou-se mais difícil obter um resultado estatisticamente significativo.

A análise do histograma de distribuição de frequência da área dos neurônios Hu-IR apresentou maior concentração de neurônios entre 150-300 μm^2 nos grupos estudados.

Com relação às células gliais entéricas S100-IR, pode-se observar uma diminuição tanto da área do perfil, DM_{ax} e DM_{in} nos grupos isquêmicos de 0 h, 24 h e 14 dias, quando comparado aos grupos Controle e Sham e, pequeno aumento no grupo de 24 h ao ser comparado ao grupo de 0 h.

A análise do histograma de distribuição de frequência da área das células gliais entéricas S100-IR apresentou maior concentração de células gliais entéricas entre 50-100 μm^2 nos grupos estudados.

Não foi possível obter medidas da área do perfil das células gliais entéricas GFAP-IR, a impossibilidade dessa análise se dá pela dificuldade de delimitar o corpo celular dessas células, visto que há grande quantidade de filamentos.

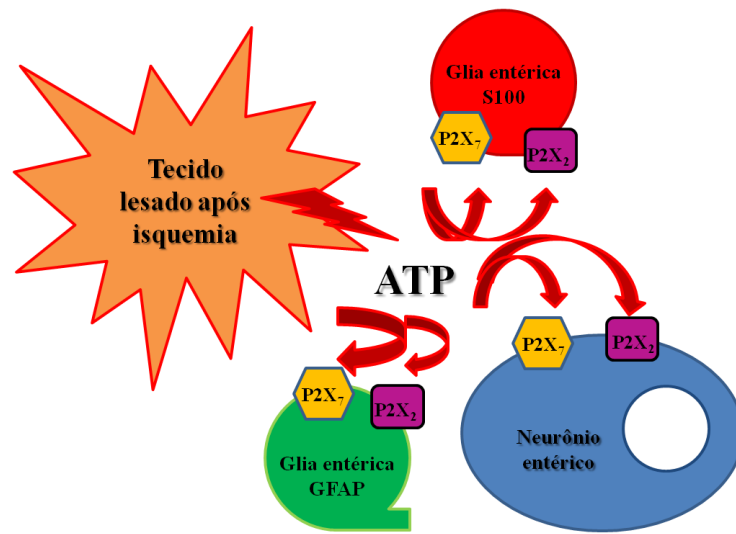
5.5 Considerações Finais

O modelo experimental de isquemia/reperfusão usado neste trabalho tem sua relevância visto que a taxa de mortalidade de pacientes internados em unidades de terapia intensiva que sofrem de comprometimento intestinal é alta. Portanto, o modelo mostrou ser eficaz, pois conseguiu mimetizar possíveis alterações que poderiam ser encontradas em pacientes com essa condição clínica.

A importância deste trabalho está em demonstrar, de maneira original, alterações da I/R-i nas células gliais entéricas. O esquema da figura 30 demonstra que o tecido lesado após a isquemia intestinal libera ATP que vai se ligar aos receptores P2X₂ e P2X₇ presentes nos neurônios entéricos e célula gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR.

As alterações observadas nos receptores P2X₂, P2X₇, neurônios entéricos e células gliais entéricas S100-IR, GFAP-IR, com relação à dupla marcação, densidade, área do perfil podem contribuir para o desenvolvimento de estudos patofisiológicos das disfunções gastrintestinais que possam ocorrer na isquemia seguida de reperfusão intestinal.

Figura 30 - Esquema de tecido lesado após isquemia.



O tecido lesado após a isquemia libera ATP. O ATP se liga a receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇ presentes nos neurônios entéricos e células gliais entéricas imunorreativas a S100 e GFAP.

Com base nos objetivos estabelecidos, a metodologia empregada e os resultados obtidos, conclui-se que:

1. Os receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇ foram identificados tanto em neurônios como em células gliais entéricas em todos os grupos estudados e foram afetados pela I/R-i;
2. As células gliais entéricas apresentaram colocalização parcial com S100 e GFAP;
3. A I/R-i provocou perda de neurônios;
4. A I/R-i levou a um aumento na quantidade de células gliais entéricas S100-IR e GFAP-IR;
5. A I/R-i não alterou a área do perfil dos neurônios Hu-IR;
6. A I/R-i provocou diminuição da área do perfil das células gliais entéricas S100-IR;
7. A I/R-i levou a proliferação de células gliais entéricas;
8. O grupo Sham apresentou alterações na dupla marcação, densidade e área do perfil, como provável consequência de manipulação visceral;
9. A isquemia dos vasos ileais com diferentes períodos de reperfusão demonstrou ser um modelo experimental importante para o estudo do SNE, sendo que esta pode provocar alterações na densidade, morfologia e induzir proliferação de células gliais entéricas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci.**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.
- ABBRACCHIO, M. P.; BOEYNAEMS, J. M.; BARNARD, E. A.; BOYER, J. L.; KENNEDY, C.; MIRAS-PORTUGAL, M. T.; KING, B. F.; GACHET, C.; JACOBSON, K. A.; WEISMAN, G. A.; BURNSTOCK, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family¹. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 52-55, 2003.
- ABDO, H.; DERKINDEREN, P.; GOMES, P.; CHEVALIER, J.; AUBERT, P.; MASSON, D.; GALMICHE, J. P.; VANDEN BERGHE, P.; NEUNLIST, M.; LARDEUX, B. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. **FASEB J.**, v. 24, n. 4, p. 1082-1094, 2010.
- ANUP, R.; SUSAMA, P.; BALASUBRAMA, K. A. Role of xanthine oxidase in small bowel mucosal dysfunction after surgical stress. **British Journal of Surgery**, v. 87, p. 1094-1101, 2000.
- AOKI, N.; SIEGFRIED, M.; TSAO, P.; LENTO, P.; LEGER, A. Beneficial mechanisms of action of a prostacyclin enhancing agent in splanchnic artery occlusion shock. **Chem. Pathol. Pharm.**, v. 60, p. 775-789, 1988.
- BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; MAURER, C. A.; FISOGNI, S.; DI FABIO, F.; CADEI, M.; MORELLI, A.; PANAGIOTIS, T.; CATHOMAS, G.; SALERNI, B. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. **Gut**, v. 55, p. 41-46, 2008.
- BASSOTTI, 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.
- BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A.; SALERNI, B. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? **Laboratory Investigation**, v. 87, p. 628-632, 2007b.
- BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Funcional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Auton. Neurosci.**, v. 85, p. 1-17, 2000.
- BIAN, X.; REN, J.; DEVRIES, M.; SCHNEGELSBERG, B.; COCKAYNE, D. A.; FORD, A. P. D. W.; GALLIGAN, J. J. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X₃ subunit. **J. Physiol.**, v. 551, n. 1, p. 309-322, 2003.

* De acordo com:

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

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

BOESMANS, W.; CIRILLO, C.; VAN DEN ABBEEL, V.; VAN DEN HAUTE, C.; DEPOORTERE, I.; TACK, J.; VANDEN BERGHE, P. Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 25, n. 2, p. 151-160, 2012.

BONVENTRE, J. V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 43, p. 1160-1178, 1993.

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

BRADLEY, J. S.; PARR, E. J.; SHARKEY, K. A. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. **Cell Tissue Res.**, v. 289, p. 455-461, 1997.

BREHMER, A.; GRONERB, R.; DIMMLERC, A.; PAPADOPOULOS, T.; SCHRODLA, F.; NAUHUBERA, W. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 112, p. 49-59, 2004.

BROOKES, S. J. H.; SONG, Z. M.; RAMSAY, G. A.; COSTA, M. Long aboral projections of Dogiel type II, AH neurons within the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 5, p. 4013-4022, 1995.

BURNSTOCK, G.; KRÜGEL, U.; ABBRACHIO, M. P.; ILLES, P. Purinergic signaling: From behavior to pathological brain function. **Progress in Neurobiology**. v. 95, p. 229-274, 2011.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Rev. Drug Discov.**, v. 7, n. 7, p. 575-590, 2008.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E.; Cellular distribution and function of P2 receptor subtypes in different systems. **Int. Rev. Cytol.**, v. 240, p. 31-304, 2004.

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

BUSH, T. G.; SAVIDGE, T. C.; FREEMAN, T. C.; COX, H. J.; CAMBELL, E. A.; MUCKE, L.; JOHNSON, M. H.; SOFRONIEW, M. V. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 189-201, 1998

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

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

CAPPELLA, P.; GASPARRI, F.; PULICI, M.; MOLL, J. A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining. **Cytometry A**, v. 73, p. 626-636, 2008.

CARAMELO, C.; ESPINOSA, G.; MANZARBEITIA, F.; CERNADAS, M. R.; PÉREZ TEJERIZO, G.; TAN, D.; MOSQUERA, J. R.; DIGIUNI, E.; MONTÓN, M.; MILLÁS, I.; HERNANDO, L.; CASADO, S.; LÓPEZ-FARRÉ, A. Role of endothelium-related mechanisms in the pathophysiology of renal ischemia/reperfusion in normal rabbits. **Circ. Res.**, v. 79, n. 5, p. 1031-1038, 1996.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, p. 2825-2837, 2004.

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

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

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

CHAN, K. L.; ZHANG, X. H.; FUNG, P. C.; GUO, W. H., TAM, P. K. H. Role of nitric oxide in intestinal ischemiareperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. **Br J Surg.**, v. 86, p. 1427-1432, 1999.

CHEHREHASA, F.; MEEDENIYA, A. C.; DWYER, P.; ABRAHAMSEN, G.; MACKAY-SIM, A. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. **J. Neurosci. Methods**, v. 177, p. 122-130, 2009.

CHEN, C. C.; AKOPIAN, A. N.; SIVILOTTI, L.; COLQUHOUN, D.; BURNSTOCK, G.; WOOD, J. N. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature**, v. 377, p. 428-431, 1995.

CHRISTOFI, F. L.; ZHANG, H.; YU, J. G.; GUZMAN, J.; XUE, J.; KIM, M.; WANG, Y. Z.; COOKE, H. J. Differential gene expression of adenosine A1, A2a, A2b, and A3 receptors in the human enteric nervous system. **J. Comp. Neurol.**, v. 439, p. 46-64, 2001.

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

CLAVIEN, P. A.; DURIG, M.; HARDER, F. Venous mesenteric infarction: a particular entity. **Br. J. Surg.**, v. 75, p. 252-258, 1988.

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

COLOMAR, A.; AMEDEE, T. ATP stimulation of P2X(7) receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, p. 927-936, 2001.

COMPOLO, M.; DI PAOLA, R.; IMPELLIZZERI, D.; CRUPI, R.; MORITTU, V. M.; PROCOPIO, A.; PERRI, E.; BRITTI, D.; PELI, A.; ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Effects of a polyphenol present in olive oil,oleuropein aglycone, in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion injury. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 277-287, 2013.

CORNEJO, R.; GATICA, H.; SEGOVIA, E.; CORTES, C. Intestinal necrosis as clinical presentation of takayasu's arteritis: reporto f one case. **Rev. Med. Chil.**, v. 130, n. 10, p. 1159-1164, 2002.

CORREIA-DE-SÁ, P.; ADÃES, S.; TIMÓTEO, M. A.; VIEIRA, C.; MAGALHÃES-CARDOSO, T.; NASCIMENTO, C.; DUARTE-ARAÚJO, M. Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: On the role of secreted adenosine deaminase. **Auton. Neurosci. Basic Clin.**, v. 126-127, p. 211-224, 2006.

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

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

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

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

DEFRAIGNE, J. O.; DETRY, O.; PINCEMAIL, J.; FRANSSEN, C.; MEURISSE, M.; LAMY, M.; LIMET, R. Direct evidence of free radical production after ischaemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies. **Eur. J. Vasc. Surg.**, v. 8, n. 5, p. 537-543, 1994.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; FERRARI, D.; SANZ, J. M.; VENKETARAMAN, V.; BARICORDI, O. R. Cytolytic P2X purinoceptors. **Cell Death Differ.**, v. 5, n. 3, p. 191-199, 1998.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v. 7, p. 505-512, 2005.

DING, S.; SACHS, F. Single channel properties of P2X2 purinoceptors. **J. Gen. Physiol.**, v. 113, p. 695-720, 1999.

DOCKENDORF, B. L.; FRAZEE, R. C.; PETERSON, W. G.; MYERS, D. Treatment of acute intestinal ischemia with hyperbaric oxygen. **South Med. J.**, v. 86, n. 5, p. 518-520, 1993.

DONATO, R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular response: the case of certain S100 proteins. **Curr. Mol. Med.**, v. 7, n. 8, p. 711-724, 2007.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique**, Perugia, Italy, v. 60, p. 540-551, 2003.

DONNELLY-ROBERTS, D.; MCGARAUGHTY, S.; SHIEH, C. C.; HONORE, P.; JARVIS, M. F. Painful Purinergic receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 324, n. 2, p. 409-415, 2007.

DUARTE-ARAÚJO, M.; NASCIMENTO, C.; TIMÓTEO, M. A.; MAGALHÃES-CARDOSO, M. T.; CORREIA-DE-SÁ, P. Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 519-533, 2009.

DULAC, C.; LE DOUARIN, N. M. Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6358-6362, 1991.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem., Res.**, v. 25, p. 1439-1451, 2000.

EVENNETT, N. J.; PETROV, M. S.; MITTAL, A.; WINDSOR, J. A. Systematic Review and Pooled Estimates for the Diagnostic Accuracy of Serological Markers for Intestinal Ischemia **Windsor World J. Surg.**, v. 33, p. 1374-1383, 2009.

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

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

FLAMANT, M.; AUBERT, P.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; BOURREILLE, A.; NEUNLIST, M. R.; MAHÉ, M. M.; MEURETTE, G.; MARTEYN, B.; SAVIDGE, T.; GALMICHE, J. P.; SANSONETTI, P. J.; NEUNLIST, M. Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. **Gut**, v. 60, n. 4, p. 473-483, 2011.

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 297-324, 2006.

FRANKE, H.; KRÜGEL, U.; ILLES, P. P2 receptors and neuronal injury. **Pflugers Arch.**, v. 452, p. 622-644, 2006.

FRANKE, H.; GÜNTHER, A.; GROSCHE, J.; SCHMIDT, R.; ROSSNER, S.; REINHARDT, R.; FABER-ZUSCHRATTER, H.; SCHNEIDER, D.; ILLES, P. P2X₇ receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 63, p. 686-699, 2004.

FREDHOLM, B. B.; ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; DUBYAK, G. R.; HARDEN, T. K.; JACOBSON, K. A.; CHWABE, U.; WILLIAMS, M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. **TIPS**, v. 18, p. 79-82, 1997.

FREYTAG, C.; SEEGER, J.; SIEGEMUND, T.; GROSCHE, J.; GROSCHE, A.; FREEMAN, D. E.; SCHUSSER, G. F.; HÄRTIG, W. Immunohistochemical characterization and quantitative analysis of neurons in the myenteric plexus of the equine intestine. **Brain Res.**, v. 244, p. 53-64, 2008.

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

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

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

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

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

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

GARCIA-CRIADO, F. J.; ELENO, N.; SANTOS-BENITO, F.; VALDUNCIEL, J. J.; REVERTE, M.; LOZANO-SÁNCHEZ, F. S.; LUDEÑA, M. D.; GOMEZ-ALONSO, A.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and

inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. **Transplantation.**, v. 66, n. 8, p. 982-990, 1998.

GEBOES, K.; RUTGEERTS, P.; ECTORS, N.; PENNINCKX, F.; VANTRAPPEN, G.; DESMET, V. J. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 103, n. 2, p. 239-447, 1992.

GENG, Y.; LI, J.; WANG, F.; LI, Q.; WANG, X.; SUN, L.; LI, W. Epidermal Growth Factor Promotes Proliferation and Improves Restoration After Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. **Inflammation**, v. 9, 2013.

GIARONI, C.; KNIGHT, G. E.; RUAN, H. -Z.; GLASS, R.; BARDINI, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G.; BURNSTOCK, G. P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 1313-1323, 2002.

GIARONI, C.; MARCHET, S.; CARPANESE, E.; PRANDONI, V.; OLDRINI, R.; BARTOLINI, B.; MORO, E.; VIGETTI, D.; CREMA, F.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Role of neuronal and inducible nitric oxide synthases in the guinea pig ileum myenteric plexus in vitro ischemia and reperfusion. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 25, n. 2, p. 114-126, 2012.

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.**, 2013. In press.

GITTERMAN, D. P.; EVANS, R. J. Properties of P2X and P2Y receptors are dependent on artery diameter in the rat mesenteric bed. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 1561-1568, 2000.

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

GONÇALEZ, P. O.; CLEBIS, N. K.; MARI, R. B.; GAGLIARDO, K. M.; STABILLE, S. R.; FARIA, H. G.; LIBERTI, E. A.; JR, J. R. Morphological effects of autoclaved diet on the myenteric neurons of rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 17, n. 43, p. 4799-4803, 2011.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; FONTES, R. B. V.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. **Auton. Neurosc.**, v. 126-127, p. 277-284, 2006.

GOMES, P.; CHEVALIER, J.; BOESMANS, W.; ROOSEN, L.; VAN DEN ABBEEL, V.; NEUNLIST, M.; TACK, J.; VANDEN BERGHE, P. ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 21, n. 8, p. 862-870, 2009.

GONZALEZ-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.

GORE, R. M.; YAGHMAI, V.; THAKRAR, K. W.; MEHTA, U. K.; NEWMARK, G. M.; MILLER, F. H. Imaging in intestinal ischemic disorders. **Radiol. Clin. North Am.**, v. 46, n. 5, p. 845-875, 2008.

GRANGER, D. N.; RICHARDSON, P. D.; KVIETYS, P. R.; MORTILLARO, N. A. Intestinal blood flow. **Gastroenterology**, v. 78, n. 4, p. 837-863, 1980.

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

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

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

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

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

HARWARD, T. R.; BROOKS, D. L.; FLYNN, T. C.; SEEGER, J. M. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. **J. Vasc. Surg.**, v. 18, p. 459-467, 1993.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HENS, J.; VANDERWINDEN, J. M.; DE LAET, M. H.; SCHUERMAN, D. W.; TIMMERMANS, J. P. Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, p. 464-471, 2001.

HSIEH, H. L.; SCHÄFER, B. W.; WEIGLE, 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.

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

HUPPERTZ, B.; FRANK, H-G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade - morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anat. Embriol.**, v. 200, p. 1-18, 1999.

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

IRNICH, D.; BURGSTÄHLER, R.; BOSTOCK, H.; GRAFE, P. ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres. **Pain**, v. 92, p. 343-350, 2001.

JAMES, G.; BUTT, A. M. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca⁽²⁺⁾ signalling in glial cell pathology in the central nervous system. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 447, p. 247-260, 2002.

JONES B. A.; GORE G. J. physiology and pathology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas and intestine. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. 1174-1188, 1997.

KASZAKI, J.; ÉRCES, D.; VARGAS, G.; SZABÓ, A.; VÉCSEI, L.; BOROS, M. Kynurenes and intestinal neurotransmission: the role of N-methyl-D-aspartate receptors. **J. Neural. Transm.**, v. 119, p. 211-223, 2012.

KIM, M.; JIANG, L. H.; WILSON, H. L.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. **EMBO J.** v. 20, n. 22, p. 6347-6358, 2001.

KIMBALL, B. C.; MULHOLLAND, M. W. Enteric glia exhibit P2u receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. **J. Neurochem.**, v. 66, p.604-612, 1996.

KIMELBERG, H. K.; NOREMBERG, M. D. Astrocytes. **Sci. Am.**, v. 260, p. 66-72, 1989.

LAKHAN, E. L.; KIRCHGESSNER, A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 7-37, 2010.

LARAJEIRA, C.; PACHNIS, V. Enteric nervous system development: Recent progress and future challenges. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 151, p. 61-69, 2009.

LE FEUVRE, R.; BROUGH, D.; ROTHWELL, N. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 447, p. 261-269, 2002.

LEWIS, C.; NEIDHART, S.; HOLY, C.; NORTH, R. A.; BUELL, G.; SURPRENANT, A. Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. **Nature**, v. 377, p. 432-435, 1995.

LIN, Z.; GAO, N., HU, Z. H.; LIU, S.; GAO, C.; REN, J.; XIA, J.; PECK, C. O.; WOOD, D. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. **Neurogastroenterol. Mot.**, v. 14, p. 197-204, 2002.

LINDESTROM, L.; EKBLAD, E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, p. 1212-1222, 2004.

LOCHSHIN, R. A.; ZACHERI, Z. Caspase-independent cell death. **Curr. Cell Biol.**, v. 14, p. 727-733, 2002.

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

LOMAX, A. E.; ZHANG, J. Y.; FURNESS, J. B. Origins of Cholinergic Inputs to the Cell Bodies of Intestinofugal Neurons in the Guinea Pig distal Colon. **Journal of Comparative Neurology**, v. 416, p. 451-460, 2000.

LOPACHIN, R. N. JR.; ASCHNER, M. Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanisms. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 118, n. 2, p. 141-158, 1993.

MARETTA, M.; TÓTH, S.; BUJDOS, M.; TÓTH, S. JR; JONECOVÁ, Z.; VESELA, J. Alterations of epithelial layer after ischemic preconditioning of small intestine in rats. **J. Mol. Hist.**, v. 43, n. 2, p. 171-178, 2012.

MARTEAU, F.; LE POUL, E.; COMMUNI, D.; COMMUNI, D.; LABOURET, C.; SAVI, P.; BOEYNAEMS, J. M.; GONZALEZ, N. S. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, n. 1, p. 104-112, 2003.

MASSBERG, S.; MESSMER, K. The nature of ischemia/reperfusion injury. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 4217-4223, 1998.

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

MATSUO, S.; YANG, W. L.; AZIZ, M.; JACOB, A.; WANG, P. Cyclic arginine-glycine-aspargate attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia/reperfusion. **Crit. Care**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2013.

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

MENDES, C. E.; PALOMBIT K.; TAVARES DE LIMA, W.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on rat enteric glial cells expressing the P2X₂ receptor. Manuscripto em preparação, 2013.

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

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

MIZUNO, M. S.; CRISMA, A. R.; BORELLI, P.; CASTELUCCI, P. Expression of the P2X₂ receptor in different classes of ileum myenteric neurons in the female obese *ob/ob* mouse. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 34, p. 4693-4703, 2012.

MYERS, S. L.; HERNANDEZ, R. Oxygen free radical regulation of rat splanchnic blood flow. **Surgery**, v. 11, p. 347-354, 1992.

NABORS, L. B.; FURNEAUX, H. M.; KING, P. H. HuR, a novel target of anti-Hu antibodies, is expressed in non-neural tissues. **J. Neuroimmunol.**, v. 92, p. 152-159, 1998.

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

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

OGWA, S.; GERLACH, H.; ESPOSITO, C.; PASAGIAN-MACAULAY, A.; BRETT, J.; STERN, D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 1090-1098, 1990.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

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

OLIVEIRA, C. O.; IKUTA, N.; REGNER, A. Biomarcadores prognósticos no traumatismo crânio-encefálico grave. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. Canoas, RS, Brasil, v. 20, n. 4, p. 134-139, 2008.

OLIVEIRA, S. D. S.; COUTINHO-SILVA, R.; SILVA, C. L. M. Endothelial P2X7 receptors' expression is reduced by schistosomiasis. **Purinergic Signalling**, v. 9, p. 81-89, 2013.

OTSUKI, Y.; LI, Z.; SHIBATA, M. Apoptotic detection methods-from morphology to gene. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 275-340, 2003.

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**, 2013. In press.

PARKS, D. A.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N.; HAMILTON, S. R.; MCCORD, J. M. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. **Gastroenterology**, v. 82, p. 9-15, 1982.

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.

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

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

PONTELL, L.; CASTELUCCI, P.; BAGYÁNSZKI, M.; THACKER, M.; NURGALI, K.; BRON, R.; FURNESS, J. B. Structural changes in the epithelium of the small intestine and

immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. **Virchows Arch.**, v. 455, n. 1, p. 55-65, 2009.

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

POWLEY, T. L.; HOLST, M. C.; BOYD, D. B.; KELLY, J. B. Three-dimensional reconstructions of autonomic projections to the gastrointestinal tract. **Microsc. Res. Tech.**, v. 29, n. 4, p. 297-309, 1994.

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

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

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

RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, J. W.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A. R.; REED, J. K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Neurobiology**, v. 59, p. 663-690, 1999.

REN, J.; BIAN, X.; DEVRIES, M.; SCHNEGELSBERG, B.; COCKAYNE, D. A.; FORD, A. P.; GALLIGAN, J. J. P2X₂ subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 552, p. 809-821, 2003.

RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, W. B. Reperfusion injury after intestinal ischemia: pathophysiology and experimental models. **J. Vasc. Br.**, v. 4, n. 2, p. 183-194, 2005.

RIVERA, L. R.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BRON, R.; FURNESS, J. B. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea-pig enteric nervous. **Acta Neuropathol.**, v. 118, p. 261-270, 2009.

RIVERA, L. R.; PONTELL, L.; CHO, H. J.; CASTELUCCI, P.; THACKER, M.; POOLE, D. P.; FRUGIER, T.; FURNESS, J. B. Knock out of neuronal nitric oxide synthase exacerbates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. **Cell and Tissue Research**, v. 349, p. 565-576, 2012.

ROBERTS, J. A.; LUKEWICH, M. K.; SHARKEY, K. A.; FURNESS, J. B.; MAWE, G. M.; LOMAX, A. E. The roles of purinergic signaling during gastrointestinal inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, p. 659-666, 2012.

RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S. T.; LEAL, R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ion: possible key factor in astrocytic plasticity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 325-338, 1997.

- RODRIGUES, D. M.; LI, A. Y.; NAIR, D. G.; BLENNERHASSETT, M. G. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, p. 44-56, 2011.
- ROMANO, S.; ROMANO, L.; GRASSI, R. Multidetector row computed tomography findings from ischemia to infarction of the large bowel. **Eur. J. Radiol.**, v. 61, p. 433-444, 2007.
- RÜHL A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 17, p. 777-790, 2005.
- RÜHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. Enteric Glia. **Neurogastroenterology**, v. 16, p. 44-49, 2004.
- SANTOS, C. H. M.; PONTES, J. C. D. V.; GOMES, O. M. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 26, n. 1, p. 28-33, 2006.
- SAVIDGE, T. C. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. **Gastroenterology**, v. 132, p. 1344-1358, 2007.
- SAYEGH, A. I.; RITTER, R. C. Morphology and distribution of nitric oxide synthase-, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. **The Anatomical Record**, v. 271A, p. 209-216, 2003.
- SCHAFFER, K. A. Cell cycle: a review. **Vet. Pathol.**, v. 35, p. 461-478, 1998.
- SCHULZE-LOHOFF, E.; HUGO, C.; ROST, S.; ARNOLD, S. GRUBER, A; BRUNE, B.; STERZEL, R. B. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X₇ receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. F962-F971, 1998.
- SHERR, C. J.; McCORMICK, F. The Rb and p53 pathway in cancer: Review. **Cancer Cell**. v. 2, p. 103-111, 2002.
- SIMMY, T.; ANUP, R.; PRABHU, R.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Effect of surgical manipulation of the rat intestine on enterocyte populations. **Surgery**, v. 130, n. 3, p. 479-488, 2001.
- 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 cavitory viscera allocated to the celiac plexus. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 49, n. 1, p. 63-67, 2008.
- SLATER, N. M.; BARDEN, J. A.; MURPH, C. R. Distributional changes of purinergic receptor subtypes P2X₁₋₇ in uterine epithelial cells during early pregnancy. **Histochemi. J.**, v. 32, p. 365-372, 2000a.
- SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPHY, C. R. The purinergic calcium channels P2X_{1,2,5,7} are down-regulated while P2X_{3,4,6} are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. **Histochem. J.**, v. 32, n. 9, p. 571-580, 2000b.

SOLLE, M.; LABASI, J.; PERREGAUX, D. G.; STAM, E.; PETRUSHOVA, N.; KOLLER, B. H.; GRIFFITHS, R. J.; GABEL, C. A. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 1, p. 125-132, 2001.

SONG, Z. M.; COSTA, M.; BROOKES, S. J. H. Projections of submucous neurons to the myenteric plexus in the guinea pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v. 399, p. 255-268, 1998.

SORCI, G.; RIUZZI, F.; ARCURU, C.; BIANCHI, R.; BROZZI, F.; TUBARO, C.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. The many faces of S100B protein: when an extracellular factor inactivates its own receptor and activates another one. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, Orlandini, Florence, v. 115, n. 1-2, p. 147-151, 2010.

SOYDAN, G.; SÖKMENSÜER, C.; KILINÇ, K.; TUNCER, M. The effects of sildenafil on the functional and structural changes of ileum induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, p. 87-92, 2009.

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

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

SPERLÁGH, B.; KOFALVI, A.; DEUCHARS, J. Involvement of P2X₇ receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 81, p. 1196-1211, 2002.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 39, p. 5346-5358, 2010.

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

TAN, L. L.; BORNSTEIN, J. C.; ANDERSON, C. R. The neurochemistry and innervations patterns of extrinsic sensory and sympathetic nerves in the myenteric plexus of the C57BL6 mouse jejunum. **Neuroscience**, v. 166, p. 564-579, 2010.

TANG, X.; FALLS, D. L.; LI, X.; LANE, T.; LUSKIN, M. B. Antigen-retrieval procedure for bromodeoxyuridine immunolabeling with concurrent labeling of nuclear DNA and antigens damaged by HCl pretreatment. **J. Neurosci.**, v. 27, p. 5837-5844, 2007.

TAUPIN, P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. **Brain Res. Rev.**, v. 53, p. 198-214, 2007.

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

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

TITTLE, R. K.; HUME, R. I. Opposite effects of zinc on human and rat P2X2 receptors. **The journal of neuroscience**, v. 28, n. 44, p. 11131-11140, 2008.

VAN CROMBRUGGEN, K.; VAN NASSAUW, L.; TIMMERMANS, J. P.; LEFEBVRE, R. A. Inhibitory purinergic P2 receptor characterisation in rat distal colon. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 257-271, 2007.

VAN NASSAUW, L.; BROUNS, I.; ADRAENSEN, D.; BURNSTOCK, G.; TIMMERMANS, J. P. Region-specific distribution of the P2Y₄ receptor in enteric glial cells and interstitial cells of Cajal within the guinea-pig gastrointestinal tract. **Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126-127, p. 299-306, 2006.

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

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

VENTURA-MARTINEZ, R.; SANTIAGO-MEJIA, J.; GOMES, C.; RODRIGUES, R.; FORTOUL, T. I. Acute morphological changes in guinea-pig ileum myenteric neurons after ischemia in situ with superfusion in vitro. **Pathol. Res. Pract.**, v. 204, p. 121-127, 2008.

VERKHRATSKY, A., O. A. KRISHTAL. Purinoceptors on neuroglia. **Mol Neurobiol.**, v. 39, n. 3, p. 190-208, 2009.

VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. **Langenbecks Arch Surg.**, v. 396, p. 13-29, 2011.

VOLONTÉ, C.; D'AMBROSI, N. Membrane compartments and purinergic signalling: the purinone, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. **FEBS Journ.**, v. 276, p. 318-329, 2009.

VON BAHTEN, L. C.; MANTOVANI, M.; NICOLUZZI, J. E. L.; SILVEIRA, F.; VON BAHTEN, A. C. Heat loss caused by bowel exposition to room temperature in rats. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 33, p. 265-271, 2006

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2011.

VON BOYEN, G. B.; STEINKAMP, M.; REINSHAGEN, M.; SCHAFFER, K. H.; ADLER, G.; KIRSCH, J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**, v. 53, p. 222-228, 2004.

VULCHANOVA, L.; ARVIDSSON, U.; RIEDHL, M.; WANG, J.; BUELL, G.; SUPRENTANT, A.; NORTH, R. A. Differential distribution of two ATP-gated ion channels

P2x receptors determined by immunohistochemistry. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 8063-8067, 1996.

XIANG, Z.; BURNSTOCK, G. P2X2 and P2X3 purinoceptors in the rat enteric nervous system. **Histochem. Cell Biol.**, v. 121, p. 169-179, 2004.

YIANGOU, Y.; FACER, P.; BAECKER, P. A.; FORD, A. P.; KNOWLES, C. H.; CHAN, C. L. H.; WILLIAMS, N. S.; ANAND, P. ATP-gated ion channel P2X3 is increased in human inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 13, p. 365-369, 2001.

YURDAKAN, G.; TEKIN, I. O.; COMERT, M.; ACIKGOZ, S.; SIPAHU, E. Y. The presence of oxidized low-density lipoprotein and inducible nitric oxide synthase expression in renal damage after intestinal ischemia reperfusion. Kaohsiung. **Journal of Medical Sciences**, v. 28, p. 16-22, 2011.

ZAGORODNYUK, V. P.; BROOKES, S. J. H. Transduction sites of vagal mechanoreceptors in the guinea pig esophagus. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 6249-6255, 2000.

ZIMMERMAN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 362, p. 299-309, 2000.

ZIZZO, M. G.; MULÉ, F.; SERIO, R. Evidence that ATP or a related purine is an excitatory neurotransmitter in the longitudinal muscle of mouse distal colon. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, p. 152-160, 2007.