

**CRISTINA EUSÉBIO MENDES**

**ESTUDO DAS CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS IMUNORREATIVAS AOS  
RECEPTORES P2X<sub>2</sub> E P2X<sub>7</sub> 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

## RESUMO

MENDES, C.E. **Estudo das células glias entéricas imunorreativas aos receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub> do íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.** 2013. 114 f. 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 P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>. 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 P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>; b) houve diminuição nas densidades das células aos receptores P2X<sub>2</sub>-IR e P2X<sub>7</sub>-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 P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors in the ileum of rats subjected to ischemia and reperfusion.** 2013. 114 f Master thesis (Ciências Morfofuncionais) - 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 P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub>; b) a decrease in density of cells immunoreactive (-IR) P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub> 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.

**Key words:** Intestinal ischemia. Reperfusion. Enteric glial cells. Purinergic receptors. Enteric nervous system.

## **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 mecânicos 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  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 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 e col. (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,  $\alpha$ -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 P2X<sub>7</sub> e P2Y<sub>2</sub> 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 P2X<sub>2</sub> e resultados de isquemia de ramos da artéria ileal demonstraram alterações nos neurônios que expressam o receptor P2X<sub>7</sub> (PALOMBIT et al., 2013).

A ativação de receptores purinérgicos como o P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>7</sub>, 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 P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>2</sub> 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).

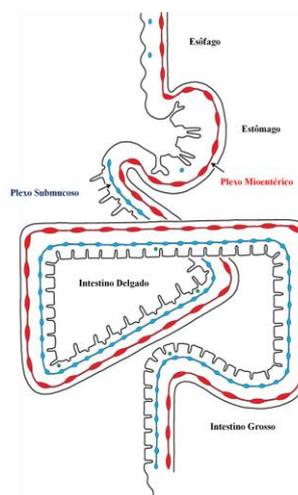
Alguns estudos demonstram que as células gliais entéricas respondem a estímulos exógenos pró-inflamatórios e a mediadores liberados por células do sistema imunológico, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a Il-6. Estes dados sugerem que as células gliais entéricas, participam 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.

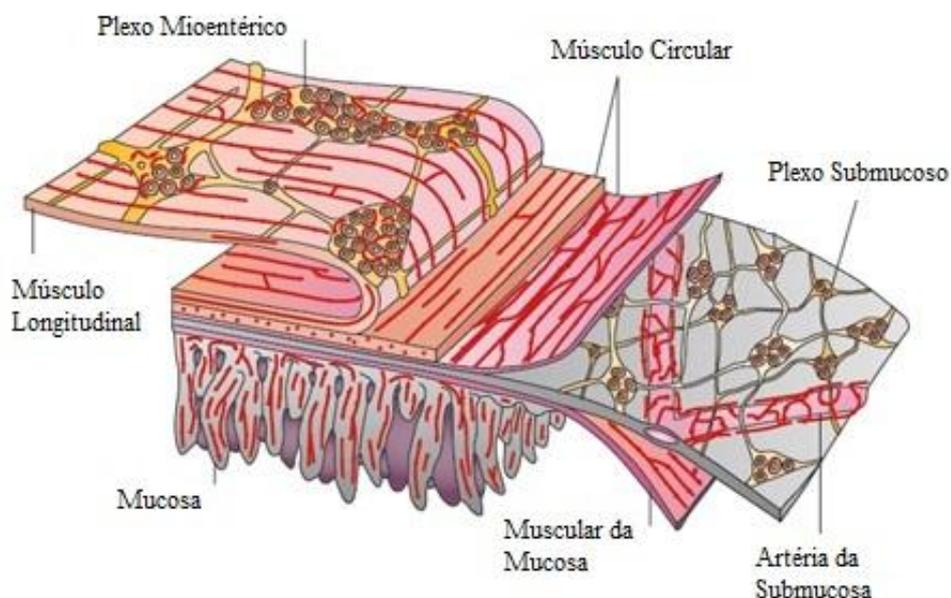


Fonte: Adaptado de Furness, 2006.

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).

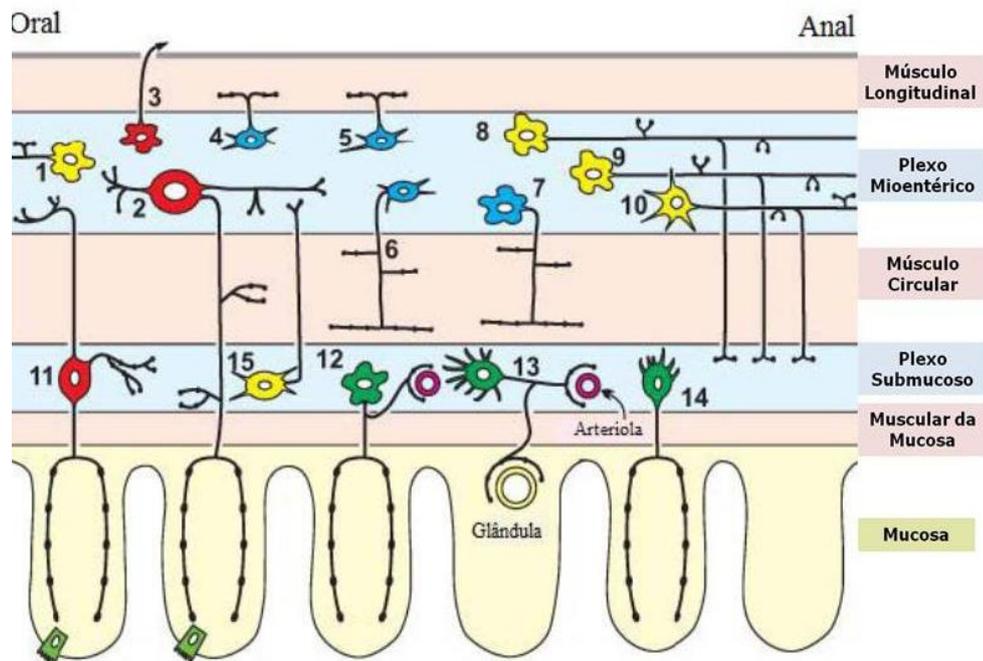
Os neurônios motores são divididos em: neurônios excitatórios e neurônios inibitórios da musculatura lisa do intestino, estes podem ser encontrados no plexo mioentérico e estão

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.

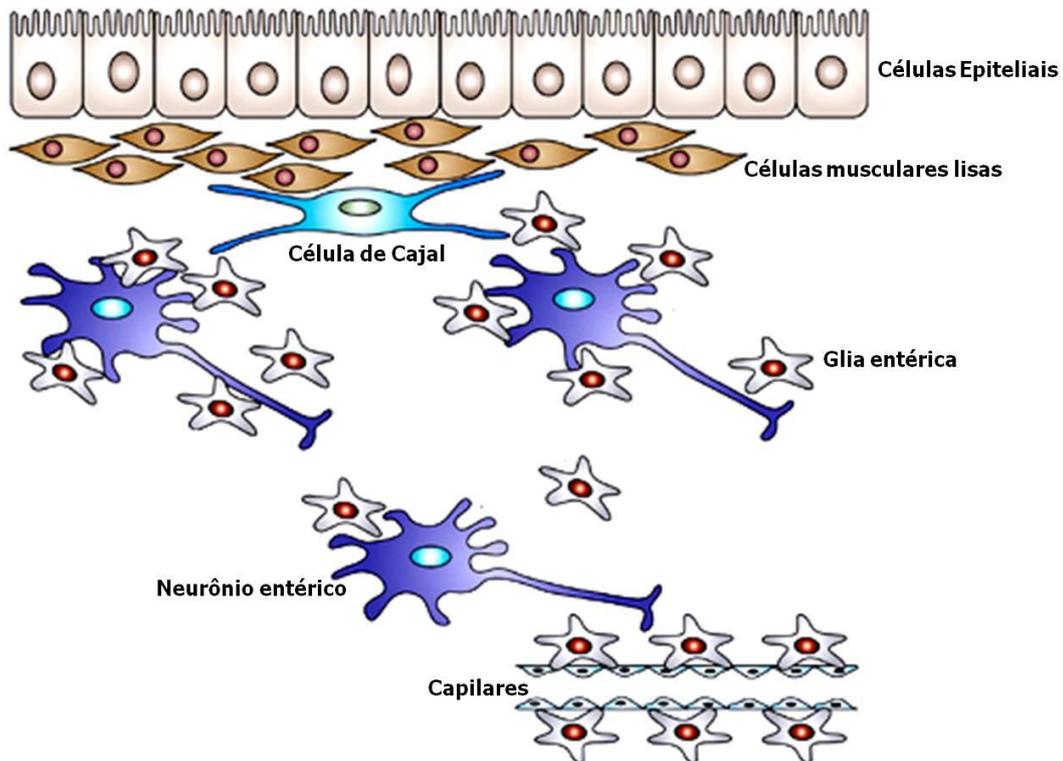
### 1.3 Células Gliais Entéricas

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 BASSOTTI, 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, P2Y<sub>4</sub>, e P2X<sub>7</sub> (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).

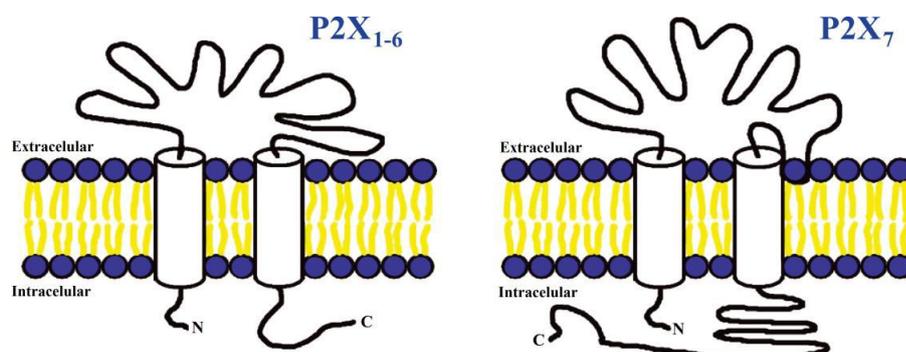
Os receptores P2 subdividem-se em receptores P2X que são canais iônicos e P2Y que são receptores acoplados a proteína G (ABBRACHIO et al., 2009; FREDHOLM et al., 1997; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

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<sub>1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14</sub>), 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>) 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<sub>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sub>). 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 P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>1</sub>/P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>4</sub>/P2X<sub>6</sub> (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 P2X<sub>7</sub>



Fonte: Di Virgilio et al., 1998.

O receptor P2X<sub>2</sub> 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 P2X<sub>2</sub> 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 P2X<sub>2</sub>; 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 P2X<sub>3</sub>, 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 P2X<sub>2</sub> 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 P2X<sub>2</sub> 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 P2X<sub>2</sub> 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 P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>1-7</sub> 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 P2X<sub>7</sub> e P2Y<sub>4</sub> (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 P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub> (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 P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>7</sub>.

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 P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>.



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

1. Os receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub> 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 P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family<sup>1</sup>. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 52-5, 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 P2X<sub>3</sub> subunit. **J. Physiol.**, v. 551, n. 1, p. 309-322, 2003.

---

\*De acordo com:

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

BOBNA, A. R. M. Efeitos da isquemia/reperfusão-intestinal sobre o receptor P2X<sub>2</sub> 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. Orientador: Profa. Dra Patricia Castelucci.

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. 2825-837, 2004.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; FURNESS, J. B. P2X<sub>2</sub> 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 P2X<sub>2</sub> 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. 252-8, 1988.

COLLO, G.; NORTH, R. A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; BUELL, G. Cloning of P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> 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 GB, D'Alecy LG,Shlafer M, Fantone III JC, Stanley JC. Clinical ischemic syndromes: mechanisms and consequences of tissue injury. **St Louis, The CV Mosby company.** p. 147-158, 1990.

DA SILVA, M. V. Estudo do efeito da colite ulcerativa experimental sobre o receptor P2X<sub>7</sub> no SNE de ratos Wistar. 2011 135 P (Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Orientador, Profa. Dra Patricia Castelucci.

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. 191-9, 1998.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v. 7, p. 505-12, 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. 409-15, 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 purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. **FEBS Lett.**, v. 447, p.71-75, 1999.

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. P2X<sub>7</sub> 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**. USA, 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.; PENNINGCKX, 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

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.; SCHUERMANN, 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.; BURGSTHALER, 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  $\text{Ca}^{2+}$  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. Pysiol.**, v. 273, p. 1174-1188, 1997.

KASZAKI, J.; ÉRCES, D.; VARGAS, G.; SZABÓ, A.; VÉCSEI, L.; BOROS, M. Kynurenines 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.; NORENBURG, 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 P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> 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.

LINDESTRÖM, 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. op 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. 104-12, 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-espartate 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 P2X<sub>2</sub> receptor. Manuscripto em preparação, 2013.

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

MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; MIZUNO, M. S.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X<sub>2</sub> 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 P2X<sub>2</sub> receptor in different classes of ileum myenteric neurons in the female obese *ob/ob* mouse. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 34, p. 4693-703, 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

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. 147-61, 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. 433-4, 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. **Neurogastroenterol.**, 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. **Ver. 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/P2X<sub>7</sub> 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 cavitary 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.; MURPHY, C. R. Distributional changes of purinergic receptor subtypes P2X<sub>1-7</sub> in uterine epithelial cells during early pregnancy. **Histochemi. J.**, v. 32, p. 365-72, 2000a.

SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPHY, C. R. The purinergic calcium channels P2X<sub>1,2,5,7</sub> are down-regulated while P2X<sub>3,4,6</sub> are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. **Histochem. J.**, v. 32, n. 9, p. 571-80, 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. 125-32, 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. P2X<sub>7</sub> receptors in the nervous system. **Prog. Neurobiology**, v. 78, p. 327-346, 2006.

SPERLÁGH, B.; KOFALVI, A.; DEUCHARS, J. Involvement of P2X<sub>7</sub> receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 81, p. 1196-211, 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 P2Y<sub>4</sub> 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 P2X<sub>7</sub>, 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.