

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA
FARMACOLOGIA E NEUROBIOLOGIA

Papel da interação nicotínica / purinérgica na modulação da libertação de acetilcolina na ileíte pós-inflamatória

Mercedes de Lacerda Marques da Silva Alves

M

2024



Declaração de Integridade Científica

Eu, Mercedes de Lacerda Marques da Silva Alves, inscrita no Mestrado Integrado em Medicina (MIM) no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP) declaro que, de acordo com as disposições do parágrafo a) do artigo 14 do código de conduta ética da Universidade do Porto, que o conteúdo desta dissertação reflete perspetivas, trabalhos de pesquisa e minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao submeter esta dissertação, declaro também que ela contém os resultados do meu trabalho de pesquisa e contribuições que não foram previamente submetidas a esta ou qualquer outra instituição.

Declaro ainda que todas as referências a outros autores estão em conformidade com as regras de atribuição e são referenciadas no texto por citação e identificadas na secção de referências bibliográficas. O projeto não inclui nenhum conteúdo cuja reprodução seja protegida por leis de direitos autorais.

Estou ciente de que a prática de plágio constitui uma forma de infração académica.

Mercedes Alves

29 de Maio de 2024

Papel da interação nicotínica / purinérgica na modulação da libertação de acetilcolina na ileíte pós-inflamatória

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

**Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Universidade do Porto**

Estudante:

Mercedes de Lacerda Marques da Silva Alves

Estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar (ICBAS) – Universidade do Porto (UP)

Endereço eletrónico: up201807754@icbas.up.pt

Orientadora:

Doutora Cátia Andreia Rodrigues Vieira, Biol, PhD

Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, MedInUP

Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia, ICBAS-UP

Endereço eletrónico: cavieira@icbas.up.pt

Coorientador:

Professor Doutor Paulo Correia de Sá, MD, PhD, Professor Catedrático

Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, MedInUP

Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia, ICBAS-UP

Endereço eletrónico: farmacol@icbas.up.pt

Porto, Junho de 2024

Estudante:

Mercedes de Lacerda Marques da Silva Alves
Mercedes de Lacerda Marques da Silva Alves

Orientadora:

Cátia Andreia Rodrigues Vieira
Doutora Cátia Andreia Rodrigues Vieira

Coorientador:

Paulo Correia de Sá
Professor Doutor Paulo Correia de Sá

Agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Cátia Andreia Rodrigues Vieira e ao meu coorientador, Professor Doutor Paulo Correia de Sá, por todo o apoio, motivação e orientação, ao longo da realização deste trabalho.

À Ana Guimarães, pela sua generosa disponibilidade e ajuda fundamental no laboratório. Aos meus pais, à Fátima, à Livinha, ao Francisco, ao André, ao João, à Babi, à Luana, à Sofia, ao Luís, ao Gabriel, ao Kilcher e à Maria Inês por todo o apoio incondicional juntamente com os bons tempos que vivemos durante este ano, obrigada por serem o meu maior suporte e fonte de motivação, nunca me esquecerei de tudo o que fizeram por mim. À minha Rosinha e à minha Sammy por serem a melhor companhia de todas as horas, e as minhas melhores amigas.

Resumo

As doenças inflamatórias intestinais são condições fisiopatológicas que apresentam elevada prevalência na sociedade, e afetam consideravelmente a qualidade de vida dos doentes¹. Perante uma inflamação, ocorrem alterações na libertação das purinas juntamente com modificações adaptativas dos recetores purinérgicos que são essenciais para a progressão das reações inflamatórias.

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor mais importante no controlo e regulação da motilidade gastrointestinal². A sua libertação ocorre a partir de neurónios entéricos e é regulada por recetores neuronais específicos. Muitos estudos têm vindo a confirmar o potencial papel de neuroprotecção neuronal mediada pelos recetores nicotínicos da acetilcolina e, mais recentemente, os seus efeitos anti-inflamatórios. No entanto, de modo surpreendente, existem escassas informações sobre o papel e envolvimento dos recetores nicotínicos nas doenças inflamatórias intestinais. Saber qual o subtipo de recetor envolvido nestes mecanismos de doença é considerado de extrema importância, tendo em consideração o seu potencial papel no tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

Neste trabalho propusemo-nos investigar o papel e envolvimento dos recetores nicotínicos, com principal enfoque na subunidade $\alpha 3$, na modulação da libertação de acetilcolina na ileíte pós-inflamatória. Para tal foram realizados estudos de imunolocalização em animais saudáveis e em animais com ileíte pós-inflamatória (7 dias após a indução do modelo). Estes estudos demonstraram que existe uma distribuição heterogénea dos recetores nicotínicos de acetilcolina com a subunidade $\alpha 3$ (nAChR $\alpha 3$) no plexo mioentérico do íleo de ratazana. Pelas imagens obtidas a partir de microscopia confocal observou-se que a imunorreatividade para os recetores nicotínicos $\alpha 3$ está localizada essencialmente e de um modo geral nos corpos celulares dos neurónios e nos terminais nervosos colinérgicos (marcados com o VaChT e com o ChAT), peptidérgicos (marcados com a SP) e nitrérgicos (marcados com a NOS). Para além disso, ainda foi observada uma diminuição significativa da densidade de marcação destes recetores nas amostras provenientes de animais com ileíte pós-inflamatória comparativamente aos animais saudáveis.

Os resultados apresentados, ainda que preliminares, alargam a compreensão atual da distribuição e função dos recetores nicotínicos no plexo mioentérico do íleo de ratazana, e podem ter implicações fisiopatológicas nas alterações da motilidade intestinal, consequência das doenças inflamatórias intestinais.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais, ileíte pós-inflamatória, plexo mioentérico, sinalização purinérgica, recetores nicotínicos, libertação de acetilcolina

Abstract

Inflammatory bowel diseases are pathophysiological conditions that are highly prevalent in society and considerably affect patients' quality of life ¹. During inflammation, changes occur in the release of purines along with adaptive modifications of purinergic receptors, which are essential for the progression of inflammatory reactions.

Acetylcholine (ACh) is the most important neurotransmitter in the control and regulation of gastrointestinal motility ². Its release occurs from enteric neurons and is regulated by specific neuronal receptors. Many studies have confirmed the potential role of neuronal neuroprotection mediated by nicotinic acetylcholine receptors and, more recently, their anti-inflammatory effects. However, surprisingly, there is little information about the role and involvement of nicotinic receptors in inflammatory bowel diseases. Knowing the composition of the receptor subtype involved in these disease mechanisms is considered extremely important, considering its potential role in the treatment of inflammatory bowel diseases.

In this work, we set out to investigate the role and involvement of nicotinic receptors, with focus on the $\alpha 3$ subunit, in modulating the release of acetylcholine in post-inflammatory ileitis. To this end, immunolocalization studies were carried out in healthy animals and in animals with post-inflammatory ileitis (7 days after model induction). These studies demonstrated that there is a heterogeneous distribution of nicotinic acetylcholine receptors with the $\alpha 3$ subunit (nAChR $\alpha 3$) in the myenteric plexus of the rat ileum. From the images obtained from confocal microscopy, it was observed that immunoreactivity for $\alpha 3$ nicotinic receptors is essentially located in the cholinergic (labelled with VaChT and ChAT), peptidergic (labelled with SP) and nitrergic (labelled with NOS) cell bodies of the myenteric neurons and nerve terminals. Furthermore, a significant decrease in the labeling density of these receptors was observed in samples from animals with postinflammatory ileitis when compared to healthy animals.

The preliminary results presented here, broaden the current understanding about the distribution and function of nicotinic receptors in the myenteric plexus of the rat ileum, and about the pathophysiological implications for changes in intestinal motility, because of inflammatory bowel diseases.

Keywords: Inflammatory bowel disease, post-inflammatory ileitis, myenteric plexus, purinergic signalling, nicotinic receptors, acetylcholine release

Lista de Abreviaturas

5-ASA	5-aminosalicílico ou Mesalazina
ACh	Acetilcolina
Ano-1	Anoctamina 1
ATP	Adenosina 5' - Trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
ChAT	Enzima colina acetiltransferase
CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTR	Controlo
EV	Endovenoso
FLCs	Células Tipo-Fibroblasto
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar da Glia
GI	Gastrointestinal
ICCs	Células Intersticiais de Cajal
IFN	Interferão
IL	Interleucina
K ⁺	Potássio
ML	Músculo Longitudinal
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
nAChR	Recetores Nicotínicos para a Acetilcolina
NO	Monóxido de azoto
NOS	Síntase do Monóxido de Azoto
NPY	Neuropeptídeo Y
O ₂	Oxigénio
PBS	Solução Salina de Fosfato
PDGFR- α	Recetor α do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PLP	Periodato-Lisina-Paraformaldeído
PM	Plexo Mioentérico
PM-ML	Plexo Mioentérico – Músculo Longitudinal
SNA	Sistema Nervoso Autónomo
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
TLR	Recetores do tipo Toll
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VAChT	Transportador Vesicular da Acetilcolina
VIP	Péptido Intestinal Vasoativo

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII-IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO	1
1.1.1 ORGANIZAÇÃO DO SNE	1-2
1.1.1.1 NEURÓNIOS ENTÉRICOS	2
1.1.1.2 CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS	3
1.1.1.3 CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL	3
1.1.1.4 CÉLULAS DO TIPO-FIBROBLASTO	3-4
1.1.1.5 CÉLULAS DO MÚSCULO LISO	4
1.2 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	4-6
1.2.1 ILEÍTE PÓS-INFLAMATÓRIA	6
1.2.2 MODELOS ANIMAIS DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL	6-7
1.3 TRANSMISSÃO COLINÉRGICA	7
1.3.1 RECEPTORES NICOTÍNICOS	8-9
1.3.1.1 RECEPTORES NICOTÍNICOS α_3	9
1.4 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	9-10
1.5 OBJETIVOS PRINCIPAIS DO ESTUDO	10-11
2. MÉTODOS E MATERIAIS	12
2.1 ANIMAIS	12
2.1.1 DECLARAÇÃO ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DOS ANIMAIS	12
2.1.2 INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDA POR TNBS	12
2.2 ISOLAMENTO DO PLEXO MIOENTÉRICO-MÚSCULO LONGITUDINAL (PM-ML) DO ÍLEO DE RATAZANA	12-13
2.3 PROTOCOLO DE IMUNOFLORESCÊNCIA POR MICROSCOPIA CONFOCAL	13
2.3.1 FIXAÇÃO	13
2.3.2 BLOQUEIO E PERMEABILIZAÇÃO	14
2.3.3 INCUBAÇÃO COM OS ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS	14
2.4 APRESENTAÇÃO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	15-16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 RESULTADOS	

3.1.1 OS RECETORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA COM A SUBUNIDADE $\alpha 3$ ESTÃO LOCALIZADOS PREDOMINANTEMENTE EM TERMINAIS NERVOSOS E NOS CORPOS CELULARES DOS NEURÓNIOS GANGLIONARES MIOENTÉRICOS	17
3.1.2 A DENSIDADE DE MARCAÇÃO DOS RECETORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA COM A SUBUNIDADE $\alpha 3$ ENCONTRA-SE DIMINUÍDA NO PLEXO MIOENTÉRICO DAS RATAZANAS COM ILEÍTE PÓS-INFLAMATÓRIA: AUSÊNCIA DE COLOCALIZAÇÃO COM MARCADORES MACROFÁGICOS	19
3.1.3 DISTRIBUIÇÃO HETEROGÊNEA DOS RECETORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA COM A SUBUNIDADE $\alpha 3$ NOS VÁRIOS GRUPOS NEURONAIIS DO PLEXO MIOENTÉRICO DO ÍLEO DE RATAZANA	22
3.2 DISCUSSÃO	24
4. CONCLUSÃO	27
<hr/>	
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28-30

Lista de Tabelas

Tabela I - Anticorpos primários e secundários usados nos protocolos de imunohistoquímica realizados.

15

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do sistema nervoso entérico, com principal enfoque nas camadas da parede do trato GI e nos plexos entéricos - o plexo mioentérico e o submucoso. Ambos os plexos são formados por uma rede complexa de neurónios entéricos, células gliais, células intersticiais de Cajal e células do tipo-fibroblasto. O plexo mioentérico encontra-se entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa, compostas, essencialmente por células do músculo liso. Imagem criada a partir do Biorender.com. **2**

Figura 2 - Representação esquemática da síntese de acetilcolina (ACh) nos terminais nervosos colinérgicos. A ACh é sintetizada a partir do acetil-CoA e da colina no citoplasma dos neurónios colinérgicos, pela enzima ChAT (colina acetiltransferase), sendo o acetil-CoA fornecido pelas mitocôndrias. Por sua vez, o VAcHT (transportador vesicular da acetilcolina) é responsável pelo armazenamento de ACh dentro das vesículas sinápticas a partir do citosol, e após a despolarização, o neurotransmissor é libertado por um fenómeno designado de exocitose diretamente para a fenda sináptica, onde se liga, posteriormente, aos seus recetores: os recetores muscarínicos e os nicotínicos. Imagem criada a partir do *Biorender.com*. **8**

Figura 3 - Marcação dos recetores nACh $\alpha 3$. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana saudável (CTR). A imunorreactividade para os recetores nACh $\alpha 3$ (verde) está presente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos (Plano Ganglionar) e nas varicosidades nervosas (Plano neuromuscular). **17**

Figura 4 - Marcação dupla dos recetores nACh $\alpha 3$ e do GFAP. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana saudável (CTR). A imagem corresponde à projecção de imagens de marcação dupla para os receptores nACh $\alpha 3$ (verde) e para o GFAP (vermelho), captadas a nível ganglionar mioentérico; a existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. **18**

Figura 5 - (A) Marcação dos recetores nACh $\alpha 3$ em tecidos controlo e TNBS. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML de íleo de ratazana, a imagem (I) corresponde ao controlo e a imagem (II) ao tecido TNBS. (B) O gráfico de barras representa a média \pm SD da fluorescência total corrigida da criosecção (CTCF) da marcação com os recetores nACh $\alpha 3$ ao nível do gânglio e da região neuromuscular. **19**

Figura 6 - Marcação dupla dos recetores nACh $\alpha 3$ com os marcadores de células inflamatórias, o CD68 e o CD206. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana. A imunorreactividade para os recetores nACh $\alpha 3$ (verde) não co-localiza com nenhum dos marcadores macrofágicos, M1 e M2, individualmente (CD68 e CD206, vermelho). A existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. **21**

Figura 7 - Marcação dupla dos recetores nACh $\alpha 3$ com o VAcHT, com o ChAT e com a SP. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana. A existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. **22**

Figura 8 - Marcação dupla dos recetores nACh $\alpha 3$ com o síntase do monóxido de azoto (nNOS). Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana. A existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. **23**

1. Introdução

1.1. Sistema Nervoso Entérico (SNE)

O sistema gastrointestinal engloba o trato gastrointestinal (GI) e seus órgãos adjacentes, e tem como principais funções a ingestão e digestão alimentar, a absorção de nutrientes, a secreção de água e de enzimas e a excreção de produtos resultantes do metabolismo ³. O sistema nervoso entérico (SNE) é a unidade mais complexa do sistema nervoso periférico e encontra-se localizado nas paredes do trato GI, desde o esófago até ao ânus. Este é considerado a terceira divisão do sistema nervoso autónomo (SNA), para além do sistema nervoso simpático e parassimpático ⁴. O SNE é formado por uma extensa rede neuronal, que pode funcionar de modo independente do sistema nervoso central (SNC), e cuja complexidade é equivalente à da medula espinhal, sendo por isso conhecido como “segundo cérebro” ⁵.

1.1.1 Organização do SNE

O SNE encontra-se organizado numa complexa rede nervosa, distribuída em dois plexos nervosos principais: (1) um plexo externo, denominado de plexo mioentérico (ou de *Auerbach*), que inerva predominantemente as camadas musculares que o compõem, designadamente a *muscularis* externa, o músculo circular interno e o músculo longitudinal externo ⁵, e (2) de um plexo interno, localizado na região da submucosa, denominado de plexo submucoso (ou de *Meissner*) (Figura 1). No âmbito da realização deste projeto, este estudo irá incidir apenas sobre um destes plexos, o plexo mioentérico. O plexo mioentérico é responsável pelo peristaltismo do trato GI, embora possa atuar independentemente do sistema nervoso central (SNC), este recebe inervação do SNA, criando uma ligação entre o SNE e o SNC. A inervação deste plexo é feita, essencialmente, pelas fibras eferentes do nervo vago com origem no núcleo motor dorsal ⁶. Existe também uma ativação intrínseca colinérgica, que facilita o peristaltismo. O controlo dos sinais nervosos é mediado por vários neurotransmissores, que podem levar tanto ao relaxamento como à contração do músculo liso. Consequentemente, os padrões de movimento específicos que são o resultado deste processo, dão origem ao peristaltismo capaz de promover a mistura e a progressão do conteúdo da boca até ao ânus ⁵.

O plexo mioentérico é formado por uma extensa rede neuronal que se estende ao longo de todo o trato GI, que é suportada na sua função de controlar a atividade muscular, glandular e vascular, pelas células entéricas gliais e pelas células intersticiais de Cajal (ICCs). Os neurónios que compõem esta rede estão distribuídos em gânglios, enquanto as células gliais entéricas e as ICCs podem encontrar-se também fora destes, nomeadamente, na mucosa e junto aos nervos na camada de músculo liso ⁵.

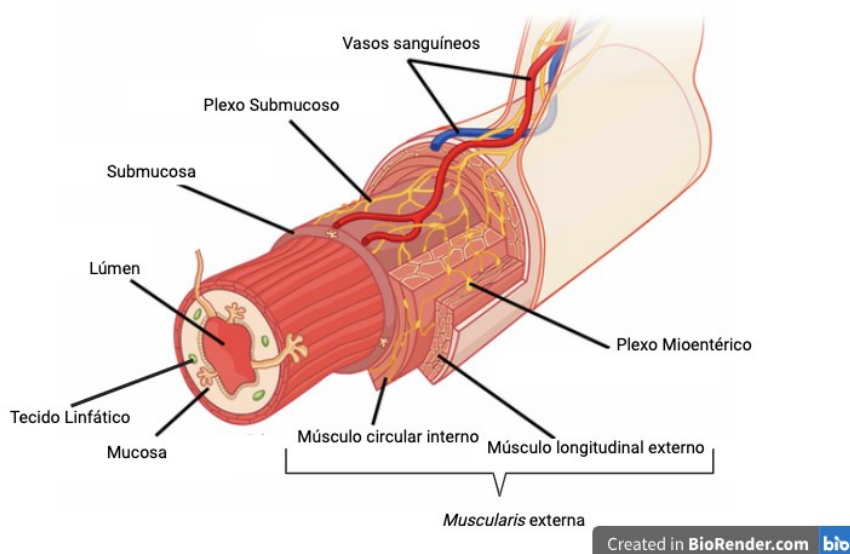


Figura 1: Representação esquemática do sistema nervoso entérico, com principal enfoque nas camadas da parede do trato GI e nos plexos entéricos - o plexo mioentérico e o submucoso. Ambos os plexos são formados por uma rede complexa de neurónios entéricos, células gliais, células intersticiais de Cajal e células do tipo-fibroblasto. O plexo mioentérico encontra-se entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa, compostas, essencialmente por células do músculo liso. Imagem criada a partir do *Biorender.com*.

1.1.1.1 Neurónios Entéricos

Os neurónios entéricos regulam e controlam uma diversidade de funções do trato GI. A maioria dos neurónios entéricos encontra-se nos gânglios mioentéricos, entre a camada muscular circular e longitudinal. Existem diferentes subtipos de neurónios entéricos baseados na sua função, morfologia, no seu código neuroquímico e nas suas propriedades elétricas⁷. Até à data, foram identificados cerca de 20 tipos de neurónios no SNE, sendo que destes apenas 14 foram considerados funcionalmente relevantes. De acordo com a sua morfologia, estes neurónios foram discriminados como neurónios *Dogiel* tipo (I-VII). A maior parte dos neurónios entéricos incluem-se nas categorias *Dogiel* tipo I, II ou III. De acordo com a sua função, estes neurónios podem ainda ser classificados como sensitivos, motores excitatórios ou inibitórios, interneurónios e secretomotores/vasodilatadores⁸. Os neurónios motores são imunorreativos à colina acetiltransferase (ChAT), a enzima responsável pela síntese de acetilcolina, e à substância P (SP)⁸. Neste sentido, os neurónios motores excitatórios são responsáveis pela libertação de neurotransmissores como a acetilcolina (ACh) e pela libertação de neuromoduladores como as taquicinas (SP e neuroquinina A). Por outro lado, os neurónios motores inibitórios libertam substâncias como o monóxido de azoto (NO), péptido intestinal vasoativo (VIP), ATP, GABA, neuropeptído Y (NPY) e o monóxido de carbono (CO)⁹.

1.1.1.2 Células Gliais Entéricas

As células gliais entéricas são células não-neuronais presentes nos plexos mioentérico e submucoso com origem na crista neural, e que apresentam um elevado nível de plasticidade.¹⁰ As células gliais entéricas encontram-se localizadas ao longo de todo o trato GI e em todas as camadas deste, e encontram-se em contacto muito próximo com as células neuronais, dentro dos gânglios, nos filamentos de fibras interganglionares e nas fibras nervosas intramusculares. Estas células, por sua vez, podem ser subdivididas em 4 populações distintas: (1) as protoplasmáticas, em forma de estrela, sendo designadas do tipo I e que estão associadas tanto ao plexo mioentérico como ao submucoso; (2) as alongadas, do tipo II que rodeiam as fibras nervosas; (3) as multipolares, do tipo III associadas à mucosa e, por último, (4) as bipolares, do tipo IV, associadas às fibras nervosas nas camadas do músculo liso¹⁰. Estas células possuem uma característica única que é a abundância de uma proteína glial fibrilar ácida (GFAP), presente no seu citoplasma, resultante do facto de possuírem filamentos intermédios de 10 nm em quantidades abundantes⁴. Para além do GFAP, expressam outra proteína, o S100β (uma proteína de ligação ao cálcio) que pode funcionar igualmente como um bom marcador deste tipo de células².

1.1.1.3 Células Intersticiais de Cajal (ICCs)

As ICCs são células de origem mesenquimal conhecidas como as células marca-passo (*pacemaker*) do trato GI^{2,4}. Estas apresentam funções que diferem consoante o seu subtipo. As ICCs que se encontram localizadas no plexo mioentérico atuam como uma espécie de *pacemaker* da motilidade gastrointestinal. Estas células demonstram uma atividade elétrica espontânea e rítmica, que se propaga ao músculo liso, promovendo contração ou relaxamento das células da musculatura lisa. A descoberta mais importante neste campo foi a expressão do recetor tirosina quinase (c-Kit) na superfície destas células¹¹. Estas células podem ainda ser distinguidas de outras células de origem mesenquimatosa, por expressarem grandes quantidades de anoctamina 1 (Ano-1 ou Tmem16A)¹². Estas células têm um corpo fusiforme e alongado, e localizam-se nas junções dos neurónios motores e nas células do músculo liso⁴. O seu papel nas doenças inflamatórias intestinais tem sido amplamente descrito, visto haver uma diminuição significativa destas células nessas circunstâncias².

1.1.1.4 Células do Tipo-Fibroblasto (FLCs)

As Células do tipo-Fibroblasto (FLCs) são células igualmente de origem mesenquimal, sendo consideradas também um tipo de células intersticiais, que se encontram distribuídas ao longo do músculo liso, entre as camadas musculares circulares e longitudinais. Estas células encontram-se na proximidade dos terminais dos neurónios motores, o que pode sugerir que tenham algum papel no desencadear de respostas neurais que controlam os movimentos gastrointestinais. Apesar da sua similaridade a nível morfológico, estas células apresentam características distintas das ICCs. Sabe-se que não apresentam uma lâmina basal, mas formam junções comunicantes com as células do músculo liso circular e longitudinal. Por microscopia, o CD34 ou a proteína de adesão celular sialomucina tem sido utilizada para distinguir estas

células das ICCs. As FLCs também podem ainda ser distinguidas, pela expressão do canal de potássio, SK3, ou pela expressão de PDGFR- α ¹³.

1.1.1.5 Células do Músculo Liso

O músculo liso na parede gastrointestinal produz contrações tónicas reguladas pelas propriedades intrínsecas mecânicas e eléctricas da sua musculatura. O músculo liso é responsável pela contratilidade de órgãos ocos como o trato GI, mas também da vesícula biliar, da bexiga e do útero. As contrações do músculo liso são mais lentas comparativamente às do músculo esquelético, sendo, no entanto, mais sustentadas. A principal função do músculo liso no trato GI é a mistura e a propulsão dos conteúdos intraluminais de forma a permitir uma digestão alimentar eficiente, seguida de uma absorção de nutrientes e evacuação de resíduos. As células musculares são constituídas em cerca de 80% por corpos densos e filamentos contráteis. Existem três tipos de filamentos observados nas células musculares, os filamentos finos de actina, os filamentos grossos de miosina e os filamentos intermédios. É a partir da hidrólise do ATP que ocorre a contração do músculo liso, ao gerar força e ao induzir um encurtamento destes filamentos ¹⁴.

1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais são condições fisiopatológicas inflamatórias que afetam, predominantemente, o intestino delgado e o cólon. Os tipos mais comuns são a Colite Ulcerosa e a Doença de Crohn. Por se tratarem de patologias que apresentam, atualmente, uma elevada prevalência que afeta consideravelmente a qualidade de vida dos doentes ¹, é importante descobrir potenciais alvos terapêuticos e, por consequência, métodos de tratamento eficazes.

A Colite Ulcerosa afeta apenas parte ou o cólon inteiro, num padrão contínuo ¹⁵, conduzindo a inflamação e ao desenvolvimento de úlceras na camada superior que reveste o cólon. Os achados endoscópicos da Colite Ulcerosa incluem uma inflamação crónica contínua com eritema, perda do padrão de vascularização, granularidade, erosões, ulcerações, friabilidade e hemorragia. A extensão da Colite ulcerosa varia e pode ser descrita de acordo com a classificação de *Montreal*: E1 ou proctite – a extensão é distal à junção reto-sigmoideia, E2 ou colite distal ou colite esquerda – estende-se desde o sigmóide até ao ângulo esplénico, E3 ou pancolite ou colite extensa – estende-se para além do ângulo esplénico ¹⁶.

Em relação à Doença de Crohn, contrariamente à Colite Ulcerosa, qualquer área do trato GI pode ser afetada, desde a boca até ao ânus, exibindo um padrão descontínuo e em “pedradecalçada” ¹⁵. Os achados endoscópicos da Doença de Crohn incluem uma inflamação transmural granulomatosa, com um padrão de distribuição descontínuo, fístulas, abscessos, úlceras, fibrose (estenose), úlceras aftóides ou agregados linfóides ¹⁷. Na Doença de Crohn todas as camadas do trato GI são afetadas, alternando com trato GI saudável entre secções do segmento afetado ^{15,17}. Quando há uma inflamação, há uma quebra na barreira intestinal, uma secreção anormal, alterações no padrão de motilidade e sensação visceral que contribui para os sintomas. As alterações da função que acompanham a inflamação gastrointestinal dão origem a sintomatologia como diarreia, câibras e dor abdominal tipo cólica ¹⁸.

O quadro clínico típico de uma doença inflamatória intestinal é caracterizado por um doente jovem que apresenta sintomas tais como dor abdominal persistente do tipo cólica, perda de peso, diarreia e até presença de sangue e muco nas fezes. Para além desta sintomatologia, na Doença de Crohn também é frequente a manifestação inicial da doença basear-se em alterações perianais como as fístulas, por exemplo¹⁷. Para além dos sintomas gastrointestinais, cerca de 25-40% de doentes com doença inflamatória intestinal apresentam manifestações extra-intestinais como artrite periférica, artropatia axial, espondilite anquilosante, eritema *nodosum*, pioderma *gangrenosum*, úlceras aftosas, colangite esclerosante primária, entre outras¹⁹.

A etiologia ainda é pouco clara, porém, pensa-se que há uma interação entre fatores ambientais e genéticos. O único fator ambiental identificável é o tabaco, sendo este considerado como um fator de risco para a Doença de Crohn.

As Doenças Inflamatórias Intestinais são caracterizadas pela ativação imune crónica e recidiva, concomitantemente com a inflamação gastrointestinal¹⁸. A fisiopatologia deste tipo de doenças baseia-se, essencialmente, nas disfunções do sistema imune e adaptativo²⁰. A Doença de Crohn é gerada por uma resposta das células Th1, enquanto a Colite Ulcerosa está mais associada a uma resposta Th2. A resposta do sistema imune inato representa a primeira linha de defesa e é inespecífica. Esta resposta é mediada por células epiteliais, neutrófilos, células dendríticas, monócitos, macrófagos e por células “*natural killer*”. A resposta inicia-se após o reconhecimento dos antigénios dos microorganismos através dos TLR (recetores do tipo Toll) e dos recetores do tipo NOD. Um estudo evidenciou que a acumulação de neutrófilos e a produção subjacente de IL-1 β e IL-8 em resposta ao trauma está reduzida na Doença de Crohn, mas não na Colite Ulcerosa²⁰. Por outro lado, a imunidade adaptativa é muito específica. As células Th1 são induzidas pela IL-12, produzem IFN- γ , enquanto as células Th2 libertam IL-4, IL-5 e IL-13. Pensa-se que uma resposta anormal das células Th1 possa ser a principal causa da Doença de Crohn, e já se evidenciou que há uma maior produção de IL-2 e IFN- γ pelas células T em doentes com doença de Crohn do que em doentes com colite ulcerosa²⁰. É interessante notar que o nervo vago tem um papel na regulação da inflamação intestinal. A libertação de ACh pelo nervo vago diminui a libertação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 pelos macrófagos submucosos que expressam a subunidade $\alpha 7$ dos recetores nicotínicos para a acetilcolina (nAChRs)²¹.

O tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais varia consoante a severidade da doença: ligeira, moderada ou severa. Para além disso, é importante ter em consideração quais as alterações a fazer do estilo de vida, nomeadamente, a cessação tabágica.

Em relação ao tratamento da Doença de Crohn, a escolha do fármaco inicial depende do fenótipo, da atividade da doença, das comorbilidades do doente, para além de outras características individuais do doente. O tratamento de primeira linha para indução da remissão é o uso de corticoesteróides. A budesonida está normalmente recomendada na doença ileocecal ligeira a moderada, enquanto a prednisolona ou a metilprednisolona são geralmente utilizadas para uma doença de Crohn mais severa ou mais extensa. A azatioprina e a mercaptopurina são eficazes na indução da remissão e no tratamento das fístulas. Enquanto

os aminosalicilatos são muito eficazes na indução da remissão da Colite Ulcerosa, já na Doença de Crohn podem diminuir a atividade da doença, mas não são tão eficazes. O metotrexato induz remissão na doença de Crohn e também pode ser utilizado no tratamento de manutenção. O infliximab pode ser tanto para a indução como para a manutenção da remissão¹⁷.

Relativamente ao tratamento da Colite Ulcerosa, este deve ser estipulado conforme a extensão da inflamação a nível endoscópico, severidade da doença e fatores de mau prognóstico (< 40 anos ao diagnóstico, doença extensa ou a presença de manifestações extraintestinais). Numa colite ulcerosa ligeira a moderada, o tratamento inicial baseia-se em aminosalicilatos (5-ASA) como a mesalamina. Nos doentes com uma resposta inadequada à terapêutica otimizada com 5-ASA, escala-se o tratamento para budesonida-micofenolato de moxetil ou prednisona oral. De forma a induzir remissão numa colite ulcerosa mais severa, corticoesteróides endovenosos (EV) são o tratamento de primeira linha, enquanto a ciclosporina e o infliximab são a terapêutica de salvação numa colite ulcerosa severa aguda que não responde aos corticoesteróides EV¹⁶. Existe ainda outro fármaco que apenas é utilizado na colite ulcerosa, o tofacitinib (anti-JAK1 e JAK3) que bloqueia a sinalização e a ativação das citocinas²².

1.2.1 Ileíte Pós-inflamatória

A ileíte é uma inflamação do íleo que induz uma série de alterações funcionais, químicas e morfológicas nos componentes celulares responsáveis pela manutenção do trato GI. Esta inflamação é muito frequentemente causada pela Doença de Crohn. A ileíte pode manifestar-se como uma inflamação aguda (dor no quadrante inferior direito e/ou diarreia) mas também de forma crónica (apresentando sintomas mais complexos como obstrução, hemorragia e manifestações extra-intestinais)²³.

1.2.2 Modelos animais de Inflamação Intestinal

Os modelos animais têm sido amplamente utilizados de forma a reconhecer a etiologia e a fisiopatologia subjacente à inflamação intestinal. Existem evidências de que os modelos animais usados para estudar as Doenças Inflamatórias Intestinais são mais agressivos para o cólon, visto que nesta localização a fase crónica da doença grave manifesta-se muito mais rapidamente do que no íleo. Tal diferença pode dever-se a alterações na colonização bacteriana do conteúdo intestinal ao longo do tubo digestivo. Neste contexto, tem sido dada menor atenção à investigação de patologias inflamatórias que ocorrem predominantemente no íleo, e ainda menos, ao estudo das fases iniciais da doença onde é possível reverter as lesões encontradas após a lesão inflamatória²³.

Considerando como hipótese relevante na fisiopatologia da doença a existência de uma disfunção do SNE secundária à lesão inflamatória, mas que precede a morte celular, a perda de relação neuro-imune e a fibrose intestinal, optamos por utilizar um modelo de ileíte

pós-inflamatória induzido por instilação de uma solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfónico (TNBS) na ratazana. Trata-se de um modelo em que o íleo apresenta lesões transmuralis características e um aumento da produção de mediadores inflamatórios em apenas 7 dias após o insulto inflamatório²⁴. Neste modelo, tem se observado que o infiltrado de células inflamatórias não penetra nos gânglios nervosos mioentéricos²⁵, sendo por isso, estas estruturas consideradas “imuno-privilegiadas” onde os imunócitos por uma razão ainda desconhecida são incapazes de penetrar²⁶. Assim, apesar do extenso infiltrado inflamatório e dano tecidual envolvente, não se verificam alterações significativas no número de neurónios entéricos no íleo destes animais^{2,27}, contrariamente à perda neuronal inexorável verificada nos modelos mais graves de doença no cólon. A preservação neuronal no plexo mioentérico do íleo destes animais é, no entanto, acompanhada por alterações no código neuroquímico e nas propriedades eletrofisiológicas dos vários subtipos de neurónios mioentéricos, cujos mecanismos fisiopatológicos (e possível reversibilidade) importa conhecer²⁸.

1.3 Transmissão Colinérgica

A ACh é o principal neurotransmissor excitatório colinérgico do trato GI. A enzima ChAT (colina acetiltransferase) é responsável pela síntese de ACh a partir do acetil-CoA e da colina no citoplasma dos neurónios colinérgicos, sendo o acetil-CoA fornecido pelas mitocôndrias. Por sua vez, o VAChT (transportador vesicular da acetilcolina) é responsável pelo armazenamento de ACh dentro das vesículas sinápticas a partir do citosol. Após a despolarização nervosa, o neurotransmissor é libertado por um fenómeno designado de exocitose diretamente para a fenda sináptica, onde se pode ligar aos seus recetores: os recetores muscarínicos e os recetores nicotínicos, desencadeando deste modo uma resposta celular²⁹. Dado que este trabalho incide sobre a expressão e atividade dos recetores nicotínicos da ACh na ileíte pós-inflamatória e a sua interação com a sinalização purinérgica, estes serão abordados em maior detalhe seguidamente.

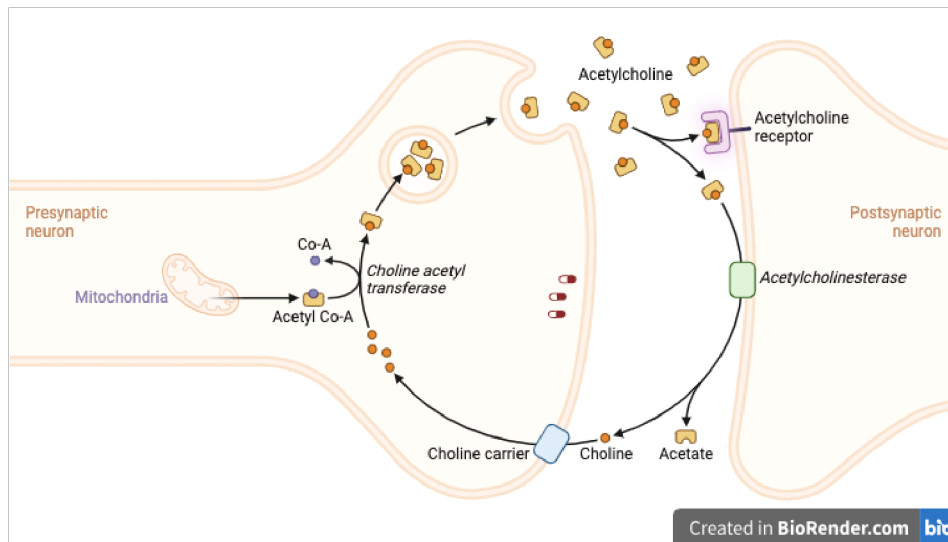


Figura 2: Representação esquemática da síntese de acetilcolina (ACh) nos terminais nervosos colinérgicos. A ACh é sintetizada a partir do acetil-CoA e da colina no citoplasma dos neurônios colinérgicos, pela enzima ChAT (colina acetiltransferase), sendo o acetil-CoA fornecido pelas mitocôndrias. Por sua vez, o VChT (transportador vesicular da acetilcolina) é responsável pelo armazenamento de ACh dentro das vesículas sinápticas a partir do citosol, e após a despolarização, o neurotransmissor é libertado por um fenômeno designado de exocitose diretamente para a fenda sináptica, onde se liga, posteriormente, aos seus receptores: os receptores muscarínicos e os nicotínicos. Imagem criada a partir do *Biorender.com*.

1.3.1 Recetores Nicotínicos

Os recetores nicotínicos de ACh (nAChRs) são canais iônicos pentaméricos que convertem um sinal químico, a ligação da ACh, a uma corrente iônica na membrana pós-sináptica. Em repouso, o canal iônico encontra-se fechado, no entanto, com a ligação ao neurotransmissor (ACh), há uma isomerização para o estado ativo, denominado de *gating*, que permite abrir um poro na membrana que é permeável a iões, como, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e permite a tal difusão ³⁰.

Sabe-se da existência de 9 subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e de três subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) ³¹. Recorrendo a técnicas de biologia molecular, demonstrou-se que no plexo mioentérico existem vários subtipos de recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ e $\beta 4$ em diferentes combinações ³². Foram demonstrados 2 subtipos *major* dos recetores nicotínicos de acetilcolina expressos no SNC de ratazana, um é composto por subunidades $\alpha 4\beta 2$, que se caracteriza por possuir elevada afinidade para a nicotina. O outro subtipo é de baixa afinidade e é composto por subunidades $\alpha 7$ apenas; este recetor liga-se com grande afinidade à toxina, α -bungarotoxina, e possui elevada permeabilidade ao Ca^{2+} ³¹. Os recetores nicotínicos colinérgicos expressos no músculo esquelético e nos gânglios do SNA são compostos por 2 subunidades α (locais de ligação à ACh) associadas a mais 3 outras subunidades ²⁹. Porém, existe muita pouca informação funcional relativamente aos subtipos expressos tanto nos neurônios do SNA como do SNE.

Para além dos recetores nicotínicos serem abundantes nas células nervosas, eles também se encontram em células não-neuronais, como os macrófagos ³³.

1.3.1.1 Recetores Nicotínicos $\alpha 3$

O alvo principal deste projeto são os recetores nicotínicos de ACh contendo subunidades $\alpha 3$. Há estudos que demonstraram o papel essencial dos recetores nicotínicos com subunidades $\alpha 3$ na transmissão sináptica ³¹, mas o seu papel neuromodulador no controlo da libertação de neurotransmissores encontra-se por esclarecer.

O subtipo principal dos nAChRs expresso pelos neurónios do SNA contém com grande probabilidade a subunidade $\alpha 3$. Isto evidenciou-se através da deleção do gene *CHRNA3* em ratinhos que causou mortalidade perinatal e disfunção severa do SNA. Existem ensaios funcionais de neurónios dos plexos mioentéricos de ratazana que demonstraram a presença de recetores com as subunidades $\alpha 3\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$, mas também, $\alpha 7$ ²¹. Existem, ainda, estudos de imunohistoquímica no plexo mioentérico do cólon de ratazanas que revelaram a presença das subunidades $\alpha 3$ nas células gliais que simultaneamente expressam a enzima NOS do tipo II. Nos gânglios do SNA e na medula suprarrenal, existe um terceiro subtipo dos recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ em combinação com subunidades $\beta 2$ e $\beta 4$ ³¹.

Alterações dos padrões de expressão dos recetores com subunidades $\alpha 3\beta 4$ nos neurónios do SNA pode levar a uma desregulação do funcionamento do trato GI em humanos. Em ganglionopatias autoimunes com elevados títulos de expressão de nAChRs com subunidades $\alpha 3$, verifica-se uma disfunção severa do SNA. Assim, os estudos referidos neste artigo refletem o papel crucial da subunidade $\alpha 3$ no controlo da atividade intestinal e, também, no eixo cérebro-intestino ²¹.

1.4 Sinalização Purinérgica

O ATP é libertado tanto por células neuronais como por células não-neuronais, sendo que é um neurotransmissor essencial para a ativação neutrofílica e defesa imunitária. Após a sua libertação, pode ativar recetores inotrópicos do subtipo P2X e metabotrópicos do subtipo P2Y. Na sinapse neuromuscular mioentérica, o ATP facilita a libertação de acetilcolina pelos terminais nervosos não estimulados através da ativação dos recetores P2X. O ATP é convertido em AMP pelas NTPDases 2 e 3 e, conseqüentemente, em adenosina através da CD73 (Ecto-5' nucleotidase). A adenosina, por sua vez, pode controlar a libertação de ACh através da estimulação dos recetores excitatórios do subtipo A_{2A} localizados nos terminais nervosos e/ou dos recetores inibitórios do subtipo A_1 localizados no corpo celular dos gânglios dos neurónios mioentéricos ²⁷.

Para além da ACh, também as purinas (e.g. ATP, adenosina) desempenham um papel relevante na homeostasia intestinal. Estes neuromoduladores podem afectar a atividade dos nervos entéricos, das fibras musculares, das células gliais entéricas e das ICCs. A sua implicação na fisiopatologia de diversas doenças do trato GI mostra que o “purinoma” constitui um potencial alvo terapêutico, devido ao seu papel imunomodulador. O papel dos diversos intervenientes na sinalização purinérgica, tais como os transportadores, ectonucleotidasas e recetores purinérgicos, tem sido estudado pelo Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia / MedInUP do ICBAS (a instituição de acolhimento deste projeto) no modelo de ileíte pós-inflamatória ^{2,27}. Os resultados mais relevantes já obtidos mostram que a inflamação intestinal gera um desequilíbrio entre a libertação de purinas, a sua metabolização extracelular (catabolismo do ATP e formação de adenosina) e a ativação de recetores específicos (P1 para a adenosina e P2 para os nucleótidos), que é capaz de alterar a libertação de acetilcolina pelos nervos colinérgicos do plexo mioentérico. A título de exemplo, refira-se que na ileíte pós-inflamatória o aumento da proliferação de células gliais entéricas favorece a libertação de ATP (gliotransmissor) que pode ser, em parte, responsável pela manutenção da transmissão colinérgica após o insulto inflamatório. O contrário verificase relativamente à libertação de adenosina pelas ICCs, facto que ajuda a explicar o aumento da excitabilidade neuronal e a perda de coordenação da atividade motora do intestino nas doenças inflamatórias intestinais ².

1.5 Objetivos Principais do Estudo

As Doenças Inflamatórias Intestinais afetam significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Por esse motivo, é de extrema importância compreender os mecanismos moleculares e celulares subjacentes à progressão da doença para descobrir abordagens terapêuticas eficazes e inovadoras. Perante uma inflamação existem alterações químicas, morfológicas e funcionais nos componentes celulares responsáveis pela manutenção da homeostasia do trato GI. Alterações na libertação das purinas juntamente com modificações adaptativas dos recetores purinérgicos são essenciais para a progressão das reações inflamatórias. O ATP e a adenosina são libertados por células inflamatórias, mas também pelas células entéricas não-neuronais e neuronais. A libertação do ATP em resposta a mediadores inflamatórios é essencial para a ativação neutrofílica e defesa imune ^{8,27}. O estado pósinflamatório é acompanhado por um aumento da motilidade entérica ²³. A ileíte pósinflamatória está também associada a uma intensa proliferação da glia entérica e a um aumento do número de macrófagos residentes e células T que podem interagir proximamente com os terminais nervosos fora da região ganglionar.

Sendo a ACh o principal neurotransmissor excitatório do trato GI libertada pelos terminais nervosos vagais e neurónios colinérgicos mioentéricos, exerce também um efeito antiinflamatório diminuindo a libertação de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de recetores nicotínicos nos macrófagos ^{34,35,36}. Trabalhos recentes realizados pelo grupo mostraram uma diminuição dos níveis de acetilcolina libertados em ambiente inflamatório, mas pouco se sabe sobre a expressão, função e envolvimento dos recetores nicotínicos nestas circunstâncias. Desta feita, o objetivo principal deste projeto foi o de explorar a distribuição do

recetor nicotínico contendo subunidades $\alpha 3$ no plexo mioentérico do íleo de ratas submetidas ao protocolo de indução de ileíte pós-inflamatória.

2. Métodos e Materiais

2.1 Animais

2.1.1 Declaração Ética para o Cuidado e Uso de Animais

Todas as metodologias que foram utilizadas neste projeto encontram-se atualmente disponíveis no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP. Os cuidados com os animais e os procedimentos experimentais foram realizados em estrita conformidade com as recomendações da Convenção Europeia para a Proteção dos Animais Vertebrados Utilizados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos (ETS 123), da Diretiva 2010/63/UE e das regras portuguesas (DL 113/ 2013). Todos os protocolos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela autoridade nacional competente Direção Geral de Alimentação e Veterinária e pelo Comité de Ética Animal do ICBAS (no 224/2017).

Ratazanas da estirpe *Wistar*, de ambos os géneros, foram mantidas a uma temperatura ambiente constante e a um ciclo de luz normal com acesso a água e a comida.

2.1.2 Inflamação Intestinal induzida por TNBS

Neste projeto foi utilizado um modelo de ileíte pós-inflamatória induzido pelo TNBS em ratazanas. Este foi gerado através da instilação intraluminal (1 mL) de uma solução química irritante, o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (TNBS, 40 mM) diluído em etanol no óleo de ratazanas anestesiadas com medetomidina (10 mg/Kg) e com cetamina (75 mg/Kg) por via subcutânea, 7 dias antes dos procedimentos experimentais^{2,27}. O procedimento cirúrgico realizado foi uma laparotomia mediana onde se exteriorizou a ansa do íleo terminal, tendo-se injetado TNBS (40mM) através da parede entérica para dentro do lúmen do íleo, nos 10 centímetros proximais à junção íleocolónica. Os controlos receberam 1mL de solução salina (NaCl 0.9 %). Após o procedimento, os animais foram recuperados através da administração de atipamezol (10 mg/Kg). 1 hora após a cirurgia, foi permitido às ratazanas ingerirem alimentos e água. Após a cirurgia, a dor foi controlada com cloridrato de tramadol (10 mg/Kg)²⁷. Trata-se de um modelo clássico promotor de inflamação intestinal que pode causar respostas imunológicas consideráveis. Nos protocolos experimentais foram usadas preparações de plexo mioentérico-músculo longitudinal (PM-ML) do íleo provenientes de ratazanas da estirpe *Wistar* (Charles River – CRIFFA, Barcelona, Espanha; Biotério do ICBAS, Porto, Portugal) saudáveis (controlo) e com ileíte pós-inflamatória (TNBS). As ratazanas foram colocadas, durante os 7 dias seguintes, sozinhas numa caixa, com acesso a água e a nutrientes, para permitir o estabelecimento de inflamação intestinal e o desenvolvimento de ileíte pós-inflamatória antes de serem utilizadas nos protocolos experimentais.

2.2 Isolamento do Plexo Mioentérico-Músculo Longitudinal (PM-ML) de Íleo de Ratazana

Após o sacrifício da ratazana, fez-se uma pequena incisão na cavidade abdominal, identificando-se o apêndice cecal, que permitiu localizar a porção distal do íleo. O intestino foi cuidadosamente separado das suas aderências mesentéricas e foi retirado um fragmento com cerca de 12 centímetros da porção distal do íleo, tendo sido excluídos sistematicamente os 2 centímetros proximais ao cego. O fragmento de íleo isolado foi colocado em solução de Tyrode

(composição: NaCl 137 mM; CaCl₂ 1.8 mM; MgCl₂ 1 mM; NaH₂PO₄ 0.4 mM; NaHCO₃ 11.9 mM; Glicose 11.2 mM), à temperatura ambiente e devidamente oxigenado com uma mistura de O₂ (95%) e CO₂ (5%). Nesse ambiente, procedeu-se ao esvaziamento do conteúdo fecal por instilação da solução de Tyrode através do lúmen intestinal com o auxílio de uma seringa. Para facilitar a disseção do plexo mioentérico e do músculo longitudinal aderente, foi introduzida uma vareta de vidro no lúmen do fragmento do íleo isolado. As camadas superficiais do intestino correspondentes à serosa, músculo longitudinal e plexo mioentérico foram seccionadas longitudinalmente com o auxílio de um bisturi, tendo o cuidado de não atingir a camada muscular circular, de forma a ser possível isolá-las em toda a sua circunferência, usando duas gazes embebidas na solução de Tyrode.

2.3 Protocolo de Imunofluorescência por Microscopia Confocal

Foram realizados estudos de imunofluorescência por microscopia confocal para detetar possíveis alterações no código químico dos neurónios mioentéricos (marcados positivamente para o VAcHT, ChAT, NOS, SP) e na densidade de populações de células específicas do subtipo (neurónios, células gliais). A distribuição tecidual e celular das proteínas de interesse, como recetores nicotínicos $\alpha 3$ e marcadores celulares específicos (como por exemplo, o GFAP para glia, CD206 e CD68 (ED1) para macrófagos infiltrantes e residentes) foram avaliados com anticorpos específicos, conforme já foi descrito pelo grupo em trabalhos anteriores ^{2,27}. A técnica de imunofluorescência aplicada envolveu uma marcação indirecta, isto é, dois conjuntos de anticorpos: um anticorpo primário, aplicado contra o antígeno de interesse; e um segundo anticorpo acoplado a um fluoróforo, que reconhecerá o anticorpo primário.

O protocolo de imunofluorescência envolveu um conjunto de procedimentos cujo objetivo principal foi o de preservar adequadamente os componentes celulares, nomeadamente antígenos e enzimas e, ainda, o de facilitar as marcações convencionais e imunológicas ³⁷. Estes procedimentos incluíram o processamento dos tecidos que engloba a fixação, o bloqueio e a permeabilização aos anticorpos e a marcação dos tecidos com os anticorpos primários e secundários.

2.3.1 Fixação

As preparações de PM-ML do íleo de ratazana obtidas, foram estiradas (com a ajuda de alfinetes) em placas de Petri revestidas com Sylgard, e fixadas em solução de PLP (paraformaldeído 2%, lisina 0.075 M, fosfato de sódio 0.037 M, periodato de sódio 0.01 M) durante 16h, a 4°C. Depois, foram lavadas com uma solução de tampão fosfato 0.1 M em 3 ciclos de 10 minutos, e criopreservadas em solução crioprotectora (glicerol anidro 20%, tampão fosfato 0,1 M), durante 16 horas a 4°C, e armazenadas a -20°C para posterior utilização.

2.3.2 Bloqueio e Permeabilização

Neste passo do procedimento, as preparações foram descongeladas e lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com uma solução tampão de bloqueio (soro bovino fetal 10%, albumina bovina sérica 1%, Triton X-100 1% em PBS) durante 2 horas e com agitação constante.

2.3.3 Incubação com os Anticorpos Primários e Secundários

As amostras foram incubadas com os anticorpos primários escolhidos (Tabela I), diluídos em tampão de incubação (soro bovino fetal 5%, albumina sérica 1%, Triton X-100 1% em PBS), a 4°C e durante 48 horas, em agitação constante. Para protocolos de marcação dupla, os anticorpos foram combinados antes de serem aplicados nas amostras, isto é, aquando da sua diluição no tampão de incubação. Após o período de incubação, procedeu-se à lavagem dos tecidos com uma solução de PBS/ Triton-X 0,1%, em 3 ciclos de 10 minutos, preparando as amostras para a marcação com os anticorpos secundários.

Os anticorpos secundários escolhidos (Tabela I) foram diluídos no tampão de incubação referido anteriormente e incubados nas amostras, no escuro (para evitar a excitação dos fluorocromos), durante duas horas, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Os protocolos de marcação dupla foram feitos do mesmo modo ao aplicado para os anticorpos primários. Após a incubação com os anticorpos secundários respetivos, as amostras passam novamente por um período de lavagem, com solução de PBS/ Triton-X 0.1% em 3 ciclos de 10 minutos.

Por fim, as amostras foram montadas em lâminas de vidro, com recurso ao meio de montagem *Fluoroshield com DAPI*. Em paralelo com as marcações realizadas, foram feitos controlos de especificidade, por omissão dos anticorpos primários da solução de reacção.

As lâminas obtidas foram analisadas com recurso a um microscópio confocal de varrimento por laser Olympus FluoView FV1000, usando os seguintes lasers: Ar-Ion, que emite na gama dos 488 nm e que, portanto, excita o fluoróforo Alexa Fluor 488; um laser de He-Ne, que emite no comprimento de onda de 543 nm e que vai excitar o fluoróforo Alexa Fluor 568; e ainda um laser de He-Ne, cujas emissões são na gama do invisível, a cerca de 633 nm, excitando o fluoróforo Alexa Fluor 633.

Tabela I: Anticorpos primários e secundários usados nos protocolos de imunohistoquímica realizados.

	Anticorpo	Código	Hospedeiro	Fornecedor	Diluição
Anticorpos Primários	$\alpha 3$	ANC-033	Rabbit (rb)	Alomone	1:200
	VaChT	AB1588	Guinea-pig (gp)	Chemicon	1:500
	GFAP	MAB360	Mouse (ms)	Chemicon	1:600
	CD68 (ED1)	ab31630	Mouse (ms)	ABCAM	1:50
	CD206	SC-34577	Goat (gt)	Santa Cruz	1:50
	ChAT	AB 144P	Goat (gt)	Chemicon	1:100
	nNOS	ab1376	Goat (gt)	ABCAM	1:300
	SP	SC-9758	Goat (gt)	Santa Cruz	1:25
Anticorpos Secundários	Alexa Fluor 488 (anti-rabbit)	A-21206	Donkey	Molecular Probes	1:1000
	Alex Fluor 633 (anti-mouse)	A21052	Goat	Molecular Probes	1:1000
	TRITC 568 (anti-guinea-pig)	706-025-148	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1:150
	Alexa Fluor 568 (anti-goat)	A11057	Donkey	Molecular Probes	1:1000
	Alexa Fluor AffiniPure 647 (anti-guinea-pig)	706-605-148	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Alexa Fluor 568 (anti-mouse)	A-10037	Donkey	Molecular Probes	1:1000

2.4 Apresentação de Dados e Análise Estatística

As imagens foram armazenadas em formato TIFF com a mesma resolução e, posteriormente, analisadas com o software ImageJ[®] versão 1.46r (National Institutes of Health) para quantificar a densidade de nAChR $\alpha 3$ nas preparações de PM-ML. Variáveis como a área, densidade integrada e valor médio de cinza foram medidas em todas as imagens analisadas para esta marcação; os valores referentes ao fundo da imagem foram obtidos a partir de uma área da secção não tratada com o anticorpo primário. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a fluorescência total corrigida da criosecção (CTCF) pela aplicação da fórmula publicada no site: <http://sciencetechblog.com/2011/05/24/measuring-cell-fluorescence-usingimagej>.

A análise estatística e a criação de gráficos foram conduzidas através do programa GraphPad Prism[®] 8 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os resultados foram apresentados como média \pm SEM (Erro Padrão da Média), salvo indicação em contrário, e foram baseados numa amostra de n indivíduos. Para a comparação entre dois grupos experimentais, recorreu-se ao teste t- com

correção de Welch. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicadores de diferenças estatisticamente significativas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Resultados

3.1.1 Os receptores nicotínicos da ACh com a subunidade $\alpha 3$ (nAChR $\alpha 3$) estão localizados predominantemente em terminais nervosos e nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos.

Em 2004, Duarte-Araújo e colaboradores revelaram evidências funcionais sugerindo que os terminais nervosos do plexo mioentérico do íleo de ratazanas possuem receptores nicotínicos da ACh (nAChRs). A ativação dos nAChRs pré-sinápticos promoveu a libertação de ACh na ausência de despolarização da membrana neuronal, presumivelmente através da despolarização focal do terminal nervoso e entrada de Ca^{2+} diretamente pelo canal nicotínico junto aos locais de libertação³⁸. A ausência de uma caracterização farmacológica seletiva e de métodos de imagem centrada nos receptores envolvidos limitou as conclusões sobre o subtipo de nAChR envolvido no processo. Na ausência deste conhecimento e considerando que os nAChRs contendo subunidades $\alpha 3$ desempenham um papel fundamental na regulação de respostas inflamatórias em células endoteliais e em macrófagos³³, pareceu-nos pertinente avaliar a presença destes nAChRs em preparações de PM-ML de íleo de ratazanas saudáveis e com ileíte pós-inflamatória.

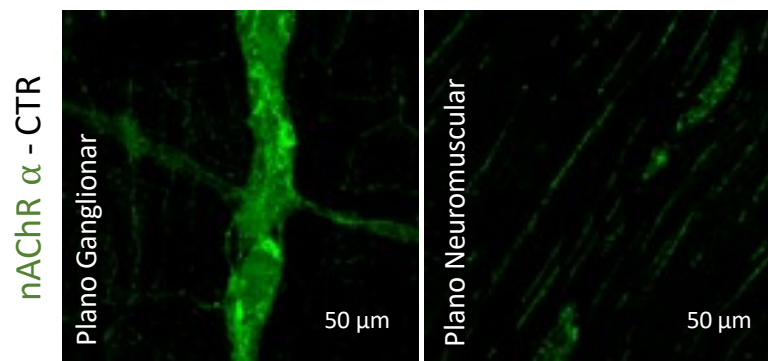


Figura 3: Marcação dos receptores nACh $\alpha 3$. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de uma ratazana saudável (CTR). A imunoreactividade para os receptores nACh $\alpha 3$ (verde) está presente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos (Plano Ganglionar) e nas varicosidades nervosas (Plano neuromuscular).

Neste trabalho, foram realizadas experiências de imunolocalização usando anticorpos primários contra os nAChRs contendo subunidades $\alpha 3$ (Figura 3). A imunoreactividade para estes receptores encontra-se localizada predominantemente nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos do íleo de ratazana e, também, nos feixes nervosos e nos terminais dos axónios dos neurónios mioentéricos, como mostra a figura 3.

No entanto, não podemos eliminar a hipótese destes recetores também se encontrarem presentes noutras células localizadas na proximidade dos neurónios e dos feixes nervosos mioentéricos, como as células gliais entéricas ou a Células intersticiais de Cajal (ICCs).

Para responder a esta questão foi realizado um protocolo de marcação dupla dos recetores os nAChRs contendo subunidades $\alpha 3$ e das células entéricas gliais, com a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que se encontra abundantemente expressa neste tipo celular. Como mostrado na figura 4, as células que exibem imunoreactividade contra os recetores nACh $\alpha 3$ (marcadas a verde) são negativas para o anticorpo contra o GFAP (marcadas a vermelho). Este resultado demonstra que os nAChRs contendo subunidades $\alpha 3$ não se encontram localizados nas células gliais entéricas.

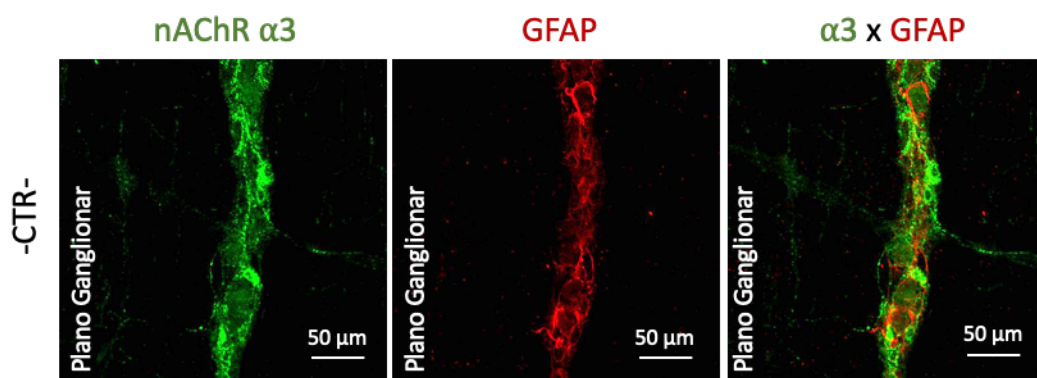


Figura 4: Marcação dupla dos recetores nACh $\alpha 3$ e do GFAP. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana saudável (CTR). A imagem corresponde à projecção de imagens de marcação dupla para os receptores nACh $\alpha 3$ (verde) e para o GFAP (vermelho), captadas a nível ganglionar mioentérico; a existência de co-localização deveria aparecer a amarelo.

Devido a questões metodológicas, encontra-se ainda em aberto a possibilidade destes recetores se localizarem nas ICCs, já que não foi possível obter imagens com uma dupla marcação dirigida para estas células. Proteínas como o c-Kit e o Ano-1 são marcadores específicos de ICCs, porém esta marcação requer a fixação das preparações com acetona (100%) que é incompatível com a marcação para os nAChRs contendo subunidades $\alpha 3$. Estão projetadas experiências para averiguar essa hipótese utilizando um marcador para células de origem mesenquimatosa (i.e., miofibroblastos, células intersticiais de Cajal) como é a vimentina.

3.1.2 A densidade de marcação dos receptores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ encontra-se diminuída no plexo mioentérico das ratazanas com ileíte pós-inflamatória: ausência de colocalização com marcadores macrofágicos.

Estudos anteriores do grupo de investigação do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP mostraram que os neurónios colinérgicos do plexo mioentérico de ratazanas tratadas com TNBS libertam uma menor quantidade de $[^3\text{H}] - \text{ACh}^2$. Para além disso, verificouse um aumento do número e ramificações das células gliais entéricas no plexo mioentérico em animais com ileíte pós-inflamatória. Também, o número de macrófagos residentes e de células T capazes de interagir com os terminais nervosos fora da região ganglionar se encontra aumentado. Admitindo que a acetilcolina libertada maioritariamente pelos terminais nervosos vagais e neurónios colinérgicos mioentéricos é um potente mediador anti-inflamatório, reduzindo a libertação de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de receptores nicotínicos dos macrófagos ^{34,35,36}, pareceu-nos relevante avaliar a densidade de marcação dos receptores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ em animais saudáveis (CTR) e em ratazanas com ileíte pós-inflamatória induzida por TNBS (7 dias).

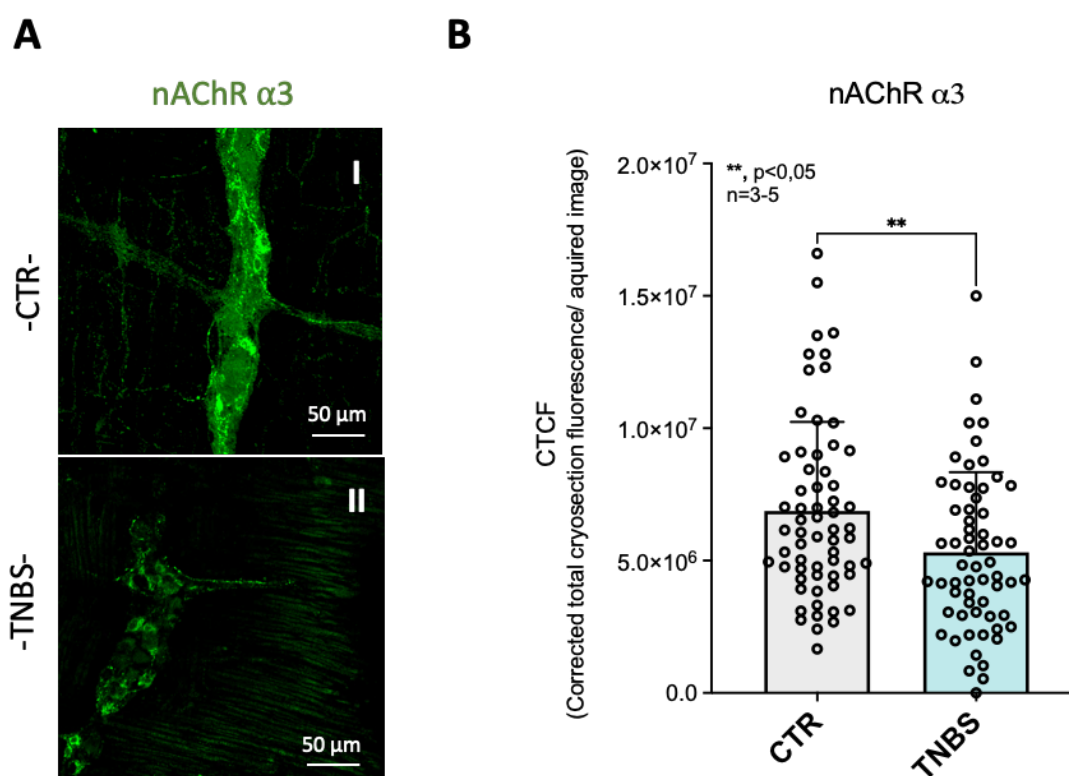


Figura 5: **(A)** Marcação dos receptores nACh $\alpha 3$ em tecidos controlo e TNBS. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML de íleo de ratazana, a imagem (I) corresponde ao controlo e a imagem (II) ao tecido TNBS. **(B)** O gráfico de barras representa a média \pm SD da fluorescência total corrigida da criosecção (CTCF) da marcação com os receptores nACh $\alpha 3$ ao nível do gânglio e da região neuromuscular.

Na figura 5A encontram-se apresentadas imagens obtidas por microscopia confocal dos receptores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ em amostras de PM-ML do íleo de ratazana controlo (Imagem I) e com ileíte pós-inflamatória (Imagem II). O tratamento estatístico da

fluorescência total (CTCF) das imagens obtidas nestas circunstâncias permitiu detetar uma diminuição global da imunomarcacão dos recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ no PM-ML do íleo das ratazanas tratadas com TNBS comparativamente com os animais CTR.

Seguidamente, avaliou-se a presença de recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ nas células inflamatórias, designadamente nos macrófagos intestinais, utilizando uma marcação dupla destes recetores com dois marcadores específicos de macrófagos do subtipo M1 e M2, CD68 (ED1) e CD206, respetivamente.

A figura 6 mostra que os macrófagos do subtipo M1 (marcados positivamente com o anticorpo contra CD68) encontram-se apenas presentes nas amostras provenientes de ratazanas com ileíte pós-inflamatória. Esta imunomarcacão não se encontra nas células em que foi identificada a marcação pelo anticorpo contra os recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$.

De forma análoga, mostra-se na Figura 6 que o número de macrófagos do tipo 2 marcados positivamente pelo anticorpo anti-CD206 aumentou substancialmente no PM-ML do íleo das ratazanas tratadas com TNBS comparativamente com os animais CTR. Esse aumento é muito mais evidente para as células CD206 positivas do que para as que marcam positivamente contra CD68. Apesar de se observarem em menor número, foram encontradas células CD206 positivas (macrófagos residentes) no tecido nos animais CTR, localizadas essencialmente em redor dos gânglios mioentéricos e na região neuromuscular (marcação a vermelho). À semelhança do que foi descrito por Kinoshita e colaboradores (2007), os macrófagos residentes CD206-positivos observados nos animais CTR apresentam uma morfologia dendrítica (ramificada) e encontram-se dispostos de forma ordenada, enquanto estes adquirem uma forma mais arredondada e uma disposição mais irregular ao longo do tecido nos tecidos dos animais TNBS ³⁹. Na figura 6 também se mostra que não existe sobreposição entre a marcação contra CD206 e contra os recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ (marcação a verde).

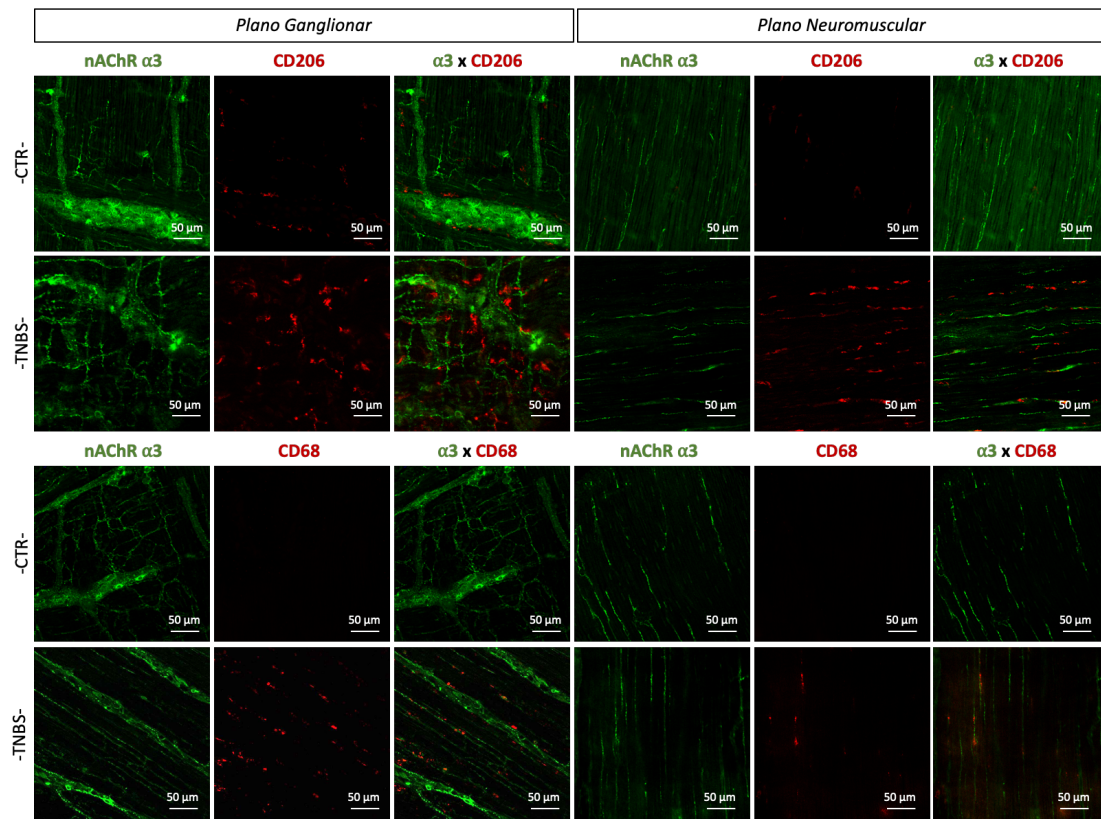


Figura 6: Marcação dupla dos receptores nACh $\alpha 3$ com os marcadores de células inflamatórias, o CD68 e o CD206. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana. A imunorreactividade para os receptores nACh $\alpha 3$ (verde) não co-localiza com nenhum dos marcadores macrófágicos, M1 e M2, individualmente (CD68 e CD206, vermelho). A existência de colocalização deveria aparecer a amarelo.

3.1.3 Distribuição heterogênea dos receptores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ nos vários grupos neuronais do plexo mioentérico do íleo de ratizona.

Considerando que os receptores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ se encontram localizados predominantemente em terminais e nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos, pareceu-nos relevante caracterizar o tipo de neurónios em que essa expressão é mais abundante para, eventualmente, se conseguir explicar a perda de sinalização colinérgica nos tecidos inflamados.

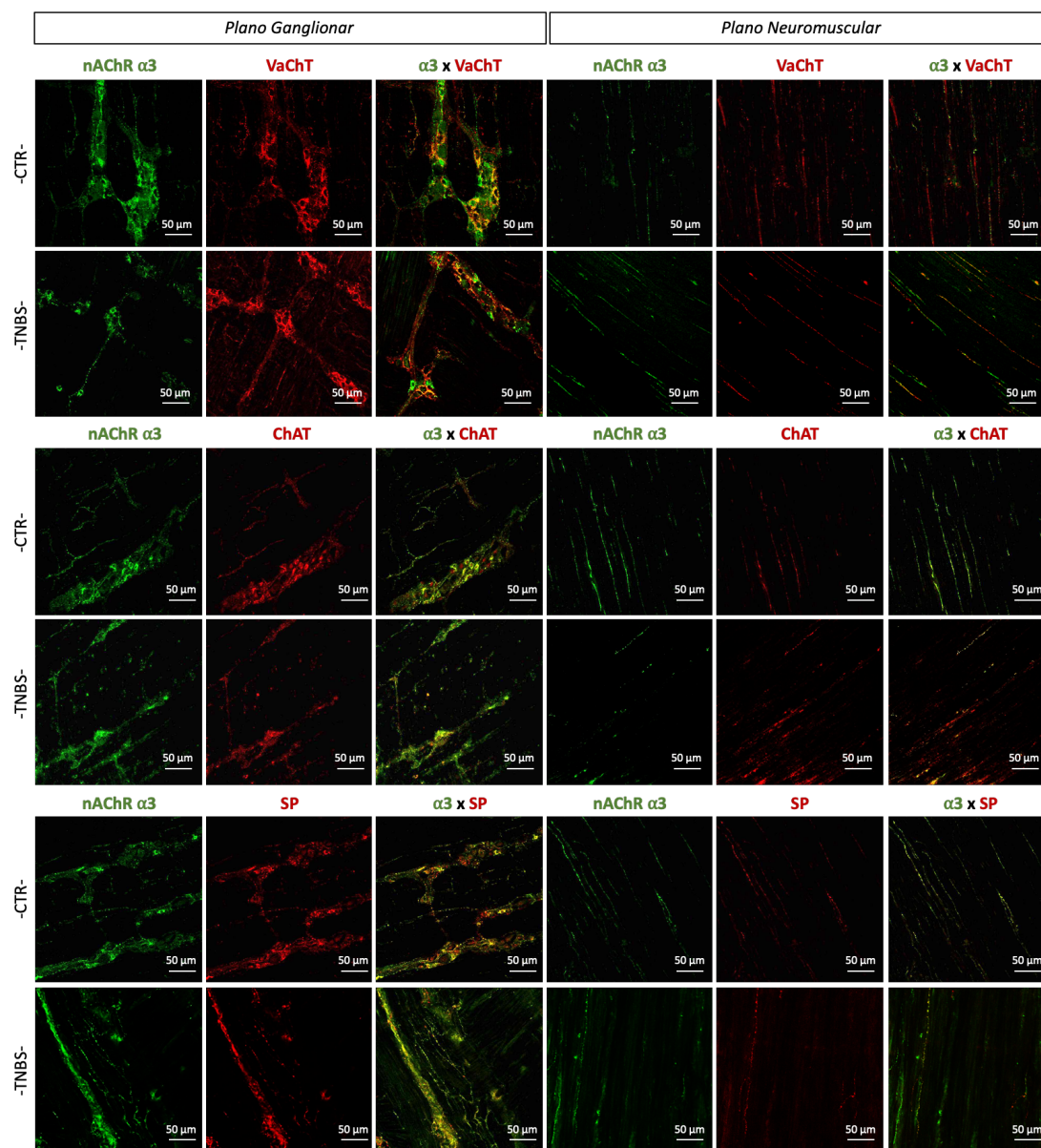


Figura 7: Marcação dupla dos receptores nAChR $\alpha 3$ com o VaChT, com o ChAT e com a SP. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratizona. A existência de colocalização deveria aparecer a amarelo.

A figura 7 mostra que a imunoreactividade contra os receptores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ co-localiza em grande medida com o transportador vesicular da ACh (VaChT) e com o ChAT, denotando a sua presença em neurónios colinérgicos, tanto a nível ganglionar

com a nível neuromuscular. A sua presença também foi referenciada em alguns neurónios peptidérgicos marcados positivamente com um anticorpo contra a Substância P (SP). No entanto, a taxa de sobreposição com o marcador peptídico foi inferior à verificada para os neurónios colinérgicos, embora estes resultados preliminares careçam de comprovação estatística através da realização de mais experiências. Globalmente os resultados também mostram que a colocação da marcação dos recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ nestes dois tipos neuronais excitatórios, colinérgicos e peptidérgicos, se mantém nos animais TNBS, apesar da densidade de marcação do recetor nicotínico ser menor nos terminais colinérgicos do que nos animais CTR (ver também, figura 5).

Relativamente à presença de recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ em neurónios inibitórios nitrérgicos positivos para a síntese do monóxido de azoto (NOS), os resultados da figura 8 mostram aspetos distintos a nível ganglionar e neuromuscular. No gânglio mioentérico, existe um reduzido de número de células apresentando dupla marcação $\alpha 3$ e NOS. Já a nível neuromuscular, grande parte dos terminais nervosos marcados positivamente contra a NOS apresentam também imunorreatividade contra os recetores nicotínicos com subunidades $\alpha 3$ (Figura 8).

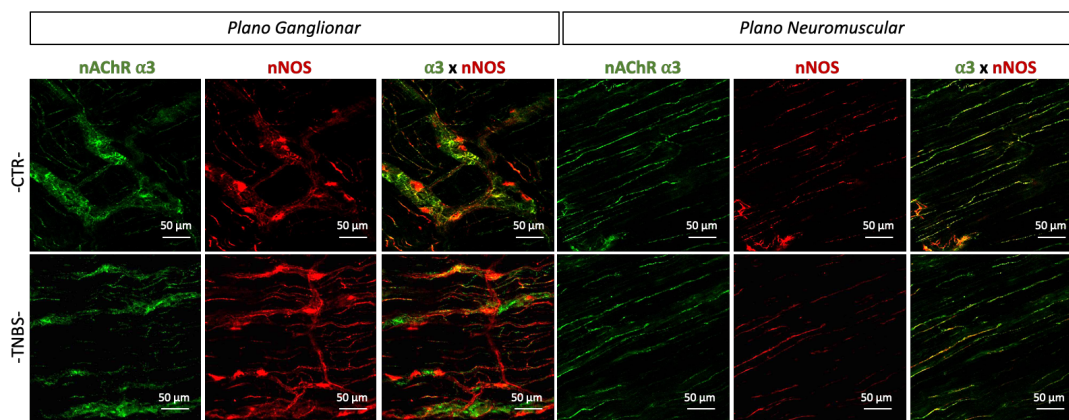


Figura 8: Marcação dupla dos recetores nACh $\alpha 3$ com o síntese do monóxido de azoto (nNOS). Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de ratazana. A existência de colocação deveria aparecer a amarelo.

3.2 Discussão

A ACh é o principal neurotransmissor excitatório no plexo mioentérico e o principal regulador da motilidade intestinal. Tendo em consideração que os recetores nicotínicos para a acetilcolina (nAChR) têm um papel essencial na neurotransmissão no SNE bem como na imunomodulação ², neste estudo fomos avaliar a distribuição / densidade dos recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ na ileíte pós-inflamatória induzida pela injeção intraluminal de TNBS 7 dias antes da realização das experiências.

A ileíte pós-inflamatória está associada a uma intensa proliferação da glia entérica e a um aumento do número de macrófagos residentes e células T que podem interagir proximamente com os terminais nervosos fora da região ganglionar. Hoje sabe-se que a transmissão colinérgica mediada por recetores nicotínicos constitui uma parte relevante da transmissão sináptica no SNE ³².

Um artigo publicado anteriormente pelo Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP no âmbito da ileíte pós-inflamatória demonstrou que os neurónios colinérgicos inflamados libertam menores quantidades de [³H] - ACh, sem que a perda da neuromodulação colinérgica tenha sido acompanhada da redução evidente destas células neuronais ². Neste contexto, pode dizer-se que existe uma perda da atividade neuronal sem que se verifiquem alterações anatómicas evidentes, certamente devidas a uma alteração do código neuroquímico e da plasticidade mioentérica que importa esclarecer ²⁸.

O nosso grupo foi pioneiro em descobrir que os recetores nicotínicos são também importantes controladores da neuromodulação colinérgica no plexo mioentérico do íleo de ratazana ³⁸. Sabe-se que as subunidades α são essenciais para a ligação da ACh ao recetor nicotínico e que (i) os neurónios excitatórios marcam com o anticorpo Mab-35, que reconhece as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ e $\beta 4$ ⁴⁰, além de que (ii) os recetores nACh com subunidades $\alpha 3\beta 4$ ou $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ estão associados ao influxo de Ca^{2+} promovido pela ACh ³⁸, justificando a sua relevância no controlo da libertação de neurotransmissores. Neste contexto, a acetilcolina libertada pelos neurónios mioentéricos desencadeia um mecanismo de retroalimentação positivo mediado por autorrecetores nicotínicos, capazes de promover o influxo de Ca^{2+} diretamente através do canal nicotínico e, assim, desencadear a libertação do neurotransmissor de forma independente da abertura dos canais de cálcio sensíveis à voltagem.

Curiosamente, este mecanismo parece ser regulado pela ativação tónica de recetores excitatórios da adenosina do subtipo A_{2A} acoplados ao sistema de transdução adenilato ciclase/ AMP cíclico ³⁸, podendo por esta via desempenhar um papel importante na regulação da motilidade gastrointestinal. Na ileíte pós-inflamatória verificou-se uma redução significativa dos níveis extracelulares de adenosina, assim como da neuromodulação colinérgica mediada pela ativação preferencial de recetores facilitatórios do subtipo A_{2A} localizados nos terminais nervosos colinérgicos ²⁷. Tendo esta informação em consideração e sabendo que os recetores A_{2A} também estão envolvidos no controlo da resposta inflamatória, será interessante avaliar a interação entre os recetores A_{2A} e os recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ no controlo da homeostasia do tecido em situações de inflamação intestinal.

Neste trabalho realizaram-se estudos de imunofluorescência para perceber qual a localização e distribuição dos recetores nACh $\alpha 3$ em preparações de PM-ML de íleo de ratazanas saudáveis (controlo) e com ileíte pós-inflamatória (7 dias após a indução do modelo TNBS), seguindo um protocolo devidamente estabelecido que nos permitiu obter imagens para leitura em microscopia confocal.

Em relação aos resultados obtidos ao longo deste projeto, mostrou-se a existência de uma distribuição celular heterogénea dos recetores nicotínicos contendo a subunidade $\alpha 3$ (nAChR $\alpha 3$) no plexo mioentérico do íleo de ratazana. Os resultados mostraram que estes recetores estão maioritariamente localizados nos neurónios excitatórios (colinérgicos e peptidérgicos), bem como nos neurónios inibitórios nitrérgicos, tanto a nível ganglionar como da junção neuromuscular. Chegou-se a esta conclusão através do facto dos recetores nicotínicos $\alpha 3$ colocalizarem com o transportador vesicular de ACh (VaChT), com a enzima colina acetiltransferase (ChAT), com a substância P (SP) e com a síntase do monóxido de azoto (NOS).

Aparentemente, as células gliais entéricas e os macrófagos residentes do plexo mioentérico do íleo de ratazana são desprovidos destes recetores. A existência de recetores nicotínicos em células inflamatórias ² estará, porventura, relacionada com outros subtipos de recetores (e.g. contendo subunidades $\alpha 7$), já que neste trabalho não foi detetada a colocalização entre o recetor com subunidades $\alpha 3$ e os marcadores de células inflamatórias, CD68 (macrófagos M1) e CD206 (macrófagos M2).

Nos animais com ileíte pós-inflamatória induzida por TNBS a densidade relativa dos recetores nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3$ encontra-se diminuída comparativamente com os animais CTR. Impõe-se, por conseguinte, comparar estes resultados morfológicos com a atividade tónica funcional deste subtipo de recetores no contexto da inflamação intestinal, para averiguar da sua relevância fisiopatológica na alteração da atividade entérica mediada pelos vários tipos de neurónios que possuem estes recetores.

Tanto quanto se sabe pela literatura disponível, em relação à localização dos recetores nACh, de um modo geral, sabe-se que estes, se encontram localizados nos corpos celulares dos neurónios e nos terminais nervosos ⁴¹. Analisando com maior especificidade para a subunidade $\alpha 3$, é sabido que, no SNP, encontra-se preferencialmente no SNE, nas células cromafins das glândulas suprarrenais e nos gânglios autónomos. Um artigo publicado em 2015 refere que os recetores nicotínicos de acetilcolina com as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ e $\beta 4$ encontravam-se expressos nos neurónios mioentéricos ³², o que vai de encontro aos resultados obtidos ao longo deste estudo, descritos anteriormente. Por sua vez, através de estudos eletrofisiológicos e farmacológicos observou-se que os neurónios mioentéricos do íleo de porquinhos-da-índia expressam nAChRs compostos, essencialmente, pelas subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 5$ ⁴². A título de curiosidade, num artigo publicado anteriormente, em 2005, fala-se da expressão dos recetores nicotínicos com as subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 5$ no intestino delgado de porquinhos-da-índia ⁴³.

Para além disso, em 1998, *Vernino* já havia observado a presença de auto-anticorpos contra os nAChR com a subunidade $\alpha 3$ neuronais em neuropatias autonómicas que apresentam como um dos sintomas a dismotilidade do trato GI ^{43,44}. Por conseguinte, infere-se que os recetores nicotínicos de acetilcolina com a subunidade $\alpha 3$ estejam associados a múltiplas patologias severas, principalmente a nível do trato GI, e que de facto, sejam um alvo terapêutico fundamental a ser explorado. Assim, dado o facto deste subtipo estar localizado nos neurónios da raiz ganglionar dorsal sugere que este esteja envolvido na sinalização neuronal da nociceção e da inflamação ⁴⁵, o que indica que possa ter um papel significativo em patologias de base inflamatória, como por exemplo, as doenças inflamatórias intestinais que são um dos principais enfoques deste projeto de investigação.

Em face dos resultados obtidos, ainda que estejamos perante resultados preliminares, pode-se inferir de que estes vão de acordo com a literatura já disponível. Este estudo permitiu uma melhor compreensão da distribuição dos recetores nicotínicos de acetilcolina com a subunidade $\alpha 3$ no plexo mioentérico de íleo de ratazana. É relevante mencionar que a fisiopatologia exata destes recetores com a subunidade $\alpha 3$ encontra-se pouco explorada devido à escassez de antagonistas seletivos para este subtipo, e, conseqüentemente, existe escassa literatura disponível, o que evidencia que se trata, de facto, de uma subunidade ainda pouco investigada.

4. Conclusão

As doenças inflamatórias intestinais são patologias que apresentam uma prevalência crescente e com impacto significativo na qualidade de vida dos doentes, devido à sintomatologia exuberante e à ineficácia da maior parte do tratamento farmacológico disponível.

O envolvimento de recetores nicotínicos e a sua alteração em patologias entéricas associadas a processos inflamatórios como as doenças inflamatórias intestinais, tornam estes recetores potenciais alvos terapêuticos ainda não explorados.

Os resultados apresentados, ainda que preliminares, sugerem que na ileíte pós-inflamatória ocorre uma diminuição da densidade dos recetores nicotínicos $\alpha 3$ tanto em neurónios excitatórios (colinérgicos e peptidérgicos) como inibitórios (nitrérgicos) no plexo mioentérico, excluindo-se a sua presença nas células gliais entéricas e nos macrófagos residentes, mesmo após a instalação da inflamação intestinal.

Referências Bibliográficas

1. Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(1):155. doi:10.1016/J.MAYOCP.2018.09.013
2. Vieira C, Ferreirinha F, Magalhães-Cardoso MT, Silva I, Marques P, Correia-de-Sá P. Post-inflammatory ileitis induces non-neuronal purinergic signaling adjustments of cholinergic neurotransmission in the myenteric plexus. *Front Pharmacol.* 2017;8. doi:10.3389/FPHAR.2017.00811/FULL
3. Ogobuiro I, Gonzales J, Shumway KR, Tuma F. Physiology, Gastrointestinal. *StatPearls.* Published online April 8, 2023. Accessed April 23, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537103/>
4. Fleming MA, Ehsan L, Moore SR, Levin DE. The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target. *Gastroenterol Res Pract.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/8024171
5. Shahrestani J, Das JM. Neuroanatomy, Auerbach Plexus. *StatPearls.* Published online May 23, 2023. Accessed January 12, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551559/>
6. Breit S, Kupferberg A, Rogler G, Hasler G. Vagus Nerve as Modulator of the Brain–Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Front Psychiatry.* 2018;9(MAR):1. doi:10.3389/FPSYT.2018.00044
7. Hao MM, Young HM. Development of enteric neuron diversity. *J Cell Mol Med.* 2009;13(7):1193. doi:10.1111/J.1582-4934.2009.00813.X
8. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000;81(1-3):87-96. doi:10.1016/S0165-1838(00)00127-2
9. Costa M, Brookes SJH, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut.* 2000;47(Suppl 4):iv15. doi:10.1136/GUT.47.SUPPL_4.IV15
10. Baghdadi MB, Kim TH. The multiple roles of enteric glial cells in intestinal homeostasis and regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2023;150-151:43-49. doi:10.1016/J.SEMCDB.2023.01.005
11. Takayama I, Horiguchi K, Daigo Y, Mine T, Fujino M, Ohno S. The interstitial cells of Cajal and a gastroenteric pacemaker system. *Arch Histol Cytol.* 2002;65(1):1-26. doi:10.1679/AOHC.65.1
12. Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, et al. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(6):G1370. doi:10.1152/AJPGI.00074.2009
13. Kurahashi M, Zheng H, Dwyer L, Ward SM, Don Koh S, Sanders KM. A functional role for the ‘fibroblast-like cells’ in gastrointestinal smooth muscles. *J Physiol.* 2011;589(Pt 3):697. doi:10.1113/JPHYSIOL.2010.201129
14. Bitar KN. Function of gastrointestinal smooth muscle: from signaling to contractile proteins. *Am J Med.* 2003;115(3):15-23. doi:10.1016/S0002-9343(03)00189-X
15. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2014;20(1):91. doi:10.3748/WJG.V20.I1.91
16. Burri E, Maillard MH, Schoepfer AM, et al. Treatment Algorithm for Mild and Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis: An Update. *Digestion.* 2020;101(Suppl. 1):2-15. doi:10.1159/000504092

17. Mills SC, von Roon AC, Tekkis PP, Orchard TR. Crohn's disease. *BMJ Clin Evid.* 2011;2011. Accessed April 27, 2024. /pmc/articles/PMC3217808/
18. Lakhan SE, Kirchgessner A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *J Neuroinflammation.* 2010;7(1):1-12. doi:10.1186/1742-2094-7-37/FIGURES/1
19. Liu D, Saikam V, Skrada KA, Merlin D, Iyer SS. Inflammatory bowel disease biomarkers. *Med Res Rev.* 2022;42(5):1856-1887. doi:10.1002/MED.21893
20. Abraham C, Cho JH. Mechanisms of Disease Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med.* 2009;361:2066-2078.
21. Ruzafa LR, Cedillo JL, Hone AJ. Nicotinic Acetylcholine Receptor Involvement in Inflammatory Bowel Disease and Interactions with Gut Microbiota. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(3):1-19. doi:10.3390/IJERPH18031189
22. Sandborn WJ, Su C, Sands BE, et al. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine.* 2017;376(18):1723-1736. doi:10.1056/NEJMOA1606910/SUPPL_FILE/NEJMOA1606910_DISCLOSURES.PDF
23. Dilauro S, Crum-Cianflone NF. Ileitis: When It Is Not Crohn's Disease. doi:10.1007/s11894-010-0112-5
24. Martinolle JP, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Altered contractility of circular and longitudinal muscle in TNBS-inflamed guinea pig ileum. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 1). doi:10.1152/AJPGI.1997.272.5.G1258
25. Pontell L, Castelucci P, Bagyánszki M, et al. 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.* 2009;455(1):55-65. doi:10.1007/S00428-009-0795-X
26. Bradley JS, Parr EJ, Sharkey KA. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* 1997;289(3):455-461. doi:10.1007/S004410050891
27. Vieira C, Magalhães-Cardoso MT, Ferreirinha F, et al. Feed-Forward Inhibition of CD73 and Upregulation of Adenosine Deaminase Contribute to the Loss of Adenosine Neuromodulation in Postinflammatory Ileitis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/254640
28. Nurgali K, Nguyen T V., Matsuyama H, Thacker M, Robbins HL, Furness JB. Phenotypic changes of morphologically identified guinea-pig myenteric neurons following intestinal inflammation. *J Physiol.* 2007;583(2):593-609. doi:10.1113/JPHYSIOL.2007.135947
29. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(1):101. doi:10.2174/1570159X13666150716165726
30. Cecchini M, Changeux JP. Nicotinic receptors: From protein allostery to computational neuropharmacology. *Mol Aspects Med.* 2022;84:101044. doi:10.1016/J.MAM.2021.101044
31. Yeh JJ, Yasuda RP, Dávila-García MI, et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$ subunit protein in rat brain and sympathetic ganglion measured using a subunit-specific antibody: regional and ontogenic expression. *J Neurochem.* 2001;77(1):336-346. doi:10.1046/J.1471-4159.2001.00259.X

32. Pei J, Foong P, Hirst CS, et al. Development/Plasticity/Repair Changes in Nicotinic Neurotransmission during Enteric Nervous System Development. Published online 2015. doi:10.1523/JNEUROSCI.4175-14.2015
33. Yang C, Li Z, Yan S, et al. Role of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$ subtype in vascular inflammation. *Br J Pharmacol*. 2016;173(22):3235. doi:10.1111/BPH.13609
34. Borovikova L V., Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-462. doi:10.1038/35013070
35. Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, et al. Selective $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med*. 2007;35(4):1139-1144. doi:10.1097/01.CCM.0000259381.56526.96
36. Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, et al. Modulation of TNF release by choline requires $\alpha 7$ subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Molecular Medicine*. 2008;14(9-10):567-574. doi:10.2119/200800079.PARRISH/FIGURES/5
37. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005;42(4):405-426. doi:10.1354/VP.42-4-405/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1354_VP.42-4-405FIG18.JPEG
38. Duarte-Araújo M, Nascimento C, Timóteo MA, Magalhães-Cardoso T, Correia-de-Sá P. Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A2A and extrajunctional inhibitory A1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2004;141(6):925. doi: 10.1038/SJ.BJP.0705697
39. Kinoshita K, Horiguchi K, Fujisawa M, et al. Possible involvement of muscularis resident macrophages in impairment of interstitial cells of Cajal and myenteric nerve systems in rat models of TNBS-induced colitis. *Histochem Cell Biol*. 2007;127(1):41-53. doi:10.1007/S00418-006-0223-0
40. Vernallis AB, Conroy WG, Berg DK. Neurons assemble acetylcholine receptors with as many as three kinds of subunits while maintaining subunit segregation among receptor subtypes. *Neuron*. 1993;10(3):451-464. doi:10.1016/0896-6273(93)90333-M
41. Nakajima H, Goto H, Azuma YT, Fujita A, Takeuchi T. Functional interactions between the SK2 channel and the nicotinic acetylcholine receptor in enteric neurons of the guinea pig ileum. *J Neurochem*. 2007;103(6):2428-2438. doi:10.1111/J.14714159.2007.04960.X
42. Zhou X, Ren J, Brown E, Schneider D, Caraballo-Lopez Y, Galligan JJ. Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestinal myenteric neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002;302(3):889-897. doi:10.1124/JPET.102.033548
43. Obaid AL, Nelson ME, Lindstrom J, Salzberg BM. Optical studies of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in the guinea-pig enteric nervous system. *Journal of Experimental Biology*. 2005;208(15):2981-3001. doi:10.1242/JEB.01732
44. Vernino S, Adamski J, Kryzer TJ, Fealey RD, Lennon VA. Neuronal nicotinic ACh receptor antibody in subacute autonomic neuropathy and cancer-related syndromes. *Neurology*. 1998;50(6):1806-1813. doi:10.1212/WNL.50.6.1806
45. Cuny H, Yu R, Tae HS, Kompella SN, Adams DJ. α -Conotoxins active at $\alpha 3$ -containing nicotinic acetylcholine receptors and their molecular determinants for selective inhibition. *Br J Pharmacol*. 2018;175(11):1855. doi:10.1111/BPH.13852

