



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

NAYANA FREIRE DE ALMEIDA FONTES

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS NEURÔNIOS DO SISTEMA
NERVOSO ENTÉRICO NO MODELO EXPERIMENTAL DE ILEÍTE INTESTINAL
INDUZIDO POR DIFERENTES CEPAS DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE***

FORTALEZA – CE

2017

NAYANA FREIRE DE ALMEIDA FONTES

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS NEURÔNIOS DO SISTEMA
NERVOSO ENTÉRICO NO MODELO EXPERIMENTAL DE ILEÍTE INTESTINAL
INDUZIDO POR DIFERENTES CEPAS DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Antoniele Souza Gomes.

FORTALEZA

2017

A Deus.

A minha Família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meus pais Edson e Conceição, pelos ensinamentos, amor incondicional, compreensão e presença na minha vida. As minhas irmãs, Anirene e Nayara, pela amizade, amor e apoio. Minha família, presente de Deus.

A minha orientadora e sobretudo amiga, prof^a Dr^a Antoniella Souza Gomes, pelo apoio, companheirismo, incentivo e realização deste trabalho. Obrigada pela sua orientação não somente no projeto, mas na vida! Por sua presença sempre tão importante, acolhedora e construtiva.

A Dra Patricia Castelucci-USP, pela importante colaboração, não somente do maravilhoso laboratório, mas de seu valioso conhecimento neste e tantos outros assuntos científicos. Obrigada pelas contribuições neste trabalho.

A prof^a Dr^a Gerly Anne, pela receptividade, desde a primeira vez que a encontrei, quando buscava fazer o mestrado, por sua simpatia, competência profissional e acolhimento de todos que a buscam.

Aos amigos de extrema e fundamental importância na realização deste trabalho, em especial a grande amiga Zulmira, sempre presente, Angélica, Dani Foscheti, Luana, Thiago (UFPB), Josiane, Deinize, Socorro, Deiziane e ao amigo Danilo do NPDM, por toda ajuda antes, durante e também após os meus experimentos. Foram e são muito importantes.

RESUMO

O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram positivo responsável por diarreias nosocomiais associadas ao uso de antibióticos, podendo ser causadora de colite pseudomembranosa, levando o paciente a morte. O *C. difficile* tem promovido a investigação sobre novas cepas e suas virulências, pelo nosso grupo de estudo, através de pacientes com diarreia, monitorados no Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ) do Instituto do Câncer do Ceará (ICC), a fim de identificar o *C. difficile* e caracterizar as cepas encontradas. O estudo da virulência das cepas de *C. difficile* isoladas no HHJ é realizada através de injeção de sobrenadantes de cultura dessa bactéria em alça ileal de camundongos do tipo Swiss, macho, pesando entre 25-30 g, divididos aleatoriamente em 4 grupos, sendo dois controles: PBS (controle negativo); ATCC 700057 (cepa não toxigênica), e 2 experimentais NAP1 (cepa hipervirulenta) e ICC 01. Esta última cepa foi isolada em amostras de fezes de pacientes internados no ICC. Os animais foram submetidos ao modelo de alça ileal seguido da injeção do sobrenadante. Quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados, a alça ileal removida, pesada e medida e aliquoteada para os ensaios: técnica de rotina com hematoxilina e eosina para avaliar os parâmetros histopatológicos por escores, imunohistoquímica e contagem de neurônios e células gliais pelo microscópio confocal. Os camundongos expostos ao sobrenadante das cepas NAP1 e ICC 01 apresentaram uma maior intensidade da resposta inflamatória verificado por maior intensidade de alterações histopatológicas como descamação, edema, infiltração e hemorragia em relação aos controles, apresentaram também diminuição de densidade de neurônios NOS.

Palavras chave: *Clostridium difficile*, neurônio, glia, ileíte, virulência.

ABSTRACT

Clostridium difficile is a gram bacillus that is positively responsible for nosocomial diarrhea associated with the use of antibiotics. It can cause pseudomembranous colitis leading to death. *C. difficile* has promoted a study on new strains and their virulence, by our study group, through patients with diarrhea, monitored at Haroldo Juaçaba Hospital (HHJ) of the Ceará Cancer Institute (ICC), in order to identify the *C. difficile* and characterize as strains found. The study of the virulence of *C. difficile* strains isolated in the HHJ is through the injection of culture supernatants of the bacteria into ileal loop of Swiss male mice weighing between 25-30 g, randomly divided into 4 groups, two controls : PBS (negative control); ATCC 700057 (non-toxicogenic strain), and 2 experimental NAP1 (hypervirulent strain) and ICC 01. This latter strain was isolated in faecal samples from patients admitted to the ICC. The animals were submitted to the ileal loop model followed by the injection of the supernatant. Four hours after the surgical procedure, sacrificed animals, ileal loop, plague and measurement and aliquotting for the tests: routine hematoxylin and eosin technique to evaluate the histopathological parameters by scores, immunohistochemistry and count of neurons and glial cells by Microscope Confocal. The mice exposed to the supernatant of the NAP1 and ICC 01 strains had a higher intensity of inflammatory response verified by a greater intensity of histopathological alterations such as desquamation, edema, infiltration and hemorrhage in relation to the controls, also presented a decrease in the density of NOS neurons.

Keywords: *Clostridium difficile*, neuron, glia, ileitis, virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática do SNE do intestino delgado.....	15
Figura 2- Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE de cobaia.....	19
Figura 3- Micrografia eletrônica dos bacilos do <i>Clostridium difficile</i>	20
Figura 4- Cultura de <i>C.difficile</i> proveniente da impressão das luvas de um enfermeiro após a manipulação de um paciente infectado com o microorganismo.....	21
Figura 5- Aspecto do cólon normal (esquerda) e do cólon de indivíduo com doença associada ao <i>Clostridium difficile</i> (DACD) (direita).....	22
Figura 6- Ciclo do transplante de fezes.....	24
Figura 7- Efeito dos sobrenadantes de diferentes cepas de <i>C. difficile</i> sobre o peso/comprimento da alça ileal de camundongos Swiss.....	32
Figura 8- Fotomicrografias do íleo de camundongos submetidos à enterite decorrentes da ação dos sobrenadantes de diferentes cepas de <i>C. difficile</i>	33
Figura 9- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS, sobre o tamanho em milímetro quadrados, dos gânglios do plexo mioentérico.....	35
Figura 10- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios NOS no plexo mioentérico.....	37
Figura 11- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP 1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios ChAT no plexo mioentérico.	39
Figura 12- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios CALR no plexo mioentérico.....	41
Figura 13- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios NOS no plexo mioentérico.....	42
Figura 14- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP 1 e ICC 45, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios ChAT no plexo mioentérico.....	43

Figura 15- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios Calretinina (CALR) no plexo mioentérico.....	44
Figura 16- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de células gliais GFAP positivas no plexo mioentérico.....	45
Figura 17- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a área de neurônios NOS no plexo mioentérico.....	46
Figura 18- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a área de neurônios ChAT no plexo mioentérico.....	47
Figura 19- Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a área de neurônios CALR no plexo mioentérico.....	48
Tabela 1- Alterações histopatológicas ileais em camundongos swiss tratados com sobrenadantes de diferentes cepas de <i>Clostridium difficile</i>	34

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ATCC	American type culture collection
C. difficile	Clostridium difficile
Ca ²⁺	Cálcio
Calb	Calbindina
Calr	Calretinina
CAT	Catalase
CDI	Infecção por Clostridium difficile
CDT	Clostridium difficile transferase
Células NK	Células natural killer
CGE	Células da glia entérica
CL ⁻	Cloreto
Cox-2	Cicloxygenase 2
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
DACD	Doença associada ao C. difficile
DC	Doença de Chron
DII	Doenças inflamatorias intestinais
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	cido desoxirribonucleico
eNOS	óxido nítrico sintetase endotelial
EROs	Espécie reativa de oxignio
EUA	Estados Unidos da América
GABA	cido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida filica glial do filamento intermediário
H.E	Hematoxilina e eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOCL	Hipoclorito
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
IFN-	Interferon alfa
IFN-	Interferon beta
IFN-	Interferon gama
IL-1R1	Receptor para interleucina 1

IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
IPANs	Neurônios aferentes primários intrínsecos
I/R-i	Isquemia/ reperfusão intestinal
JNK	Quinase c-Jun-N-terminal
K ⁺	Potássio
L	Litro
LAFICA	Laboratório de farmacologia e inflamação e do câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKp38	Mitogen-activated protein kinase p38
MC	Músculo circular
ML	Muscular longitudinal
MM	Muscular da mucosa
mm ²	Milímetro quadrado
MUC	Mucosa
mg	Miligrama
mmol	Milimol
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
Na ⁺	Sódio
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo P reduzido
NAP1	North American Pulsed Fiel Type 1
NEMPI	Núcleo de Estudo em Microscopia e Processamento de Imagem
NEJM	The New England Journal of Medicine
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ -	Nitrito
NO ₃ -	Nitrato
NOD-1	Receptor de nucleotídeo de oligomerização-1
NPY	Neuropeptídeo Y
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction

PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Plexo mioenterico
PS	Plexo submucoso
PSM	Proteína de superfície de membrana
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SP	Substancia P
S100b	Proteína de ligação ao cálcio
T CD3+	Linfócito T grupamento de diferenciação 3
T CD4+	Linfócito T grupamento de diferenciação 4
TCA	Ácido tricloroacético
tcdA	Gene regulador da síntese de TCDA
TCDA	Toxina A do C. difficile
tcdB	Gene regulador da síntese de TCDB
TCDB	Toxina B do C. difficile
tcdC	Regulador negativo da síntese das proteínas A e B do C. difficile
TGF- α	Fator de crescimento transformante alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TLR-4	Toll like 4
TNBS	Ácido trinitrobenzenossulfônico
TNF R1	Receptor para TNF
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TxA	Toxina A
TxB	Toxina B
UC	Colite ulcerativa
UTI	Unidade de terapia intensiva
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1 Sistema Nervoso Entérico.....	14
1.2 Células Gliais.....	16
1.3 Código Químico.....	18
1.4 Clostridium difficile.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Cepas.....	28
4.3 Modelo de ileite experimental induzido pela administração da sobrenadante das diferentes cepas de <i>c.difficile</i> em camundongos.....	28
4.4 Elaboração do preparado de membrana.....	28
4.5 Imunofluorescência para neurônios NOS, ChAT ou Calr	29
4.6 Análises qualitativas dos neurônios imunorreativos ao receptor nos, chat ou calr.....	29
4.7 Análises quantitativas dos neurônios imunorreativos ao receptor nos, chat e calr.....	30
4.7.1 Análise do código químico.....	30
4.7.2 Análise da densidade e morfometria neuronal.....	30
4.8 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Efeitos dos sobrenadantes de diferentes cepas de <i>clostridium difficile</i> sobre as alterações de peso/comprimento das alças ileais de camundongos.....	31
5.2 Avaliação histopatológica dos efeitos dos sobrenadantes de diferentes cepas de <i>clostridium difficile</i> nas alças ileais de camundongos.....	32
5.3 Efeito do sobrenadante de diferentes cepas de <i>clostridium difficile</i> nas alças ileais de camundongos sobre as densidades neuronais e gliais no	

plexo mioentérico.....	35
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1-INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1-Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso entérico faz parte do sistema nervoso autônomo, é constituído de uma rede de neurônios que integram o sistema digestivo (trato gastrointestinal, pâncreas e vesícula biliar). Os plexos mioentérico e submucoso são os principais formadores deste sistema, podendo funcionar de modo independente, contudo o sistema nervoso simpático e o parassimpático são capazes de ativar ou inibir as suas funções (GUYTON,1997).

Por ser um local independente de integração e processamento neural, o SNE é também conhecido como o segundo cérebro (GERSHON, 1998). Neste sistema, seus gânglios contêm neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs), interneurônios e neurônios motores, componentes neurais necessários para um circuito reflexo completo e dando autonomia a este sistema. (BROOKES, 2001; FURNESS et al., 2003a).

O SNE está presente em todo trato digestório tubular: no esôfago, no estômago e nos intestinos delgado e grosso, e é formado por redes interconectadas ou plexos de neurônios, seus axônios e células gliais entéricas. O SNE tem múltiplas funções como determinação dos padrões de movimento do trato gastrintestinal, controle da secreção de ácido gástrico, regulação do movimento de fluido através do epitélio, mudanças do fluxo sanguíneo local e interações com os sistemas endócrino e imune do intestino (FURNESS, 2006, 2012).

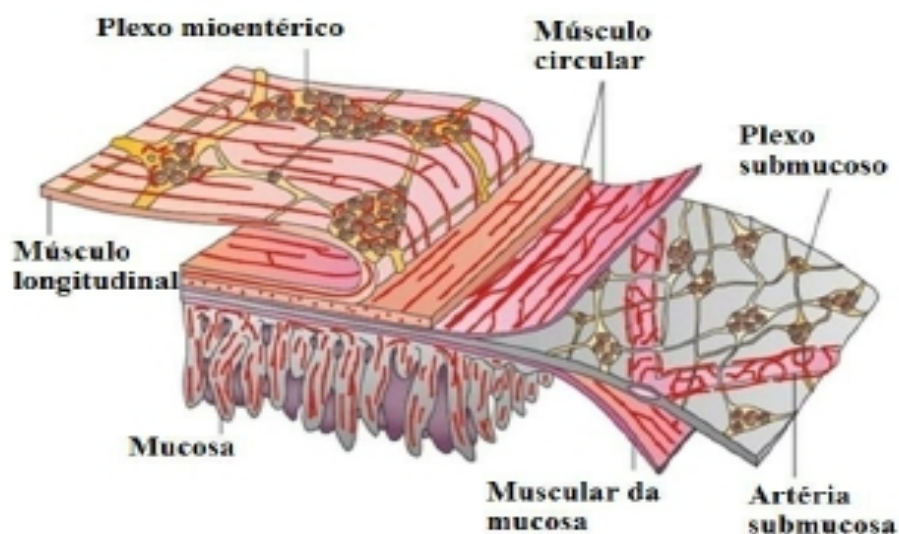
Os primeiros a deprever com clareza os plexos ganglionares dentro da parede do trato digestivo foram Meissner (1857), Billroth (1858), e Auerbach (1862a, b, 1864). Por sua vez Remak (1840, 1852), havia observado a presença de gânglios microscópicos nas paredes da faringe e estômago, porém sem descrições sugestivas de reconhecimento de plexo ganglionar. Após a sua descoberta, os gânglios e plexos entéricos atraiu considerável atenção e inúmeras descrições de sua organização foram publicados, incluindo os de Henle (1871), Drasch (1881), Dogiel (1895b, 1899), Cajal (1911), Kuntz (1913, 1922), Hill (1927), Schabadasch (1930 a, b), Stöhr (1930), e Irwin (1931) (FURNESS,2000).

Os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório, porém são encontradas diferenças quanto à densidade, a morfologia dos neurônios e a

forma dos gânglios (FURNESS, 2006).

O plexo mioentérico ou de Auerbach localiza-se entre a túnica muscular longitudinal externa e a túnica muscular circular interna, estendendo-se ao longo do trato digestório, desde o esôfago até o reto (FURNESS, 2006). O plexo mioentérico apresenta três componentes: um plexo primário, um plexo secundário e um plexo terciário (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2006) (Figura 1).

Figura 1 -Representação esquemática do SNE do intestino delgado.



(Fonte: Furness,2012).

O plexo submucoso (Meissner) é proeminente nos intestinos delgado e grosso e, localiza-se abaixo da mucosa e junto à camada circular do músculo liso. Suas malhas são menores do que o plexo mioentérico, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor (FURNESS, 2006).

Processos de células nervosas de fora do trato digestivo também se conectam com neurônios entéricos, e misturam-se com processos de neurônios entéricos. Um aspecto notável do sistema nervoso entérico é que os seus circuitos reflexos são capazes de dirigir as funções do sistema digestivo sem depender dos comandos a partir do cérebro ou da medula espinal. Esta independência é modulada pelos ricos intercâmbios de sinais entre o sistema nervoso entérico e sistema nervoso central (FURNESS,2006).

Com a evolução das técnicas de imunohistoquímicas, os neuromediadores do SNE começaram a ser estudados e foi possível identificar até o momento, ao redor

de 14 tipos funcionais de neurônios entéricos, incluindo os neurônios motores (excitatórios e inibitórios), interneurônios e neurônios sensoriais que controlam as funções gastrintestinais (FURNESS 2006; SAYEGH & RITTER, 2003). A rede neural do plexo mioentérico está envolvida com a regulação reflexa das atividades contráteis da musculatura externa, enquanto que os neurônios motores do plexo submucoso estão relacionados com o controle das atividades secretomotora e vasomotora da túnica mucosa (FURNESS ET AL., 2003).

A literatura tem demonstrado que o SNE é muito afetado nas doenças inflamatórias intestinais, com necrose, apoptose e degeneração dos gânglios entéricos (GEBOES & COLLINS, 1998; LOMAX ET AL., 2005). A reação inflamatória induzida por TNBS (ácido trinitrobenzenossulfônico) leva a um aumento da excitabilidade dos neurônios entéricos da mucosa do íleo e contribui para a persistência da neuropatia entérica (PONTELL ET AL., 2009) No trato digestório a isquemia/reperfusão intestinal (I/R-i) promove a perda significativa dos neurônios do plexo mioentérico e submucoso, bem como uma diminuição da densidade e do tamanho dos neurônios, resultando em alterações importantes da motilidade intestinal (PAULINO ET AL., 2011; PALOMBIT ET AL., 2013). Em modelos de desnutrição, houve uma recuperação do peso corporal e do perfil de células neuronais no plexo mioentérico em animais inicialmente privados de alimentos e posteriormente realimentados, mostrando a capacidade de regeneração dos neurônios mioentéricos após a desnutrição (CASTELUCCI ET AL., 2002). No modelo experimental de inflamação intestinal tem sido possível constatar alterações na diminuição dos neurônios dos gânglios entéricos, anormalidade nas funções contráteis e secretora do colo distal associados com diarreia (COLLINS 1996; GALEAZZI ET AL., 2000, JACOBSON ET AL., 1997). Estes trabalhos demonstram a necessidade da realização de mais trabalhos que visem a caracterização neuroquímica do SNE, principalmente em patologias gastrintestinais nas quais o perfil neuronal estaria alterado.

1.2 Células Gliais

As células gliais foram observadas pela primeira vez pelo patologista alemão Rudlof Virchow (1846), como uma substância “macia, medular e de natureza frágil”, contrastando com o tecido fibroso dos neurônios, como se aquelas fossem a cola

mantenedora destes, originando o nome neuroglia ("nerve-glue"). Até a década de 50, a neuroglia era vista como um mero suporte estrutural, a partir da década de 70 as células gliais começaram a ser vistas não mais apenas como suporte mecânico e metabólico, mas também como uma estrutura funcional no sistema nervoso central. As células da glia apresentam diferentes tipos morfológicos, as células localizadas exclusivamente no sistema nervoso central (SNC), incluem astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células ependimárias (KIMELBERG, H.K. ; NOREMBERG, M. D., 1989).

A primeira descrição das células da glia entérica foi feita por Dogiel (DOGIEL., 1899). Células gliais entéricas são descritas como pequenas células de forma estrelada que interconectam neurônios dentro dos gânglios entéricos e feixes de fibras nervosas (GABELLA G. 1972).

As células gliais entéricas são semelhantes aos astrócitos do sistema nervoso central, que expressam a proteína ácida fiélica glial do filamento intermediário (GFAP) e a proteína de ligação ao cálcio, S100b (HANANI M., REICHENBACH A.; 1994).

Classicamente, acreditava-se que as células gliais limitavam as suas funções em promover defesa do sistema nervoso contra agentes patógenos, remover neurônios mortos, formar a bainha de mielina, nutrir e dar sustentação aos neurônios. Ao longo das últimas décadas, o conhecimento sobre o papel das células da glia vem expandindo, essas células também apresentam as seguintes funções: guiar os neurônios em sua migração e os axônios no seu crescimento; diferenciação neural; manter a homeostase neuronal, regulando o pH extracelular, tamponando os níveis de íons extracelulares como o K^+ , Na^+ e lactato; participar na formação da barreira hemato-encefálica, intermediando o transporte de substâncias entre o sangue e os neurônios; sintetizar e liberar compostos neurotróficos; formar tecido cicatricial em resposta à perda neuronal e participam de respostas imune (LENZ, G., 1996).

O SNE também contribui juntamente com as células gliais entéricas para a manutenção da integridade da barreira epitelial entre o lúmen do intestino e as células da parede intestinal (FURNESS, 2012; SAVIDGE et al., 2007; TOUMI et al., 2003).

1.3 Código Químico

No estudo do código químico, este depende da detecção da imunorreatividade aos anticorpos produzidos contra o marcador neuronal, assim como os neurotransmissores, receptores, proteínas citoesqueléticas, ou enzimas nos neurônios entéricos, por exemplo, óxido nítrico sintase (NOS), P2X, calbindina (Calb) e neurofilamento-N (FURNESS, 2006a; SAYEGH e RITTER, 2003; CASTELUCCI et al., 2002a; COSTA et al., 1996; YOUNG et al., 1993).

Entre os estudos do código químico, existem relatos da distribuição e padrões de dupla marcação da calbindina (Calb), calretinina (Calr), ácido gama-aminobutírico (GABA), 5hidroxitriptamina (5-HT), óxido nítrico sintase (NOS), neuropeptídeo Y (NPY), substância P (SP) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) em neurônios entéricos de camundongos (QU et al, 2008; SANG et al., 1997; SANG e YOUNG, 1996).

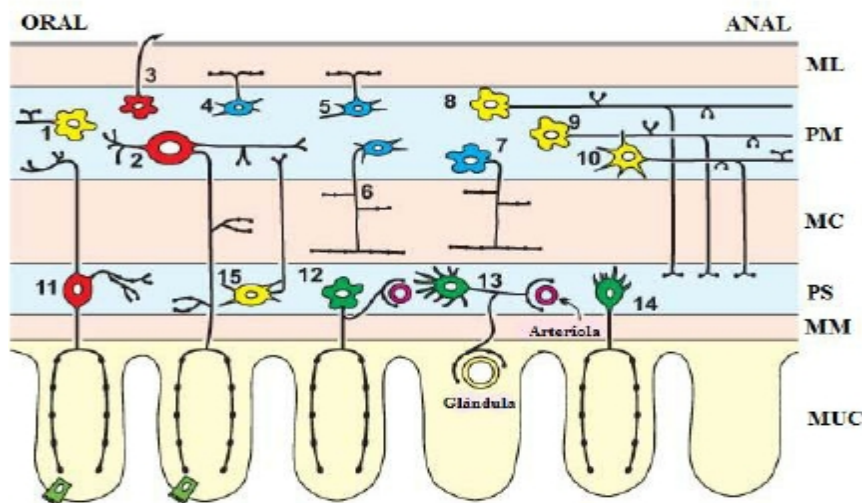
Os neurônios entéricos têm sido classificados pelas suas morfologias, propriedades fisiológicas, marcações imonohistoquímicas e histoquímicas, as estruturas que eles inervam, os transmissores que utilizam e as conexões que recebem. Os neurônios entéricos podem ser agrupados em neurônios motores, interneurônios e IPANs, que são algumas vezes referidos como neurônios sensoriais intrínsecos (FURNESS,2006).

Métodos imuno-histoquímicos, eletrofisiológicos, morfológicos (microscopias de luz e eletrônica), farmacológicos e técnicas de traçadores retrógrados foram combinados e utilizados para a identificação e classificação dos neurônios (BREHMER et al., 2004; FURNESS et al., 2004; CASTELUCCI et al., 2002b; POOLE et al., 2002; FURNESS, 2000; LOMAX et al., 2000; SONG et al., 1998; WANG et al., 1995; BROOKES et al., 1995).

A utilização destes métodos é de grande importância para o entendimento dos circuitos neurais e neurofisiológicos do SNE e em consequência destes estudos, houve a descoberta de que cada neurônio entérico contém vários marcadores químicos, o qual indica as suas funções. Estes estudos utilizaram combinações metodológicas que permitiram a descoberta, até o momento, ao redor de 14 tipos funcionais de neurônios entéricos somente no intestino de cobaias (BROOKES, 2001; FURNESS, 2000; 2006a).

Segundo Furness (2000,2006) foram identificados dezessete tipos de neurônios entéricos, quatorze destes encontrados no intestino delgado de cobaias (figura 2). Furness (2000) descreveu no intestino delgado de cobaias os tipos de neurônios segundo as funções, as morfologias do corpo celular, código químico e projeções, que estão representadas na figura 2: 1. Interneurônio ascendente; 2. Neurônio aferente primário intrínseco mioentérico; 3. Neurônio intestinofugal; 4. Neurônio motor excitatório do músculo longitudinal; 5. Neurônio motor inibitório do músculo longitudinal; 6. Neurônio motor excitatório do músculo circular; 7. Neurônio motor inibitório do músculo circular; 8. Interneurônio descendente (reflexos locais); 9. Interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10. Interneurônio descendente (complexo mioelétrico migratório); 11. Neurônio aferente primário intrínseco submucoso; 12. Neurônio vasodilatador/secretomotor não-colinérgico; 13. Neurônio vasodilatador/secretomotor colinérgico; 14. Neurônio secretomotor (não vasodilatador) colinérgico.

Figura 2- Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE de cobaia.

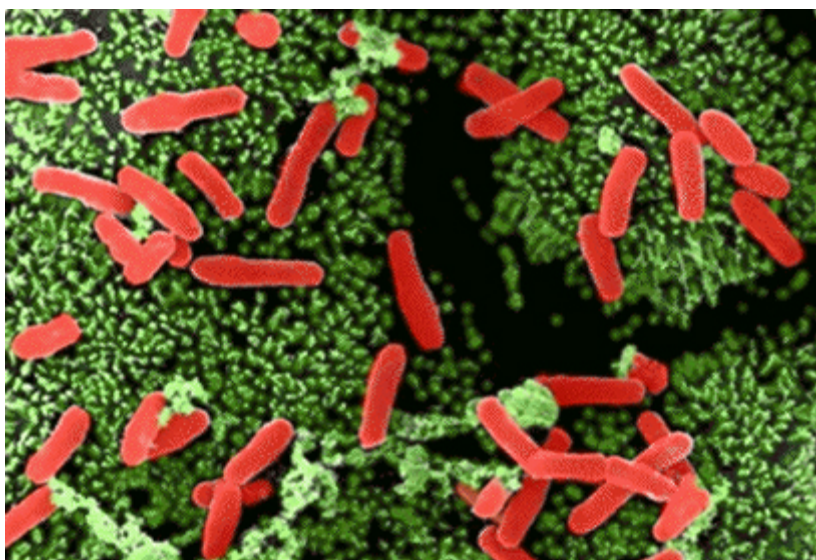


(FONTE: Adaptado de Furness, 2006. Todos foram definidos por suas funções, morfologia do corpo celular, código químico e projeções. ML: Muscular longitudinal; PM: Plexo mioentérico; MC: Músculo circular; PS: Plexo submucoso; MM: Muscular da mucosa; MUC: Mucosa).

1.4 Clostridium Difficile

O *Clostridium difficile* (*C. difficile*) é um bacilo gram positivo anaeróbio, formador de esporos e tem sido reconhecido como agente etiológico da colite pseudomembranosa em humanos desde 1978 (Figura 3) (LOO ET AL., 2011).

Figura 3- Micrografia eletrônica dos bacilos do *Clostridium difficile*.



(Fonte: Universidade de Hobot University of Wales College of Medicine UK.)

O indivíduo portador do *C. difficile* pode ser assintomático, ter diarreia leve ou desenvolver uma colite pseudomembranosa fulminante (KINE ET AL., 2000; OWENS, 2007). Esse bacilo, produz duas exotoxinas envolvidas na patogênese desta doença, a toxina A (TxA) e a toxina B (TxB) (POXTON ET AL., 2001; POPOFF & GENY, 2011). A maioria das cepas toxigênicas do *C. difficile* produzem ambas as toxinas, cujos mecanismos de ação são análogos (CHAVES-OLARTE ET AL., 1997; CHAVES-OLARTE ET AL., 1999).

Evidências mostram que o surgimento de uma nova cepa hipervirulenta “North American Pulsed Field Type 1” (NAP1) está ligado ao aumento da incidência e da gravidade da doença induzida pelo *C. difficile* (MCDONALD ET AL., 2005). Além disso, na Costa Rica, um novo genótipo toxigênico foi isolado, apresentando altas taxas de resistência à antibióticos. Essas linhagens foram chamadas NAP-CR (QUESADA-GÓMEZ ET AL., 2010).

Uma nova cepa de *C. difficile* (ICC-45) foi recuperada de um paciente portador de câncer, em um hospital do Ceará no Brasil, que foi a óbito por diarreia

grave. A abordagem polifásica atribuiu um novo ribotipo de PCR e um padrão de macrorrestricção de PFGE à estirpe ICC-45, que é toxigénico (tcdA β , tcdB β e ctdB β), classificada como ST41 de MLST Clade 2 e toxinótipo IX, sendo susceptível a fluoroquinolonas e não produz quantidades elevadas de TcdA e TcdB. Porém os sobrenadantes das estirpes ICC-45 e NAP1 / 027 produziram uma expressão semelhante de citocinas pró-inflamatórias, danos epiteliais e resposta ao estresse oxidativo no modelo de alça ileal em camundongos, mostrando as características comuns na patogênese (COSTA ET AL., 2016).

Segundo González- Garcia, Gómez- Pavón e Martínez- Porras (2005), a seqüência para o aparecimento da diarreia causada pelo *C. difficile* ocorre da seguinte forma: uso de antibiótico de amplo espectro, alteração da microbiota intestinal, exposição e colonização pelo *C. difficile* e por fim a produção de toxinas que induzem a resposta inflamatória aguda, podendo variar de uma simples diarreia até uma colite pseudomembranosa (Figura 5).

Hoje se sabe que a aquisição da bactéria ocorre frequentemente em hospitais, onde é comumente isolada na superfície de mãos e vestimentas de pessoas da equipe médica que entram em contato diretamente com pacientes infectados com o bacilo (Figura 4) (POUTANEN & SIMOR, 2004).

Figura 4: Cultura de *C.difficile* proveniente da impressão das luvas de um enfermeiro após a manipulação de um paciente infectado com o microorganismo.



(Fonte: Dr. Curtis Donskey, Clinical Infectious Diseases, February 2008.)

A infecção causada pelo *C. difficile* pode causar na sua forma mais grave uma colite necrosante, no qual por vezes se torna necessário tratamento radical como a colectomia a fim de evitar a morte do paciente (MUTO ET AL., 2005), mas também pode causar outras complicações como: desidratação, alterações hidroeletrólíticas, acidose, choque séptico, anasarca e hipoalbuminemia grave (FEKETY, 1997). A alta mortalidade está relacionada principalmente com grupos de risco como: pacientes imunodeprimidos e idosos a partir de 65 anos de idade (DALLAL ET AL., 2002). A colite fulminante acomete 1 a 3% dos pacientes com sintomas de toxicidade grave, febre, dor e distensão abdominal (KELLY; LAMONT, 1998).

Figura 5 - Aspecto do cólon normal (esquerda) e do cólon de indivíduo com doença associada ao *Clostridium difficile* (DACD) (direita).



(Fonte: Adaptada de RUPNIK; WILCOX E GERDING, 2009) Colonoscopia do intestino normal e em seguida a imagem das pseudomembranas formadas por placas amareladas e confluentes.

Atualmente, acredita-se que no Brasil essa bactéria seja responsável por cerca de 10% de todas as diarreias e por mais de 70% das diarreias hospitalares (BALASSIANO ET AL., 2011). Adicionalmente, um trabalho revelou que espécies de *C. difficile* foram detectadas em 6,7% de amostras de fezes de crianças hospitalizadas ou não nos países em desenvolvimento (PINTO ET AL., 2003).

O tratamento instituído há quase três décadas com os antibióticos metronidazol e vancomicina são capazes de controlar a doença (DOLGIN, 2011), porém a resposta à antibioticoterapia pode ser precária, e a taxa de recorrência chega a 25%. Após a primeira recorrência, o risco de apresentar uma segunda recorrência aumenta para 40% e, para múltiplas recorrências, o risco ultrapassa 50% (RUBIN TA, 2013).

Recentemente, a fidaxomicina surgiu como uma alternativa para os casos de *Clostridium difficile* resistentes. Apesar de mais eficiente que os antibióticos tradicionais, essa medicação ainda não está disponível no nosso meio, e sua eficácia não está definitivamente avaliada (ANTONIO J., 2015).

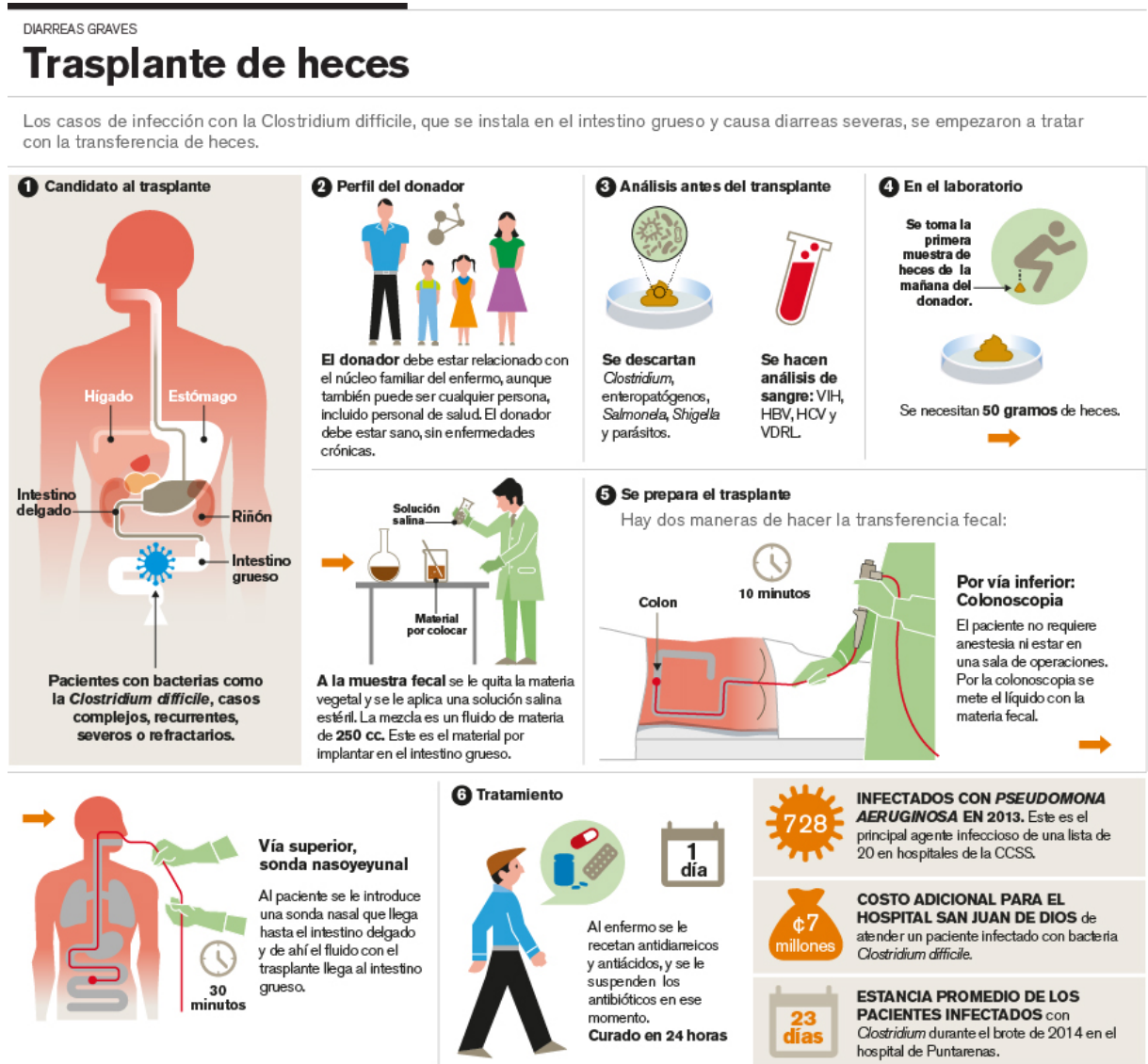
A mais recente alternativa para o tratamento da diarreia por *Clostridium difficile* recorrente é o transplante de microbiota fecal. O conceito não é novo e as primeiras publicações a respeito datam de 1958 (EISEMAN ET AL, 1958) Porém, por vários motivos, desde culturais até a descrença do meio científico, passaram-se mais de cinco décadas até que essa linha de raciocínio fosse retomada. No início dessa década, foram publicados vários artigos segundo os quais utilizou-se o transplante de microbiota fecal para pacientes com recorrência da infecção por *Clostridium difficile*. Mesmo assim, o meio médico manteve-se incrédulo. Foi somente no ano passado, com uma publicação no The New England Journal of Medicine (NEJM), que a comunidade médica percebeu o quão promissora pode ser essa técnica. O mais impressionante do trabalho publicado no NEJM foi a discrepância dos resultados apresentados entre o grupo tratado com antibióticos e o tratado com transplante de microbiota fecal. Este último foi tão superior que o estudo foi interrompido pelo Comitê de Ética Médica da instituição (KELLY CP,2013).

Em publicações anteriores, a infusão da microbiota fecal foi realizada por meio de enemas, colonoscopias ou infusões lentas por sonda nasoenteral, com o paciente acordado (KASSAM Z,2013; RUBIN TA,2013; KELLY CP,2013).

O indivíduo doador é geralmente um membro da família do paciente e que se enquadra em alguns critérios, como não ter feito uso de antibiótico nos últimos 6 meses, não ser imunocomprometido, e não ter antecedente de uso de drogas ilícitas, tumor ou doença inflamatória intestinal. São feitos alguns exames para triagem: sorologia para hepatites A, B e C, vírus da imunodeficiência humana (HIV), protoparasitológico de fezes, pesquisa de *Clostridium difficile* nas fezes, além de cultura fecal. Uma vez selecionado o doador, o material fecal é colhido e processado

em laboratório, de modo que fique diluído com soro fisiológico a 0,9%, formando a solução a ser infundida no indivíduo receptor (ARNALDO J. et al, 2015) (Figura 6).

Figura. 6 Ciclo do transplante de fezes.



(Fonte: Dr Manuel Villalobos, Serviço de Infectologia, HSJD.)

O grupo de pesquisa da UFC vem a alguns anos se dedicando ao estudo do papel da toxina A na patogênese da doença induzida pelo *C. difficile*, bem como sua possível modulação farmacológica em modelos experimentais *in vivo* e em *in vitro*, tendo publicado vários trabalhos nesta área (DE ARAUJO JUNQUEIRA ET AL., 2011). A TxA purificada causa secreção intestinal, intensa destruição da mucosa, hemorragia e inflamação acentuada com infiltração de neutrófilos quando injetada na

luz intestinal de murinos *in vivo* (HUMPHREY ET AL., 1979). A literatura mostra que a toxina A induz produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β por macrófagos peritoneais de ratos (ROCHA ET AL., 1997), bem como produção de TNF - α por células epiteliais intestinais humanas (BRITO. G.A.C. ET AL., 2002B).

Essas observações sugerem que a resposta inflamatória do trato gastrointestinal induzidas por toxinas produzidas por *C. difficile* poderiam causar significativas alterações neurofuncionais. E que os possíveis mecanismos ainda precisam ser elucidados.

2.JUSTIFICATIVA

O *C. difficile* é considerado a causa mais importante de diarreia nosocomial, especialmente após o uso de antibióticos de largo espectro (Blossom & McDonald, 2007). A doença pode variar desde uma leve diarreia até a colite pseudomembranosa com risco de morte. Apesar da escassez de informações sobre a incidência da doença no Brasil, um estudo demonstrou que dentre os enteropatógenos prevalentes na diarreia da comunidade, o *C. difficile* foi a terceira espécie mais frequentemente isolada (Antunes *et al.*, 2002).

Considerando esses dados, seria plausível que a ileite induzida por diferentes genótipos de *C. difficile* leve a uma alteração importante do código químico e na morfologia dos neurônios do SNE como resposta ao processo inflamatório induzido pelas toxinas.

A definição desse padrão buscou estabelecer se há diferenças entre as toxinas dos genótipos mais virulentos (NAP-CR), dos genótipos hipervirulentos (NAP1) e dos genótipos isolados de pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, definiu-se as alterações morfológicas dos neurônios do plexo mioentérico no modelo experimental de ileite e associaram-se essas diferenças com os níveis de virulência observados clinicamente em cada genótipo.

O desenvolvimento deste projeto também contribuiu para a formação de recursos humanos nas áreas de Morfologia, tendo em vista importante participação dos estudantes de iniciação científica neste projeto.

3.OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi comparar o efeito das toxinas presente no sobrenadante das diferentes cepas de *C.difficile* (cepas brasileiras isoladas no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, cepa hipervirulenta americana, NAP1 e cepa isolada na Costa Rica, NAP1CR) sobre a morfologia e o código químico dos neurônios do plexo mioentérico no modelo experimental de ileíte em camundongos e associar essas diferenças com os níveis de virulência observados clinicamente em cada genótipo

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar os neurônios imunorreativos a NOS (marcador de neurônios inibitórios), ChAT (marcadora de neurônios colinérgicos excitatórios motores), Calretinina (Calr) (marcadores de neurônios sensoriais excitatórios) no modelo experimental de ileíte intestinal induzido pelas toxinas presentes no sobrenadante das diferentes cepas de *C.difficile*;
- b) Avaliar a densidade dos neurônios imunorreativos ao receptor NOS, ChAT e Calr no modelo experimental de ileíte intestinal induzido pelas toxinas presentes no sobrenadante das diferentes cepas de *C.difficile*;
- c) Verificar a morfometria baseados na área do perfil do pericário, diâmetro máximo e diâmetro mínimo dos neurônios imunorreativos ao receptor NOS, ChAT e Calr no modelo experimental no modelo experimental de ileite intestinal induzido pelas toxinas presentes no sobrenadante das diferentes cepas de *C.difficile*;
- d) Correlacionar às alterações encontradas nos neurônios do plexo mioentérico de camundongos submetidos ao modelo experimental de ileíte induzida pelas toxinas presentes no sobrenadante das diferentes cepas de *C.difficile* e associar essas diferenças com os níveis de virulência observados clinicamente em cada genótipo.

e) Avaliar parâmetros histopatológicos (descamação, edema, infiltração e hemorragia) na ileíte provocada pela ação de sobrenadantes de diferentes cepas de *C. difficile* em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando cerca de 25-30g provenientes do Biotério Central do Campus do Pici, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno medindo 430x430x200, forradas com raspas de madeira, num ambiente com temperatura em cerca de 23° C com livre acesso a água filtrada e ração. Anteriormente aos procedimentos experimentais, os camundongos foram mantidos em jejum por 24 horas com água filtrada ad libitum e retiradas as raspas das caixas. Para o protocolo experimental os animais foram pareados por similaridade dos pesos e em seguida distribuídos de forma aleatória em um dos grupos abaixo:

- Grupo PBS (controle com PBS) – 05 animais. Receberam 300 µL de PBS/ alça ileal.
- Grupo ATCC 700057 (controle ATCC) – 05 animais. Receberam 300 µL do sobrenadante da cepa não toxigênica ATCC/ alça ileal.
- Grupo NAP 1 (NAP 1) – 05 animais. Receberam 300 µL do sobrenadante da cepa NAP 1/ alça ileal.
- Grupo ICC 01 (ICC 01) – 10 animais. Receberam 300 µL do sobrenadante da cepa ICC/ alça ileal isolada do paciente 01 infectado com *C. difficile* no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará-ICC.

Todos os protocolos experimentais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) Protocolo nº 31/2015.

4.2. CEPAS

Os sobrenadantes das cepas de *C. Difficile* bem como a controle ATCC 700057 foram obtidos junto ao laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal do Ceará através do uso do método de obtenção ainda não publicado, desenvolvido pelo Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia da Facultad de Microbiología da Universidad de Costa Rica.

As cepas de *C.difficile* usadas no projeto para indução da ileíte experimental foram: a cepa brasileira ICC 01 isolada, por pesquisadores do nosso grupo, dos pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará e a cepa hipervirulenta americana -NAP1 e a cepa ATCC (cepa não toxigênica), porém usamos destas cepas seus sobrenadantes.

4.3.MODELO DE ILEITE EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DA SOBRENADANTE DAS DIFERENTES CEPAS DE *C.DIFFICILE* EM CAMUNDONGOS

A técnica utilizada de ileite (alça ileal) seguiu o protocolo descrito por Carneiro et al, (2006) com algumas modificações (Carneiro *et al.*, 2006). Camundongos pesando 20 - 30g, do sexo masculino foram mantidos em jejum durante a noite, mas permitido o acesso à água e, em seguida, anestesiados com ketamina e xilazina (60 e 5 mg/kg, respectivamente). Através de uma laparatomia de linha média, uma alça de 5-8 cm foi ligada e em seguida injetada com 300 µl de sobrenadantes das cepa de *C. difficile* (cepa brasileira isolada dos pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto de Câncer do Ceará, ou cepa americana (NAP1)), solução salina e sobrenadante de *C. difficile* ATCC® 700057 (como controle). O abdome foi fechado com suturas, e os animais foram deixados a recuperar a consciência. Quatro horas após da administração de sobrenadantes das cepas de *C. difficile*, os camundongos foram sacrificados e as alças ileais removidas para elaboração dos preparados de membranas.

4.4. Elaboração do preparado de membrana

A alça ileal dos camundongos tratados com o sobrenadante das cepas de *C. difficile* ou PBS (grupo controle) foram removidos e colocados em tampão fosfato-

salina (PBS: 0,15M NaCl em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH7,2). O íleo foi aberto e limpo de seu conteúdo, e depois colocados e esticados por meio de alfinetes em uma balsa fina de madeira, com a túnica mucosa para baixo. Após este procedimento, o material foi imerso no fixador com paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M pH7,3, “over night” e refrigerado a 4 °C. No dia seguinte, os tecidos foram clareados No fixador com 03 lavagens, de 10 minutos cada, em dimetilsulfoxido (DMSO) seguido por 03 lavagens de 10 minutos em PBS. Após este procedimento, os tecidos foram estocados em PBS contendo 0,1% sódio-azida em 4°C (Castelucci et al 2003; Castelucci et al. 2002b; Poole et al. 2002). Após a fixação e o clareamento, os tecidos de cada animal foram seccionados em cerca de 1cm² e dissecados com o auxílio da lupa estereoscópica (ZM800 Nikon) para a obtenção do plexo mioentérico.

4.5. Imunofluorescência para neurônios NOS, ChAT ou Calr

Com o plexo mioentérico isolado, este foi novamente seccionado e imerso em uma solução contendo 10% de soro normal de cavalo, 1,5% de Triton-X (Sigma) e PBS durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após este período, os tecidos foram incubados em anticorpos primários (Hu C/D, NOS, Calr e ChAT) durante 24 horas a 4 °C e em seguida lavados em PBS por três vezes de 10 minutos cada. Após a incubação com os anticorpos primários, os tecidos foram lavados 03 vezes durante 10 minutos cada em PBS e incubados em anticorpos secundários (fluorófulos) por 01 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a 03 lavagens de 10 minutos cada em PBS e montadas as lâminas em glicerol tamponado com tampão carbonato de cálcio 0,5M pH8,6.

4.6. ANÁLISES QUALITATIVAS DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS AO RECEPTOR NOS, CHAT OU CALR

As análises qualitativas dos neurônios entéricos dos animais submetidos à ileíte intestinal induzida por diferentes cepas de *C.difficile* foram realizadas no microscópio confocal Olympus acoplado ao analisador de imagem. O aparelho é equipado com filtros para discriminar as fluorescências 488 (coloração vermelha) e 594 (coloração verde). As imagens serão capturadas e analisadas no programa Imagem Flouview.

4.7. ANÁLISES QUANTITATIVAS DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS AO RECEPTOR NOS, CHAT E CALR

4.7.1. ANÁLISE DO CÓDIGO QUÍMICO

As análises quantitativas do código químico dos neurônios entéricos imunorreativos foram realizadas através da contagem de neurônios imunorreativos ao receptor com dupla marcação á NOS, ChAT ou Calr no microscópio confocal Olympus. Para esta análise, primeiramente, os neurônios foram localizados segundo a presença do fluoróforo que marcou um determinado antígeno, após a localização deste neurônio, o filtro foi mudado para determinar se o neurônio estava ou não imunomarcado para o segundo antígeno, que foi localizado pelo fluoróforo de cor diferente. Assim, a percentagem de neurônios imunofluorescentes para um particular marcador foi também imunorreativo para um segundo marcador.

4.7.2. ANÁLISE DA DENSIDADE E MORFOMETRIA NEURONAL

A obtenção das densidades dos neurônios imunorreativos (neurônios/cm²) ao receptor NOS, ChAT e CALR do plexo mioentérico, foi realizada utilizando a objetiva de 100X do microscópio confocal Olympus acoplado ao analisador de imagem equipado com filtros para discriminar entre a fluorescência 488 e 594. A densidade foi realizada através da contagem do número de neurônios em 20 campos microscópicos, em dois preparados de membrana de cada animal de cada grupo experimental. Com os valores obtidos, foi realizado o cálculo para a conversão do número de neurônios em cm². As imagens foram analisadas através do programa Image Pro Plus, onde foi possível selecionar itens de mensuração como a área e o diâmetro máximo e o diâmetro mínimo do pericárdio. Na análise quantitativa do número de neurônios imunorreativos a NOS, Calr e ChAT por gânglio mioentérico foram contados os corpos celulares de 20 gânglios. A estimativa do número de neurônios no intestino delgado foi calculada, baseada na densidade neuronal e na área do intestino delgado que foi mensurada através de um planímetro.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística do plexo mioentérico foi realizada comparando-se os grupos controles e os grupos tratados com as diferentes cepas de *c. difficile*, verificando as duplas-marcações (%), densidade neuronal (n/cm²), estimativa de neurônios (neurônios no órgão), área do perfil do pericário (µm²), diâmetros máximo

e mínimo (μm) e número de neurônios por gânglio. Os dados foram comparados estatisticamente empregando-se o teste t de Student e ao nível de significância $p < 0,05$ (ZAR, 1984). Os resultados foram expressos com suas respectivas médias \pm desvio padrão. Após a obtenção de todos os resultados, estes foram tabulados e submetidos à análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de DHS (Diferença Honestamente Significante) de Tukey. Para todos os testes estatísticos, o nível de significância foram $p < 0,05$.

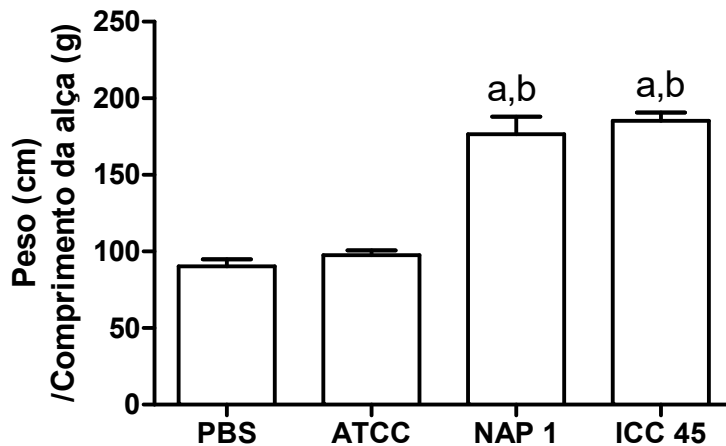
5 RESULTADOS

5.1 Efeitos dos sobrenadantes de diferentes cepas de *Clostridium difficile* sobre as alterações de peso/comprimento das alças ileais de camundongos

No modelo de enterite induzido pelos sobrenadantes das diferentes cepas de *C. difficile* podemos observar alterações macroscópicas importantes nas alças ileais dos camundongos Swiss. Note-se que os sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP 1 e ICC 01 mostram alças ileais mais escuras sugerindo hemorragia e necrose no seu interior, quando comparadas as alças ileais dos camundongos tratados com PBS ou ATCC (cepa não toxigênica).

Baseada nas observações anteriormente citadas, a relação peso/comprimento de alça foi avaliada (CAVALCANTE et al., 2006). Após sua remoção, a alça foi pesada em balança analítica e seu comprimento foi avaliado com auxílio de um paquímetro. Em seguida, dividiu-se o peso pelo comprimento da alça. Os resultados foram expressos em mg/cm (média \pm EP) (figura 7). Estes resultados mostram diferenças significativas entre a NAP1 e ICC 01 em relação ao grupo PBS ou ATCC.

Figura 7 - Efeito dos sobrenadantes de diferentes cepas de *C. difficile* sobre o peso/comprimento da alça ileal de camundongos Swiss.



Os camundongos foram tratados com 300 μ L de PBS, ou 300 μ L de sobrenadante de cepa não toxigênica (ATCC) ou toxigênica (NAP1 ou ICC 01). Os dados de peso/comprimento da alça estão plotados como média \pm EP ($8 \leq n \leq 10$).^a $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS. ^b $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC. ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

5.2 Avaliação histopatológica dos efeitos dos sobrenadantes de diferentes cepas de *Clostridium difficile* nas alças ileais de camundongos

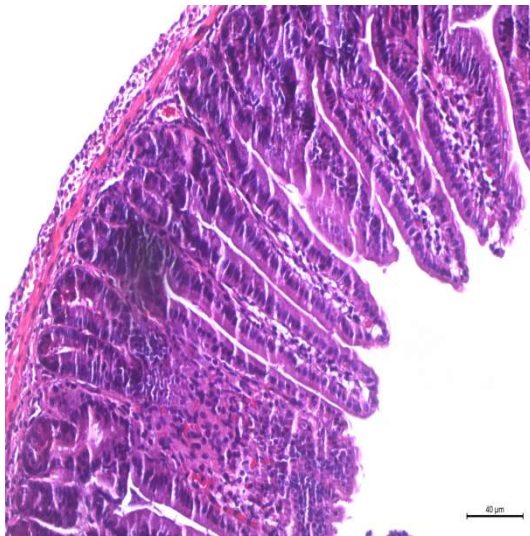
A análise histopatológica dos fragmentos ileais dos animais tratados com sobrenadantes de cepas toxigênicas (NAP1 ou ICC 01), revelaram a presença de sinais inflamatórios mais acentuados quando comparados com o grupo PBS ou ATCC 700057 (cepa não toxigênica). A descamação epitelial foi um achado frequente em todos os grupos experimentais, sendo mais significativos ($p < 0,05$) no grupo NAP1 e ICC 01 quando comparados com o grupo PBS ou ATCC. O edema também foi um achado importante sendo significativamente ($p < 0,05$) mais elevado nos grupos NAP1 e ICC 01. No quesito infiltração de células inflamatórias, NAP1 e ICC 01 foram superiores ($p < 0,05$) em relação a cepa não toxigênica (ATCC) ou PBS. Quanto ao parâmetro hemorragia, foi verificado que os grupos experimentais NAP1 e ICC 01 apresentavam sangramentos na área da mucosa, camada muscular ou lúmen ileal, significativamente superior ($p < 0,05$) aos grupos PBS ou ATCC (figura 8). Os escores estão expressos em mediana e valores máximo e mínimo conforme mostrado na tabela 1.

Na figura 16, foi possível avaliar a densidade glial através da marcação e posterior contagem das células GFAP positivas nos grupos experimentais. Observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de células GFAP

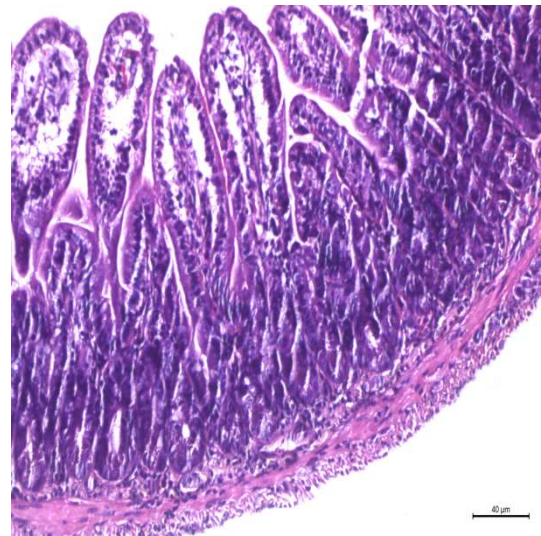
positivas no grupo NAP 1 (25592 ± 2509 células GFAP/cm²) em relação aos grupos PBS ($12643 \pm 915,3$ células GFAP/cm²) ou ATCC ($15395 \pm 790,4$ células GFAP/cm²). O sobrenadante da cepa toxigênica ICC 01 ($17697 \pm 205,4$ células GFAP/cm²) promoveu um discreto aumento na marcação de GPAF, contudo sem relevância estatística quando comparados aos grupos PBS ou ATCC citados à cima.

Figura 8 - Fotomicrografias do íleo de camundongos submetidos à enterite decorrentes da ação dos sobrenadantes de diferentes cepas de *C. difficile*.

PBS – A

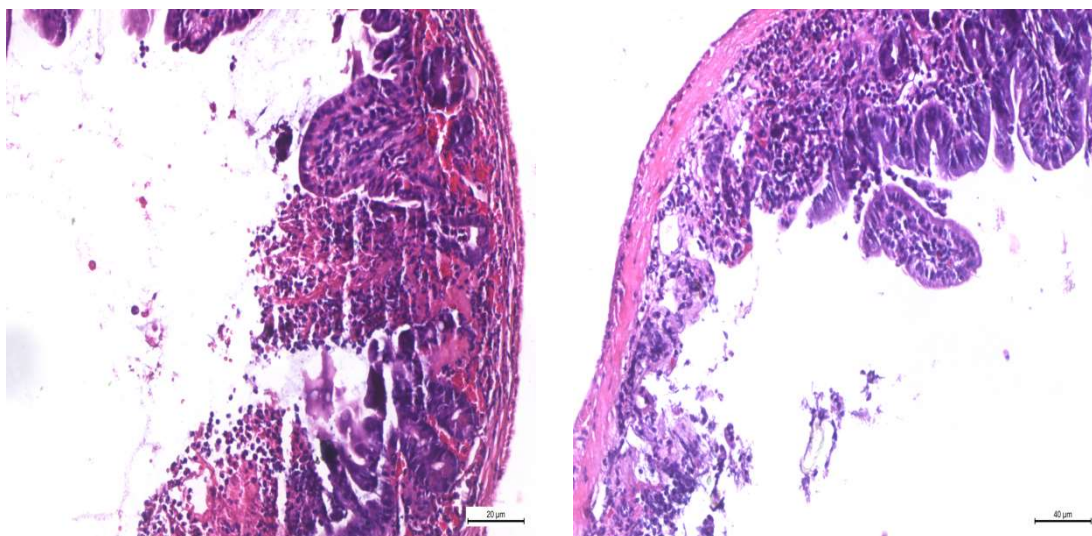


ATCC – B



NAP 1 – C

ICC 01 – D



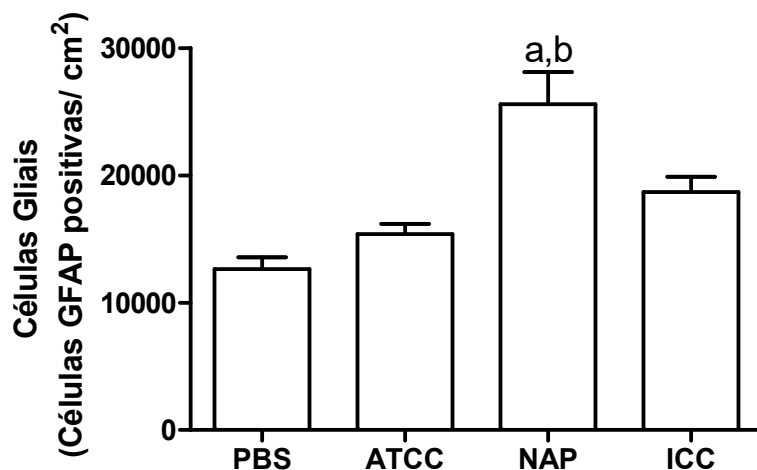
Os animais controles receberam 300 μ L de PBS (A) ou sobrenadantes de cepas não toxigênicas ATCC (B). Os grupos experimentais receberam, para cada animal em todos os grupos, 300 μ L de sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 (C) ou ICC 01 (D) ($n \geq 8$). O íleo foi removido e processado pela técnica de processamento e corado pelo método H.E (200x). Observe uma maior destruição tecidual em C e D quando comparada a cepa não toxigênica (ATCC) ou PBS. Há uma nítida descamação epitelial, hemorragia, edema e infiltração de células inflamatórias em C (NAP1) e D (ICC 01). Observe ainda a destruição dos vilos e necrose das criptas nos animais com enterite induzidas pelas cepas toxigênicas NAP1 (C) e ICC 01 (D), quando comparadas aos grupos PBS (A) ou ATCC (ATCC). (aumento da imagem 20x)

Tabela 1 - Alterações histopatológicas ileais em camundongos swiss tratados com sobrenadantes de diferentes cepas de *Clostridium difficile*.

Parâmetros	PBS	ATCC	NAP 1	ICC 01
Inflamatórios				
Descamação	1 (0-1)	1 (0-1)	4 (3-4) ^{a,b}	3.5 (3-4) ^{a,b}
Edema	1 (0-1)	1 (0-1)	3 (2-3) ^{a,b}	3 (2-3) ^{a,b}
Infiltração	1 (0-1)	2 (1-2)	3 (3-3) ^{a,b}	3 (2-3) ^{a,b}
Hemorragia	1 (0-1)	1 (1-2)	4 (4-4) ^{a,b}	4 (3-4) ^{a,b}

Os camundongos receberam 300 μ L de PBS ou 300 μ L sobrenadantes de cepa não toxigênica (ATCC) ou toxigênicas (NAP1 ou ICC 01). Os parâmetros inflamatórios foram mensurados quantitativamente por escores que variam de 0-4 para edema, hemorragia, descamação epitelial e infiltração de células inflamatórias. Os escores estão expressos em mediana e valores máximo e mínimo. ^a $p < 0,05$ quando comparados ao grupo PBS. ^b $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ATCC. Dados estatísticos realizado através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn.

Figura 16 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de células gliais GFAP positivas no plexo mioentérico.

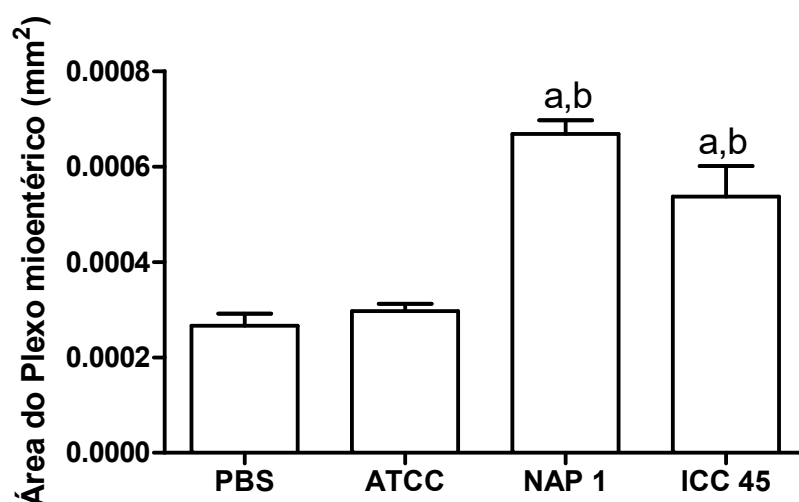


A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300 μ L/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico da densidade glial (número de células GFAP positivas por cm²), sendo contados 20 campos de cada grupo. ^a p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS e ^b p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC). ANOVA, seguido do teste de Bonferroni

5.3 Efeito do sobrenadante de diferentes cepas de *Clostridium difficile* nas alças ileais de camundongos sobre a área do gânglio no plexo mioentérico

Ao realizar-se uma coloração de HE, observou-se um aumento significativo (P<0,05) do tamanho do gânglio do plexo mioentérico dos grupos tratados com sobrenadante das cepas NAP1 e ICC 01, quando comparados aos grupos ATCC ou PBS. Utilizando planimetria, foi demonstrado um aumento significativo do tamanho dos gânglios mioentéricos acompanhado de processo de vacuolização importante e uma possível depleção neuronal das cepas toxigênicas, quando comparadas com as amostras PBS ou ATCC (Figura 9).

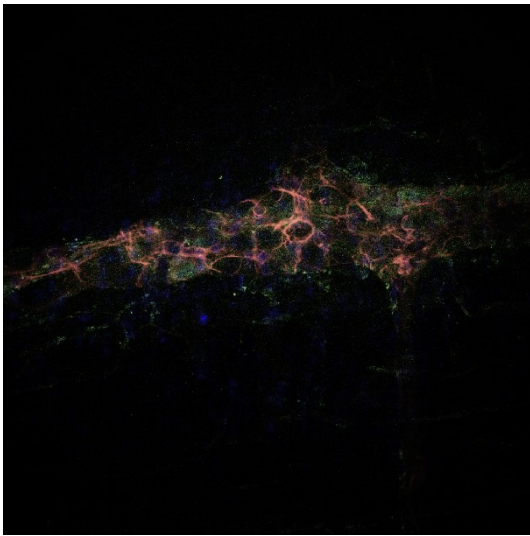
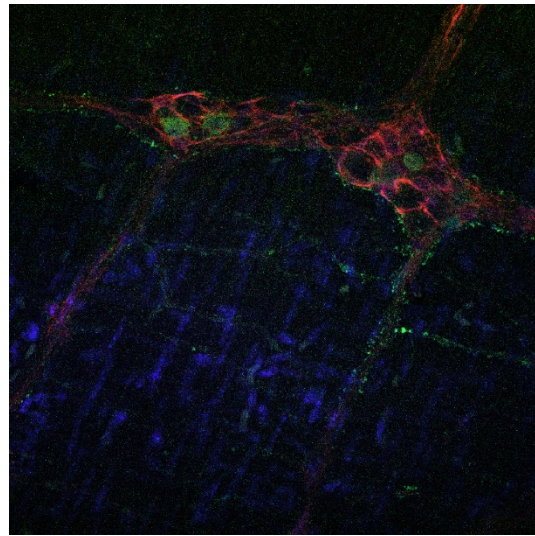
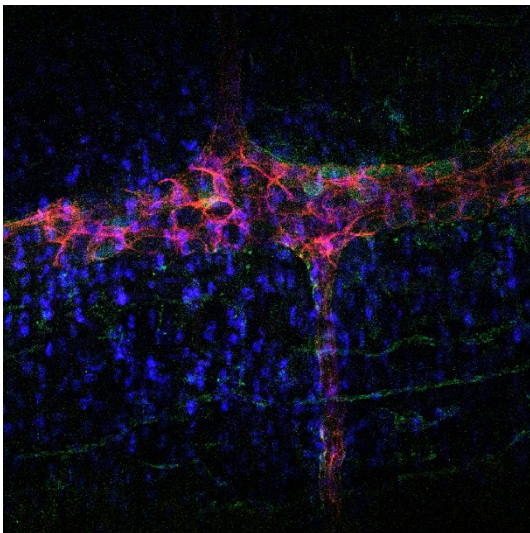
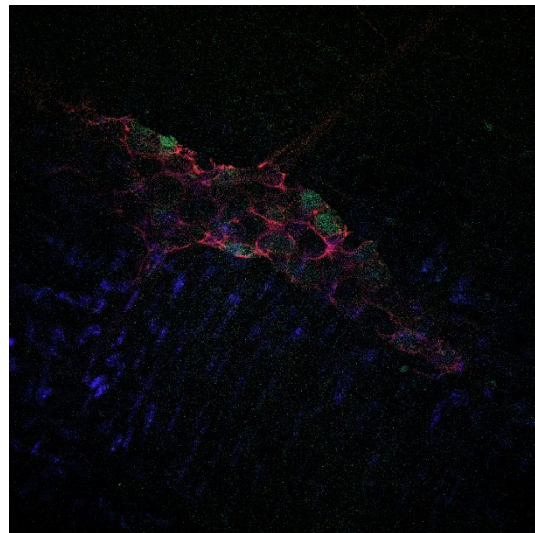
Figura 9 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS, sobre o tamanho em milímetro quadrados, dos gânglios do plexo mioentérico.



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300 μ L/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico do tamanho dos gânglios do plexo mioentérico (mm²), sendo contados 10 campos de cada grupo, sendo cada grupo formado por cinco amostras para cada grupo de tratamento. ^a p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS. ^b p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC. ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

A partir desses dados procurou-se entender as possíveis alterações no plexo mioentérico de camundongos com enterite induzida por diferentes sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênica ATCC, bem como PBS. Para isso foram realizadas imunofluorescências (dupla marcação) em preparados de membranas do plexo mioentérico para marcadores neuronais NOS, ChAT ou Calretinina (CALR) e um marcador de célula glial, o GFAP. Através de uma análise qualitativa, observamos uma diminuição da fluorescência dos neurônios imunorreativos a NOS (figura 10), ChAT (figura 11) e CALR (figura 12) nos grupos NAP1 e ICC 01, quando comparado ao grupo controle (PBS) ou ATCC. Contudo, um certo aumento na fluorescência de GFAP (um marcado específico de células gliais) pode ser notado apenas nos animais com enterite induzida por NAP1, em todas as figuras citadas anteriormente, quando comparadas aos grupos PBS ou ATCC. Um leve aumento na imunorreatividade das células GFAP foi observado no grupo ICC 01, porém sem relevância estatística.

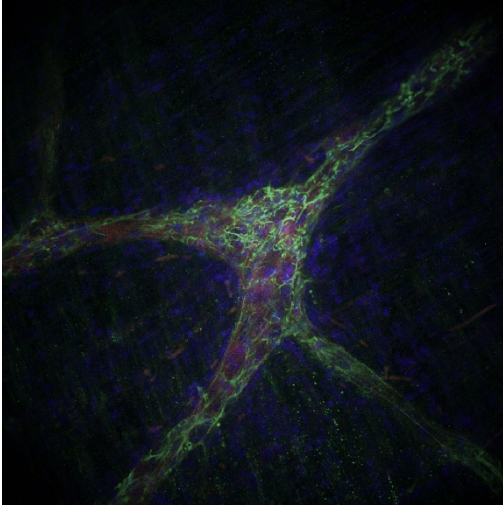
Figura 10 – Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios NOS no plexo mioentérico

PBS**ATCC****NAP****ICC**

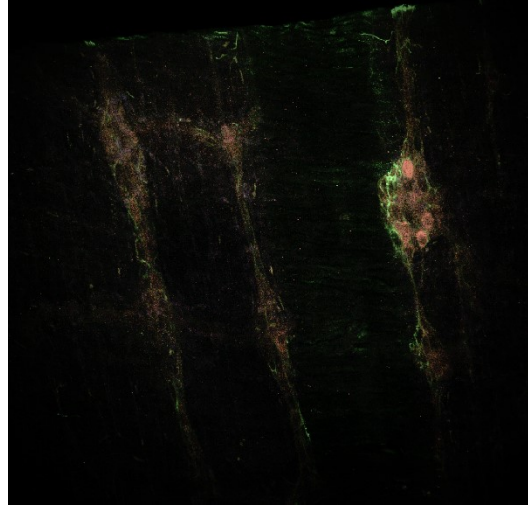
A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300 μ L/alça de PBS (painel A) ou dos sobrenadantes das cepas ATCC (painel B) ou NAP1 (painel C) ou ICC 01 (painel D). A imunofluorescência foi realizada no preparado de membrana, expondo o plexo mioentérico imunomarcado com os fluoróforos: alexia flúor 488 e 594 para NOS e GFAP, respectivamente. (aumento da imagem de 20x).

Figura 11 – Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP 1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios ChAT no plexo mioentérico.

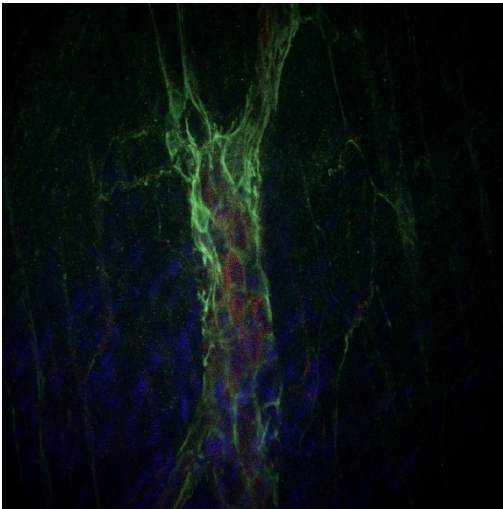
PBS



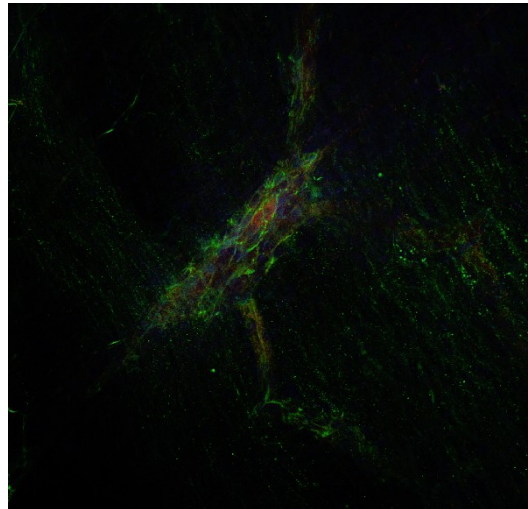
ATCC



NAP



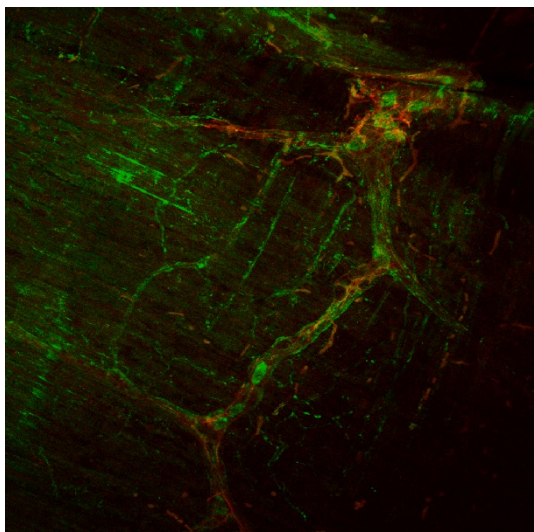
ICC



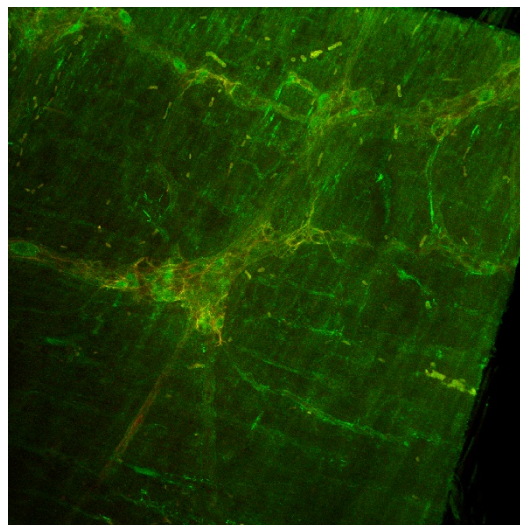
A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300µL/alça de PBS (painel A) ou dos sobrenadantes das cepas ATCC (painel B) ou NAP 1 (painel C) ou ICC 45 (painel D). A imunofluorescência foi realizada no preparado de membrana, expondo o plexo mioentérico imunomarcado com os fluoróforos: alexia flúor 488 e 594 para GFAP e ChAT, respectivamente. (aumento da imagem 20x).

Figura 12 – Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios CALR no plexo mioentérico.

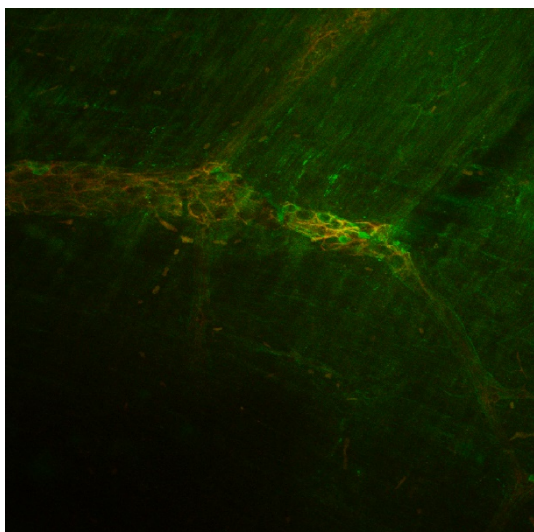
PBS



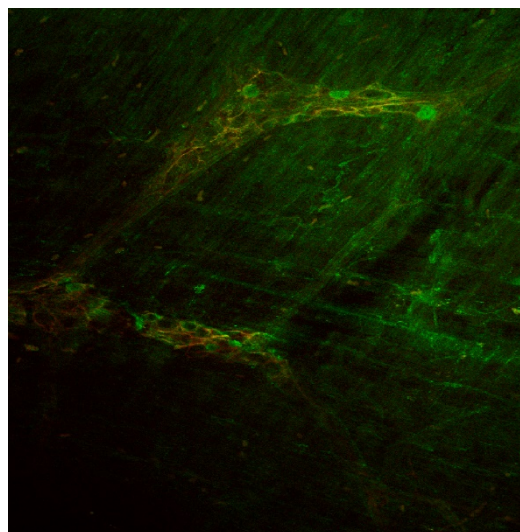
ATCC



NAP



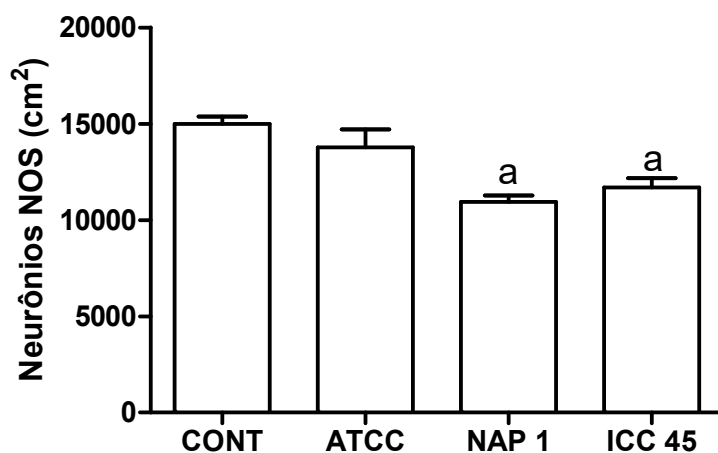
ICC



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300 μ L/alça de PBS (painel A) ou dos sobrenadantes das cepas ATCC (painel B) ou NAP1 (painel C) ou ICC 01 (painel D). A imunofluorescência foi realizada no preparado de membrana, expondo o plexo mioentérico imunomarcado com os fluoróforos: alexia flúor 488 e 594 para CALR e GFAP, respectivamente. (aumento da imagem 20x).

A densidade neuronal (número de neurônios por cm²), após a realização da técnica de imunofluorescência, visualização e contagem através de microscopia confocal apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) nos neurônios imunorreativos a NOS (figura 13) no plexo mioentérico dos animais tratados com os sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 (10949 \pm 333,4 neurônios/cm²) e ICC 01 (11686 \pm 486,4 neurônios/cm²), quando comparados aos grupo ATCC (13768 \pm 939,5 neurônios/cm²) ou PBS (14990 \pm 392,2 neurônios/cm²).

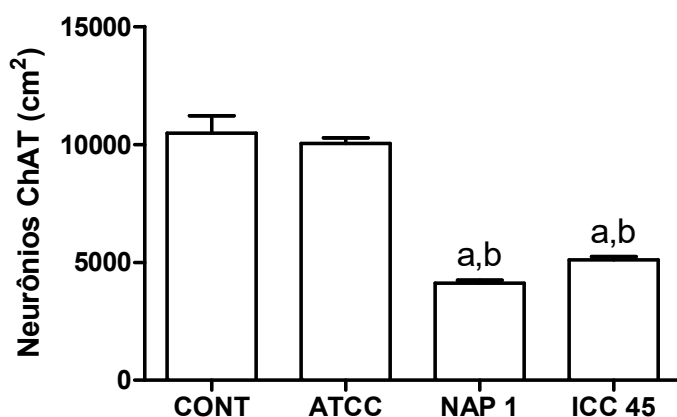
Figura 13 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios NOS no plexo mioentérico.



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300µL/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm²), sendo contado 20 campos de cada grupo. ^a p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS. ANOVA, seguido do teste de Bonferroni

Esse resultado é semelhante ao que observamos na população de neurônios ChAT no plexo mioentérico dos animais com enterite induzida pelos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênica ATCC, bem como PBS. Nos neurônios imunorreativos a ChAT (figura 14), observou-se uma redução significativa (P<0,05) nos grupos com enterite induzida por NAP1 (4124 ± 115,7 neurônios/cm²) ou ICC 01 (5111 ± 128,0 neurônios/cm²), em relação aos grupos da cepa não toxigênica ATCC (10042 ± 237,9 neurônios/cm²) ou PBS (10482 ± 733,8 neurônios/cm²).

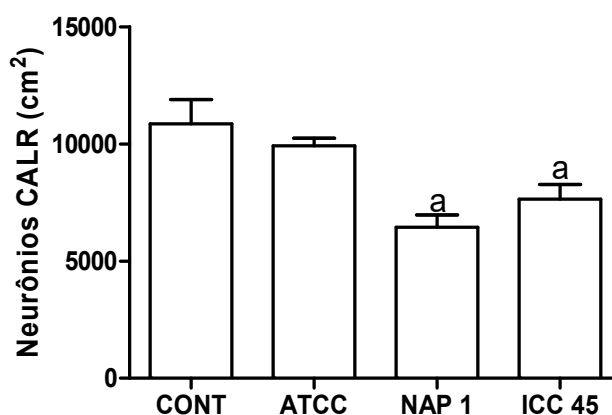
Figura 14 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP 1 e ICC 45, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios ChAT no plexo mioentérico.



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300 μ L/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm²), sendo contados 20 campos de cada grupo. a $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS e b $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC). ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Na marcação para os neurônios imunorreativos a CALR (figura 15), e corroborando com os dados anteriores citados, observou-se novamente uma diminuição dos neurônios imunorreativos a CALR nos animais com enterite induzida pelos sobrenadantes das cepas NAP1 (6444 \pm 522,4 neurônios/cm²) e ICC 01 (7643 \pm 624,1 neurônios/cm²), quando comparado com os animais induzidos com ATCC (9925 \pm 324,5 neurônios/cm²) ou PBS (10852 \pm 1045 neurônios/cm²).

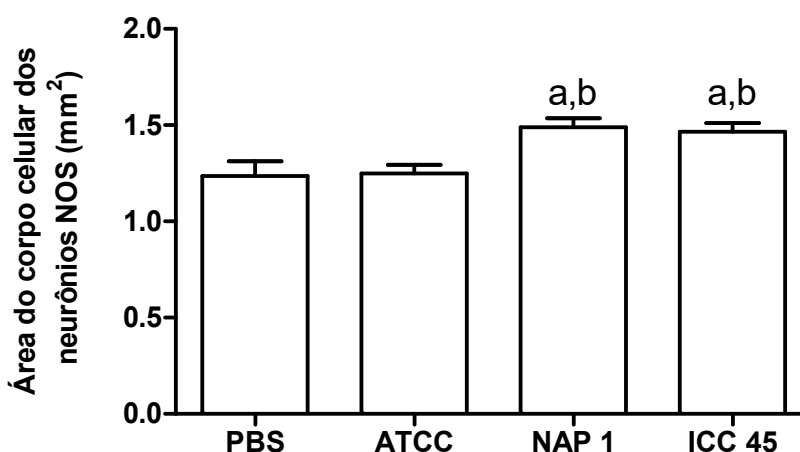
Figura 15 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a população de neurônios Calretinina (CALR) no plexo mioentérico.



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300 μ L/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm²), sendo contados 20 campos de cada grupo. ^a p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS e ^b p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC). ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Corroborando com esses dados citados anteriormente, é possível observar um aumento significativo no tamanho do corpo celular dos neurônios (área em mm²) nos mesmos grupos onde ocorreram uma maior depleção neuronal. Nos grupos com enterite induzida pelos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 ou ICC 01, observamos um aumento no corpo celular dos neurônios NOS e ChAT, quando comparados com os grupos PBS ou ATCC (cepa não toxigênica do *c. difficile*). Por planimetria podemos observar, avaliando a área do corpo neuronal dos neurônios imunorreativos à NOS (figura 17) um aumento significativo (p<0,05) nos grupos NAP1 (1,489 \pm 0,07 mm²) e ICC 01 (1,466 \pm 0,04 mm²), quando comparados aos grupos PBS (1,235 \pm 0,07 mm²) ou ATCC (1,250 \pm 0,05 mm²).

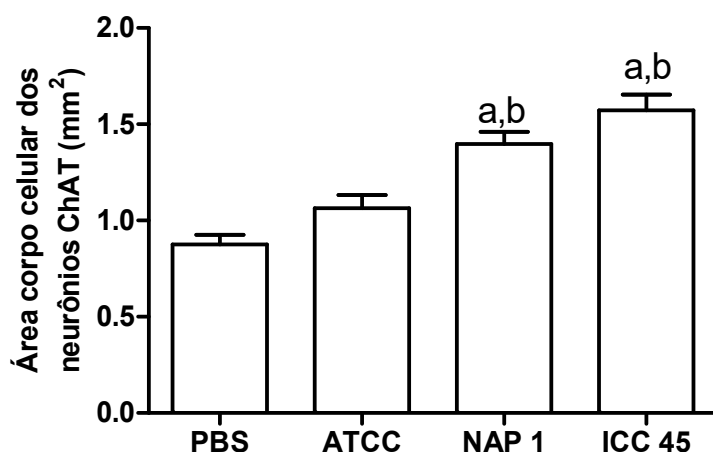
FIGURA 17 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a área de neurônios NOS no plexo mioentérico.



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300µL/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico da área neuronal em mm², sendo contados 100 neurônios de cada grupo. ^a p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS e ^b p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC). ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Para neurônios imunorreativos à ChAT (figura 18) observamos aumento (p<0,05) da área em NAP1 (1,398 ± 0,06 mm²) e ICC 01 (1,572 ± 0,08 mm²), ao se comparar aos grupos PBS (0,8764 ± 0,04 mm²) ou ATCC (1,064 ± 0,06 mm²).

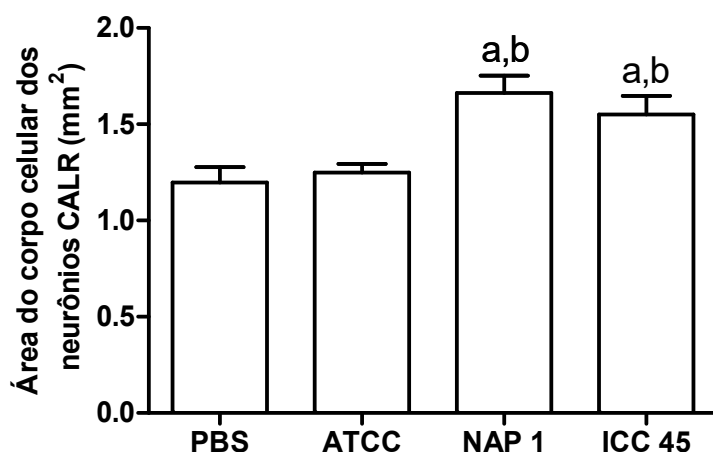
FIGURA 18 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a área de neurônios ChAT no plexo mioentérico.



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300µL/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico da área neuronal em mm², sendo contados 100 neurônios de cada grupo. ^a p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS e ^b p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC). ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Seguindo o mesmo processo de avaliação para neurônios CALR (figura 19), foi verificado um aumento significativo (p<0,05) do corpo celular neuronal nos animais com enterite induzidas por NAP1 (1,662 ± 0,09 mm²) e ICC 01 (1,552 ± 0,09 mm²), quando comparado aos grupos PBS (1,197 ± 0,08 mm²) ou ATCC (1,250 ± 0,04 mm²). Em todas as análises de área neuronal citadas anteriormente, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos PBS e ATCC.

FIGURA 19 - Efeito dos sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01, cepa não toxigênicas ATCC, bem como PBS sobre a área de neurônios CALR no plexo mioentérico.



A alça ileal dos camundongos foi injetada com 300µL/alça de PBS ou dos sobrenadantes das cepas ATCC ou NAP1 ou ICC 01. Gráfico da área neuronal em mm², sendo contados 100 neurônios de cada grupo. ^a p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS e ^b p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ATCC). ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Portanto, ao se fazer uma análise geral dos neurônios imunorreativos aos códigos químicos ChAT, NOS e CALR, mostrou-se uma redução tanto na imunofluorescência, bem como na quantidade de neurônios no plexo mioentérico dos animais com enterite induzida pelas cepas toxigênicas de *c. difficile* estudadas.

Essa depleção pode ser constatada pelo processo de morte celular observado através de um aumento significativo no tamanho do corpo celular neuronal, levando a uma diminuição importante da população de neurônios excitatórios e inibitórios no plexo mioentérico. Importante destacar que nesse processo ocorre um aumento na população de células gliais, bem como o processo de vacuolização e aumento do tamanho do gânglio mioentérico. Todos esses eventos citados no modelo de enterite induzido por diferentes cepas de *c. difficile* levam a prejuízos importantes na atividade do SNE.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, buscamos comparar as alterações na população de neurônios e células da glia, bem como dos códigos químicos específicos no plexo

mioentérico de animais com enterite experimental induzida pela virulência de diferentes cepas de *C. difficile* (ICC 01, NAP1 e ATCC), modelo este, bem aceito na literatura mundial e utilizado extensivamente pelo nosso grupo de pesquisa (CAVALCANTI et al., 2006).

Os sintomas de infecção do CD são amplos, incluindo desde quadros leves, com alguns episódios de diarreia sem febre, até quadros graves, com toxemia importante (TRINN C, PRABHAKAR K.,2007). O quadro típico é de diarreia aquosa com vários episódios durante o dia, que melhora após evacuação, febre baixa e leucocitose (TRINN C, PRABHAKAR K.,2007). As complicações incluem hipoalbuminemia, desidratação e desnutrição (TRINN C, PRABHAKAR K.,2007). Os casos mais graves coincidem com diminuição da diarreia pela atonia e afinamento da mucosa intestinal, caracterizado pelo megacólon tóxico, que pode evoluir para perfuração (TRINN C, PRABHAKAR K.,2007).

No modelo de enterite induzido pelos sobrenadantes das diferentes cepas de *C. difficile* foi observado alterações macroscópicas importantes nas alças ileais dos camundongos (COSTA, CL et al.,2016). Segundo Costa e colaboradores 2016, notou-se que os sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP1 e ICC 01 mostram alças ileais mais escuras sugerindo hemorragia e necrose no seu interior, corroborando com nossos resultados.

Avaliando macroscopicamente, inicialmente buscamos uma relação entre o peso e comprimento da alça ileal e observamos que os grupos NAP1 e ICC 01 apresentaram essa relação mais elevada quando comparados com os outros grupos PBS e ATCC (cepa não toxigenica), sugerindo assim uma atividade secretóra ou edematosa mais acentuada, resultados estes que vão de encontro com os achados de Costa e colaboradores,2016.

A análise histopatológica dos fragmentos ileais dos animais tratados com sobrenadantes de cepas toxigênicas (NAP1 ou ICC 01), revelaram a presença de sinais inflamatórios mais acentuados quando comparados com o grupo PBS ou ATCC (cepa não toxigênica). A descamação epitelial, edema, hemorragia, bem como infiltração leucocitária foram achados importantes nos grupos NAP 1 e ICC 01, quando comparados com o grupo PBS ou ATCC. Leite e colaboradores (2016) demonstraram alterações histopatológicas em modelo de enterite induzidas pelo

sobrenadantes das cepas NAP 1 e ICC 01, bem como de outras estudadas, corroborando com os resultados acima citados. Segundo a literatura, trabalhos demonstraram que nas doenças inflamatórias intestinais (DII), a infiltração de células inflamatórias na mucosa do cólon é uma característica importante.

A infiltração maciça de neutrófilos é necessária para conter a disseminação da infecção, todavia, pode exacerbar a colite e retardar a recuperação tecidual (HASEGAWA et al., 2011). De acordo com Leite e colaboradores (2016), as cepas NAP1 e ICC 01 apresentaram um aumento na atividade de MPO tecidual, sugerindo uma maior infiltração neutrofílica. Hasegawa et al. (2011) mostrou que o *C. difficile* é reconhecido pelo receptor imune inato de ligação de nucleótidos de domínio de oligomerização-1 (NOD-1), que ativa a produção da CXCL1 (uma quimiocina para neutrófilo) presente nos camundongos, e que contribui para o recrutamento de neutrófilos para a lamina própria durante o desenvolvimento da CDI.

As cepas toxigênicas e não toxigênicas de *C. difficile* induziam a secreção de CXCL1, indicando que sua secreção era independente de TcdA (toxina A) e TcdB (toxina B). Esses dados sugerem que no nosso modelo é possível que o CXCL1 esteja envolvido com o aumento do infiltrado de células inflamatórias, diagnosticado nas lâminas histológicas, presentes nos grupos com enterite induzida por NAP 1 e ICC 01.

Sabe-se que os enterócitos, cerca de 2-3 horas após início da infecção, regula um programa de genes do hospedeiro cujos produtos ativam as respostas inflamatórias e imunológicas incluindo a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas da mucosa alterando as funções epiteliais (ECKMANN et al., 1997). Brito et al. (2002) mostraram, *in vitro*, que enterócitos humanos produzem grande quantidade de TNF- α frente ao estímulo da TcdA. Segundo LEITE (2016) os grupos NAP1, ICC 01 e ICC 45, produziram significativamente mais TNF- α e IL-1 β que os demais grupos experimentais (LEITE et al., 2016).

Esses resultados são compatíveis com estudos anteriores que mostram uma superprodução dessa citocinas a partir da exposição tecidual à TcdA e TcdB, *in vitro* (BRITO et al., 2002; JEFFREY et al., 2010, CHUMBLER et al., 2012) e em modelos de alça ileal em camundongos frente as duas toxinas TcdA e TcdB, *in vivo* ((ISHUIDA et al., 2002; KELLY; KYNE, 2011). TNF- α induz, ao menos, cinco tipos de sinais que incluem ativação do NF κ B, indução da apoptose celular, estimulação da quinase extracelular regulada por sinal (ERK), da p38 ativada por proteína quinase

(p38MAPK) e quinase c-Jun N – terminal (JNK) (HSU *et al.*, 1996). De forma alternativa, o TNF- α pode ativar as mitocôndrias promovendo a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), citocromo C e Bax que induzem a ativação da caspase-9, o qual estimula a atividade da caspase efetora 3 induzindo, conseqüentemente, a apoptose. De maneira contrária, o TNF- α pode ativar o NF- κ B, que por sua vez regula a expressão de proteínas destinadas a sobrevivência celular (AGGARWAL, 2004).

É descrito na literatura que a IL-1 β é indutora da febre sistematicamente e pode levar a destruição tecidual local. Além disso, essa citocina também está relacionada com o recrutamento de neutrófilos, estímulo da síntese de IL-6 e MCP-1, e ainda mantém, por um tempo maior, a resposta inflamatória primária tendo participação na imunidade adaptativa, aumentando a taxa de diferenciação das células T CD4+ em células TH17 que estão envolvidas na depuração bacteriana *in vitro* e em humanos (COLLINS *et al.*, 2014). O aumento da infiltração leucocitária verificado nesse trabalho nos grupos NAP 1 e ICC 01 também pode ter sido influenciado pelo aumento da expressão de IL-1 β , como já demonstrado por LEITE e colaboradores, através de ELISA uma maior concentração de IL-1 β nos grupos NAP1 e ICC 01.

Estudo realizado por Brito e colaboradores (2016) mostrou que em camundongos durante o processo de envelhecimento ocorrem grandes perdas dos neurônios do SNE, havendo um possível envolvimento da regulação da função gastrointestinal, além das alterações nas junções íleo-cecais, onde ocorrem também nos padrões das fibras colágenas, levando a distúrbios intestinais como a diminuição da motilidade. Dentro das doenças intestinais, a diverticulite, uma inflamação dos divertículos (bolsas) presentes no intestino grosso com sintomatologias importantes de dor abdominal, náuseas, vômitos, febre e alterações de motilidade levando a prisão de ventre ou diarreia, revelou uma diminuição significativa da densidade neuronal, bem como das células gliais no plexo submucoso e mioentérico no SNE (WEDEL *et al.*, 2010).

De acordo com uma conferência sobre distúrbios de inervação do cólon, os presentes achados se assemelham a características histopatológicas típicas da hipoganglionose oligo-neuronal. Em contraste com a aganglionose intestinal caracterizada por uma completa ausência de neurônios intramurais, a hipoganglionose oligo-neuronal é definida por uma diminuição numérica significativa

de neurónios entéricos e tem sido descrita anteriormente em vários transtornos de motilidade intestinal, tais como em constipação de trânsito, Megacolon em adultos, pseudo-obstrução intestinal crônica e constipação crônica em crianças. Esses estudos sugerem uma diminuição importante, levando a alterações fisiológicas críticas capazes de comprometer as atividades adequadas do sistema nervoso entérico (WEDEL et al., 2010).

Um estudo demonstrou que a desnervação extrínseca, ou seja, a ausência de uma parte do SNE diminui as alterações morfológicas (MANTYH, MCVEY & VIGNA; 2000) e os danos inflamatórios (LIMA *et al.*, 2008), induzidos pela TcdA. É possível observar no experimento de contratilidade um aumento transitório da motilidade para em seguida reduzir ou mesmo extinguir a motilidade espontânea, podendo estar relacionado a morte neuronal que foi observado no presente estudo. De maneira contrária, o TNF- α pode ativar o NF- κ B, que por sua vez regula a expressão de proteínas destinadas a sobrevivência celular (AGGARWAL, 2004).

Esta informação é relevante pois a enterite induzida pelo sobrenadante das cepas virulentas do *C.difficile* leva a uma redução de neurónios entéricos e das células da glia, como foi demonstrado neste estudo, além de alterar as junções oclusivas das células epiteliais pela desorganização no citoesqueleto (SANTOS *et al.*, 2013).

A colite ulcerativa (UC) é uma doença inflamatória intestinal com alterações da motilidade colônica, com possíveis alterações morfofuncionais no sistema nervoso entérico. Segundo Bernardini e colaboradores (2012) em pacientes com UC é possível observar um processo de vacuolização ganglionar do plexo mioentérico acompanhado do aumento do tamanho do gânglio e redução da população neuronal e das células gliais. Segundo Yan Robert, 2015, as anormalidades são transmurais e penetram todas as quatro túnicas da parede do órgão na Doença de Chron(DC).

Afirmam quanto às alterações histológicas, a formação de edema, a redução de células produtoras de muco, a hiperplasia das criptas intestinais, as erosões, as ulcerações profundas, granulomas, proeminentes agregados linfoides e vasos linfáticos dilatados na túnica submucosa (YAN ROBERT.,2015). A arquitetura dos plexos submucosos e mioentérico também é afetada, esboça uma rede de fibras irregulares com tamanho variável, além das hipertrofias dos corpos celulares neuronais e células gliais entéricas presentes na DC (YAN ROBERT.,2015).

Esse mesmo padrão de organização foram observados nos gânglios do plexo mioentérico em nossos experimentos. Ao realizar-se uma coloração de HE, observou-se um aumento significativo do tamanho dos gânglios do plexo mioentérico dos grupos tratados com os sobrenadantes das cepas NAP1 e ICC 01, mostrando um processo de vacuolização importante, aumento no diâmetro dos neurônios e depleção neuronal, quando comparadas com as amostras PBS ou ATCC (cepa não toxigênica).

A partir desses dados procurou-se entender as possíveis alterações no plexo mioentérico de camundongos com enterite induzida por diferentes sobrenadantes das cepas toxigênicas NAP 1 e ICC 01, cepa não toxigênica ATCC, bem como PBS. Através de uma análise qualitativa e quantitativa, observamos uma diminuição da densidade dos neurônios imunorreativos a NOS, ChAT e CALR nos grupos com enterite induzidas pela NAP 1 ou ICC 01, quando comparado aos grupos PBS ou ATCC. Resultados semelhantes foram encontrado no modelo de colite ulcerativa (SILVA *et al.*, 2015) e no modelo de isquemia e reperfusão (PALOMBIT *et al.*, 2013), onde há uma redução significativa desses tipos de neurônios. Os neurônios imunorreativos NOS têm um importante papel na função motora inibitória do intestino, pois o óxido nítrico é o maior mediador do relaxamento do músculo liso não adrenérgico e não colinérgico (AIMI *et al.*, 1993).

Os neurônios imunorreativos NOS têm um importante papel na função motora inibitória do intestino, pois o óxido nítrico é o maior mediador do relaxamento do músculo liso não adrenérgico e não colinérgico (AIMI *et al.*, 1993). A marcação para Os ChAT é expressa em neurônios motores excitatórios, interneurônios e neurônios aferentes intrínsecos (PHILLIPS; KIEFFER; ILLES, 2006), e Calr, que é uma proteína ligada ao Ca^{2+} envolvida processo de sinalização do mesmo e está presente nos neurônios coligênicos excitatórios (BAIMBRIDGE; CELIO; ROGERS, 1992).

A marcação para os neurônios imunorreativos à ChAT é expressa em neurônios motores excitatórios, interneurônios e neurônios aferentes intrínsecos (PHILLIPS; KIEFFER; ILLES, 2006), e CALR que é uma proteína ligada ao Ca^{2+} envolvida no processo de sinalização do mesmo está presente nos neurônios colinérgicos excitatórios (BAIMBRIDGE; CELIO; ROGERS, 1992). Neste trabalho observa-se uma redução significativa de neurônios positivos para ChAT e para CALR nos grupos NAP 1 e ICC 01, corroborando com o descrito por Palombit e

colaboradores (2013) e Silva e colaboradores (2015). Porém esses achados diferem dos dados relatados no modelo de desnutrição, no qual houve um aumento da densidade neuronal de todos os códigos neuroquímicos testados neste trabalho (GIROTTI et al., 2013). Corroborando com nossos dados, Santos e colaboradores(2017), mostraram em seus resultados que a TcdA isolada do *C.difficile* (cepa virulenta) promoveu também uma diminuição dos neurônios ChAT e CALR. Por conta da diminuição dos neurônios imunorreativos ChAT e CALR, que marcam neurônios motores excitatórios, infere-se que os sobrenadantes das cepas virulentas alteram a motilidade intestinal promovendo a paralisia desta musculatura (SANTOS et al.,2017).

Portanto a diarreia segundo, (BLOSSOM; MACDONALD, 2007; DIAL et al., 2005; KEEL et al., 2007), característica da patologia, provavelmente seria de origem inflamatória e resultado de destruição de mucosa podendo estar relacionada também ao aumento transitório da motilidade que foi descrito por Lima e colaboradores (2008), seguida de dismotilidade que é comum em modelos de colite (ROBERTS et al., 2012). Essa perda da motilidade parece estar associada com a destruição tecidual, ao processo inflamatório instalado, como descrito anteriormente, mas também as alterações do SNE não só no modelo estudado de enterite induzido por cepas virulentas do *C. difficile*, mas também em DII (ROBERTS et al., 2012). Diante dos resultados apresentados, o plexo mioentérico se mostra alterado pelo processo de vacuolização ganglionar e depleção neuronal com diminuição significativa dos neurônios motores excitatórios, ChAT e CALR, e consequente perda da motilidade intestinal.

O histologista russo Alexander Stanislavich Dogiel (1852-1922), classificou, à época, os neurônios entéricos por critérios morfológicos: neurônios Dogiel tipo I e Dogiel tipo II, o primeiro possui corpos celulares pequenos (entre 13 e 35mm de comprimento e 9-22mm de largura) com múltiplos e curtos dendritos e com um axônio, e o segundo possui corpos celulares grandes (apresentam diâmetro máximo de 22 a 47mm e diâmetro mínimo de 13 a 22mm) com um ou dois longos processos (FURNESS. J. B.,2006).

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados,

acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a à morte por apoptose ou necrose (HALLIWELL, B.,2001).

A dinâmica morfofuncional dos neurônios entéricos não cessa, mesmo em condições de saúde. O envelhecimento, enquanto processo fisiológico, é responsável por um grau considerável de redução numérica e reorganização dos neurônios entéricos. Até certo ponto. Isso resulta simplesmente de uma eliminação de neurônios redundantes e uma redistribuição de tarefas entre os neurônios remanescentes. Porém, esta também relacionado a diversas anomalias gastrointestinais comuns em indivíduos senis. Dados morfológicos e quantitativos dos neurônios entéricos relativos ao envelhecimento em animais e humanos são encontrados na literatura (Santer & BAKER,1988; GABELLA,1989;DE SOUZA ET AL.,1993; MECIANO FILHO ET AL.,1998).

Em relação a morfometria, verificou-se um aumento na área dos neurônios marcados positivamente para ChAT e NOS, podendo estar relacionado ao aumento do influxo Ca^{2+} intracelular, levando a produção de óxido nítrico e a morte celular pelo processo de necrose, onde se percebe o entumescimento celular (DONG et al., 2006). Estes resultados diferem do efeito da TcdA nas células epiteliais intestinais, no qual observa-se a redução da área celular devido ao colapso do citoesqueleto (SANTOS et al., 2013) mas concordam com Genth e colaboradores (2008), no qual afirmam que a morte celular por necrose pode ser mais relevante que a apoptose na DACD. Acredita-se que a Calr está envolvida na regulação do Ca^{2+} intracelular, por isso os neurônios reativos a esta proteína não sofreram alterações na área neuronal. (GIROTTI et al., 2013; PALOMBIT et al., 2013; SILVA et al.,2015).

A glia entérica é um relevante componente do SNE, estando ativamente envolvida no controle da motilidade, barreira epitelial, além de atuar como ponte celular e molecular entre os nervos entéricos, células enteroendócrinas, células do sistema imunológico e células epiteliais, dependendo da localização (SHARKEY, 2015). As células da glia entérica (CGE) se encontram distribuídas no SNE, no plexo mioentérico e submucoso, e abaixo do epitélio, muito próximo a borda epitelial, ao longo da mucosa intestinal e na camada muscular (GULBRASEN; SHARKEY, 2012; SAVIDGE *et al.*, 2007). Essas células expressam marcadores como: S100 β e a GFAP (BOESMAN *et al.*, 2014). No modelo utilizado por nosso grupo de pesquisa, Santos e colaboradores demonstraram no modelo de enterite induzido por TcdA do *C. difficile* um aumento na imunomarcagem positiva para S100 β e a GFAP, quando

comparado ao grupo controle. Nossos dados utilizando o sobrenadante das cepas NAP1 ou ICC 01 a população de células GFAP positivas se mostraram elevadas quando comparadas com PBS ou a cepa não virulenta (ATCC). Esse aumento de GFAP, corrobora com os dados encontrados por Von Boyen e colaboradores (2011) que mostraram níveis elevados de GFAP na mucosa intestinal de pacientes com colite ulcerativa inflamada e na colite infecciosa por *C.difficile* em comparação a pacientes controle e portadores de colite ulcerativa não inflamada. Costa *et al.* (2016) relatou o aumento dos níveis de GFAP em animais, onde foi induzida a mucosite por 5-FU. Em contrapartida, Cornet e colaboradores (2001) revelou que o GFAP está reduzido em pacientes com Doença de Chron não inflamados. A proteína S100 β é especificamente expressa pelas CGE, sendo uma proteína que em baixas concentrações, nanomolares, regula a homeostase microambiental e em concentrações maiores, micromolares, relaciona-se com o processo patológico inflamatório através da ativação de MAP quinase e fator de ativação nuclear- κ B (NF- κ B), levando à transcrição de diferentes citocinas (OCHOA-CORTES *et al.*, 2016; RÜHL, 2005).

A expressão da mesma está aumentada nos processos inflamatórios, em resposta aos primeiros sinais de destruição da barreira epitelial intestinal, ocorrendo também em pacientes celíacos, sugerindo que essa regulação positiva faz com que a CGE participe diretamente da inflamação (CIRILLO *et al.*, 2009). Esse aumento do S100 β ratifica os dados encontrados nesta pesquisa, levando a conjectura de que as CGE assumem um fenótipo reativo, aumentando a sua proliferação, a expressão de proteínas gliais, alteração de funções e a expressão de fatores neurotróficos, atuando na patogênese da DACD (COELHO-AGUIAR *et al.*, 2015; VON BOYEN *et al.*, 2011).

Segundo Neunlist e colaboradores (2007), as CGEs secretam TGF- β 1 afetando negativamente a proliferação das células epiteliais, sendo esta via também ativada pela TcdA, como mostrado em Veras (2015), enfatizando o papel do fenótipo reativo das CGE na patogênese da DACD, pois a TcdA também eleva a concentração de citocinas, além de ativar a imunidade inata, através dos receptores TLR-4, NOD1 e Il-1 β (SMITS *et al.*, 2016). Apesar das funções desta proteína ainda não serem claras, a sua quantidade se relaciona com o estado funcional da CGE (BRAUDY *et al.*, 2012).

7.CONCLUSÃO

Concluimos que existe um aumento significativo do tamanho dos gânglios do plexo mioentérico, assim como um processo de vacuolização importante, aumento no diâmetro dos neurônios e depleção neuronal, dos grupos tratados com os sobrenadantes das cepas NAP1 e ICC 01, quando comparadas com as amostras PBS ou ATCC (cepa não toxigênica).

Diminuição da densidade dos neurônios imunorreativos a NOS, ChAT e CALR nos grupos com enterite induzidas pela NAP 1 ou ICC 01, quando comparado aos grupos PBS ou ATCC.

Por conta da diminuição dos neurônios imunorreativos ChAT e CALR, que marcam neurônios motores excitatórios, infere-se que os sobrenadantes das cepas virulentas alteram a motilidade intestinal promovendo a paralisia desta musculatura e consequente perda da motilidade intestinal

Nossos dados utilizando o sobrenadante das cepas NAP1 ou ICC 01 a população de células GFAP positivas se mostraram elevadas quando comparadas com PBS ou a cepa não virulenta (ATCC), expressando aumento no processo inflamatório em resposta aos primeiros sinais de destruição da barreira epitelial intestinal.

REFERÊNCIAS

AIMI, Y; KIMURA, H; KINOSHITA, T; MINAMI, Y; FUJIMURA, M; VINCENT, SR. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. **Neuroscience**. v.53, n.2, p.553-60. 1993.

ALCANTARA, C. S., JIN, X., BRITO G.A.C., CARNEIRO-FILHO B.A., BARRET L.A., CAREY R.M., GUERRANT R.L. (2005). Angiotensin II subtype 1 receptor blockade inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal secretion in a rabbit model. **The Journal of infectious diseases** 191, 2090-2096.

ANTUNES, E.N., FERREIRA, E.O., VALLIM, D.C., PAULA, G.R., SELDIN, L., SABRÁ, A., FERREIRA, M.C.S., DOMINGUES, M.C.P. (2002) Pattern III non-toxicogenic *Bacteroides fragilis* (NTBF) strain in Brazil. **Anaerobe** 8: 17-22.

AGGARWAL, B.B. Nuclear factor-kappa B: the enemy within. **Cancer Cell**. v. 6, n. 3, p. 203-208, 2004.

ARGENZIO, R.A. Pathophysiology of diarrhea. In: ANDERSON, N.V. Veterinary gastroenterology. **Philadelphia: Lea & Febiger**, 1992. Cap.10, p.163-172.

ARNALDO JOSÉ GANC , RICARDO LEITE GANC , SÍLVIA MANSUR REIMÃO , ALBERTO FRISOLI JUNIOR , JACYR PASTERNAK. Transplante de microbiota fecal por enteroscopia alta para o tratamento da diarreia causada por *Clostridium difficile*. **Einstein**. 2015;13(2):338-9

BAIMBRIDGE, KG; CELIO, MR; ROGERS, JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends Neurosci**.v.15, p.303–308. 1992.

BALASSIANO, I.T., SANTOS-FILHO, J., VITAL-BRAZIL, J.M., NOUER, S.A., SOUZA C.R.C., BRAZIER J.S., FERREIRA E.O. et al. (2011). Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek** 99, 249-255.

BARRETO, AR; CAVALCANTE, IC; CASTRO, MV; JUNQUEIRA, AF; VALE, MR; RIBEIRO, RA; SOUZA, MH; BRITO, GA. Funcoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A- induced ileal enteritis in mice. **Dig. Dis. Sci.** v. 53, n.4, p. 990-6, 2008.

BASSOTTI G, VILLANACCI V, MAURER CA et al. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. **Gut** 2006; 55: 41–6.

BERKES, J. et al. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. **Gut**, v.52, p.439-451, 2003.

BLOSSOM, DB; MCDONALD, LC. The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection. **Emer infec.** v.45, p.222-227. 2007.

BOESMANS, W; ROCHA, NP; REIS, HJ; et al. The astrocyte marker Aldh1L1 does not reliably label enteric glial cells. **Neurosci Lett.**v.566, p.102–105. 2014.

BRITO, G.A.C.; SULLIVAN, G.W.; CIESLA JR, W.P.; CARPER, H.T.; MANDELL, G.L.; GUERRANT, R.L. Clostridium difficile Toxin A Alters In Vitro-Adherent Neutrophil Morphology and Function. **J Infect Dis.** V. 185, N. 9, P. 1297-1306, 2002a. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/185/9/1297.full>.

BRITO, G.A.; FUJJI, J.; CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, A.A.; OBRIG, T.; GUERRANT, R.L. Mechanism of Clostridium difficile toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **J Infect Dis.** v. 186, n. 10, p. 1438-1447, 2002b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12404159>>.

BRITO, GA; ORIÁ, RB; LIMA, AA; GUERRANT, RL; CARNEIRO-FILHO, B; DESTURA, RV. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig. Dis. Sci.** v.50, n.7, p. 1271-1278. 2005.

BRITO, MC; GHOPARD, RP; CURY, DP; WATANABE,IS; MENDES, CE; CASTELUCCI, P. Effects of aging on the architecture of the ileocecal junction in rats. **World J Gastrointest Pharmacol Ther.** v.7, n.3, p.416-427.2016.

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. PMID:7751962

BROOKES, S. J. H. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **The Anat. Rec.**, v. 262, p. 58-70, 2001. doi:10.1002/1097-0185(20010101)262:1<58::AIDAR1011>3.0.CO;2-V PMID: 11146429

CARNEIRO-FILHO, BA; FUJJI, J; BRITO, GA; ALCANTARA, C; ORIÁ, RB; LIMA, AA; OBRIG, T; GUERRANT, RL. Caspase and bid involvement in *Clostridium difficile* toxin A - induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and vitro. **Infect. Immun.** v.74, n.1, p. 81-87. 2006.

CASTAGLIUOLO, I. et al. Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholera* enterotoxin in rat ileum. **Gastroenterology**, v.107, p.657-665, 1994.

CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; DE ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre-and postanal protein deprivation and postanal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Res.**, v. 310, p. 1-7, 2002a. doi:10.1007/s00441-002-0615-y PMID:12242478

CASTELUCCI P, DE SOUZA RR, DE ANGELIS RC, FURNESS JB, LIBERTI EA (2002b) Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal re-feeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Res** 310:1–7. doi:10.1007/s00441-002-0615y

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; POOLE D. P.; FURNESS J. B. The distribution of purine P2X2 receptors in the guinea-pig enteric nervous system. **Histochem. Cell Biol.**, v. 117, p. 415-422, 2002b. doi:10.1007/s00418-002-0404-4 PMID:12029488

CAVALCANTE, I.C.; CASTRO, M.V.; BARRETO, A.R.; SULLIVAN, G.W.; VALE, M.; ALMEIDA, P.R.; LINDEN, J.; RIEGER, J.M.; CUNHA, F.Q.; GUERRANT, R.L.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A. Effect os novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on *Clostridium difficile* toxin A-induced murine ileal enteritis. **Infect Immun.** v. 74, n. 5, p. 2606-2612, 2006.

CHAVES-OLARTE, E.; WEIDMANN, M.; VON EICHEL-STREIBER, C.; THELESTAM, M. (1997). Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. **The Journal of clinical investigation**,100,1734-1741.

CHAVES-OLARTE E, LOW P, NORLIN T, FREER E, EICHEL-STREIBER CV, THELESTAM M. (1999). A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. **Journal of Biological Chemistry**, 274, 11046-11052.

CHUMBLER, N.M.; FARROW, M.A.; LAPIERRE, L.A.; FRANKLIN, J.L.; HASLAM, D.B.; GOLDENRING, J.R.; LACY, D.B. *Clostridium difficile* Toxin B Causes Epithelial Cell Necrosis through an Autoprocessing-Independent Mechanism. **Plos Pathog.** v. 8, n. 12, p. 112, 2012.

CIRILLO, C; SARNELLI, G; ESPOSITO, G; GROSSO, M; PETRUZZELLI, R; IZZO, P; CALÌ, G; D'ARMIENTO, FP; ROCCO, A; NARDONE, G; IUVONE, T; STEARDO, L; CUOMO, R. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. **Neurogastroenterol Motil.** v.21, n.11, p.1209-e112. 2009.

CIRILLO, C; SARNELLI, G; ESPOSITO, G; TURCO, F; STEARDO, L; CUOMO, R. S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. **World J Gastroenterol.** v.17, n.10. p.1261-6. 2011.

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

COLLINS, L.E.; LYNCH, M.; MARSZALOWSKA, I.; KRISTEK, M.; ROCHFORT, K.; O'CONNELL, M.; WINDLE, H.; KELLEHER, D.; LOSCHER, C.E. Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. **Microbes Infect.** p. 1-10, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645791400015X>>.

CORNET, A; SAVIDGE, TC; CABARROCAS, J; et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proc Natl Acad Sci USA.** v.98, p.13306–13311.2001.

COSTA, M.; BROOKES, S. J. H.; STEELE, P. A.; GIBBINS, I.; BURCHER, E.; KANDIAH, C. J. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 75, n. 3, p. 949-967, 1996. doi:10.1016/0306-4522(96)00275-8 PMID: 8951887.

COSTA, CL et al. A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. **Anaerobe.** v.40, p.76-84. 2016.

DALLAL, RM; HARBRECHT, BG; BOUJOUKAS, AJ; SIRIO, CA; FARKAS, LM; LEE, KK; SIMMONS, RL. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. **Ann Surg** 235: 363-372. 2002.

DE ARAUJO JUNQUEIRA, A.F., DIAS A.A.M., VALE M.L., SPILBORGHS G.M.G.T., BOSSA A.S., LIMA B.B., CARVAHLO A.F., GUERRANT R.L., RIBEIRO R.A., BRITO, G.A. (2011). Adenosine deaminase inhibition prevents *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. **Infection and immunity**, 79, 653-662.

DOGIEL, AS. U ¨ber den Bau der Ganglien in den Geflechtendes Darmesund der Gallenblase des Menschen und der Sa ¨ugestiere [German]. **Arch Anat Physiol Leypzig. Anat Abt Jg.** 1899;130–158.

DOLGIN, E. (2011). 'Game changer' antibiotic and others in works for superbug. **Nature medicine** 7, 1-10.

EISEMAN B, SILEN W, BASCOM GS, KAUVAR AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. **Surgery.** 1958;44(5):854-9.

ECKMANN, L.; STENSON, W.F.; SAVIDGE, T.C.; LOWE, D.C.; BARRETT, K.E.; FIERER, J.; SMITH, J.R.; KAGNOFF, M.F. Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. **J Clin Invest.** v. 100, n. 2, p. 296-309, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/928506>>.

FEKETY, R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. **Am J Gastroenterol.**v.92, p.739-50. 1997.

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

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 81, p. 87-96, 2000. doi:10.1016/S0165-1838(00)00127-2

FURNESS, J. B.; ALEX, G.; CLARK, M. J.; LAL, V. V. Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. **Anat. Rec.**, v. 272A, p. 475-483, 2003a.

FURNESS, J. B.; JONES, C.; NURGALI, K.; CLERC, N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Prog. Neurobiol.**, v. 72, p. 143-164, 2004. doi:10.1016/j.pneurobio.2003.12.004 PMID: 15063530

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

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

GABELLA G. Fine structure of the myenteric plexus in the guineapig ileum. **J Anat.** 1972;111:69–97.

GADEWAR, S. & FASANO, A. Current concepts in the evaluation, diagnosis and management of acute infectious diarrhea. **Curr. Opin. Pharmacol.** 5, 559–565, doi: 10.1016/j.coph.2005.08.002 (2005).

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

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

GERSHON MD, ROTHMAN TH. Enteric glia. **Glia.** 1991;4:195–204.

GERSHON, M. D. The second brain. **New York: HarperCollins Publishers Inc**, 1998.

GIROTTI, PA; MISAWA, R; PALOMBIT; K, MENDES, CE; BITTENCOURT, JC; CASTELUCCI, P. Differential effects of undernourishment on the differentiation and maturation of rat enteric neurons. **Cell Tissue Res.**v.353, p.367–380. 2013.

GONZÁLEZ-GARCÍA, N; GÓMEZ-PAVÓN, J; MARTÍNEZ-PORRAS, JL; Diagnóstico, tratamiento y control de la infección causada por *Clostridium difficile*. **Rev Esp Geriatr Gerontol.**40(5):310-9 2005.

GULBRANSEN, BD; SHARKEY, KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** v.9, p.625–632. 2012.

GUYTON, ARTHUR C. HALL, JOHN E. Tratado de Fisiología Médica. 9ª ed. **Guanabara Koogan.** 1997. Pgs. 717,718.

HALE SAYAN-OZACMAKA, VEYSEL HAKTAN OZACMAKA, INCI TURANA, FIGEN BARUT B E VOLKAN HANCI C. Pretreatment with remifentanil protects against the reduced-intestinal contractility related to the ischemia and reperfusion injury in rat. **Rev Bras Anesthesiol.** 2015;65(6):483---490

HANANI M, REICHENBACH A. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. **Cell Tissue Res.** 1994;278:153–160.

HASEGAWA, M.; YAMAZAKI, T.; KAMADA, N.; TAWARATSUMIDA, K.; KIM, Y.G.; NÚÑEZ, G.; INOHARA, N. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. **J Immunol.** v. 186, n. 8, p. 4872-4888, 2011.

HECHT G. et al. *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of culture human intestinal epithelial monolayers. **Journal Clinical Investigation**, v.82, p.1516-1524, 1988.

HOWARD ER, GARRETT JR, KIDD A. Constipation and congenital disorders of the myenteric plexus. **J R Soc Med** 1984; 77(Suppl. 3): 13–9.

HSU, H.; SHU, H.B.; PAN, M.G.; GOEDDEL, D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.

Cell. v. 84, n. 2, p. 299-308, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565075>>.

ISHIDA, Y.; MAEGAWA, T.; KONDO, T.; KIMURA, A.; IWAKURA, Y.; NAKAMURA, S.; MUKAIDA, N. Essential Involvement of IFN- γ in Clostridium difficile Toxin A-Induced Enteritis1. **J Immunol.** v. 172, n. 5, p. 3018-3025, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/172/5/3018.long>>.

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

JEFFREY, N.G.; HIROTA, S.A.; GROSS, O.; LI, Y.; ULKE-LEMEE, A.; POTENTIER, M.S.; SCHENCK, L.P.; VILAYSANE, A.; SEAMONE, M.E.; FENG, H.; ARMSTRONG, G.D.; TSCHOPP, J.; MACDONALD, J.A.; MURUVE, D.A.; BECK, P.L. Clostridium difficile Toxin–Induced Inflammation and Intestinal Injury Are Mediated by the Inflammasome. **Gastroenterology**. v. 139, n. 2, p. 542-552, 2010. Disponível : <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508510005512>>.

JONES, S.L.; BLIKSLAGER, A.T. Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.222-228, 2002.

KASSAM Z, LEE CH, YUAN Y, HUNT RH. Fecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection: systematic review and meta-analysis. **Am J Gastroenterol**. 2013;108(4):500-8. Review.

KELLY, T. W., PATRICK, M. R. & HILLMAN, K. M. Study of diarrhea in critically ill patients. **Crit. Care Med.** 11, 7–9 (1983).

KELLY, CP; LAMONT, JT; *Clostridium difficile* infection. **Annu Rev Med.** 49: 375-390. 1998.

KELLY, C.P.; KYNE, L. The host immune response to *Clostridium Difficile*. **Journal of Microbiology**. v. 60, n. 8, p. 1070-1079, 2011.

KELLY CP. Fecal microbiota transplantation--an old therapy comes of age. **N Eng J Med**. 2013;368(5):474-5.

KYNE, L., WARNY, M., QAMAR, A., KELLY, CP. (2000). Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. **N Engl J Med**. 342, 390-397.

LASSIANO, I.T.; DOS SANTOS-FILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J.M.; NOUÉR, S.A.; SOUZA, C.R.; BRAZIER, J.S.; FERREIRA, EDE, O.; DOMINGUES, R.M. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 99, n. 2, p. 249-255, 2011.

LENZ, G. Efeito da lesão com ácido caínico sobre a fosforilação e o imuno conteúdo da proteína glial fibrilar ácida em hipocampo de ratos. **Porto Alegre: UFRGS**, 1996.

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. doi:10.1007/s004410000260 PMID:11079716

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

LOO, V.G., BOURGAULT, A.M., POIRER, L., LAMOTHE, F., MICHAUD S., TURGEON, N. *et al.* (2011). Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. **N Engl J Med** 365, 1693-703.

MANTYH, CR; MCVEY, DC; VIGNA, SR. Extrinsic surgical denervation inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rats. **Neuroscience Letters**. v.292, p.95-98. 2000.

MCDONALD, L.C.; KILLGORE, G.E.; THOMPSON, A.; OWENS R.C.; KAZAKOVA,S.V.; SAMBOL, S.P.; JOHNSON, S.; GERDING, N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**. 8, p. 2433-2441, 2005.

MEIER-RUGE WA, BRUNNER LA, ENGERT J et al. A correlative morphometric and clinical investigation of hypoganglionosis of the colon in children. **Eur J Pediatr Surg** 1999; 9: 67–74.

MUTLU, G. M., MUTLU, E. A. & FACTOR, P. GI complications in patients receiving mechanical ventilation. **Chest** 119, 1222–1241 (2001).

MUTO, CA; POKRIWKA, M; SHUTT, K; MENDELSON, AB; NOURI, K; POSEY, K; ROBERTS, T; CROYLE, K; KRISTOFIAK, S; PATEL-BROWNS, S; PASCULLE, AW; PANTERSON, DL; SAUL, M; HARRISON, LH; A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v.26, n.3, p.273-280.2005

OCHOA-CORTES, F; TURCO, F; LINAN-RICO, A; SOGHOMONYAN, S;

WHITAKER, E; WEHNER, S; CUOMO, R; CHRISTOFI, FL. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. **Inflamm Bowel Dis**. v.22, p.433–449. 2016.

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. **Dig. Dis. Sci.**, v. 58, p. 3429-3439, 2013.

PAULINO AS, PALOMBIT K, CAVRIANI G, TAVARES-DE-LIMA W, MIZUNO MS, MAROSTI AR, DA SILVA MV, GIROTTI PA, LIBERTI EA, CASTELUCCI P (2011) Effects of ischemia and reperfusion on P2X2 receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system. **Dig Dis Sci** 56:2262–2277. doi:10.1007/s10620-011-1588-z.

PHILLIPS, RJ; KIEFFER, EJ; POWLEY, TL. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Auton Neurosci.**v.106, p.69–83. 2003.

PINTO, L.J.; ALCIDES, A.P.; FERREIRA, E.O.; AVELAR, K.E.; SABRÁ, A.; DOMINGUES, R.M.; FERREIRA, M.C. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in pediatric diarrhea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. V. 52, n. 12, p.1095-1099, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614068>.

POOLE, D. P.; CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; CHIOCCHETTI, R.; FURNESS, J. B. The distribution of P2X3 purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. **Auton. Neurosci.**, v. 101, p. 39-47, 2002. doi:10.1016/S1566-0702(02)00179-0 PMID: 12462358.

POPOFF, M.R.; GENY, B. Rho/Ras-GTPase-dependent and -independent activity of clostridial glucosylating toxins. **J Med Microbiol**. v. 60, n. 8, 2011. Disponível em: <<http://jmm.sgmjournals.org/content/60/8/1057.full>>.

PONTELL L, CASTELUCCI P, BAGYÁNSZKI M, JOVIC T, THACKER M, NURGALI K, BRON R, FURNESS JB (2009) 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** 455:55–65. doi:10.1007/s00428-009-0795-x.

POXTON, I. R.; MCCOUBREY, J.; BLAIR, G (2001). The pathogenicity of *Clostridium difficile*. **Clinical microbiology and infection** 7, 421-427.

POUTANEN SM1, SIMOR AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **CMAJ**. 2004 Jul 6;171(1):51-8.

- PURI P. Variant Hirschsprungs disease. **J Pediatr Surg** 1997; 32: 149–57.
- 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, n. 2, p. 147-61, 2008. doi:10.1007/s00441-008-0684-7 PMID:18855018.
- QUESADA-GÓMEZ, C.; RODRÍGUEZ, C.; GAMBOA-CORONADO, M.M.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. **J Clin Microbiol.** v. 48, n. 2, p. 669-670, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815634/>>.
- REINTAM BLASER, A. et al. Gastrointestinal function in intensive care patients: terminology, definitions and management. Recommendations of the ESICM Working Group on Abdominal Problems. **Intensive Care Med.** 38, 384–394, doi: 10.1007/s00134-011-2459-y (2012).
- ROCHA, M.F. et al. (1997). *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. **Infect Immun.** 65, 2740-2746.
- RUBIN TA, GESSERT CE, AAS J, BAKKEN JS. Fecal microbiome transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection: report on a case series. **Anaerobe.** 2013;19:22-6.
- RUPNIK, M; WILCOX, MH; GERDING, DN; *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature**, v7, 526-536, jul, 2009.
- SABOL, V. K. & CARLSON, K. K. Diarrhea: applying research to bedside practice. **AACN Adv. Crit. Care** 18, 32–44 (2007).
- SANG, Q.; YOUNG, H. M. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. **Cell Tissue Res.**, v. 284, p. 39-53, 1996. doi:10.1007/s004410050565 PMID:8601295.

SANG, Q.; WILLIAMSON, S.; YOUNG, H. M. Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. **J. Anat.**, v. 190, p. 209-222, 1997. doi:10.1046/j.1469-7580.1997.19020209.x PMID:9061444.

SAVIDGE, T. C.; NEWMAN, P.; POTHOUKAKIS, C.; RUHL, A.; NEUNLIST, M.; BOURREILLE, A.; HURST, R.; SOFRONIEW, M. V. 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. **Anat. Rec.**, v. 271A, p. 209-216, 2003. doi:10.1002/ar.a.10024 PMID:12552637.

SHIMOJIMA N, NAKAKI T, MORIKAWA Y, et al. Interstitial cells of cajal in dysmotility in intestinal ischemia and reperfusion injury in rats. **J Surg Res**. 2006;135:255---61.

SILVA, MV; MAROSTI, AR; MENDES, CE; PALOMBIT, K; CASTELUCCI, P. Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression In enteric neurons. **Histochem Cell Biol**. v.143, p.171–184. 2015.

SPILLER, R.C. Role of nerves in enteric infection. **Gut**, v.51, p.759-762, 2002.

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. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19980921)399:2<255::AID-CNE8>3.0.CO;2-# PMID: 9721907.

TOUMI, F.; NEUNLIST, M.; CASSAGNAU, E.; PAROIS, S.; LABOISSE, C. L.; GALMICHE, J. P.; JARRY, A. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 15, p. 239-242, 2003.

TRINN C, PRABHAKAR K. Diarrheal diseases in the elderly. **Clin Geriatr Med.** 2007;23(4):833-56,vii.

VON BOYEN, GB; SCHULTE, N; PFLÜGER, C; SPANIOL, U; HARTMANN, C; STEINKAMP, M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterol.**v.11, n.3. p.1-8. 2011.

WANG, X. Y.; WONG, W. C.; LING, E. A. Localization of NADPH-diaphorase activity in the submucous plexus of the guinea-pig intestine: light and electron microscopic studies. **J. Neurocytol.**, v. 24, p. 271-281, 1995. doi:10.1007/BF01186540 PMID:7643133

WEDEL T, ROBLICK UJ, OTT V et al. Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation. **Dis Colon Rectum** 2002; 45: 54–62.

WEDEL T, SPIEGLER J, SOELLNER S et al. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. **Gastroenterology** 2002; 123: 1459–67.

WHELAN, K., JUDD, P. A., PREEDY, V. R. & TAYLOR, M. A. Enteral feeding: the effect on faecal output, the faecal microflora and SCFA concentrations. **Proc. Nutr. Soc.** 63, 105–113 (2004).

WIESEN, P., VAN GOSSUM, A. & PREISER, J. C. Diarrhea in the critically ill. **Current Opin. Crit. Care** 12, 149–154, doi: 10.1097/01. ccx.0000216583.64804.46 (2006).

YAN ROBERT, S.C., MARIA RAQUEL, M.N., doenças inflamatórias intestinais: revisão narrativa da literatura. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 17, n. 3, p. 116 - 119, 2015.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SEWELL, P.; BURCHER, E. F.; KANDIAH, C. J. Total number of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.**

