

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Efeitos de processos inflamatórios sobre a morfologia da
parede intestinal e a neuroquímica das células gliais do
sistema nervoso entérico

TESE DE DOUTORADO

RAPHAELA DA CUNHA FRANCESCHI

PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Efeitos de processos inflamatórios sobre a morfologia e
neuroquímica de células gliais do sistema nervoso entérico**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA.

RAPHAELA DA CUNHA FRANCESCHI

ORIENTADORA: DRA. DENISE MARIA ZANCAN

CO-ORIENTADOR: DR. CARLOS ALBERTO GONÇALVES

PORTO ALEGRE

2017

*“Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito
sem concentração e auto-sacrifício, esforço e
dúvida.”*

*MAX BEERBOHM
(1872 – 1956)*

Dedico às pessoas fundamentais e essenciais na minha vida: Débora, Círio, Franthiela e Marlene; e aos animais que, sem escolha, entregaram suas vidas para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Não somos capazes de viver sozinhos. A seleção natural contribuiu para a nossa evolução e as pressões adaptativas e instintivas nos levaram à uma vida em sociedade. A ciência não foge a essa regra. Se é impossível viver isolado, é também improvável fazer ciência sozinho.

Este trabalho só foi factível através do envolvimento de inúmeras pessoas e a elas inicio meus agradecimentos.

UFRGS

Agradeço aos meus orientadores, Prof^a. Denise Zancan e Prof. Carlos Alberto Gonçalves, pelos ensinamentos, dedicação, apoio e profissionalismo.

À Patrícia Nardin, que empregou seu tempo e paciência para me instruir na execução de diversas técnicas de laboratório, exercendo inúmeras vezes o papel de co-orientadora, mas principalmente por me permitir ter sua amizade e confiança.

À Bárbara Paranhos, amiga e colega que sempre esteve disposta a auxiliar e ensinar, que inúmeras vezes dividiu as apreensões do doutorado e outras tantas vezes mais esteve ao meu lado fornecendo apoio e boas risadas.

À Clivia Machado, iniciação científica dedicada que cuidou das chinchilas com muito zelo e auxiliou impecavelmente em diversas etapas deste trabalho.

Ao Malcon Martinez, que não mediu esforços para estar presente, madrugando nos domingos comigo, auxiliando à distância e sendo sempre meu colega-amigo-orientador.

Aos colegas Adriana Vizuete, Caroline Zanotto, Cíntia Battú, Cristiane Batassini, João Paulo dos Santos, Lucas Tortorelli e Regina Biasibetti, que em diferentes momentos auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

A todos os professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, que estiveram envolvidos na minha formação.

A todos os colegas do laboratório 33, pela convivência e incentivo.

À cabanha Chilacenter pela colaboração.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

ESPECIAIS

“Quando se decompõe uma sociedade, o que se acha como resíduo final não é o indivíduo, mas sim a família. (Victor Hugo) ”

Agradeço imensa e eternamente a minha mãe Débora, simplesmente pelo fato de ser tua filha, por sempre enxergar minhas angústias, medos e excitações sem que seja preciso dizer. Sem teu incentivo, apoio e puxões de orelhas nunca seria essa pessoa e provavelmente não chegaria aqui. Nossa conexão é a maior e a mais especial.

À mana Franthiela, meu elo mais forte, que sempre me apoia e vibra junto. Tu sempre serás a minha pequena que irei proteger e amar.

À dinda Marlene, por suas preocupações, mimos e amor materno, não apenas nessa jornada, mas ao longo da minha vida.

Ao meu pai Círio, que tornou a vida acadêmica mais confortável e que ao longo desta torceu e zelou como se ainda fosse sua pequena pirulita.

Ao Guilherme Berti, pelo amor e paciência, por fazer parte desta etapa apoiando, “pegando junto”, me acalmando e por sempre me convencer que as coisas vão resultar como desejo. A você que me completa e me transborda.

AMIGOS

“Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante. Tenho amigos para saber quem sou. (Marcos Lara Resende) “

Agradeço aos amigos que compreenderam as inúmeras ausências e o mesmo disco quebrado por anos, que torceram e estiveram junto, cada um ao seu modo: Aline Jung, Charles Berçot, Emanuele Sulzbach, Fabiane Bergmann, Itiana Menezes, Jucélli Mazotti, Leone Vargas, Loiri Berti, Maria Julia Bittencourt, Márcia Kratz, Márcia Peiter, Michele Nunes, Mity Schlesener, Priscylla Senna, Rosalva Garibaldi e Rossana Lopes.

Aos novos colegas de trabalho, e entre eles, aos amigos da Polícia Civil.

Aos cães Dexter e Bonno e ao gato Mindulho, que não entendem porquê ficar tanto tempo longe ou focada trabalhando ao invés de estar dando atenção a eles, mas que certamente sentem meu amor e, principalmente, por sempre me lembrar que a vida exige simplicidade e lealdade.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	13
APRESENTAÇÃO DO TEMA	12
SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO	12
GLIA ENTÉRICA	14
S100B	23
PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL	25
LIPOPOLISSACARÍDEO	28
CHINCHILAS	31
CÓLICA TIMPÂNICA	34
ARTIGO I	36
OBJETIVO ESPECÍFICO	36
METODOLOGIA	36
RESULTADOS	39
ARTIGO II	49
OBJETIVO ESPECÍFICO	49
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÕES	99
PERSPECTIVAS	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEG: células enterogliais

CEGM: células gliais entéricas da mucosa

CT: cólica timpânica

DC: doença de Crohn

DP: doença de Parkinson

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

IBD: Inflammatory Bowel Disease

IL-1 β : citocina pró-inflamatória interleucina-1 β

iNOS: óxido Nitrico Sintase

LPS: lipopolissacarídeo

MHC II: complexo principal de histocompatibilidade classe II

NF-kB: Fator nuclear-kb

NO: óxido nítrico

PBS: Salina tamponada com fosfato

S100 β : Proteína β de ligação de cálcio

SNC: sistema nervoso central

SNE: sistema nervoso entérico

SNP: sistema nervoso periférico

TGI: trato gastrointestinal

TLR: receptor toll-like

TNF- α : fator de necrose tumoral

RESUMO

FRANCESCHI, R. C. **Efeitos de processos inflamatórios sobre a morfologia e neuroquímica de células gliais do sistema nervoso entérico**. Porto Alegre, 2017. 118p. Tese de Doutorado: Programa de Pós-graduação em Neurociências – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sabe-se que inflamações no trato gastrointestinal (TGI) ocasionam mudanças estruturais e funcionais que influenciam significativamente a qualidade de vida. Os efeitos variam de acordo com o tipo e extensão do processo inflamatório, que, por consequência, depende da natureza do estímulo ou do grau de lesão ocasionado. Existem, entretanto, lacunas na compreensão da etiopatologia das neuropatias entéricas. Há evidências de que diferentes causas, como defeitos de desenvolvimento congênitos no sistema nervoso entérico (SNE), ação de agentes tóxicos conhecidos ou condições patológicas secundárias indicam perda, degeneração e/ou comprometimento funcional dos neurônios entéricos. Por outro lado, crescem as evidências de que a integridade das células enterogliais (CEG), bem como das células imunitárias residentes no TGI, sofrem modulação de diferentes mediadores do SNE, assim como de distintos agentes nocivos. Portanto, existe um consenso de que interações entre os neurônios, as CEG e as células do sistema imunitário são determinantes para os efeitos dos processos inflamatórios na estrutura e nas funções do TGI. No presente trabalho foram escolhidos dois protocolos distintos de indução de inflamação entérica: o efeito de uma toxina associada a processos infecciosos, pelo fato de, até então, inexistir estudos dos efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) sobre as CEG *in vivo*; e o efeito de uma dieta irregular, cuja patologia decorrente é relativamente frequente no roedor *Chinchilla lanigera* em cativeiro. Os objetivos propostos foram avaliar a atividade das CEG: **(1)** sob os efeitos da administração sistêmica do LPS *in vivo* em ratos e **(2)** nos efeitos do timpanismo provocado por dieta em *Chinchilla lanigera*. A avaliação histopatológica da administração de LPS intraperitoneal em ratos revelou uma resposta inflamatória intestinal dependente da dose, tempo e região intestinal. A menor dose de LPS intraperitoneal (0,25 mg kg⁻¹) resultou em um estado inflamatório com resposta menos intensa em 1h e resultou em um aumento de linfócitos, células plasmáticas e no tamanho dos nódulos linfáticos, além uma discreta perda de organização nas criptas intestinais. Enquanto a maior dose de LPS (2,5 mg kg⁻¹) resultou em uma inflamação moderada em todas as regiões entéricas, em todos os tempos, sendo o dano à cripta mais intenso no grupo analisado 24h após a injeção. Foi observada uma lesão visível na mucosa do duodeno, ceco e cólon dos ratos 24 horas e 7 dias após a injeção de LPS, porém o duodeno foi o segmento menos suscetível a essa resposta inflamatória. Com o protocolo de indução de CT nas chinchilas foi observado infiltrado inflamatório mais denso nas criptas do ceco e do cólon ascendente, confinados principalmente à mucosa, caracterizando um processo inflamatório subagudo nesses animais. Áreas infartadas também foram observadas nos vasos mesentéricos em todo o intestino dos animais timpânicos. Esses danos, entretanto, foram revertidos nos animais do grupo recuperado, sem distinção significativa entre os animais que receberam, além do retorno à dieta controle, anti-inflamatório por 5 dias. As alterações morfológicas, contudo, nem sempre foram acompanhadas por variações concomitantes na expressão dos marcadores de atividade glial, GFAP e S100B intra e extracelular, em resposta tanto à administração sistêmica de LPS em ratos, como pela administração de uma dieta que desencadeou a CT. Nas três regiões intestinais analisadas dos

ratos houve aumento de S100B intracelular após 24 horas da administração da maior dose de LPS, retornam a níveis basais ou níveis ligeiramente inferiores aos do controle após 7 dias. Não foi observada variação expressiva na secreção de S100B entérica em resposta ao LPS sistêmico. Em relação a GFAP, o LPS também foi capaz de induzir um aumento na GFAP intestinal dos ratos em todas as regiões entéricas 24 h após a injeção da dose mais alta de LPS. São necessários mais estudos das respostas imunitárias, e da relação destas com o SNE nas diferentes regiões do TGI sob condições inflamatórias, sejam desencadeadas sistemicamente ou localmente no trato intestinal.

ABSTRACT

FRANCESCHI, R. C. **Effects of inflammatory processes on the morphology and neurochemistry of glial cells from the enteric nervous system.** Porto Alegre, 2017. 118p. Tese de Doutorado: Programa de Pós-graduação em Neurociências – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Gastrointestinal tract (GIT) inflammation cause structural and functional alterations that significantly influence the quality of life. The effects vary according to the type and extension of the inflammatory process, which depends on the nature of the stimuli or the level of lesion caused. There are, however, gaps in the understanding of the etiopathology of enteric neuropathies. There are evidences that different causes, such as congenital development defects of the enteric nervous system (ENS), action of known toxic agents, or secondary pathological conditions indicate loss, degeneration and/or functional damage of enteric neurons. On the other hand, there are increasing evidence that the integrity of enteroglia cells (EGC), as well as immune cells that reside on the GIT, suffer modulation from different ENS regulators, as from several harmful agents. Therefore, a consensus exists that interactions between neurons, EGCs and immune cells are determinant for the effects of inflammatory processes on the structure and functions of the GIT. In the present study, two distinct protocols of enteric inflammation induction were chosen: the effect of lipoprotein (LPS), a toxin associated with infectious processes, on EGCs *in vivo*, of which no studies existed so far; and the effects of an irregular diet, which the deriving pathology is relatively frequent on the farmed rodent *Chinchilla lanigera*. The proposed objectives were to evaluate the activity of EGCs: **(1)** under the effects of systemic administration of LPS *in vivo*, on rats and **(2)** on the effects of tympanism induced by diet on *Chinchilla lanigera*. Histopathologic evaluation from intraperitoneal administration of LPS in rats revealed an intestinal inflammatory response that was dependent on the dose, time and intestinal region. The lowest intraperitoneal LPS dose (0.25 mg kg⁻¹) caused an inflammatory state with a less intense response at 1h and resulted in increase of lymphocytes, plasm cells and the size of lymphatic nodules, in addition to a discrete loss of organization in the intestinal crypts. The highest LPS dose (2.5 mg kg⁻¹) caused a moderate inflammation in all enteric regions, at all the times tested, and the damage to the crypt was more intense on the group analyzed 24h after the injection. Visible lesions were observed in the duodenum, cecum and colon mucosa of rats at 24h and 7 days after LPS injection, with duodenum being the less susceptible segment to this inflammatory response. As for the protocol of tympanic colic induction in chinchillas, a denser inflammatory infiltrate was observed in the crypt of cecum and ascending colon, mainly confined to the mucosa, characterizing a subacute inflammatory process on these animals. Infarcted areas were also observed in the myenteric blood vessels throughout the entire intestine of tympanic animals. These injuries, nevertheless, were reversed in the animals from the recovery group, without significant distinction between the animals that received anti-inflammatory medication for 5 days, in addition to the return to the diet of the control group. Morphological alterations, however, not always were accompanied by concomitant variations in the expression of glial activity markers, as intra and extracellular GFAP and S100B, in response to both the systemic administration of LPS in rats, and the administration of a diet that induced TC. In the three analyzed regions in rats, there was an increase in intracellular S100B 24h after administration of the higher LPS dose, and this marker returned to basal levels

or slightly inferior levels compared to control after 7 days. Enteric S100B secretion remained unaltered in response to systemic LPS. As for GFAP, LPS also induced an increase in intestinal GFAP in rats throughout all enteric regions 24h after the injection of the higher LPS dose. More studies are needed about the immune responses and the connection between those with the ENS in different GIT regions under inflammatory conditions, whether these conditions are triggered systemically or locally in the intestinal tract.

INTRODUÇÃO

APRESENTAÇÃO DO TEMA

SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO:

As funções do sistema digestório são influenciadas por neurônios motores viscerais do sistema nervoso central (SNC), através das divisões simpática (vias sensoriais e motora) e parassimpática (ajuste fino de diversas funções) do sistema nervoso autônomo (Furness, 2012). O trato gastrointestinal (TGI) possui ainda um sistema nervoso intrínseco extenso, denominado sistema nervoso entérico (SNE), em que diferentes tipos celulares interagem de forma dinâmica através de uma variedade de moléculas de sinalização em comunicação com SNC (De Giorgio, 2015). Esse sistema é capaz de controlar as funções do TGI de forma completamente separada do SNC, no entanto, não é considerado um sistema autônomo. O controle neuronal das funções do TGI consiste em um sistema integrado envolvendo interações entre reflexos entéricos locais, reflexos que passam por gânglios simpáticos e reflexos que passam do intestino e de volta através do SNC (Furness, 2012).

O SNE é formado por uma população de células tronco multipotentes derivadas da crista neural, constituindo uma inervação intrínseca altamente organizada do TGI e desempenhando um papel crítico por toda a vida pós-natal (Laranjeira e Pachnis, 2009; Metzger, 2010). Este sistema, descrito primeiramente por Langley (1921), abrange as camadas desde o início do esôfago até o ânus, incluindo a inervação de órgãos anexos como glândulas salivares, pâncreas e vesícula biliar, e está organizado através de gânglios entéricos e estes em plexos: plexo mioentérico (muscular superficial e profundo), plexo submucoso (externo e interno), plexo muscular da mucosa, plexo mucoso e plexo perivascular (Figura 1). A existência de gânglios entéricos é um dos fatores que contribuem para a complexidade do SNE, visto que estes compõem-se por um vasto número de neurônios fenotipicamente distintos (neurônios sensoriais, motores e interneurônios) e de células gliais, organizados na forma de núcleos interligados, resultando na expressão/liberação de marcadores diversos ao longo do TGI (Krammer *et al.*, 1997; Burns, 2003; Hansen, 2003; Jänig, 2006; Laranjeira e Pachnis, 2009). Além das células neuroentéricas, as células musculares lisas formam um sincício elétrico dentro do intestino e são inervadas, direta ou indiretamente através de células intersticiais de

Cajal (CIC), por neurônios entéricos. As CIC possuem um papel ativo no controle da motilidade como marca-passos e através de canais iônicos mecano-sensíveis (Pasternak *et al.*, 2016).

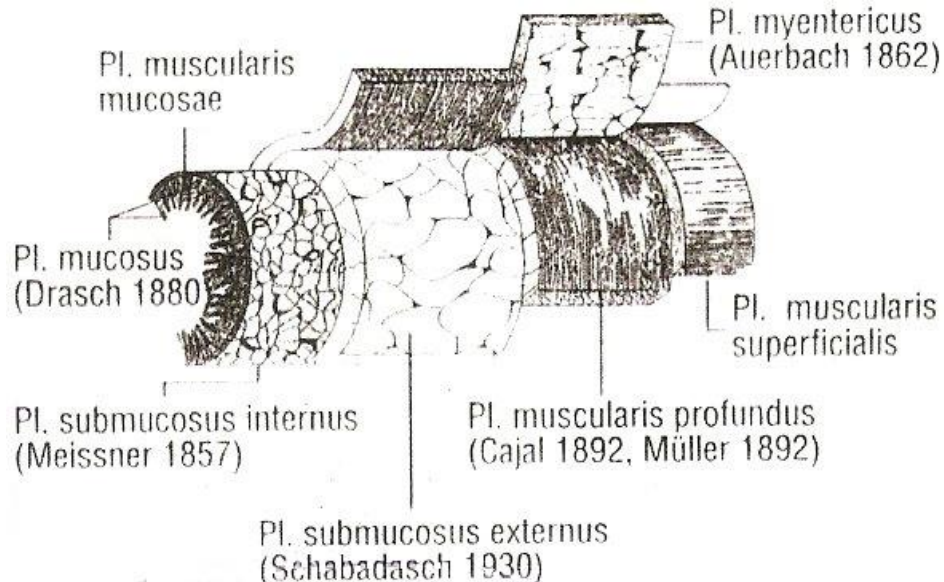


Figura 1. Esquema da topografia, arquitetura e nomenclatura (descrição original em parêntesis) dos plexos ganglionares e aganglionares que constituem o SNE em preparatos de membrana ao longo do TGI. Adaptado de Krammer *et al.*, 1997.

Sabe-se que distúrbios das funções do SNE influenciam significativamente a qualidade, e em casos mais graves, o risco de vida (Metzger, 2010). Também já está bem estabelecido que inflamações no TGI causam mudanças tanto estruturais quanto funcionais no SNE. As respostas no SNE variam de acordo com o tipo e extensão do processo inflamatório, que por consequência depende da natureza do estímulo (Collins, 1996; Sharkey e Kroese, 2001; Lomax *et al.*, 2005). Para muitos autores a etiologia das doenças entéricas ainda é incerta e pode envolver múltiplas causas. Evidências atuais indicam que as neuropatias entéricas se originam a partir de perda, degeneração e/ou comprometimento funcional dos neurônios entéricos, resultante de defeitos de desenvolvimento congênitos do SNE, da ação de agentes tóxicos conhecidos (intoxicações, infecções) ou condições patológicas secundárias como inflamação crônica, neuropatia diabética e DP (Sasselli *et al.*, 2012). A desregulação da SNE ocorre não somente na fase aguda da inflamação, mas também é considerada como um evento promotor de inflamação crônica (de Filippis *et al.*, 2011). Um exemplo são as alterações no SNE relatadas em quadros de doença inflamatória intestinal (IBD ou *Inflammatory bowel disease*), que incluem aumento no número de neurônios entéricos, alteração na síntese, conteúdo e

liberação de neurotransmissores, alterações no número de células gliais entéricas e ganglionite no plexo mioentérico, além de modificações nos circuitos intrínsecos motores intestinais (hiperexcitabilidade neuronal, aumento da facilitação sináptica e diminuição transmissão inibidora neuromuscular descendente) (Margolis e Gershon, 2016).

Atribui-se ao sistema imunitário e à glia entérica o papel de modulador ativo do TGI (De Giorgio, 2015), assim, pode-se afirmar que interações entre os neurônios, a glia e as células do sistema imunitário podem afetar tanto a estrutura quanto as funções do SNE, sendo essas interações uma área de crescente interesse na compreensão das patologias do sistema digestório. O melhor entendimento das ligações entre o desenvolvimento do SNE, a sua fisiologia, e as doenças entéricas, são suscetíveis de serem uma prioridade para a próxima década, levando a melhores tratamentos desses distúrbios (Sasselli *et al.*, 2012).

GLIA ENTÉRICA:

Descritas no final do século XIX por Dogiel (Dogiel, 1899), as células gliais entéricas ou célula enteroglial (CEG) são numericamente o maior componente celular do SNE e, por muito tempo, foram consideradas apenas células de sustentação para os neurônios. Atualmente, as CEG são um componente integral e importante do circuito neuronal e, na maioria dos mamíferos estudados, elas excedem os neurônios no número de células. Por exemplo, em mamíferos adultos, as CEG ultrapassam os neurônios em cerca de 3-4 : 1, e dependendo da região/espécie essa relação é de 7:1, como por exemplo no íleo humano (Hoff *et al.*, 2008; McClain *et al.*, 2014). Localizam-se principalmente nos gânglios dos plexos mioentérico e submucoso, onde encontram-se entrelaçadas aos neurônios entéricos (Gershon, 2011). Nos gânglios, as CEG estão acopladas ao redor dos neurônios, estendendo diversas projeções que de forma incompleta os isolam de outras células extraganglionares (Figura 2). Ainda se encontram presentes nas fibras axonais de interconexão dos plexos ganglionares como nos aganglionares, onde são o único elemento celular (Bassotti, Villanacci, Antonelli *et al.*, 2007), constituindo uma ampla rede em todos os níveis do TGI com interações celulares multidirecionais para os neurônios, às células epiteliais, células mesenquimais e células do sistema imunológico, desempenhando dessa forma um papel importante na saúde da inervação entérica (Figuras 3 e 4; Rühl, 2005).

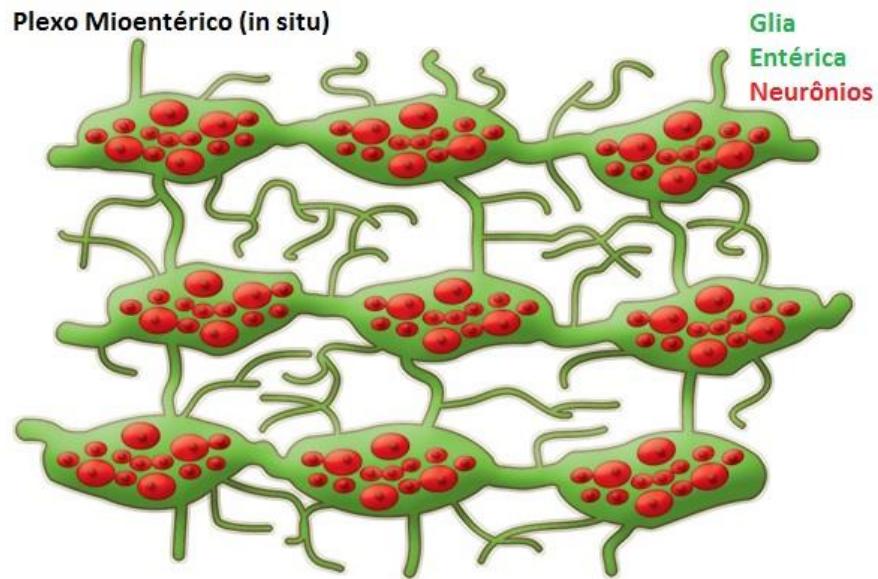


Figura 2: Desenho representando o plexo mioentérico intacto como apareceria em uma preparação laminar da parede intestinal. Os neurônios (vermelho) são cercados por uma densa rede de glia entérica (verde). Adaptado de Gershon, 2011.

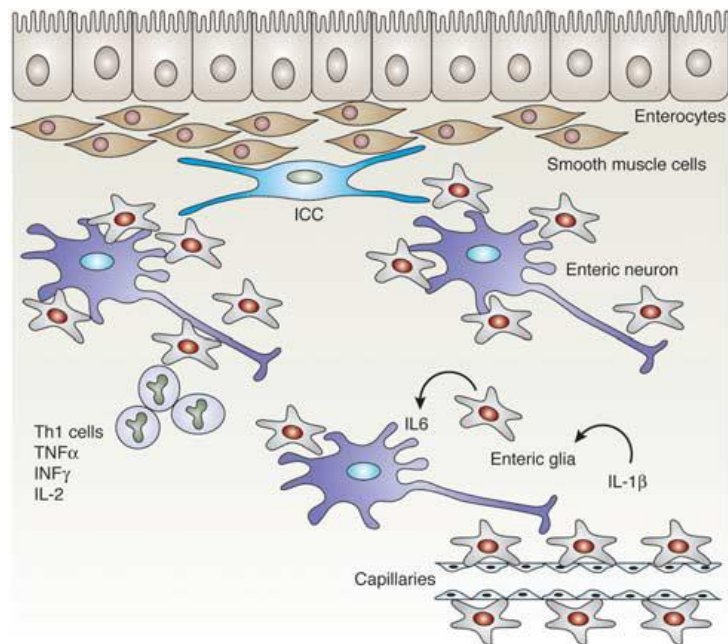


Figura 3: Representação esquemática das interações anatômicas-funcionais da glia entérica com os outros elementos do SNE. Neurônios coloridos em roxo e as CEG em cinza. ICC, células intersticiais de Cajal. Adaptado de Bassotti, Villanacci, Antonelli *et al.*, 2007.

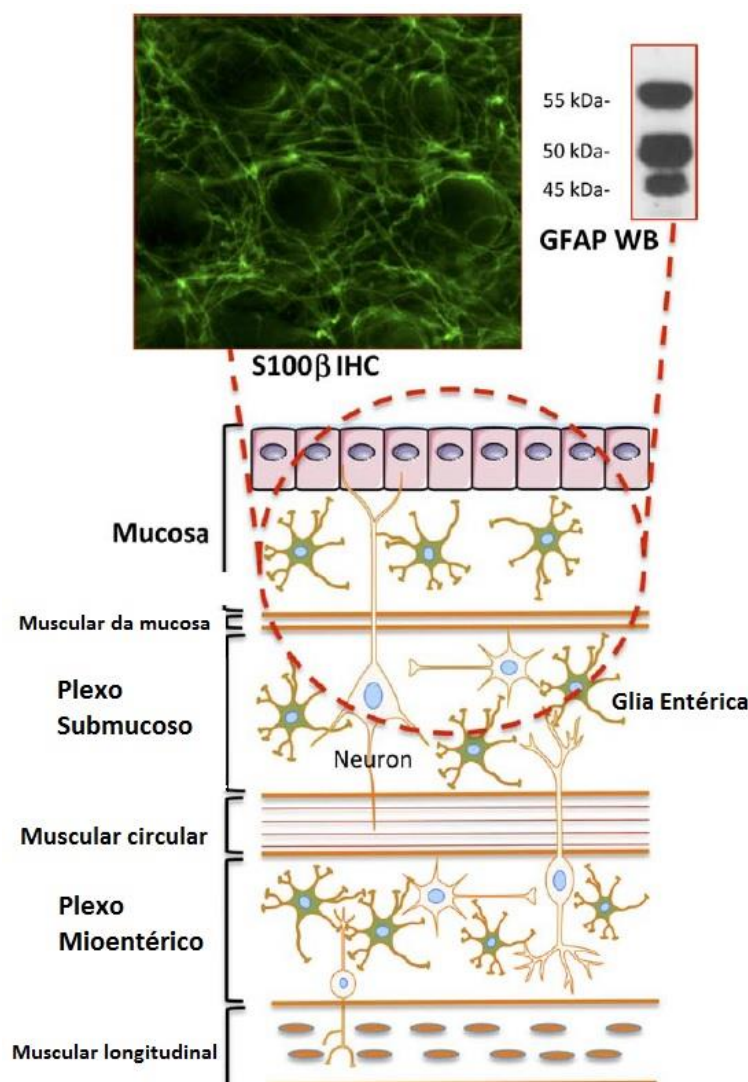


Figura 4: As populações de CEG na parede do intestino. Uma subpopulação de CEG está localizada diretamente abaixo da camada epitelial e está envolvida na regulação da barreira epitelial intestinal. CEG dos plexos submucoso e mioentérico se misturam com os neurônios e participam na regulação da neurotransmissão entérica. CEG que se encontram sob a mucosa e no plexo submucoso são facilmente observáveis por biopsias gastrointestinais (linha pontilhada) por imuno-histoquímica (imunomarcação S100B) Adaptado de Clairembault *et al.*, 2015.

As CEG eram geralmente observadas como uma população relativamente homogênea, sendo pequenas, em formato de estrela e apresentando numerosos processos de comprimento e tamanho variados (Rühl, 2005). As CEG envolvem os neurônios nos gânglios entéricos e nervos, e como os vasos sanguíneos e tecidos conjuntivos estão ausentes no interior dos gânglios, a glia entérica estende suas projeções que terminam como botões achatados junto da margem ganglionar, isolando, ainda que de forma incompleta, os neurônios entéricos de células extraganglionares. Possuem, ainda, características ultraestruturais exclusivas: filamentos longos (10 nm) capazes de cruzar o corpo celular, formar

feixes axiais ao longo do curso e ancorar firmemente as células na superfície ganglionar. Semelhante aos astrócitos, o seu principal constituinte é proteína glial fibrilar ácida (GFAP; Rühl, 2005).

CEG maduras lembram morfologicamente os astrócitos do SNC e expressam marcadores moleculares similares, sendo morfológica e imunohistologicamente diferentes das células de Schwann presentes no sistema nervoso periférico (Grubišić e Gulbransen, 2017). No entanto, há evidências para sugerir uma heterogeneidade morfológica e funcional entre essas células, baseada na ontogenia das populações gliais entéricas, que permitiu, primeiramente, identificar duas populações distintas de CEG: uma que preenche a inervação intrínseca do intestino e outra que se associa com a inervação extrínseca (Rühl *et al.*, 2004). Esta característica foi demonstrada pela primeira vez no plexo mioentérico de porquinhos-da-índia (Hanani, 1994), em que as CEG encontradas dentro dos gânglios mioentéricos seriam classificadas como "tipo I" ou "gliócitos protoplasmáticos", enquanto que as células distribuídas nos feixes de fibras seriam classificadas como "tipo II" ou "gliócitos fibrosos", se assemelhando à distinção descrita para os astrócitos. Todavia, subpopulações estão presentes, o que permitiu que fosse identificada uma glia subepitelial com vários processos longos e ramificados a qual poderia ser classificada como "mucosa" ou "tipo III" e a glia alongada acompanhando fibras nervosas na musculatura como "intramuscular" ou "tipo IV" (Figura 5) (Gulbransen e Sharkey, 2012). Entretanto, no intestino maduro essas populações não são facilmente distinguíveis e em circunstâncias normais elas também parecem funcionar de forma idêntica. Embora derivem de progenitores comuns da crista neural, as CEG assumiriam um fenótipo final determinado pelos microambientes específicos das distintas partes do TGI (Dulac e Le Douarin, 1991; Hanani, 1994; Boesmans *et al.*, 2015).

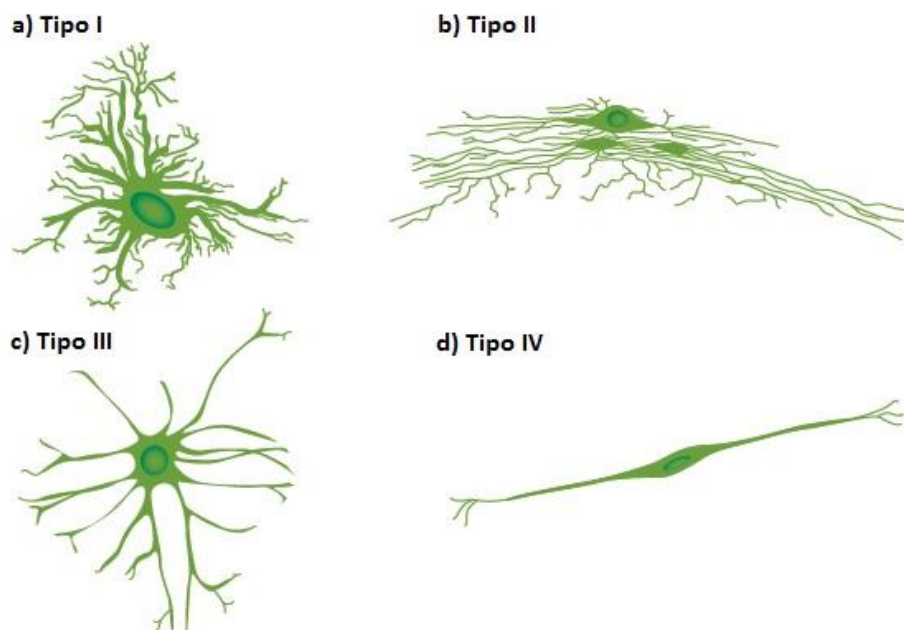


Figura 5: Tipos de células glias entéricas. Ilustrações esquemáticas dos quatro tipos morfológicos diferentes de CEG descritas até a data. a) Tipo I ou “protoplasmáticas” são em forma de estrela, com processos curtos, de forma irregular ramificada que se assemelha aos astrócitos protoplasmáticos do SNC. b) Tipo II ou “fibrosas” são as glias alongadas dentro de feixes de fibras que se assemelham a astrócitos fibrosos da substância branca no SNC. c) Tipo III ou “mucosas” são glias subepiteliais com vários processos longos e ramificados. d) Tipo IV ou “intramusculares” são as glias alongadas correndo com fibras nervosas na musculatura. Adaptado de Gulbransen e Sharkey, 2012.

Outra diferenciação morfológica considera que a glia que está dentro dos gânglios apresenta processos mais curtos e mais ramificados que os relacionados aos feixes de fibra (Gulbransen e Sharkey, 2012). Isto faz com que, no interior do gânglio, a CEG amplie o número de pés terminais até suas bordas, fazendo o papel de pé terminal dos astrócitos e/ou tecidos conjuntivos. Por outro lado, as células glias na zona de transição entre gânglios e feixes de fibras podem ter os dois tipos de processos, indicando que o critério morfológico pode não ser preciso para definir os subgrupos de glia entérica (Gulbransen e Sharkey, 2012). Neste sentido, considerando as peculiaridades estruturais das CEG, foi sugerido a adoção de nomenclatura semelhante ao sistema utilizado atualmente para distinguir tipos de células intersticiais de Cajal. Assim, a glia entérica dentro dos plexos mioentérico e submucoso pode ser referida como CEGPM e CEGPSM, respectivamente, e a glia extragangliônica associada com a mucosa e a musculatura como CEGMucosa, e CEGIM, respectivamente (Gulbransen e Sharkey, 2012; Gulbransen, 2014).

Outra forma de classificação baseia-se nos níveis de expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Aproximadamente 40 a 50% das CEG podem ser GFAP negativas. Entretanto, a

expressão de GFAP é dinamicamente regulada e reflete, principalmente, o estado funcional de uma célula glial, o que pode mudar ao longo do tempo, inclusive em resposta a citocinas pró-inflamatórias (Von Boyen *et al.*, 2004; Rühl, 2005). O nível de expressão de outros marcadores básicos das CEG – a proteína ligante de cálcio S100 β e o fator de transcrição Sox 10 – também ampliam a variabilidade das CEG (Boesmans *et al.*, 2015).

Comparadas aos neurônios entéricos, o papel fisiológico das células gliais entéricas ainda é menos estudado. Classicamente, pensava-se que o papel da CEG seria apenas atuar como suporte estrutural para os neurônios entéricos através da liberação de uma ampla gama de fatores neurotróficos, os quais atuam no desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação de muitos neurônios (Esposito *et al.*, 2007). Seu papel na saúde e em estados de doença no SNE adulto vem sendo estudado e evidências indicam que a CEG pode desempenhar um papel mais ativo na fisiologia e fisiopatologia do TGI, bem como suas implicações em doenças do sistema digestório (Neunlist *et al.*, 2014). Por outro lado, há estudos que indicam outras funções, como as relacionadas à neurotransmissão entérica (Bassotti, Villanacci, Fisogni *et al.*, 2007), controle da motilidade (Aube *et al.*, 2006) e da secreção gastrointestinal, fluxo sanguíneo, captação de nutrientes, homeostase do TGI por meio da conservação da integridade da barreira mucosa (Rühl *et al.*, 2004; Matteoli, 2011; Yu e Li, 2014), controle do fenótipo neuroquímico de neurônios entéricos (Aube *et al.*, 2006), papel de células progenitoras gliais (Hao e Young, 2009), bem como desempenhando a função de elo entre o SNE e o sistema imunitário (Bush *et al.*, 1998). Uma atividade crucial das CEG é a sua capacidade de estimular a manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal, liberando fatores que regulam a inflamação, preservam a barreira epitelial intestinal de danos bacterianos e ainda protegem contra a invasão de patógenos (Matteoli, 2011). Esta atividade pode ter implicações clínicas importantes, não só para doenças digestivas, tais como íleo pós-operatório e doenças inflamatórias intestinais, distúrbios extra-intestinais como obesidade (Stenkamp-Strahm *et al.*, 2013), ou ainda para patologias encefálicas como DP (Clairembault *et al.*, 2015). A DP, inicialmente descrita como uma disfunção apenas do SNC, é atualmente considerada uma doença multicêntrica, sendo um exemplo de perturbação neurodegenerativa capaz de mudar o comportamento do TGI (Coelho-Aguiar *et al.*, 2015), e o estado inflamatório das CEG é o responsável pela constipação associada a esta condição (Sharkey, 2015). O autismo também possui diferentes aspectos etiopatogenéticos, com disfunções e sintomas que abrangem o TGI (De Magistris *et al.*, 2010).

Estudos em camundongos geneticamente modificados que sofreram eliminação da glia entérica que expressa GFAP resultaram em degeneração neuronal, ruptura da arquitetura dos plexos entéricos, lesões vasculares proeminentes, destruição da integridade do epitélio intestinal e/ou mudanças específicas na codificação neuroquímica de neurônios entéricos, com subsequente inflamação e em última instância morte dos animais (Bush *et al.*, 1998), sugerindo seu papel crucial na manutenção da integridade intestinal e sobrevivência neuronal. A CEG poderia manter a integridade neuronal através da prestação de apoio estrutural, da liberação de fatores neurotróficos, ou garantindo uma proteção ao microambiente (Coelho-Aguiar *et al.*, 2015).

Evidências indiretas sugerem o envolvimento das CEG na neurotransmissão entérica através de redes gliais funcionais no SNE, que permitiria um acoplamento celular capaz de coordenar uma atividade glial cooperativa, como a descrição de ondas de cálcio que viajam de forma ondulatória entre cultura de CEG após estimulação mecânica e química de uma única CEG (Zhang *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* (Gomes *et al.*, 2009) e *in vivo* (Gulbransen e Sharkey, 2009) têm demonstrado uma comunicação neurônio-glia, com as CEG respondendo a um aumento de Ca^{2+} intracelular por estímulo elétrico ou despolarização dos neurônios entéricos, sendo mediado por hemicanais de conexina-43. Além disso, camundongos *knockout* para conexina-43 CEG-específica apresentam o trânsito colônico substancialmente atrasado. Estas alterações refletem ainda os efeitos do envelhecimento, onde a conexina-43 é modificada explicando as reduções relacionadas à idade na motilidade do cólon (McClain *et al.*, 2014).

A expressão de glutamina sintetase e a imunorreatividade pelo transportador GABAérgico GAT2 nas CEG sugere que elas possam desempenhar um papel na sinalização glutamatérgica, assim como os astrócitos no SNC e, também, na neurotransmissão GABAérgica no SNE (Fletcher *et al.*, 2002). Outro importante neurotransmissor localizado em neurônios entéricos, o óxido nítrico (NO), formado a partir de seu precursor L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), pode ser sintetizado nas CEG. Análise ultra-estrutural de gânglios entéricos mostrou que a L-arginina-imunorreativa estava presente apenas em CEG, mas não em neurônios (Nagahama *et al.*, 2001). Sugerindo que a CEG pode representar o principal reservatório da L-arginina, que pode eventualmente ser transferida para os neurônios, quando necessário. Demonstrou-se, posteriormente, que enquanto os neurônios entéricos possuem NOS I, as CEG possuem NOS II e ambas as isoformas de NOS poderiam liberar NO sob estimulação nicotínica (Maceachern *et al.*, 2011). Tomados em conjunto, essas

observações sugerem que as CEG estão ativamente envolvidas na regulação da atividade neuronal dentro do SNE.

Respostas enterogliais a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos podem ser evidenciados via expressão de Fos, cuja expressão só foi observada em algumas subpopulações de CEG, sugerindo a possibilidade de heterogeneidade funcional entre essas células (Rühl *et al.*, 2004). No estômago de ratos essa expressão foi observada via estimulação eferente central vagal, através de receptor nicotínico de acetilcolina no SNE (Miampamba *et al.*, 2001) ou, ainda, sob colite aguda, induzida por formalina em ratos, que está associada com a indução de Fos glial (Miampamba e Sharkey, 1999). Nasser *et al.* (2006) descrevem CEG imunorreativas a $\alpha 2$ -adrenoceptor no plexo mioentérico do cólon de ratos e camundongos. A CEG ainda responde à estimulação de nervos aferentes primários por capsaicina intraluminal e à inflamação (Sharkey *et al.*, 1999).

As CEG em adultos produzem o fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (do inglês *Glial cell-derived neurotrophic fator*, GDNF) e Neurotrofina-3 (NT-3), cujas produções em níveis elevados têm efeitos neuroprotetores, auxiliando na manutenção do SNE (Rühl, 2005; Anitha *et al.*, 2006). No entanto, durante a ontogênese os neurônios entéricos se desenvolvem e diferenciam-se antes da CEG, e no SNE de mamíferos adultos, nenhuma subpopulação neuronal GDNF ou NT-3-dependente foi relatada (Bar *et al.*, 1997). O significado fisiológico do GDNF pela glia entérica ainda não está claro. Por mais que este fator seja importante no desenvolvimento pós-natal dos neurônios mioentéricos, a principal secreção de GDNF ocorre pelas células do músculo liso e não pelas CEG (Rodrigues *et al.*, 2011). É possível que as CEG produzam BDNF em quantidades significantes apenas sob determinadas condições, como processos inflamatórios (Rodrigues *et al.*, 2011; Von Boyen *et al.*, 2011). As CEG também podem expressar enzimas (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, NTPDase), transportadores e receptores (à ATP e ao glutamato, por exemplo), que pode tamponar o meio extracelular no SNE por absorção de cátions ou participação na síntese e inativação da transmissão (Rühl, 2005; Lavoie *et al.*, 2011; Gulbransen e Sharkey, 2012).

As CEG são ativadas por danos inflamatórios, podendo contribuir ativamente nessa condição por meio da oferta de antígenos e síntese de citocinas (Neunlist *et al.*, 2014). A iniciação ou progressão da doença inflamatória está atribuída a um dano imuno-mediado à glia entérica (Bassotti, Villanacci, Antonelli *et al.*, 2007). Em co-culturas com interferon-gama e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), as CEG atuam como células apresentadoras de

antígenos, pois adquirem a capacidade de processar e apresentar antígenos de forma eficiente para as células T específicas. Expressam ainda substância P, que pode induzir a ativação de mastócitos e macrófagos e promover a proliferação de linfócitos (Rühl, Trotter *et al.*, 2001). As proteínas S100B, especificamente expressa por CEG, podem orquestrar uma ampla variedade de vias de ativação do sinal que são diretamente correlacionadas com a severidade dos processos inflamatórios intestinais (Yu e Li, 2014). A palmitoiletanolamida pode exercer efeitos anti-inflamatórios através do direcionamento seletivo do eixo S100B/TLR4 nas CEG, causando uma inibição do fator nuclear kappa-B dependente do cólon inflamado (Esposito *et al.*, 2013). Além disso, CEG têm a capacidade de responder a estímulos inflamatórios através da produção de citocinas pró-inflamatória, tais como IL-6, *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), etc (Yu e Li, 2014). Ainda, em situação de inflamação aguda, as CEG podem contribuir para o estresse oxidativo através da produção de NO, o que resulta na ativação de hemicanais Cx43 e a subsequente morte neuronal (Brown *et al.*, 2016). Assim, nos últimos anos, o papel das CEG expandiu de simples suporte nutritivo para neurônios entéricos, para ser as participantes fundamentais na regulação de eventos inflamatórios no intestino (Cirillo, Sarnelli, Turco *et al.*, 2011; Neunlist *et al.*, 2014).

Através de modelos animais de inflamação intestinal foi observado que as CEG, mas não os neurônios, proliferam em resposta à inflamação comunicando-se de forma ativa com imunócitos intestinais (Rühl *et al.*, 2004). A capacidade da CEG proliferar *in vivo* foi sugerida pela primeira vez por Gabella e Gaia (1967), que demonstraram que as CEG, ao contrário dos neurônios entéricos, são capazes de se dividir por algum tempo após o nascimento. As CEG atuam nos processos inflamatórios intestinais, aumentando a expressão de fatores neurotróficos tal como GDNF, *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e *Nerve growth factor* (NGF). Os primeiros possuem efeito anti-apoptóticos sobre as CEG. Ainda, na IBD, o GDNF também possui efeito anti-apoptótico em células epiteliais intestinais. Em contraste, o NGF parece melhorar a inflamação do intestino (Coelho-Aguiar *et al.*, 2015). Durante o quadro de inflamação entérica crônica na IBD, as CEG se proliferam e liberam neurotrofinas, fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, as quais, por sua vez, amplificam as respostas imunitárias (Steinkamp *et al.*, 2003). Em culturas celulares primárias purificadas de CEG, a ativação por IL-1 β estimula a síntese e liberação de IL-6, que por sua vez, faz feedback inibitório de sua própria secreção. Após a estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro* ou citocinas, as CEG podem liberar mediadores tais como o NO, IL-6, IL-1 β ou prostaglandina E2.

O GDNF secretado em resposta a IL-1 β , ao TNF- α e LPS pode modular a apoptose das células epiteliais intestinais (Neunlist *et al.*, 2014).

Na doença de Crohn (DC) o SNE sofre infiltração linfocitária associada com a expressão glial do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), que por sua vez está associado com inchaço axonal ou esgotamento de organelas axonais, sugerindo que imunologicamente a CEG pode diretamente mediar danos ao SNE nessa doença (Geboes *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2010). Experimentos com cultura de tecidos já confirmaram a capacidade de fagocitose e indução de citocinas MHC II e ICAM-1 pelas CEG, enquanto que *in vivo*, a CEG parece ativar diretamente as células CD8+, podendo realmente ser alvo de células do sistema imunológico (Hollenbach *et al.*, 2000; Cornet *et al.*, 2001). Por outro lado, a imunidade inata no cérebro é controlada principalmente por receptores toll-like (TLR) expresso em células gliais, em especial nos astrócitos e microglia. Em condições saudáveis, os astrócitos mal expressam TLR, mas a sua expressão é rapidamente regulada após uma invasão bacteriana. Assim como os astrócitos, as CEG são as sentinelas do sistema imunológico residente, pois expressam TLR em níveis basais, apenas TLR3 e TLR5 em nível intermediário. Estes resultados indicam que as CEG, em conjunto com a capacidade de serem ativadas por danos exógenos e bactérias, também possuem os mecanismos moleculares potencialmente capazes de desencadear imunidade inata no intestino (Turco *et al.*, 2013).

As CEG expressam marcadores gliais chaves tais como S100B, GFAP e Sox10, havendo variabilidade significativa na expressão dos mesmos. O significado desta variabilidade dentro da CEG não é bem compreendido, não havendo um consenso quanto qual o melhor marcador de CEG, sendo GFAP e S100 os mais utilizados. Alterações na expressão dos níveis dos marcadores gliais GFAP e S100B têm sido observadas em vários distúrbios gastrointestinais associados a disfunções de barreira, incluindo distúrbios intestinais inflamatórios (Clairembault *et al.*, 2014; Grubišić e Gulbransen, 2017).

S100B:

A proteína S100B foi identificada na década de 60, sendo nomeada de S100 devido a sua solubilidade em solução de sulfato de amônia saturada a 100% (Moore, 1965). As proteínas S100 estão localizadas no citoplasma e/ou núcleo de uma ampla gama de tecidos nervoso e não nervoso. Nos tecidos nervosos, S100 ocorre como dímeros – $\beta\beta$ e $\alpha\beta$ com

predominância do homodímero- $\beta\beta$ (por exemplo, S100B) (Rühl, 2005). No SNC, a S100B é considerada a neurotrofina "face de Janus", pois dependendo da sua concentração no meio extracelular é capaz de exercer ações opostas. Em concentrações nanomolares possui atividade neurotrófica com efeito pró-proliferativo na astroglia e em neurônios serotoninérgicos, respectivamente, sendo capaz de modular o crescimento e diferenciação celular. Já em concentrações micromolares exerce função neurodegenerativa e determina a proliferação de células gliais e a amplificação da neuroinflamação (Cirillo, Sarnelli, Esposito *et al.*, 2011), tendo sido observada aumentada em diferentes neuropatologias como a Doença de Alzheimer e Síndrome de Down (Griffin, 2006). Concentrações elevadas de S100B em fluidos biológicos (sangue, urina, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva) têm sido considerados marcadores biológicos de condições patológicas, como tumores e lesões agudas do encéfalo, distúrbios psiquiátricos, neuroinflamatórias e neurodegenerativas, entre outros (Michetti *et al.*, 2012).

No TGI, a S100 é encontrada exclusivamente nas CEG, sendo considerada um marcador glial específico. Está localizada no citoplasma das CEG, onde regula a estrutura e função do citoesqueleto bem como a homeostase do Ca^{2+} (Rühl, 2005). Um aumento na expressão e na liberação desta proteína tem sido relatado em distúrbios do TGI. Em doença celíaca encontrou-se nível elevado de S100B em biopsias de duodeno e reto de humanos (Esposito *et al.*, 2007), assim como em colite ulcerativa (Cirillo *et al.*, 2009), ambas inflamações NO-dependentes. Quando administrada em segmentos de duodeno não inflamados, a S100B resultou tanto na expressão da proteína iNOS quanto na liberação de NO, indicando que em concentrações micromolares esta proteína participa da resposta inflamatória mesmo no "duodeno saudável" (Esposito *et al.*, 2007). A exacerbada expressão e liberação desta proteína foi observada em intestinos em estado inflamatórios (Cirillo *et al.*, 2009) e sabe-se ainda que diferentes tipos desta proteína estão envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer de cólon em humanos (Kiss *et al.*, 2001).

No geral, a S100B acumula-se no receptor para produtos finais avançados de glicação (RAGE) apenas em concentrações micromolares, interagindo com a *mitogen-activated proteína quinase* (MAPK) e conseqüentemente ativando a fosforilação do fator nuclear-kB (NF-kB) o qual, por sua vez, leva à transcrição de diferentes citocinas e da proteína iNOS. Assim, a S100B pode ser considerada como uma citocina pró-inflamatória facilitadora que ganha acesso ao espaço extracelular especialmente em reações imuno-inflamatória

intestinais (Cirillo, Sarnelli, Esposito *et al.*, 2011; Cirillo *et al.*, 2011b e 2012). Por outro lado, a expressão da proteína S100B também é positivamente regulada quando culturas primárias de CEG humana são expostas a bactérias patogênicas (*Escherichia coli*), mas não a probióticos (*Lactobacillus paracasei* F19). Esta regulação positiva está relacionada com o aumento da produção de NO a partir das CEG que expressam TLR e interagem diretamente respondendo ao insulto bacteriano. O potencial papel das CEG no desencadeamento das respostas inatas imunitárias é enfatizado pela demonstração de que estas células não só expressam TLR, mas são capazes de discriminar entre patógenos e probióticos por modulação da expressão TLR que, por sua vez, é especificamente regulada pelos tipos de bactérias que interagem com ele (Turco *et al.*, 2013).

Neste sentido, acumulam-se evidências de que o aumento nos níveis desta proteína não se limita a refletir o seu extravasamento em células danificadas (neural ou não neurais). A síntese e liberação de S100B em concentrações elevadas parecem ser fisiologicamente reguladas para participar de processos inflamatórios, comportando-se a S100B como uma citocina. Atualmente, o sistema nervoso pode ser considerado como fonte natural de S100B extracelular, visto que é o principal local de concentração e onde a maioria das condições patológicas, associadas com elevado níveis desta proteína em fluidos biológicos, investigados até a data, estão envolvidos. Outro local de concentração de S100B é o tecido adiposo, onde circulam moléculas com papéis ativos na regulação. Neurônios são considerados como células alvo naturais para S100B, enquanto há descrição de um efeito estimulante sobre a microglia e um efeito autócrino regulador sobre os astrócitos. É razoável supor que S100B circulante produz também efeitos sobre células não neuronais (Michetti *et al.*, 2012). Assim, abre-se a perspectiva desta proteína não ser apenas um biomarcador, tendo seus níveis aumentados meramente como consequência aos danos celulares, mas também ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento das condições patológicas em que está envolvida.

PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL:

Similarmente aos astrócitos a glia entérica madura é rica em proteínas GFAP. No intestino, a GFAP é considerada como um marcador específico de células gliais. Apesar disso, a GFAP não permite a distinção confiável entre a glia intrínseca e extrínseca, pois sua expressão também pode ser induzida em células de Schwann não-mielinizantes (Rühl *et al.*,

2004; Rühl, 2005), condrócitos, fibroblastos, células mioepiteliais e linfócitos (Middeldorp e Hol, 2011). Diversas variantes de GFAP foram descritas, embora o papel específico destes tipos na saúde e na doença permaneça relativamente inexplorados (Sullivan, 2014). Foi observado que a principal isoforma expressa pela CEG é a GFAP κ (Clairembault *et al.*, 2014), diferente do encéfalo humano, no qual o transcripto GFAP κ é aproximadamente 1% dos transcriptos do GFAP α (Sullivan, 2014).

No cérebro, os níveis de expressão de GFAP são modulados por diferenciação de astrócitos, inflamações e lesões. No SNC, identificar as mudanças gliais pode fornecer uma imagem única da progressão da doença, permitindo intervenção médica precoce para controlar os sintomas (Sullivan, 2014). Assim, alterações na expressão e fosforilação da GFAP têm sido consistentemente relatadas no SNC durante o desenvolvimento, envelhecimento e em várias doenças, incluindo doença de Alexander, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, demência fronto-temporal, DP e esclerose lateral amiotrófica), acidente vascular cerebral e lesão cerebral traumática. A alta expressão de GFAP é uma característica bem conhecida de astrócitos reativos no SNC, no entanto, se o mesmo também ocorre no intestino ainda não é totalmente aceito (Coelho-Aguiar *et al.*, 2015). Por outro lado, no SNP, uma lesão nervosa induz a expressão de GFAP em células mielinizantes e células de Schwann, não-mielinizantes (Rühl, 2005). Tem sido descrito que no SNE os níveis de GFAP aumentam durante quadros inflamatórios (Von Boyen *et al.*, 2011). Em analogia ao SNC, tem sido proposto que a up-regulation da GFAP no intestino é induzida pela ativação de CEG (Clairembault *et al.*, 2014; Sullivan, 2014). Curiosamente, a redução na expressão de GFAP foi relatada no íleo não inflamado de pacientes com DC (Cornet *et al.*, 2001). Essas observações indicam que a expressão de GFAP é dinamicamente regulada e reflete o estado funcional da CEG (RÜHL, 2005). Não apenas a expressão de GFAP é variável, mas as expressões diferenciais de combinações de GFAP, S100B e Sox10 nos diferentes subtipos gliais (I-IV) sugere que a expressão de genes específicos das CEG seja um processo muito dinâmico e que pode ser influenciado por fatores variados espacialmente e temporalmente (Boesmans *et al.*, 2015). Coerente com a observação de que o intestino está em um contínuo estado de inflamação fisiológica, o nível de expressão de GFAP na CEG aparece maior do que o observado normalmente em astrócitos no SNC (Rühl *et al.*, 2004). Os mecanismos responsáveis pela gliose reativa (processo de proliferação, aumento da expressão e síntese de proteínas celulares, tais como GFAP e da secreção de citocinas) no intestino inflamado não estão

totalmente definidos. Sabe-se que a taxa de proliferação das CEG é afetada por citocinas, as quais são expressas de modo diferenciado em modelos animais de colite, como anteriormente referido (Rühl, Trotter *et al.*, 2001).

Comparação de dados *in vitro* com modelos animais de inflamação intestinal propõem que a proliferação glial, durante o quadro inflamatório intestinal, é um processo diferencialmente regulado ao longo do SNE. Alguns estudos têm focado no comportamento da GFAP no SNE e os resultados são controversos. Foi observado na mucosa intestinal de pacientes com IBD sinais de anomalias na rede glial entérica juntamente com o aumento da expressão de fatores específicos derivados da CEG (ou seja, GFAP e S100B) (Cabarrocas *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2007; Cirillo *et al.*, 2009). Em biópsias de porções intestinais inflamadas de pacientes com colite ulcerativa foi observado um elevado aumento de CEG GFAP-positiva em comparação com o controle. As biópsias de porções intestinais não inflamadas de pacientes com colite ulcerativa caracterizaram-se por uma rede mais densa de CEG que os controles, mas significativamente menos densa que a observada nas seções inflamadas. Biópsias de cólon inflamados de pacientes com DC também apresentaram um aumento na expressão da GFAP, mas este aumento foi menos impressionante do que em pacientes com colite ulcerativa. Porções de cólon sem inflamação de pacientes com DC demonstraram uma marcação reduzida de GFAP em comparação com estruturas não-inflamadas do intestino de pacientes com colite ulcerativa (Von Boyen *et al.*, 2011). No mesmo sentido, culturas de células gliais, incubadas e tratadas com citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF α , IL-4, interferon- γ) e pelo vasoconstritor endotelina-1, assim como com LPS, também apresentaram um aumento significativo de GFAP (Von Boyen *et al.*, 2004; Von Boyen e Steinkamp, 2010).

Por outro lado, algumas patologias intestinais têm demonstrado diminuição da expressão ou imunorreatividade do GFAP, como o observado por Cornet *et al.* (2001), em outro estudo com DC na qual houve diminuição nos processos GFAP imunoreativos nas amostras intestinais, sugerindo que a CEG seja direcionada especificamente por mecanismos imunitários ou não imunitários (por exemplo, antígeno viral não próprio). Assim como a intensidade da imunocoloração GFAP de gânglios do plexo submucoso de jejuno de camundongos duplo transgênicos (ratos que expressam um antígeno neoself viral em astrócitos e CEG, foram cruzados com ratos transgênicos de receptores de células T específicas, resultando em depleção apoptótica de CEG) foi significativamente menor que no controle. Para os autores a ausência de inflamação intestinal pode ocorrer devido a ruptura

da CEG não ter sido profunda o suficiente para causar grave inflamação, não afetando o número de estruturas de GFAP neste modelo (Aube *et al.*, 2006). Dados semelhantes foram observados por Kleinschmidt *et al.* (2011) em gatos com enterite linfocítica plasmocitária, o que pode indicar redução no número de CEG e pode refletir em uma alteração destas como observado e descrito no íleo na DC e na enterocolite necrosante (Bush, 2002), ou no cólon de pacientes com IBD (Neunlist *et al.*, 2008) e de ratos diabéticos (Liu *et al.*, 2010).

Como referido no item anterior, no cólon de pacientes com Doença de Chagas foi observada destruição neuronal, em porções dilatadas e não dilatadas, precedida pela perda da CEG. Entretanto, as porções não dilatadas apresentaram maior expressão de GFAP quando comparadas às porções dilatadas e ao grupo não infectado, sugerindo que esta proteína impeça a dilatação do órgão e proteja o SNE do processo inflamatório e da destruição neuronal, além de impedir a expansão da doença para áreas não afetadas do cólon (Da Silveira *et al.*, 2009). Danos estruturais em filamentos de CEG GFAP positivas também foram observados em segmentos entéricos de ratos submetidos a um protocolo de isquemia e reperfusão, tal resultado é justificado pelos autores pelos filamentos de GFAP serem fosforilados e desagregados após o insulto nas CEG (Thacker *et al.*, 2011).

LIPOPOLISSACARÍDEO:

A inflamação intestinal acompanha alterações na permeabilidade entérica e os papéis da CEG na inflamação da mucosa têm sido investigados. Semelhante aos astrócitos do SNC, as CEG são reconhecidas como células imunocompetentes que possuem capacidade de produzir e responder a uma variedade de quimiocinas e citocinas (Yu e Li, 2014). O TGI é a primeira linha de defesa contra endotoxinas, havendo falhas na detecção e desativação das mesmas pode ocorrer quadros inflamatórios locais, sistêmicos, endotoxemia e até mesmo morte (Mani *et al.*, 2012). Um modelo largamente utilizado para provocar respostas inflamatórias e ativação do sistema imunitário inato via sinalização do TLR, tanto central quanto periférico, é o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente tanto na parede de bactérias gram negativas, como também encontrada nas CEG (Hoshino *et al.*, 1999; Von Boyen *et al.*, 2004; Brahmachari *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2011).

A ativação da resposta imune inata, pela administração sistêmica de LPS produz inflamação com respostas neuroendócrinas e neuroquímicas que atuam em sinergia com o estresse (Cunningham e Sanderson, 2008). Já foi observado que a administração de LPS (por

injeção intraperitoneal ou intracerebroventricular, em culturas de astrócitos ou mesmo em cortes de hipocampo) promove um aumento na expressão de GFAP dos astrócitos e altera os níveis extracelulares de S100B (Brahmachari *et al.*, 2006). As expressões de proteína GFAP e S100B derivadas das CEG aumentam com a administração de LPS em culturas de CEG e de cólon dissecado (Von Boyen *et al.*, 2004; Cirillo, Sarnelli, Turco *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Coquenlorge *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram obtidos em cultura celular derivada de biópsias do cólon de pacientes colite ulcerativa (De Filippis *et al.*, 2011). Em culturas de astrócitos primários e fatias hipocampais, o LPS, após administração intraperitoneal, estimula a secreção de S100B e também induz um rápido aumento nos níveis de S100B no líquido cefalorraquidiano (Guerra *et al.*, 2011). Já foi descrito que a administração de LPS por via intravenosa leva a uma resposta específica das CEG mioentéricas GFAP positivas. Sendo estas capazes de responder a um ambiente inflamatório dentro de um curto período de tempo através da ativação da glia da mucosa (Rosenbaum *et al.*, 2016).

O TGI é um grande reservatório de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Ley *et al.*, 2006), onde as bactérias gram-negativa funcionam como uma fonte de endotoxina LPS (Mani *et al.*, 2012). Embora o LPS intestinal seja considerado inofensivo e proporcione efeitos protetores contra lesões epiteliais, também tem sido sugerido que o LPS provoque inflamação intestinal, como a enterocolite necrosante, e que se encontra em alta concentração em uma lesão intestinal (Im *et al.*, 2012). Assim, os intestinos representam tanto uma barreira principal como uma fonte principal de endotoxina (Mani *et al.*, 2012). O LPS induz a ativação das funções da barreira intestinal através da ativação de mediadores químicos (eicosanóides, IL-1, IL-6, TNF- α , NO), prejudicando células epiteliais e suas junções. A integridade da barreira intestinal é um importante determinante clínico no resultado da endotoxemia, sua falha - induzida por LPS - leva a diversos efeitos biológicos, incluindo o choque letal e a falência múltipla de órgãos, sendo esta resposta inflamatória ao LPS conhecida por variar em diferentes segmentos intestinais (Yue *et al.*, 2013). Doenças intestinais e tensões ambientais e metabólicas resultam na diminuição da integridade de barreira das células epiteliais intestinais (Shimizu *et al.*, 2011; Mittal e Coopersmith, 2014). Considerando a proximidade das CEG às células epiteliais intestinais e seu papel de mediadores atuando na função da barreira mucosa, tem sido proposto que as CEG são um componente essencial para a integridade da parede intestinal (Von Boyen *et al.*, 2004; Guerra *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Coquenlorge *et al.*, 2014). Já foi observado, por exemplo, durante um protocolo de nutrição parenteral total

intravenosa, que a perda da função da barreira intestinal afeta todo o intestino delgado e ceco, mas não o cólon. Provavelmente por este possuir diferentes características de permeabilidade em relação ao intestino delgado, incluindo maior resistência elétrica e menor permeabilidade ao movimento passivo de ions, além de conter maior número de micróbios, possuindo assim maior capacidade de eliminar bactérias translocadas (Yue *et al.*, 2013).

Durante a inflamação o SNE responde a uma ampla gama de mediadores e a desafios bacterianos como LPS, em que expressa uma grande variedade de receptores TLRs. Neurônios entéricos expressam TLR4 (e as conseqüências funcionais dessa ativação permanecem desconhecidas), os plexos mioentérico e submucoso expressam TLR3 e TLR7, e as CEG TLR3, TLR4 e TLR7 (Coquenlorge *et al.*, 2014). Sob a estimulação de LPS, as CEG poderiam exercer efeito protetor sobre as funções da barreira intestinal epitelial por inibição do aumento de atividade da síntese do NO induzida pelo LPS. Um estudo recente demonstrou que o receptor TLR2, o qual desempenha um papel chave nas estruturas microbianas de sensoriamento, é expresso nas CEG. No intestino, o TLR2 exerce efeitos citoprotetores em células epiteliais intestinais e regula a função da barreira epitelial. Além disso, o TLR2 poderia estimular a expressão intestinal de GDNF através da NF-kB e da p38 ativada por mitogênio de sinalização da via proteína-quinase (Yu e Li, 2014). TLR2 também foi expresso em neurônios entéricos, CEG e células do músculo liso da parede intestinal de camundongos (Brun *et al.*, 2013).

Em segmentos entéricos humanos da musculatura longitudinal/plexo mioentérico e em cultura primária entérica de ratos, ambos tratados com LPS, foi observado um aumento na produção de TNF- α por neurônios entéricos dependentes de TLR2. Sabe-se que o TLR2 interfere na resposta de reação à inflamação e suspeita-se que esta produção também possa induzir uma reatividade glial entérica. Além disso, o LPS amplificou a produção de IL-6, a qual possui um papel central na geração de respostas na fase aguda da inflamação e diferenciação de linfócitos. No SNE a IL-6 aumenta a excitabilidade neuronal e pode participar da disfunção do TGI associada à inflamação intestinal ou síndrome do intestino irritável, podendo ainda reduzir a sobrevivência neuronal (Coquenlorge *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que o TLR2 é necessário para manter a integridade e a proteção contra a colite e sua deficiência genética induz anomalias na estrutura, função e codificação neuroquímica do SNE de camundongos (Brun *et al.*, 2013), assim, este aumento induzido pelo LPS poderia estar envolvido na participação de uma resposta protetora contra desafios inflamatórios ou infecciosos (Coquenlorge *et al.*, 2014).

Em modelo de cultura animal, a adição de LPS também promoveu a secreção de IL-1 β pelas CEG (Murakami *et al.*, 2009) e desencadeou um aumento na expressão de GFAP indicando uma estimulação próinflamatória nessas células (Von Boyen *et al.*, 2004), enquanto *in vivo* foi observado um aumento da contratilidade, da expressão de Fos e de citocinas tanto nos neurônios entéricos como nas CEG, especulando-se assim que esta endotoxina estimula a ativação de todo o SNE (Duncan *et al.*, 2008).

O intestino é um órgão mecanicamente ativo com um microambiente dinâmico, sendo a gliogênese no SNE adulto regulada por danos ou condições inflamatórias (Rao e Gershon, 2015). A administração de LPS (por injeção intraperitoneal ou intracerebroventricular, em culturas de astrócitos, ou mesmo em fatias de hipocampo) promove um aumento na expressão de GFAP nos astrócitos e altera os níveis extracelulares de S100B (Brahmachari *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2011). As expressões de proteína GFAP e S100B derivadas da enteroglia aumentam com a administração de LPS no cólon dissecado e de cultura de CEG (Von Boyen *et al.*, 2004; Cirillo, Sarnelli, Esposito *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Coquenlorge *et al.*, 2014). Atualmente, existe apenas uma evidência da existência de dados *in vivo* para confirmar o impacto da atividade de CEG na resposta a uma única dose elevada de LPS (Rosenbaum *et al.*, 2016) como observado no tecido cerebral (Guerra *et al.*, 2011; Borges *et al.*, 2012; Ifuku *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2015). Desta forma, é necessário avaliar os efeitos da administração sistêmica de LPS *in vivo*, em diferentes concentrações e tempos, nas expressões de proteínas enterogliais GFAP e S100B e em diferentes segmentos do intestino (duodeno, ceco e cólon proximal). As CEG estão provavelmente envolvidas na maioria dos processos fisiológicos e fisiopatológicos do intestino, e estamos apenas começando a descobrir suas diversas funções no TGI (Gulbransen, 2014). A utilização de diferentes modelos e doses que induzam a inflamação do SNE é necessária para a compreensão da fisiologia e das funções fisiopatológicos das CEG, sendo assim necessários mais estudos a respeito do tema.

CHINCHILAS:

A *Chinchilla lanigera* pertence à ordem Rodentia (subordem Hystricomorpha e família Chinchillidae) e caracteriza-se por possuir uma longa cauda, grossa, que forma uma porção distal mais ouriçada, sendo roedores que despertam grande interesse na criação comercial (Spotorno *et al.*, 2004; Carleton e Musser, 2005). Tanto a caça comercial, com início em 1828,

quanto a criação em cativeiro, com início no século XX, foram motivadas pelas características ímpares da pelagem (cerca de 30 vezes mais macia que o cabelo humano e muito densa, com pelos longos de 2 a 4 cm, emergindo 50-75 fios de um único folículo da pele, com cerca de 20.000 pelos/cm²). No Brasil, a criação concentra-se no Rio Grande do Sul, maior exportador de peles de chinchila. Além da comercialização das peles, a domesticação desses animais proporcionou a atual utilização como animais de estimação, por serem considerados limpos, sem cheiro e amigáveis, podendo ser mantidos facilmente em cativeiro e treinados (Jiménez, 1996; Ozdemir *et al.*, 2008).

Há trabalhos sobre os cuidados básicos necessários à criação e hábitos de chinchilas (Donnelly e Brown, 2004), mas ainda são poucas as informações científicas detalhadas sobre as enfermidades que acometem a espécie, a maioria destas informações baseia-se em comunicação oral ou em relatos de casos por parte de médicos veterinários ou criadores, divulgadas na Internet. Os trabalhos utilizando esta espécie vão desde alguns estudos anatômicos, fisiológicos e auditivos, à aspectos reprodutivos. Os estudos anatômicos descrevem os territórios vasculares (De Castro *et al.*, 2007; De Araujo e Campos, 2009), o arterial cardíaco (Ozdemir *et al.*, 2008), a inervação espinhal (De Oliveira Gamba *et al.*, 2007; Martinez-Pereira e Rickes, 2011) e o aparelho digestório (Cevik-Demirkan *et al.*, 2007; De Castro *et al.*, 2010; Stan *et al.*, 2014). Enquanto a fisiologia busca alguns aspectos gerais como a regulação do metabolismo hídrico (Cortés *et al.*, 2000), a termorregulação (Cortés *et al.*, 2000), hábitos alimentares (Cortés *et al.*, 2002; Grant, 2014), monitoramento endócrino (Mastromonaco *et al.*, 2015), exigências líquidas para ganho de peso (Antonio *et al.*, 2007) e pressão intraocular em diferentes faixas etárias (Chacaltana *et al.*, 2016). Já os estudos de aspectos reprodutivos destes animais em cativeiro buscam melhores índices de produtividade (Bekyürek *et al.*, 2002; Busso, J. *et al.*, 2005; Busso, J. M. *et al.*, 2005; Busso *et al.*, 2007; Leal e França, 2008; Leal e França, 2009; Niedbała *et al.*, 2015). Atualmente, temos estudos comparando os tipos de anestésicos utilizados nesses animais (Fox *et al.*, 2016), enquanto outros estudos buscam compreender melhor os comportamentos nocivos de animais confinados (Franchi *et al.*, 2016). Ainda, estes animais, por possuírem uma curva de audibilidade semelhante à dos seres humanos (Heffner e Heffner, 1991), são utilizadas como modelo experimental para estudos sobre audição (Spotorno *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2015), sensibilidade auditiva (Nelson e Kiester, 1978) e percepção sonora por meio de condicionamento (Shofner, 2002). Outros estudos ainda descreveram as áreas do sistema

nervoso central (SNC) envolvidas na percepção auditiva (Harel *et al.*, 2000; Langner *et al.*, 2002; Pienkowski e Harrison, 2005a; b), como também no mapeamento do sistema vestibular nesses animais (Hullar e Williams, 2006).

Dentre as patologias estudadas em *Chinchilla lanigera* são destacadas algumas de origem bacteriana (Naglić *et al.*, 2003; Kimpe *et al.*, 2004; Forbes *et al.*, 2008; Bakaletz, 2009; Lucena *et al.*, 2012; Diaz *et al.*, 2013), algumas viroses (Wohlsein *et al.*, 2002; Morton *et al.*, 2004; Buchinsky *et al.*, 2007), micotoxicoses associadas a dietas inadequadas ou a rações contaminadas (Pereyra *et al.*, 2008; Cepeda *et al.*, 2011) e endoparasitoses (Holmberg *et al.*, 2007; Staebler *et al.*, 2007; Levecke *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011; Veronesi *et al.*, 2012; D'ovidio *et al.*, 2015; Petroneto *et al.*, 2015; Qi, Luo *et al.*, 2015; Qi, Yu *et al.*, 2015; Cardia *et al.*, 2016).

Com relação ao trato digestório, há estudos referentes a digestão e absorção de carboidratos (Krishnamurti *et al.*, 1974), comparações anatômicas entre o intestino grosso de chinchilas e coelhos (Stan *et al.*, 2014), anatomia e desordens dentárias (Crossley *et al.*, 1997; Mans e Jekl, 2016) bem como uma breve descrição macroscópica do TGI, ração utilizada e doenças intestinais mais frequentemente relatadas (Johnson-Delaney, 2006).

Estudos anatômicos descrevem o trato gastrintestinal (TGI) destes animais como sendo longo e com a complexidade encontrada em lagomorfos (Johnson-Delaney, 2006; De Castro *et al.*, 2010). O ceco é menor, quando comparado aos coelhos, e apresenta uma porção sacular espiralada, seguida de uma porção tubular que se continua em um cólon ascendente longo, que possui três partes (alça proximal, porção intermediária simples e porção distal longa), o cólon transverso é a porção mais curta, enquanto o cólon descendente se caracteriza por formar numerosas circunvoluções (De Castro *et al.*, 2010; Stan *et al.*, 2014). O ceco desses animais é responsável pela retenção de teor maior de matéria seca do conteúdo do intestino grosso, quando comparados a coelhos e porcos-da-índia (Hillyer *et al.*, 1997). Esta organização macroscópica permite inferir que seja necessário um sistema de controle nervoso complexo, para que ocorra o seu pleno funcionamento.

As chinchilas e os coelhos - ordem rodentia e lagomorfa, respectivamente - são verdadeiros herbívoros não ruminantes, com processo digestivo caracterizado pela fermentação no intestino grosso e com a maior parte da digestão acontecendo no ceco e no cólon ascendente (Stan *et al.*, 2014). As características anatômicas do TGI destes roedores herbívoros, contribuem para o desenvolvimento de diversas patologias. Condições como o TGI

muito longo, o ceco volumoso e o trânsito intestinal lento em associação com o fornecimento de uma dieta rica em grãos e leguminosas, permitem o fácil acometimento de CT, com rápido agravamento do quadro (Quinton, 2005). O número de animais não exóticos mantidos como animais de estimação tem aumentado em todo o mundo (Veronesi *et al.*, 2012) e os hábitos alimentares desses roedores em cativeiro são pouco estudados e mudam constantemente em função da experiência e novos conhecimentos adquiridos (Hillyer *et al.*, 1997; (Antonio *et al.*, 2007).

Há rações comerciais disponíveis para chinchilas, entretanto são baseadas em misturas de rações de coelhos, porcos-da-Índia e de outros roedores, fornecidas com um suplemento de vitamina C, sendo a fórmula mais aceita numa proporção de 10-20% de proteínas, 2-5% de gordura e 15-35% de fibras (Weeb, 1994; Hillyer *et al.*, 1997; Johnson-Delaney, 2006). Sabe-se que alterações na dieta devem ser graduais, pois mudanças dietéticas bruscas podem resultar em doenças graves como a própria CT (Spotorno *et al.*, 2004), a qual tem se mostrado elevada em chinchilas de cabanhas (Hillyer *et al.*, 1997).

CÓLICA TIMPÂNICA (CT):

A CT é uma doença metabólica que pode ser desencadeada por alteração na dieta e caracterizada pela distensão acentuada da parede do ceco devido ao acúmulo ou à incapacidade de expulsar os gases produzidos em excesso por mecanismos fisiológicos durante a digestão fermentativa, acarretando dificuldade respiratória e circulatória, com asfixia e morte (Hironaka, 1992).

A doença manifesta-se especialmente quando há alteração súbita na alimentação de hidratos de carbono altamente fermentáveis (Johnson-Delaney, 2006; Radostits *et al.*, 2006) e apresenta duas formas de quadro clínico: a cólica primária ou metabólica e a cólica mecânica. A primeira possui a etiologia relacionada ao aumento na tensão superficial do líquido intestinal ou de sua viscosidade, fato relacionado à presença de saponinas e pectinas, particularmente nas leguminosas (alfafa), que em excesso permitem que bactérias e protozoários intestinais aumentem a produção de secreção viscosa, que irá ligar-se ao gás produzido durante o metabolismo normal destes microrganismos e, desta forma, impedindo sua eliminação (Hironaka, 1992). Em função da carência de estudos mais específicos sobre a dieta ideal de chinchilas em cativeiro, a frequência da CT em animais de cabanhas e de estimação se apresenta elevada (Hillyer *et al.*, 1997).

Por meio de um modelo de protocolo experimental, foi observado que chinchilas acometidas pela CT apresentam aumento do volume do ceco, da porção intercecal e dos segmentos do cólon, bem como focos de isquemia nos tecidos da junção íleo-cecal e cólon ascendente. Também foi descrito um processo inflamatório agudo, mais evidente nas regiões do ceco e cólon ascendente dos animais timpânicos, com a presença de infiltrados inflamatórios, indicando que o SNE sofre modificações frente a CT (Martinez-Pereira *et al.*, 2014). Não há estudos sobre a CEG de chinchilas e, não se conhece, portanto, sobre o efeito de quadro inflamatório provocado por alteração alimentar sobre a glia entérica. Sabe-se, no entanto, que estudos em ratos, que examinam os efeitos da manipulação alimentar, revelam que o número de CEG parece ser influenciado pela dieta (revisão de Voss *et al.*, 2013; Sharkey, 2015).

Com base em todo o exposto, optamos por trabalhar com distintos protocolos de inflamação em diferentes modelos animais. A primeira parte deste estudo teve como base um protocolo já utilizado para análise da glia no SNC de ratos submetidos a distintas doses de LPS i.p. Neste primeiro momento nosso objetivo foi descrever o comportamento da glia entérica frente aos efeitos das diferentes doses de LPS utilizadas e compará-lo ao já descrito nos astrócitos do SNC. Já a segunda parte deste estudo é a continuidade de um trabalho anterior no qual foi utilizado o protocolo de CT em chinchila. Neste primeiro estudo realizamos uma análise de distintos segmentos intestinais para obter um melhor entendimento da distribuição ganglionar e arquitetura das redes entéricas interganglionares e encontramos respostas diferenciadas do TGI ao timpanismo, o qual afetou principalmente os neurônios do plexo mioentérico do ceco e do cólon ascendente das chinchilas. Desta forma, a segunda parte deste trabalho objetiva compreender o comportamento das CEG dessas regiões, gerando assim informações inéditas quanto ao desenvolvimento da inflamação na CEG e, também, informações complementares em relação a uma resposta inflamatória quando utilizado o protocolo de CT.

ARTIGO I: ENTERIC GLIAL REACTIVITY TO SYSTEMIC LPS ADMINISTRATION: CHANGES IN GFAP AND S100B PROTEIN

OBJETIVO ESPECÍFICO

Nesta etapa buscou-se elucidar o grau de inflamação no sistema nervoso entérico de ratos submetidos a diferentes protocolos (tempo e doses) de LPS intraperitoneal, verificando e classificando o grau de inflamação através da técnica histológica de hematoxilina e eosina (H&E). Também determinamos os conteúdos das proteínas S100B e GFAP através de ELISA, bem como a secreção de S100B, e ainda, qualitativamente a imunohistoquímica destas proteínas.

METODOLOGIA

ESTUDO HISTOLÓGICO: Esta etapa constitui-se de procedimento de coloração histológica que permitiu: (1) classificar o grau de inflamação da parede do TGI dos diferentes segmentos estudados (duodeno, ceco e cólon proximal) por meio de técnica de H&E; (2) descrever as modificações morfológicas encontradas em cada segmento do TGI.

Para a análise histológica foram utilizados cortes de diferentes regiões entéricas de 06 animais controle e 30 animais considerados LPS agudos (que receberam apenas uma injeção intraperitoneal de 250 µg/kg ou 2500 µg/kg de LPS). Os animais foram divididos em dois grupos de 15 animais cada conforme a dose. Os animais foram mortos em diferentes tempos após o recebimento da injeção (05 animais por grupo): 1 h, 24 h e 07 dias (7D).

Os cortes foram fixados em paraformaldeído 4%, incluídos em parafina, os blocos foram cortados a 10 µm no micrótomo, corados com hematoxilina-eosina e as lâminas montadas. As mesmas foram analisadas por dois observadores Cegos e a análise e quantificação da inflamação foi baseada no trabalho de Dieleman *et al.* (1998).

SECREÇÃO DE S100B: constitui-se em quantificar a concentração da proteína S100B secretada no meio extracelular entre animais controle e animais que receberam diferentes doses (250 e 2500 µg/kg) de LPS intraperitoneal e foram mortos em diferentes tempos (1 h, 24 h e 7 D), visto que a secreção de S100B é utilizada como um parâmetro de ativação e/ou

morte glial em diversas situações de dano. Este procedimento foi realizado em fatias de duodeno, ceco e cólon proximal.

Para esta técnica foram utilizadas porções entéricas de até 08 animais por grupo LPS, que receberam uma única dose de 250 ou de 2500 µg/kg de LPS intraperitoneal e foram separados em distintos grupos conforme o tempo em que seriam mortos após a dose: 1 h, 24 h ou 7 Dias (D). Os cortes foram colocados em triplicata em placas de 24 poços contendo 400 µl do tampão hepes-salina cada. O meio foi trocado a cada 15 minutos até chegar ao tempo de 1 h 30 min, onde então foi coletado e analisado. O material foi quantificado através da técnica de ELISA já previamente padronizada (Leite *et al.*, 2008).

S100B INTRACELULAR: consta em quantificar o conteúdo de S100B intracelular em diferentes porções entéricas de animais que receberam diferentes doses (250 e 2500 µg/kg) de LPS intraperitoneal e foram mortos em diferentes tempos (1 h, 24 h e 7 D), visto que as diferentes regiões entéricas podem responder de forma distinta em situações de dano e serem atingidas em diferentes intensidades.

Para a padronização do conteúdo intracelular da proteína S100B foram utilizadas porções entéricas (duodeno, ceco e cólon proximal) de até 08 animais por grupo LPS divididos em grupos de 1 h, 24 h e 7 D. Cada corte de tecido foi lisado em 400 µl de solução de lise com inibidor de protease em tampão fosfato. O tecido foi diluído na concentração de 1:200 e o material foi quantificado através da técnica de ELISA já previamente padronizada (Leite *et al.*, 2008).

GFAP INTRACELULAR: consta em quantificar o conteúdo de GFAP em diferentes porções entéricas de animais que receberam diferentes doses (250 e 2500 µg/kg) de LPS intraperitoneal e foram mortos em diferentes tempos (1 h, 24 h e 7 D), visto que a proteína GFAP é considerada um marcador de células gliais e seus níveis encontram-se aumentados durante períodos de inflamação indicando que a expressão de GFAP é regulada e reflete o estado funcional da glia.

Para a padronização do conteúdo da proteína GFAP foram utilizadas porções entéricas de até 08 animais por grupo LPS divididos em grupos 1 h, 24 h e 7 D. Cada corte de tecido foi lisado em 400 µl de solução de lise com inibidor de protease em tampão fosfato. O tecido foi

diluido na concentração de 1:100 e o material foi quantificado através da técnica de ELISA já previamente padronizada (Tramontina *et al.*, 2007).

RESULTADOS

ARTIGO I

**Enteric glial reactivity to systemic LPS administration:
Changes in GFAP and S100B protein**

Neuroscience Research, aceito em 27/12/2016



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neures

Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein



Raphaella da Cunha Franceschi^{a,b}, Patrícia Nardin^c, Clivia Valle Machado^{a,b},
Lucas Silva Tortorelli^c, Malcon Andrei Martinez-Pereira^d, Caroline Zanotto^c,
Carlos-Alberto Gonçalves^{b,c,*}, Denise Maria Zancan^{a,b}

^a Laboratory of Comparative Neurobiology, Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^b Graduate Program in Neuroscience, ICBS, UFRGS, Brazil

^c Laboratory of Calcium-Binding Proteins, Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Brazil

^d Health Science Center, University of Cruz Alta, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2016

Received in revised form

29 November 2016

Accepted 27 December 2016

Available online 4 January 2017

Keywords:

Enteric glia cell

GFAP

Inflammation

LPS

S100B

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) is used to induce inflammation and promotes nervous system activation. Different regions of the brain present heterogeneous glial responses; thus, in order to verify whether systemic LPS-induced inflammation affects the enteric glia differently across the intestinal segments, we evaluated the expressions of two glial activity markers, GFAP and S100B protein, in different intestine segments, at 1 h, 24 h and 7 days after acute systemic LPS administration (0.25 or 2.5 mg kg⁻¹) in rats. Histological inflammatory analysis indicated that the cecum was most affected when compared to the duodenum and proximal colon at the highest doses of LPS. LPS induced an increased S100B content after 24 h in all three regions, which decreased at 7 days after the highest dose in all regions. Moreover, at 24 h, this dose of LPS increased *ex-vivo* S100B secretion only in the cecum. The highest dose of LPS also increased GFAP in all regions at 24 h, but earlier in the cecum, where LPS-induced enteric S100B and GFAP alterations were dependent on dose, time and intestine region. No associated changes in serum S100B were observed. Our results indicate heterogeneous enteric glial responses to inflammatory insult, as observed in distinct brain areas.

© 2017 Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

1. Introduction

For over forty years, astrocytic characteristics have been recognized in the enteric glia cell (EGC) (Gabella, 1971, 1981). The similarities between astrocytes and the enteric glia have been demonstrated in both morphological (Gabella and Trigg, 1984; Hanani and Reichenbach, 1994; Komuro et al., 1982) and func-

tional (Aube et al., 2006; Ferri et al., 1982; Hoff et al., 2008; Jessen and Mirsky, 1980, 1983; Kimball and Mulholland, 1996; Nasser et al., 2006a) aspects. Even in response to different insults, such as inflammation and infection, similarities are observed between the responses of the astrocytes and the enteric glia (Cabarrocas et al., 2003; Coelho-Aguiar et al., 2015). Despite these similarities, there is growing evidence of important diversity among enteric glia (Boesmans et al., 2015; Rao et al., 2015).

The characteristic response of the astrocytes to these insults is called reactive astrogliosis, in which increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and extensively-modified enzymatic metabolism are observed (Anderson et al., 2014; Eddleston and Mucke, 1993; Kálmán, 2004; Ridet et al., 1997). Brain reactive gliosis is a complex process that has been intensively investigated in many conditions of injury and diseases. The response to injuries in the enteric glia has been less well characterized. The S100B protein, another astrocyte marker of glial activation in the brain tissue is also expressed by the glial elements of the enteric nervous system (Cirillo et al., 2011a) and its expression is affected by gastroin-

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; EGC, enteric glia cell; ENS, enteric nervous system; EGTA, ethylene-bis-(oxyethylenitrilo)-tetracetic acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid; LDH, lactate dehydrogenase; LPS, lipopolysaccharide; NR, Neutral Red; OPD, *o*-phenylenediamine; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PBS, phosphate-buffered saline; RAGE, receptor for advanced glycation end-products; TLR, Toll-like receptor; UC, ulcerative colitis.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

E-mail address: casg@ufrgs.br (C.-A. Gonçalves).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2016.12.005>

0168-0102/© 2017 Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

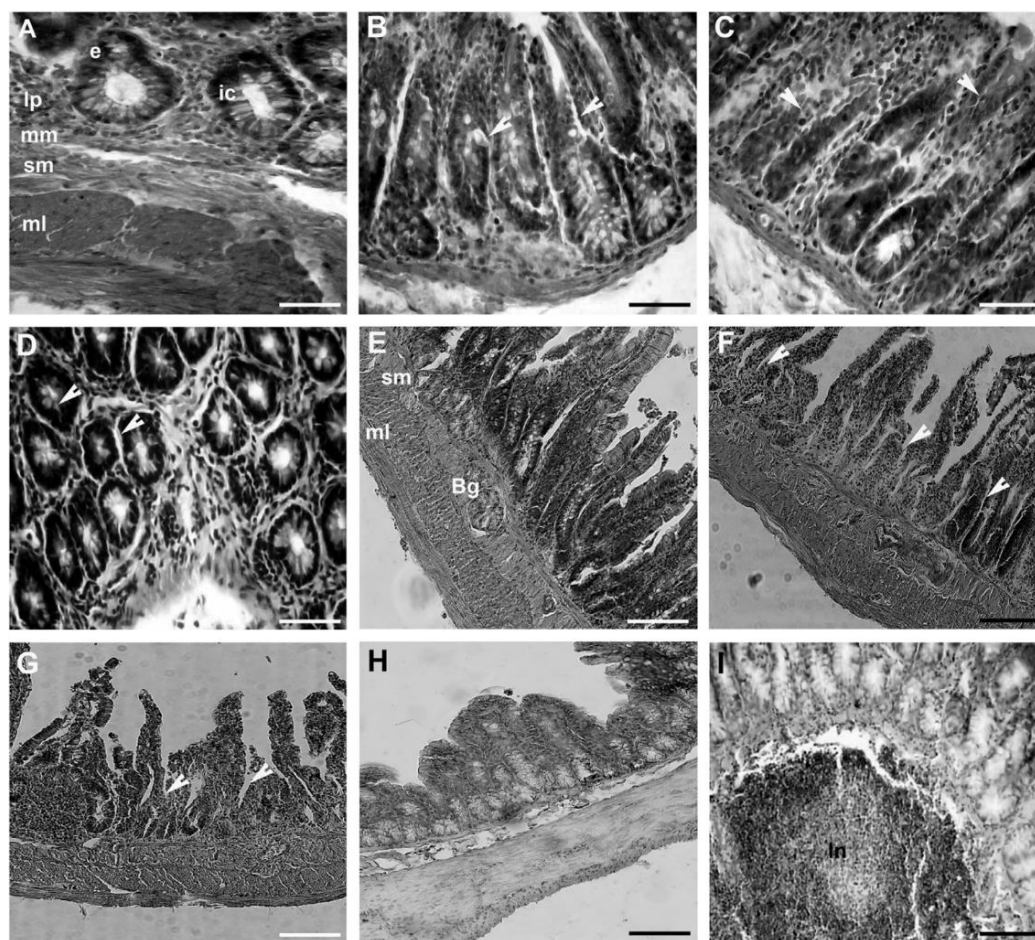


Fig. 1. Representative horizontal sections of the small and large intestines of rats treated with i.p. LPS (hematoxylin-eosin staining). (A) cecum, control: intestinal crypts (ic), epithelium (e), lamina propria (lp), muscularis mucosa (mm), submucosa (sm) and muscular (ml) layers. (B) cecum, LPS 0.25/24 h. (C) cecum, LPS 0.25/7 days. (D) cecum, LPS 2.5/24 h. (E) duodenum, control: Brunner's glands (Bg). (F) duodenum, LPS 0.25/24 h. (G) duodenum, LPS 2.5/24 h. (H) proximal colon, control. (I) proximal colon LPS 2.5/7 days. Dense infiltrate of inflammatory cells in the epithelium and lamina propria of the mucosa was observed (B–D; F, G). The arrowheads indicate the focal loss of intestinal crypt organization (B–D; F, G). After 7 days of LPS injection there was recovery of the organization and morphology of the crypts (I), as well as the lymph nodes without increased size and evidence of low lymphocyte activity for the clear identification of the mantle and germinal center, indicating a decrease in the inflammatory process. Scale bar = 100 μ m (A–D); 75 μ m (E–H); 50 μ m (I).

testinal inflammatory disorders. In patients with celiac disease and ulcerative colitis (UC), S100B overexpression and release by the EGC network have been reported (Cirillo et al., 2009; Esposito et al., 2007). The increase in S100B protein observed in rectal biopsies of UC patients suggests that extracellular S100B works as a ligand for cell surface receptors via a RAGE-dependent mechanism (receptor for advanced glycation end-products) (Cirillo et al., 2011b).

Lipopolysaccharide (LPS) is commonly used to induce inflammation and activation of the innate immune system via Toll-like receptor (TLR) signaling (Hoshino et al., 1999), which is also found in EGC (Brahmachari et al., 2006; Guerra et al., 2011; von Boyen et al., 2004). The gastrointestinal tract is a large reservoir of both gram-positive and gram-negative bacteria (Ley et al., 2006), where the gram-negative bacteria works as a source of endotoxin LPS. Thus, the intestines represent both a major barrier and a major source of endotoxin (Mani et al., 2012). Intestinal diseases, systemic inflammatory response syndrome, or environmental and metabolic stresses result in a decrease in the barrier integrity of the intestinal epithelial cells (Mittal and Coopersmith, 2014; Shimizu et al., 2011). Considering the close proximity of the EGCs to intestinal epithelial

cells and their production of mediators acting in mucosal barrier function, the EGC has been proposed to be an essential component for the integrity of the gut wall (Coquenlorge et al., 2014; von Boyen et al., 2004; Xiao et al., 2011).

LPS administration (by intraperitoneal or intracerebroventricular injection, in astrocyte cultures, or even in hippocampal slices) promotes an increase in the astrocyte expression of GFAP and alters extracellular levels of S100B (Brahmachari et al., 2006; Guerra et al., 2011). Enteroglia-derived GFAP and S100B protein expressions increase with LPS administration in dissected colon and cultured enteric glia cells (Cirillo et al., 2011b; Coquenlorge et al., 2014; von Boyen et al., 2004; Xiao et al., 2011). At present, there is one evidence of the existence of *in vivo* data to confirm the impact of EGC activity on the response to single high-dose of LPS (Rosenbaum et al., 2016) as we have observed in the brain tissue (Borges et al., 2012; Cardoso et al., 2015; Guerra et al., 2011; Ifuku et al., 2012). In this study, we evaluate the effects of *in vivo* systemic LPS administration, at different concentrations and times, on the enteroglia GFAP and S100B protein expressions on different segments of the

intestine (duodenum, cecum and proximal colon). Moreover, basal *ex-vivo* S100B secretion was measured in enteral slices.

2. Material and methods

2.1. Animals

A total of seventy two male Wistar rats (60-days old, weighing 200–300 g) were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, UFRGS). The animals were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to commercial chow and water. All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and all procedures were previously approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care Committee in 2012. Moreover, all efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used. The experiments described in the present study were made during 2014–15.

2.2. Treatment

Rats were randomly divided into three groups: Sham (phosphate-buffered saline – PBS, 0.1 M; $n=24$), LPS 0.25 (LPS, 0.25 mg kg^{-1} , $n=24$) and LPS 2.5 (LPS, 2.5 mg kg^{-1} , $n=24$) groups. Both LPS groups received a single intraperitoneal injection of LPS (1 mL/kg body weight) in PBS, while the sham group received only the vehicle (PBS).

At 1 h, 24 h or 7 days after administration of vehicle or LPS, the animals were anesthetized using ketamine and xylazine (Syntec, São Paulo, Brazil), administered intraperitoneally at doses of 75 and 10 mg kg^{-1} , respectively. Subsequently, whole blood was obtained through an intracardiac puncture using a 5 mL syringe and 21 G needle (0.80 mm diameter, 25 mm length) inserted into the intercostal space above the sternum. Serum was separated by centrifugation at $3000g$ for 10 min. Rats were then killed by decapitation and the tissue samples were collected for stereological analysis, for preparation of acute slices or stored at -20°C for biochemical analyses.

Body weight changes were monitored at 1 or 7 days after LPS administration. We observed decreases in body weight of 5% and 7% at LPS doses of 0.25 and 2.5 mg kg^{-1} , respectively at 24 h. No significant decrease was observed at 7 days after LPS administration (data not shown).

2.3. Chemicals

LPS from *Escherichia coli*, O55:B5, L2880; 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES); monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1); *o*-phenylenediamine (OPD); ethylene-bis-(oxyethylenitrilo)-tetracetic acid (EGTA) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polyclonal anti-GFAP and anti-S100 rabbit antibodies were obtained from DAKO (Glostrup, Denmark). Anti-rabbit peroxidase-conjugated IgG was obtained from Amersham (Buckinghamshire, UK) and fluoresceine-conjugated anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488) was purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

2.4. Histological analysis

After decapitation, pieces of approximately 0.2 cm^2 regions of duodenum, cecum and proximal colon were collected, fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 4 h, and post-fixed in Bouin solution for 1 h. The cross sections ($10 \mu\text{m}$ in Leica microtome RM 2125) were stained with a standard hematoxylin-eosin method.

The intestinal damage was graded (based on a published scoring system (Dieleman et al., 1998)) by two observers who were blinded to the experimental conditions. Briefly, the scale of 0–4 was graded by the following criteria: amount of inflammation (acute and chronic, ranging from 0 to 3) and the amount of crypt damage (range 0–4). The histological sections were photographed with a Nikon Optiphot-2 microscope. The value obtained corresponds to the average of the two blinded observers for the sum score of eight animals in each group of interest.

2.5. Preparation of acute enteral slices for S100B secretion measurement

The preparation of acute slices was performed as previously described (Nardin et al., 2009). Briefly, immediately after decapitation, the intestines were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgSO_4 ; 25 HEPES; 1 KH_2PO_4 , and 10 D-glucose. Intestinal segments were longitudinally cut and circular slices (0.5 mm of diameter) were obtained with metallic sharp punchers from three intestinal regions (duodenum, cecum and proximal colon), and transferred into 24-well culture plates, each well containing 0.4 mL of saline medium and only one slice. For S100B secretion, the medium was replaced every 15 min with fresh saline medium at room temperature (25°C) (see Fig. 4). Following a 120min equilibration period, the medium was removed and replaced every 60 min with saline medium at 30°C on a warm plate. At end of each period (i.e. 180, 240 and 300 min), $50 \mu\text{L}$ of media were collected and stored (at -80°C) until S100B quantification.

2.6. ELISA for S100B

ELISA for S100B was carried out, as described previously (Leite et al., 2008). Briefly, $50 \mu\text{L}$ of medium aliquots (diluted 1:3 for S100B secretion) or $50 \mu\text{L}$ enteric tissue slice homogenates (diluted 1:200 for S100B content) or $50 \mu\text{L}$ serum were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 from rabbit was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-IgG antibody was added for another 30 min. The colorimetric reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL .

2.7. ELISA for GFAP

ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plates with the samples diluted (TBS) from enteric tissue slice homogenates (diluted 1:100) overnight at 4°C . Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP antibody for 2 h was followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-IgG antibody for 1 h at room temperature and by incubation with peroxidase substrate for 30 min in the dark. The colorimetric reaction with OPD was read at 492 nm. The standard GFAP curve ranged from 0.1 to 5 ng/mL (Tramontina et al., 2007).

2.8. Metabolic viability and cell integrity assay

Enteric slice viability was assessed by the colorimetric Neutral Red (NR) assay (Hansen et al., 1989). Briefly, enteric slices were incubated with $50 \mu\text{g/mL}$ NR, for 30 min at 30°C . The slices were then rinsed twice with phosphate buffer for 5 min each. The NR dye taken up by viable cells was then extracted with an acetic acid/ethanol/water (1/50/49, v/v) mixture. Absorbance values were measured at 560 nm. Results are expressed as a percentage of the uptake measured at 1 h. In order to evaluate cell integrity, lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined in the incubation

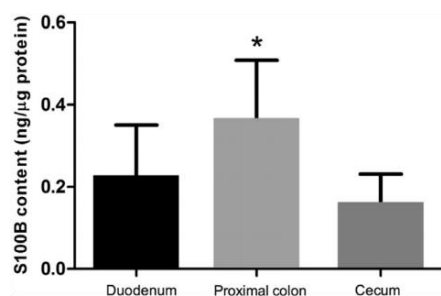


Fig. 2. S100B content and distribution in intestinal regions of Wistar rats. S100B content in the regions of the duodenum, cecum and proximal colon, measured by ELISA and expressed in ng/μg protein. Values of S100B are mean and standard error (n = 12 slices/region, performed in triplicate). * Statistically significant different from other regions, one-way ANOVA, p < 0.05.

medium by a colorimetric commercial kit (from Doles, Brazil), according to the manufacturer's instruction.

2.9. Statistical analysis

Data normality (by Kolmogorov-Smirnov test) and statistical analyses were performed using PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), assuming p < 0.05 as significant. Parametric data from the experiments are presented as means ± standard error and were statistically evaluated by ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Non-parametric data are presented as medians and interquartile range and were statistically evaluated by Kruskal-Wallis.

3. Results

3.1. Intraperitoneal LPS administration causes an intestinal inflammatory response that is dependent on dose, time and region

Histological analysis revealed that the lowest dose of LPS (0.25 mg kg⁻¹) did not result in an inflammatory state at 1 h. The three regions analyzed were intact, and did not differ from those of the control (Fig. 1). However, the lowest dose of LPS resulted in a slight inflammatory effect that could be observed in the mucosa at 24 h and 7 days after administration. This inflammation was characterized by a cellular increase in lymphocytes and plasmocytes, as well as an apparent increase in the activity of lymphoid nodules in the three enteric regions. A discrete loss of organization in the intestinal crypts was observed. The cecum and proximal colon were the most affected by the lowest dose of LPS at 7 days.

With a higher LPS dose (2.5 mg kg⁻¹), moderate inflammation was observed in all enteric regions, at all times. Crypt damage was more intense at 24 h. In general, based on inflammation scores, the cecum was the most affected region at all times analyzed.

3.2. LPS causes an increase in intestinal S100B

The average basal level of intracellular S100B found in vehicle-treated animals was higher in the proximal colon, in relation to the duodenum and cecum (Fig. 2). Based on S100B content, we observed a biphasic response to LPS. The highest dose of LPS resulted in a greater increase in intracellular S100B content after 24 h in the three regions of the intestinal tract (Fig. 3). Values of p, determined by Kruskal-Wallis analysis, were 0.0041, 0.0030 and 0.0214 for the duodenum, cecum and proximal colon, respectively, at 24 h. Moreover, at 7 days after the LPS injection, at the highest dose, the intracellular S100B content decreased in all regions. Values of p, determined by Kruskal-Wallis analysis, were 0.0062,

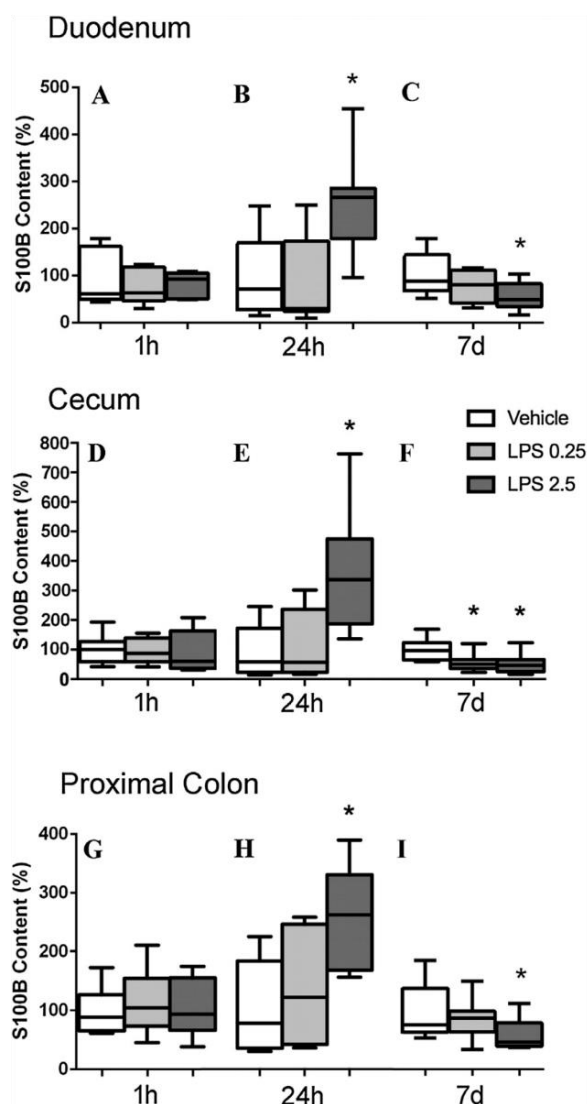


Fig. 3. Changes in the intestinal S100B content after *in vivo* systemic LPS exposure. S100B content measured by ELISA in the duodenum, cecum and proximal colon regions at 1 h, 24 h and 7 days after i.p. LPS administration (0.25 or 2.5 μg/kg). Non-parametric data are expressed in medians and interquartile range, compared to control (vehicle), in each intestinal region, for each time. Duodenum data are shown in panels A-C (n = 9–11), cecum panels D–E (n = 9–11) and proximal colon in panels G–I (n = 11–15). Data were evaluated by Kruskal Wallis analysis.

0.0105 and 0.0270 for the duodenum, cecum and proximal colon, respectively, at 7 days. No effect on S100B content was observed for the lowest dose of LPS, except in the cecum (at 7 days).

3.3. LPS-induced S100B secretion is increased in the cecum

In order to evaluate the cellular integrity in slice preparations and to confirm a secretory mechanism of S100B release, LDH activity was measured. Measurement of extracellular S100B is referred to as "secretion" only after 2 h (Fig. 4A), since no parallel increase in LDH in the medium was observed. In fact, LDH activity data indicate a significant loss of cell integrity during the first 2 h (see Fig. 6A ahead); however, no additional losses occurred during the next 3 h.

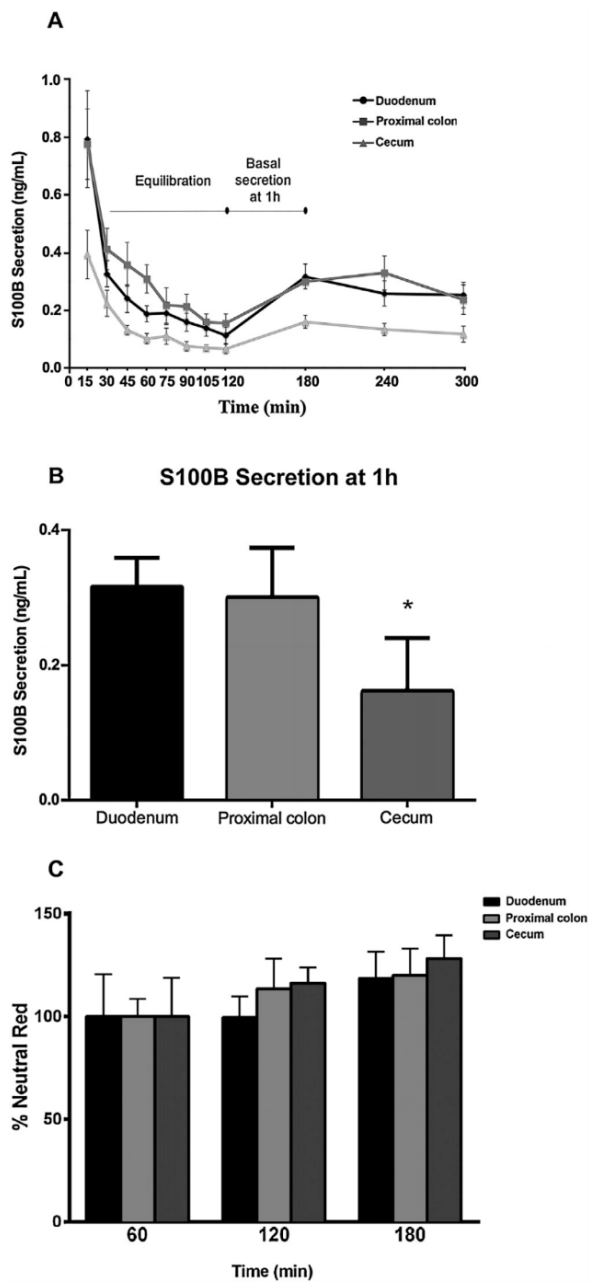


Fig. 4. S100B release and secretion during equilibration phase and afterwards. A, Extracellular S100B in the slices of duodenum, proximal colon and cecum of rats at different times was measured by ELISA. S100B content in the saline medium decreased during the first 30 min of incubation and continued to decrease significantly until 75 min when it reached a plateau up to 120 min, as evaluated by repeated measures ANOVA for each region. Medium was replaced every 15 min. After this time we measured basal S100B secretion every 1 h (i.e. at 180 min, 240 min and 300 min). B, Basal S100B secretion for 1 h (between 120 and 180 min) in slices of duodenum, cecum and proximal colon. * Significantly different from duodenum and proximal colon, one-way ANOVA, $p < 0.05$. Values of S100B are means and standard error ($n = 10$ – 12 slices/region, performed in triplicate) and are expressed as ng/mL. C, Cell viability was measured by neutral red uptake assay from different enteric regions at indicated times. Results are expressed as a percentage of the uptake measured at 1 h.

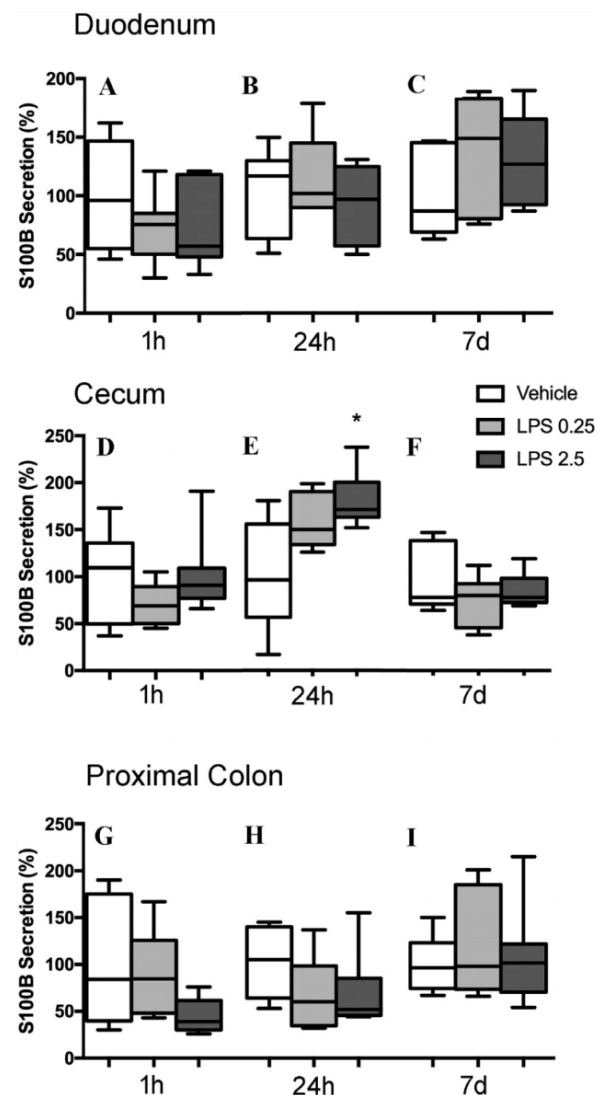


Fig. 5. Changes in the ex-vivo S100B secretion of intestinal slices after in vivo systemic LPS exposure. Animals were exposed to i.p. LPS administration (0.25 or 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and intestinal slices were obtained at 1 h, 24 h and 7 days. Slices of 0.5 mm diameter from the duodenum, cecum and proximal colon were incubated for 1 h in HEPES-buffered saline medium and extracellular S100B content measured by ELISA. Non-parametric data were expressed in percentages compared to controls (vehicle) in each intestinal region, at each time point, and evaluated by Kruskal-Wallis analysis. Duodenum data are in panels A–C ($n = 6$ – 9), cecum panels D–E ($n = 6$ – 8) and proximal colon in panels G–I ($n = 6$ – 9); * Significantly different from vehicle, $p < 0.05$.

Basal S100B secretion (measured at 1 h, after 2 h equilibration, Fig. 4B) was lower in cecum than in the duodenum and proximal colon ($F(2, 30) = 7.044$ and $p = 0.031$). Moreover, neutral red uptake assay confirmed the viability of the cells in the intestinal slice preparations (Fig. 4C).

However, LPS administration induced an increase in the S100B secretion only in slices of the cecum at 24 h ($p = 0.0149$, Fig. 5, panel E). No significant changes were observed in S100B secretion in the duodenum and proximal colon slices at all times analyzed (Fig. 5). The ex-vivo increase of S100B secretion in cecum by LPS administration at 24 h was confirmed by cell integrity evaluation, measured by extracellular LDH activity (Fig. 6A).

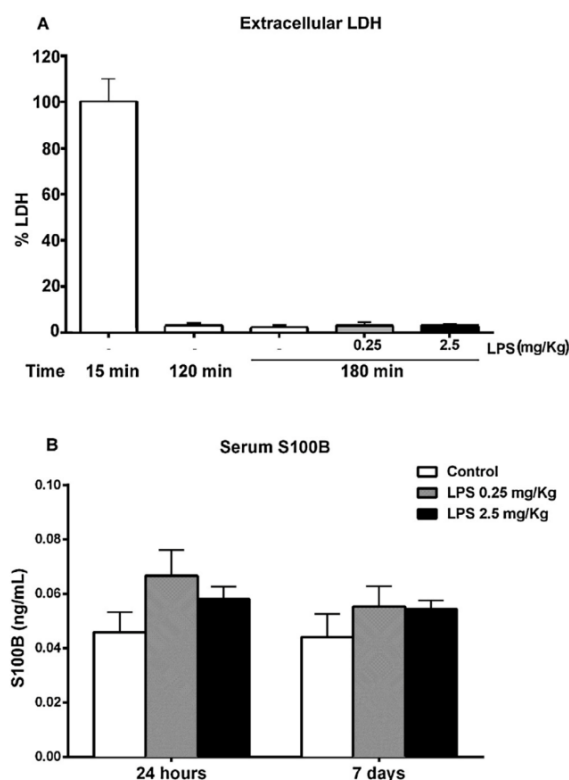


Fig. 6. Cell integrity of cecum slices measured by LDH release and serum levels of S100B after acute LPS administration. Animals were exposed to i.p. LPS administration (0.25 or 2.5 μ g/kg). A, Cell integrity of cecum slices ($n=6-8$). Extracellular LDH activity at 15 min of equilibration (first measurement) is assumed as 100%. Low levels of extracellular LDH are detected at end of equilibration phase (120 min). These low levels are maintained at 180 min in sham or LPS-treated animals. B, serum S100B content samples ($n=8-11$) were analyzed by ELISA at 24 h or 7 days. S100B values (mean \pm SE) were expressed in ng/mL. No significant changes were observed in serum S100B (two-way ANOVA, $p < 0.05$).

3.4. Serum S100B levels were not modified by LPS administration

In order to identify whether enteric changes in the S100B would be accompanied by serum alteration of this protein, we carried its measurement at 24 h and 7 days after LPS administration. The acute administration of LPS, independently of dose, was unable to induce changes in the serum S100B content (Fig. 6B). There was no LPS ($F(2, 49) = 2.629$; $p = 0.0823$) or time ($F(1, 49) = 0.8457$; $p = 0.3623$) main effect. Additionally, no LPS \times time interaction was found ($F(2, 49) = 0.2199$; $p = 0.8034$) by two-way ANOVA.

3.5. LPS induced an acute increase in intestinal GFAP

Similarly to the changes in S100B, at the highest dose of LPS, all intestinal regions exhibited an increase in GFAP at 24 h (Fig. 7). Using one-way ANOVA, followed by Tukey's test, we found $F(2, 13) = 16.52$ and $p = 0.0003$ in the duodenum; $F(2, 14) = 10.57$ and $p = 0.0016$ in the cecum; $F(2, 14)$ and $F(2, 14) = 21.57$ and $p < 0.0001$ in the proximal colon. Interestingly, in the cecum, we observed an increase in GFAP at 1 h after LPS, at the highest dose, $F(2, 14) = 10.86$ and $p = 0.0014$. An apparent increase in GFAP was found in the duodenum, $F(2, 14) = 3.561$ and $p = 0.0561$, at 1 h. No changes were observed at 7 days in any of the regions of intestine analyzed (Table 1).

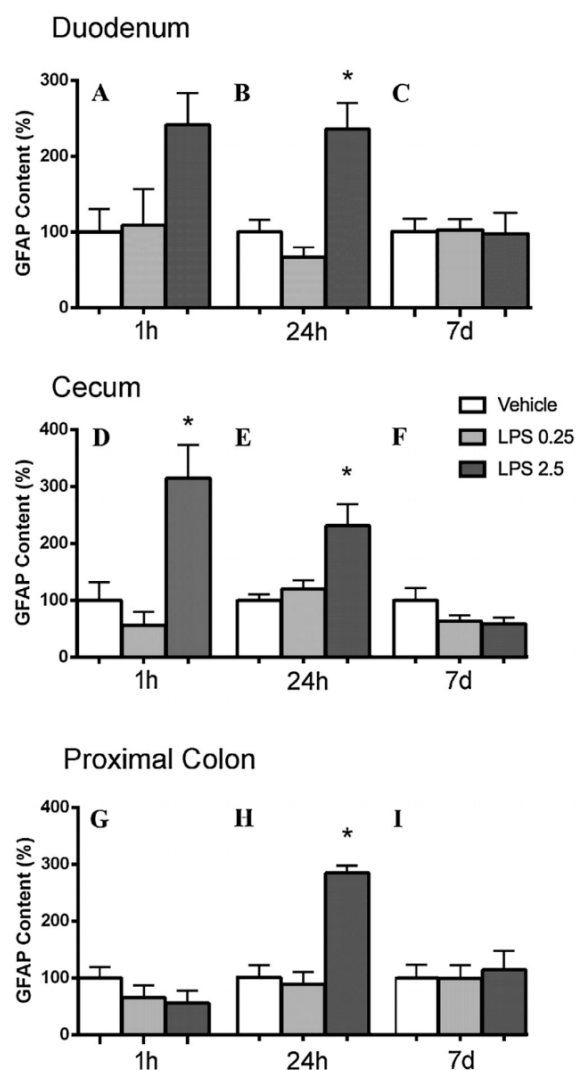


Fig. 7. Changes in the intestinal GFAP content after *in vivo* systemic LPS exposure. GFAP content measured by ELISA in the duodenum, cecum and proximal colon regions at 1 h, 24 h and 7 days after i.p. LPS administration (0.25 or 2.5 μ g/kg). Parametric data (mean \pm SE) are expressed in percentages, compared to control (vehicle), in each intestinal region, at each time and evaluated by one-way ANOVA followed by post hoc Tukey's. Duodenum data are in panels A–C ($n=6-8$), cecum panels D–F ($n=6-8$) and proximal colon in panels G–I ($n=7-9$). * Significantly different from vehicle, $p < 0.05$.

4. Discussion

LPS produced transient decreases in body weight in the rats, as it was already reported by other studies (Chen et al., 2012; Engeland et al., 2001). Loss of body weight is commonly reported until 24 h after the LPS injection and it is probably due to a combination of decreased food intake and the hypomotility (data not included). These responses are described as an adaptive sickness behavior (Hart, 1988).

Histological analyses of the effects of different doses of i.p. LPS on inflammatory parameters revealed visible injury to the mucosa of the duodenum, cecum and colon of adult Wistar rats. These data are in agreement with the literature regarding the gut inflammation induced by LPS in humans and other species (Coquenlorge

Table 1
Intestinal inflammatory response to systemic LPS

Group	Control	0.25 mg/Kg						2.5 mg/Kg					
		1 h		24 h		7 days		1 h		24 h		7 days	
Parameter		I/CD	I	CD	I	CD	I	CD	I	CD	I	CD	
Region													
Duodenum	NA	NA	7.5	4	5 ^a	4	10.5 ^{a,b}	NA	12 ^{a,b}	14	4 ^a	4	
Cecum	NA	NA	8	4	10 ^b	4	14 ^a	4	20 ^a	16	15.5 ^b	4	
Proximal colon	NA	NA	7.5	4	7.5 ^{a,b}	NA	8 ^b	NA	8 ^b	12	12 ^b	4	

Values: Average of two blinded observers.

NA, no alteration; I, inflammation; CD, crypt damage.

Score numbers (I or CD) indicate difference from respective NA-labeled control, in each region, at the same LPS dose and time point, as determined by Kruskal-Wallis analysis. Statistical differences among intestinal regions are indicated by different letters, in a comparative analysis (inflammation or crypt damage) at the same LPS dose and time point, i.e., among values in the same column in this Table.

et al., 2014; Im et al., 2012; Murakami et al., 2009). We found that, the duodenum, when compared with the proximal colon and the cecum, was less susceptible to the inflammatory response triggered by LPS and this is possibly related to the regional distribution of immune cells. Lymphocyte populations of TH17, TH22 and TReg are expressed more in the human cecum in relation to the small intestine or colon, in contrast to mice, which express more TH17 in the ileum than in the large intestine (Wolff et al., 2012). We did not find similar comparative studies for rats (besides the report of the existence of morphologically similar lymphoid cells in these two kinds of rodents (Kanamori et al., 1996)), but if the frequency of inflammation suppressor lymphocytes is higher in the small intestine of rats than in the cecum, as occurs in mice, this would explain the greater response in the cecum than in the duodenum of rats treated with LPS. A minor inflammatory response in the most rostral portions of the small intestine has already been observed in a study that used a more severe inflammatory approach (Gulbransen and Sharkey, 2012). The unequal distribution of alkaline phosphatases (AP) or of their level of activity in the enterocytes of several intestine parts could also be the reason for the different responses in the three intestine segments. AP dephosphorylates one of the toxic phosphate groups of the lipid A moiety of LPS, decreasing inflammation (Turco et al., 2014). The intestinal AP activity in rodents is inversely proportional to the bacterial density in the intestine, while the enzymatic activity is higher in the duodenum and progressively lower in the jejunum and ileum (De Filippis et al., 2011). The colon displays even lower AP activity than the small intestine (Celikbilek et al., 2014). An increased activity of the AP in response to i.p. LPS may have contributed to the smaller inflammatory effect in the duodenum, when compared to the more distal segments of the intestine of treated rats.

In addition to the components of both the innate and adaptive immune systems that contribute to the protection of the mucosal surface, another important component of GI tract homeostasis is the EGC. These cells act as an intermediate cell component between the immune system and the nervous system via the GI tract (Esposito et al., 2007; von Boyen and Steinkamp, 2010; Yu and Li, 2014) and also exhibit diverse cell population, dependent on region (Gulbransen and Sharkey, 2012; Hanani and Reichenbach, 1994). There are evidences of the dynamic state of EGCs during the adult life. Both glial cells of the myenteric and submucosal plexus could be renewed in adult animals (Joseph et al., 2011; Kabouridis et al., 2015; Laranjeira et al., 2011). The homeostasis of mucosal EGCs could be controlled by the gut microbiota, not only by the number of micro-organisms within the ileum lumen, as demonstrated by Kabouridis et al. (Kabouridis et al., 2015), but also possibly by the diversity of the bacterial population across the small and large intestine compartments. It will be interesting to investigate whether the distinct bacterial profiles among the intestine segments influence the homeostasis of EGCs.

The present study evaluated the expression of two glial activity markers, S100B and GFAP, in response to the administration of LPS. Reinforcing the idea of the diversity of EGC, we found that the S100B protein content (in the vehicle-treated animals) was higher in the proximal colon than in the cecum and duodenum. However, it is important to mention that, at this moment, it is unclear whether the difference in S100B content among intestinal regions is due to the different number S100B-positive cells or to the differentiated expression of this protein. Further immunohistochemistry studies will help to clarify this question.

The duodenum, cecum and colon presented increases in S100B content at 24 h after the higher dose of LPS, in association with the highest score of inflammation. Although an inflammatory response is already visible in the cecum within 1 h of high-dose LPS administration, a detectable increase in S100B can only be observed 24 h later. Furthermore, while the tissue still presents morphological inflammatory-derived alterations after one week, the levels of the S100B protein are lower than those of controls at this timepoint.

Moreover, the inflammatory stimulus caused by the highest i.p. LPS dose administration resulted in a detectable increase in S100B secretion only in the cecum, at 24 h. Notice that changes in the S100B content, in all analyzed intestinal regions, were not accompanied by parallel changes in S100B secretion in the duodenum and colon proximal, at least when measured *ex-vivo*. Moreover, the decrease in S100B content in all intestinal regions at 7 days, at the highest dose of LPS, was not accompanied by changes in basal secretion. In agreement, even in astrocyte cell cultures, the intracellular variation in S100B is not always followed by changes in the protein's secretion (Gonçalves et al., 2008; Leite et al., 2008; Ziegler et al., 2004). In the only other existing study about *in vivo* LPS administration, using the same higher LPS dose (2.5 mg kg⁻¹), the S100B gene expression decreased in duodenum and ileum myenteric plexus (Rosenbaum et al., 2016). However, this S100B downregulation reported by Rosebaum et al. was analyzed only at 4 h after the injection. Our study indicates that the LPS-mediated systemic inflammation could elicit a later alteration in the enteric S100B level. Following the highest dose of LPS, the higher morphological score, indicative of inflammation, in the cecum, compared to the duodenum and the proximal colon, and the early increase in GFAP (at 1 h) and alteration in S100B secretion (at 24 h) are suggestive of the differentiated sensitivity of the EGC of this region. Considering that the secretion of S100B may lead to increased inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression and production of NO, triggering nitrosative stress and lipid peroxidation (Esposito et al., 2007; Turco et al., 2014), capable of inducing inflammation (De Filippis et al., 2011), this could help to explain the greater inflammatory response in the cecum mucosa in response to the presence of high-dose LPS. However, the increases in GFAP and S100B were transient (at 24 h), returning to basal (GFAP) or

even lower (S100B) levels at 7 days, while gut tissues still presented some morphological signs of inflammation.

The increase in S100B protein in the intestinal tissue has been reported under inflammatory conditions (De Filippis et al., 2011; Esposito et al., 2007; Turco et al., 2014). However, LPS-induced S100B release by EGCs *in vitro* has been measured indirectly, based on its extracellular activity (e.g. increment of NO production) (Cirillo et al., 2011b). Herein, we measured S100B secretion *per se* (confirmed by cell integrity assay) from intestinal slices. This is the first direct demonstration, to our knowledge, of the modulation of S100B secretion by LPS in the intestine. There are three studies, employing biopsies from patients with ulcerative colitis or celiac disease, which found upregulation of S100B, suggesting the involvement of S100B protein release in the inflammatory responses of the human gut (Cirillo et al., 2011a; Esposito et al., 2007; Turco et al., 2014). However, local S100B secretion was not appropriately evaluated in these studies and changes in S100B serum levels were not observed.

We also did not find any changes in serum S100B in this study in association with the enteric changes. Moreover, patients with ulcerative colitis showed a decrease in serum S100B levels (Celikbilek et al., 2014). However, we can presume that S100B is being secreted from activated enteric glia (from some regions) in response to LPS, and that this secretion should have a local action, contributing to inducible NOS expression and the NO-dependent inflammation of the gut wall, as has been observed in enteric glia cultures (Cirillo et al., 2011a; Ley et al., 2006; Mani et al., 2012). However, NOS expression or NO release were not evaluated in this study.

Intestinal GFAP also increased after systemic LPS exposure. Similarly to the S100B increase, the increase in GFAP was observed at 24 h after LPS exposure, at the highest dose. No changes were detected later, at 7 days. The increased content of GFAP has been detected in the enteric system in gastrointestinal disorders such as ulcerative colitis (Cornet et al., 2001; von Boyen et al., 2011) and EGC cultures exposed to LPS (von Boyen et al., 2004). Additionally, we observed a regional variation of GFAP to *in vivo* LPS exposure. Using the same high dose of LPS, Rosenbaum et al. (2016) found increased levels of GFAP gene expression in the duodenal and colonic muscular layer at 4 h after injection. In these intestine segments we found an increase of GFAP content only at 24 h after LPS injection, but at 1 h after injection we observed an increase of GFAP only in cecum, which was not analyzed by Rosenbaum et al. (2016). Apparently, a fast response of EGCs to LPS exposure may last for 24 h of hyperinflammation condition. The acute and specific increment of GFAP content at 1 h after LPS exposure in the cecum involves structural changes in GFAP (e.g. phosphorylation) that affect antibody recognition of GFAP and not necessarily its content (Tramontina et al., 2007).

We have interpreted glial changes in S100B and GFAP as direct consequences of glial LPS activation or secondary to immune activation; however, it is also important to consider the neuronal LPS-induced influence on intestinal segments. The EGCs, as well as the intestinal epithelial cells, have adrenergic (Nasser et al., 2006b), purinergic (Kimball and Mulholland, 1996; Vanderwinden et al., 2003) and nicotinic cholinergic receptors (Costantini et al., 2012). In fact, increased GFAP expression occurs in the EGCs following vagal nerve stimulation. It is possible that a pharmacological approach that focuses on the cholinergic control of the enteric glia may clarify this differentiated response of the glial markers to an inflammatory insult.

Another relevant aspect to mention is that despite the local and differentiated changes in S100B content and secretion induced by LPS in intestinal regions, no changes were observed in serum S100B, suggesting that gut S100B does not contribute significantly to serum S100B content and, additionally, that only EGC from the

cecum significantly changed S100B secretion when exposed to LPS, as observed for the glial cells in the brain (Guerra et al., 2011). However, we cannot rule out significant enteric S100B release to serum in other inflammatory conditions.

5. Conclusions

In summary, we evaluated the contents of GFAP and S100B, as well as *ex-vivo* S100B secretion in duodenum, cecum, and proximal colon, in response to systemic LPS administration (0.25 or 2.5 mg kg⁻¹, i.p.) at 1 h, 24 h and 7 days afterwards. LPS induced intestinal inflammation and enteric glial activation in rats, increases in intracellular S100B and GFAP after 24 h, and a specific decrease in S100B, 7 days afterwards. S100B secretion was significantly affected only in the cecum. No associated changes in serum S100B were observed. The LPS effect was dependent on dose, time and intestinal region. These data contribute to understanding the complexity of interactions among the different cells that constitute the gut wall.

Conflicts of interests

The authors have no competing interests to declare.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Eduardo Cambuzzi, for help with the histopathologic analysis and to Ms Barbara Paranhos Coelho, for help with Figure 1. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Anderson, M.A., Ao, Y., Sofroniew, M.V., 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* 565, 23–29.
- Aube, A.C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., Neunlist, M., 2006. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630–637.
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., Pachnis, V., 2015. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* 63, 229–241.
- Borges, B.C., Rorato, R., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L., 2012. Glial cell activity is maintained during prolonged inflammatory challenge in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 784–791 (Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]).
- Brahmachari, S., Fung, Y.K., Pahan, K., 2006. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J. Neurosci.* 26, 4930–4939.
- Cabarrocas, J., Savidge, T.C., Liblau, R.S., 2003. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41, 81–93.
- Cardoso, F.L., Herz, J., Fernandes, A., Rocha, J., Sepodes, B., Brito, M.A., McGavern, D.B., Brites, D., 2015. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J. Neuroinflammation* 12, 82.
- Celikbilek, A., Celikbilek, M., Sabah, S., Tanik, N., Borekci, E., Dogan, S., Akin, Y., Baldane, S., Deniz, K., Yilmaz, N., Ozbakir, O., Yucesoy, M., 2014. The Serum S100B Level as a Biomarker of Enteroglia Activation in Patients with Ulcerative Colitis. *Int. J. Inflamm.* 2014, 986525.
- Chen, Z., Jalabi, W., Shpargel, K.B., Farabaugh, K.T., Dutta, R., Yin, X., Kidd, G.J., Bergmann, C.C., Stohlman, S.A., Trapp, B.D., 2012. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J. Neurosci.* 32, 11706–11715.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Grosso, M., Petruzzelli, R., Izzo, P., Cali, G., D'Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., Iuvone, T., Steardo, L., Cuomo, R., 2009. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, e1112–e1209.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Turco, F., Steardo, L., Cuomo, R., 2011a. S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. *World J. Gastroenterol.* 17, 1261–1266.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., Cuomo, R., 2011b. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, e372–382.

- Coelho-Aguiar Jde, M., Bon-Frauches, A.C., Gomes, A.L., Verissimo, C.P., Aguiar, D.P., Matias, D., Thomasi, B.B., Gomes, A.S., Brito, G.A., Moura-Neto, V., 2015. The enteric glia: identity and functions. *Glia* 63, 921–935.
- Coquenlorge, S., Duchalais, E., Chevalier, J., Cossais, F., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., 2014. Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J. Neuroinflammation* 11, 202.
- Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P., Liblau, R.S., 2001. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13306–13311.
- Costantini, T.W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G.A., Putnam, J.G., Hageny, A.M., Lopez, N., Eliceiri, B.P., Bansal, V., Coimbra, R., 2012. Targeting alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *Am. J. Pathol.* 181, 478–486.
- De Filippis, D., Esposito, G., Cirillo, C., Cipriano, M., De Winter, B.Y., Scuderi, C., Sarnelli, G., Cuomo, R., Steardo, L., De Man, J.G., Iuvone, T., 2011. Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. *PLoS One* 6, e28159.
- Dieleman, L.A., Palmen, M.J., Akol, H., Bloemena, E., Pena, A.S., Meuwissen, S.G., Van Rees, E.P., 1998. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 114, 385–391.
- Eddleston, M., Mucke, L., 1993. Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15–36.
- Engeland, C.G., Nielsen, D.V., Kavaliers, M., Ossenkopp, K.P., 2001. Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. *Physiol. Behav.* 72, 481–491.
- Esposito, G., Cirillo, C., Sarnelli, G., De Filippis, D., D'Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., Petruzzelli, R., Grosso, M., Izzo, P., Iuvone, T., Cuomo, R., 2007. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology* 133, 918–925.
- Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P.J., Polak, J.M., 1982. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 297, 409–410.
- Gabella, G., Trigg, P., 1984. Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J. Neurocytol.* 13, 49–71.
- Gabella, G., 1971. Glial cells in the myenteric plexus. *Zeitschrift für Naturforschung. Teil B: Chem. Biochem. Biophys. Biol.* 26, 244–245.
- Gabella, G., 1981. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* 6, 425–436.
- Gonçalves, C.A., Leite, M.C., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin. Biochem.* 41, 755–763.
- Guerra, M.C., Tortorelli, L.S., Galland, F., Da Re, C., Negri, E., Engelke, D.S., Rodrigues, L., Leite, M.C., Gonçalves, C.A., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J. Neuroinflammation* 8, 128.
- Gulbransen, B.D., Sharkey, K.A., 2012. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract: nature reviews. *Gastroenterol. Hepatol.* 9, 625–632.
- Hanani, M., Reichenbach, A., 1994. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 278, 153–160.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203–210.
- Hart, B.L., 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 123–137.
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., Ruhl, A., 2008. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* 509, 356–371.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S., 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162, 3749–3752.
- Ifuku, M., Katafuchi, T., Mawatari, S., Noda, M., Miake, K., Sugiyama, M., Fujino, T., 2012. Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogen in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J. Neuroinflammation* 9, 197.
- Im, E., Riegler, F.M., Pothoulakis, C., Rhee, S.H., 2012. Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G490–497.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736–737.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., 1983. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci.* 3, 2206–2218.
- Joseph, N.M., He, S., Quintana, E., Kim, Y.G., Nunez, G., Morrison, S.J., 2011. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J. Clin. Invest.* 121, 3398–3411.
- Kabouridis, P.S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S.H., Snippet, H.J., Clevers, H., Petersson, S., Pachnis, V., 2015. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron* 85, 289–295.
- Kanamori, Y., Ishimaru, K., Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., Ishikawa, H., 1996. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med.* 184, 1449–1459.
- Kimball, B.C., Mulholland, M.W., 1996. Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. *J. Neurochem.* 66, 604–612.
- Komuro, T., Baluk, P., Burnstock, G., 1982. An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience* 7, 1797–1806.
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., Pachnis, V., 2011. Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J. Clin. Invest.* 121, 3412–3424.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Kálmán, M., 2004. Glial reaction and reactive glia. In: L. H. (Ed.), *Non-neuronal Cells of the Nervous System: Function and Dysfunction*. Part III: Pathological Conditions, vol. 3. Elsevier, Inst Ciências Biomédicas USP, pp. 787–836.
- Mani, V., Weber, T.E., Baumgard, L.H., Gabler, N.K., 2012. Growth and Development Symposium: endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. *J. Anim. Sci.* 90, 1452–1465.
- Mittal, R., Coopersmith, C.M., 2014. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol. Med.* 20, 214–223.
- Murakami, M., Ohta, T., Ito, S., 2009. Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J. Neurosci. Res.* 87, 2095–2104.
- Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M., Leite, M.C., Thomazi, A.P., Gottfried, C., Wofchuk, S.T., Donato, R., Gonçalves, C.A., 2009. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K(+). *Neurochem. Res.* 34, 1603–1611.
- Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C.M., Ho, W., Oland, L.D., Tibbles, L.A., Schemann, M., MacNaughton, W.K., Ruhl, A., Sharkey, K.A., 2006a. Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G912–G927.
- Nasser, Y., Ho, W., Sharkey, K.A., 2006b. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J. Comp. Neurol.* 495, 529–553.
- Rao, M., Nelms, B.D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M.D., Corfas, G., 2015. Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia* 63, 2040–2057.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577.
- Rosenbaum, C., Schick, M.A., Wollborn, J., Heider, A., Scholz, C.J., Cecil, A., Niesler, B., Hirrlinger, J., Walles, H., Metzger, M., 2016. Activation of myenteric glia during acute inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One* 11, e0151335.
- Shimizu, K., Ogura, H., Hamasaki, T., Goto, M., Tasaki, O., Asahara, T., Nomoto, K., Morotomi, M., Matsushima, A., Kuwagata, Y., Sugimoto, H., 2011. Altered gut flora are associated with septic complications and death in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 56, 1171–1177.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andreazza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Gonçalves, C.A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods* 162, 282–286.
- Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., Cuomo, R., 2014. Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* 63, 105–115.
- Vanderwinden, J.M., Timmermans, J.P., Schiffmann, S.N., 2003. Glial cells, but not interstitial cells, express P2 × 7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. *Cell Tissue Res.* 312, 149–154.
- Wolff, M.J., Leung, J.M., Davenport, M., Poles, M.A., Cho, I., Loke, P., 2012. TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum. *PLoS One* 7, e41373.
- Xiao, W.D., Chen, W., Sun, L.H., Wang, W.S., Zhou, S.W., Yang, H., 2011. The protective effect of enteric glial cells on intestinal epithelial barrier function is enhanced by inhibiting inducible nitric oxide synthase activity under lipopolysaccharide stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 527–534.
- Yu, Y.B., Li, Y.Q., 2014. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J. Gastroenterol.* 20, 11273–11280.
- von Boyen, G., Steinkamp, M., 2010. The role of enteric glia in gut inflammation. *Neuron Glia Biol.* 6, 231–236.
- von Boyen, G.B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K.H., Adler, G., Kirsch, J., 2004. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53, 222–228.
- von Boyen, G.B., Schulte, N., Pfluger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., Steinkamp, M., 2011. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* 11, 3.
- Ziegler, D.R., Oliveira, D.L., Pires, C., Ribeiro, L., Leite, M., Mendez, A., Gonçalves, D., Tramontina, F., Portela, L.V., Wofchuk, S.T., Perry, M.L., Gonçalves, C.A., 2004. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci. Res.* 50, 375–379.

ARTIGO II: ENTERIC GLIAL CELL AND ITS MODIFICATIONS DURING TYMPANIC COLIC IN CHINCHILLAS (*Chinchilla lanigera*).

OBJETIVO ESPECÍFICO

Tendo em vista que o acometimento da CT, através de protocolo previamente estabelecido, traz prejuízo ao SNE, tornou-se pertinente investigar os possíveis efeitos durante e após o acometimento desta doença nas células gliais do SNE de chinchilas. Para tanto, foram determinados os conteúdos das proteínas S100B e GFAP no SNE destes animais, visto que a S100B é utilizada como parâmetro de ativação e/ou morte glial em diversas situações de dano, já tendo sido localizada nas células gliais do TGI, e mostrando alterações em resposta a uma variedade de danos, incluindo a inflamação. O GFAP, outro marcador de células gliais, apresenta seus níveis aumentados durante períodos de inflamação intestinal indicando que a expressão de GFAP é regulada e, pode ser utilizada como indicativo do estado funcional da glia entérica. Foi avaliado o processo inflamatório ocasionado pela CT nas CEG destes animais, bem como a destes animais com ou sem o uso de antiinflamatórios.

RESULTADOS

ARTIGO II

Title: Enteric glial cell and its modifications during tympanic colic in chinchillas (*Chinchilla lanigera*).

Raphaella da Cunha Franceschi^{1,2}, Patrícia Nardin³, Clivia Valle Machado², Bárbara Paranhos Coelho⁴, Malcon Andrei Martinez-Pereira⁵, Carlos Alberto Gonçalves^{2,3}, Denise Maria Zancan^{1,2}

¹Laboratory of Comparative Neurobiology, Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Graduate Program in Neuroscience, ICBS, UFRGS

³Laboratory of Calcium-Binding Proteins, Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS

⁴Graduate Program in Biochemistry, ICBS, UFRGS

⁵Laboratory of Animal Anatomy, Center of Rural Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil

Corresponding author:

Denise Maria Zancan
Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Sarmiento Leite-500, 90035-190
Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel.: +55 51 3308 3305
E-mail: zancan@ufrgs.br

Abbreviations:

AChE: Acetylcholinesterase
ENS: Enteric Nervous System
EGC: Enteric Glial Cell
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein
GIT: Gastrointestinal Tract
IBD: Inflammatory Bowel Disease
LPS: Lipopolysaccharide

LSD: Least Significant Difference

OPD: o-phenylenediamine

PBS-Tx: Phosphate Buffered SalinTriton X-100

S100 β : calcium-binding protein β

TC: Tympanic Colic

TGF β : fator β de transformação do crescimento

TNF α : Tumor necrosis factor alfa

UC: ulcerative colitis

Abstract

The rodents *Chinchilla lanigera* are predisposed to tympanic colic (TC), a disease caused by abrupt dietary changes, feeding mistakes or unbalance diet. Under this condition, distention of the intestinal wall induces ischemic and inflammation foci throughout the intestine. To verify whether TC results in a gliosis or even in a moderate enteric glial cell (EGC) activation, we evaluated the expression of GFAP and S100B intracellular and S100B secretion of EGCs from duodenum, cecum and ascending colon of *C. lanigera*, comparing the level of these proteins in the tympanic, recovered and control animals. We also verified the amount of GFAP and S100B immunostaining between submucosal and myenteric plexus. GFAP content in the intestine of tympanic animals remained unaltered. Immunoreactivity of GFAP was significantly higher in the submucous plexus when compared to the myenteric plexus, in all experimental groups. S100B immunostaining in treatment or recovery groups remained unaltered. In the controls groups, S100B immunostaining revealed distinct results according to the region. The level of S100B protein was unaltered, either in the duodenum or in the ascending colon, while the cecum of the tympanic chinchillas showed a decrease in the intracellular S100B content. S100B secretion was lowered in the three intestinal segments in the tympanic chinchillas. Lesser responsiveness of the EGC, or its absence, to the experimental tympanism can indicate the existence of several protection mechanisms in the *C. lanigera* enteric system. Furthermore, our data indicate that the tympanism process could be reversed only with diet. Apparently the ENS is less affected by this pathology, since no degree of severity was able to provoke reactive gliosis during CT.

Keywords: Chinchilla, Enteric glia cell, GFAP, Inflammation, LPS, S100 β , Tympanic colic

Introduction

Some gastrointestinal anatomy characteristics of the herbivore rodents, as *Chinchilla lanigera*, predispose to tympanic colic or acute abdomen. Chinchillas have fermenting hindguts, with a highly sacculated cecum, a large colon and slow intestinal transit (De Castro *et al.*, 2010). Abrupt changes in the quality or quantity of some kind of food, as clover or alfalfa result in an increased risk of colic. Feeding mistakes or unbalance diet is occasionally observed in chinchilla husbandry and is one of the most common causes of disease in chinchillas seen in practice (Hoefler, 1994; Schaeffer e Donnelly, 1997). Tympany can result from gases accumulation produced by microbial fermentation (Hironaka, 1992). The distention of the intestinal wall in this condition induces an ischemic foci and inflammation throughout the intestine. There are several animal models developed to study gut inflammation. In contrary to some stimuli frequently utilized to obtain inflammatory responses (trinitrobenzene sulfonic acid (Matsumoto *et al.*, 2016); dextran sodium sulfate (Winston *et al.*, 2013); or lipopolysaccharide (Im *et al.*, 2012), to name but a few examples), the experimental tympany protocol did not cause a much severe form of inflammation, but instead simulates a condition closer to the clinical problems encountered in small animal medicine.

The alterations of the histological aspects of the TGI wall in tympanic chinchillas were already described (Martinez-Pereira *et al.*, 2014). The question examined in this study is whether the tympanic colic could influence the function of the enteric nervous system (ENS), specially the enteric glial cells (EGC). The majority of enteric neurons and glial cells are organized into interconnected ganglia distributed between the myenteric and submucous layers. These enteric plexuses controls motility, secretion, uptake of nutrients, blood flow, and immunological process in TGI (Gabella, 1981; Furness, 2012). The EGCs have been recognized to provide regulation actively of gut homeostasis through their interaction with neurons, immune and epithelial cells, influencing the motility, secretions and inflammatory processes (Rühl, 2005; Savidge, Newman *et al.*, 2007; Neunlist *et al.*, 2014; Yu e Li, 2014).

The ENS is directly affected during an inflammatory insult (Lomax *et al.*, 2005) and the ENS dysfunction, in turn, are directly associated with gastrointestinal dysfunctions, and reflected in motility alteration and pain. The fact that EGCs exert protecting mechanisms to the intestinal barrier functions (Steinkamp *et al.*, 2003; Savidge, Sofroniew *et al.*, 2007; Neunlist *et al.*, 2008) and react to inflammation (Cabarrocas *et al.*, 2003; Von Boyen *et al.*, 2004; Bassotti *et al.*, 2007), indicates a crucial role of the EGCs in the control of TGI

pathogenesis. Significant decrease of EGCs has been associated with several TGI diseases (colonic diverticular disease, (Bassotti *et al.*, 2005); Crohn's disease, (Cornet *et al.*, 2001)). On the other hand, an overactivation of EGCs in an inflammatory context, an inflammation-induced gliosis, could promote a neuropathy of ENS (Neunlist *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2016). Could the diet-induced tympanic colic result in a gliosis or even in a moderate enteric glial activation? An approach to answer this question is analyze the expression of some functional glial markers.

Glia-specific molecular markers that have been used extensively for the identification and characterization of EGCs are intermediate filament glial fibrillary acidic protein (GFAP; (Jessen e Mirsky, 1980)), the Ca²⁺-binding protein S100B (Ferri *et al.*, 1982) and the nuclear localized transcription factor Sox10 (Bondurand *et al.*, 2003). These markers are differently expressed in the distinct morphological types of EGCs (Boesmans *et al.*, 2015). The reason of these differential distribution of glial markers is unclear, but could be related to the local microenvironment where located the EGC and/or as a result of functional specialization (Boesmans *et al.*, 2015). Both S100B and GFAP are overexpressed in EGCs from patients with inflammatory diseases (Cornet *et al.*, 2001; Esposito *et al.*, 2007; Cirillo *et al.*, 2009; Von Boyen *et al.*, 2011). In a previous study we obtained varied responses of the S100B and GFAP of EGCs from distinct intestinal segments to a systemic inflammation (lipopolysaccharide i.p.) (Franceschi *et al.*, 2017). In the present study, we therefore investigated whether the glial cells from different intestinal segments of *Chinchilla lanigera* are affected by the diet-induced tympanic colic. We analyze the expression of GFAP and S100B intracellular and S100B secretion of EGCs from duodenum, cecum and ascending colon of *C. lanigera*, comparing the level of these proteins at the height of the tympany symptoms with the recovered and control animals.

Material and Methods

Animals

A total of thirty two adults *Chinchilla lanigera* were obtained from the Chillacenter Farm (Viamão, RS, Brazil). All animal procedures were previously approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care Committee (project number 22943) and were in accordance with the Federal Law on procedures for the scientific use of animals

(11.794/2008). Moreover, all efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Tympanic colic protocol

Thirty two adults *Chinchilla lanigera* were used for inducing the tympanic colic (TC). The TC inducing protocol for chinchillas was described previously (Martinez-Pereira *et al.*, 2014). Briefly, all animals were acclimated for three days before any experimental procedure (D0 at D3) with free access to water and commercial food (Supra Chinchila, Alisul Alimentos SA, Brazil), kept individually in cages, with controlled temperature and photoperiod regimen (12 h light/12 h dark). They were then divided into control (8 animals), tympanic (8 animals), diet recovery (8 animals) and antiinflammatory recovery (8 animals) groups. The tympanic and recovered groups were fed with the colic-inducing diet daily for fifteen days (D3 to D18), while the control group was fed commercial food daily (5% of BW; as-fedbasis) and 1.5% of BW of alfalfa (as-fed) once a week. The clinical diagnosis was based on physical examination, using palpation, auscultation and abdominal percussion. Once TC had been diagnosed (D18), the recovered groups returned to the control feeding and the recovery antiinflammatory group were medicated with 1% ketoprofen (2 mg/kg Ketofen[®], IM, Merial, Brazil) once a day, for five days (D18 to D23). The analysis of abdominal sensitization was tested with a mechanical force transducer (digital von Frey, Insight, Brazil) on the D4, D11, D18, D25 and D38. Foot withdrawal frequencies in response to von Frey stimuli were measured and used to indicate abdominal mechanic sensitivity. All animals were euthanatized by an overdose of ketamine and xylazine (Pfizer, Brazil). The tympanic group and half of the control group were euthanized at D18. The remainder of the control group and the recovered groups were euthanized in the D38. All animal procedures were approved by the local authorities and were in accordance with the Federal Law on procedures for the scientific use of animals (11.794/2008).

Chemicals

Monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1); o-phenylenediamine (OPD); ethylene-bis-(oxyethylenenitrilo)-tetracetic acid (EGTA); phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polyclonal anti-GFAP and anti-S100 from rabbit antibodies were obtained from DAKO (Glostrup, Denmark). Anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated was obtained from Amersham (Buckinghamshire, UK) and fluoresceine-conjugated

anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488) was purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Rat TNF α ELISA from eBioscience (San Diego, USA). All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

Preparation of acute enteral slices for S100B secretion

The preparation of acute slices was performed as previously described (Nardin *et al.*, 2009). Briefly, immediately after euthanasia, the intestines were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄, and 10 *D*-glucose. Circular slices, with 2 cm diameter, of each of the three intestine regions (duodenum, cecum and ascending colon) were obtained and transferred into 24-well culture plates, each well containing 0.4 mL of saline medium and only one slice.

For S100B secretion, the medium was replaced every 15 minutes by fresh saline medium at room temperature (25° C). Following a 120-min-equilibration period, the medium was removed and replaced with basal medium for 60, 120 or 180 min at 30° C in a warm plate. In each time, at equilibration phase (every 15 minutes) and at post-equilibration phase (every 60 minutes), 50 μ L of media of each slice was collected. Aliquots from removed medium were stored (at -20° C) until S100B quantification.

ELISA for enteral S100B

ELISA for S100B was carried out, as described previously (Leite *et al.*, 2008). Briefly, 50 μ L of medium aliquots (diluted 1:3 - to S100B secretion) or 50 μ L from enteric tissue slices homogenate (diluted 1:200 - to S100B content) were incubated for 2 hours on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 from rabbit was incubated for 30 minutes and then peroxidase-conjugated anti-IgG antibody was added for another 30 minutes. The colorimetric reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

ELISA for enteral GFAP

ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plates with the samples diluted (TBS) from enteric tissue slices homogenate (diluted 1:100) for overnight at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 2 hours was followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-IgG antibody for 1 hour at room temperature and by incubation

with peroxidase substrate for 30 minutes in the dark. The colorimetric reaction with OPD was read at 492 nm. The standard GFAP curve ranged from 0.1 a 5 ng/mL (Tramontina *et al.*, 2007).

Immunohistochemistry for GFAP and S100B

Pieces of duodenum, cecum and ascending colon were fixed at 4% buffered paraformaldehyde for 4 hours at room temperature and cryoprotected by immersing the intestinal pieces in 15% and, after, 30% sucrose in phosphate buffer at 4° C. The pieces were sectioned (10 µm) on a cryostat (Leica CM1850) and free-floating sections, maintained in phosphate buffer at 4°C. The sections were then, pre-incubated in 2% bovine serum albumin (BSA) containing 0.4% Triton X-100 (PBS-Tx) for 30 minutes and after, incubated with polyclonal anti-GFAP from rabbit (1:2000) in PBS-Tx for 48 hours at 4°C or polyclonal anti-S100B from rabbit (1:1000) in PBS-Tx for 48 hours at 4°C. After that, the sections were incubated in a fluoresceine-conjugated anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488) diluted 1:500 in PBS-Tx at room temperature for 1 hour. Slices were covered with Aqueous mounting medium (Fluor Save™ Reagent) and coverslips. Images were acquired with a FluoView™ FV1000 confocal microscope and processed with ImageJ software (with plugins from ImageJ for microscopy collection, from MacBiophotonics, McMaster University, Ontario, Canada). To measure GFAP and S100B fluorescence, images were taken from the duodenum, cecum and ascending colon, from each experimental group. Using ImageJ software, a region of interest (ROI) in the shape of a rectangle was drawn over the myenteric or submucosal plexuses to measure the fluorescence intensity. The identical ROI was placed in an area without fluorescent objects to be used for background subtraction. The fluorescence intensity was measured from 8-10 images from each sample, and the results were plotted as the average fluorescence intensity from 8 animals per experimental group.

ELISA for enteral Tumor necrosis factor α (TNFα)

This assay was carried out in 100 µL of plasma obtained from systemic blood and portal vein blood, by centrifugation at 1000 ×g for 5 min at 4 °C, using a rat TNFαELISA from eBioscience (San Diego, USA).

Statistical Analysis

Data from the experiments are submitted as mean \pm standard error and analyzed statistically by Anova analysis of variance with three factors via Generalized Linear Models (GZLM) Generalized Estimating Equations (GEE) followed by multiple comparisons by Tukey or Bonferroni test, as indicated in each item analyzed in the results, assuming $P < 0.05$. The statistical program used was the "Statistical Package For The Social Sciences (SPSS / PASWSTAT), version 18. Data were analyzed by repeated measure analysis of variance (ANOVA) for von Frey Test and Tukey post-hoc test, with mechanical transducer force and time as factors. For the immunolabeling analysis, one-way ANOVA (for group) was performed, followed by Tukey post-hoc multiples comparisons test. Significance was set at $p < 0.05$. For some statistical analyses that result significantly different with the ANOVA, but not different with the Tukey or Bonferroni test, the LSD (Least Significant Difference) test was also utilized.

Results

Von Frey Test

The von Frey test revealed signs of abdominal sensitivity in the treatment animals on D11, indicating the onset of the disease (Figure 1). On D18, the control group shows a statistical difference when compared with the treatment animals, it revealed increased abdominal sensitivity in the tympanic animals. Other evident clinical signs confirm the diagnosis, as the abdomen was more swollen, increase in abdominal percussion sounds, and the animals showed withdrawal behavior during palpation, indicating a possible hyperalgesic response. The recovered groups showed an abdominal sensitivity similar to that of the control group on D38, as measured by the von Frey test. On D23, the recovery animals did not show the symptoms observed on D18 and regained their appetite.

Intracellular S100B

The average intracellular S100B found in the control group's regions was higher in the ascending colon (0,0039ng/ μ g of protein) when compared to the cecum (0.0017ng/ μ g of protein) and duodenum (0.0008 ng/ μ g of protein). These data are showed with percentages in relation to control (assumed as 100% expressed in the graphics to the same analyzed segments).

The S100B content in the duodenum and ascending colon regions increased in tympanic animals and kept elevated in the recovery groups regarding control; however, this increase was not significant in the control group (Figure 2).

The opposite was observed in the cecum region, where the tympanic and recovery groups showed values lower than the ones in the control group. However, when we compared the values found in the different treatment groups for the same intestinal region, significant differences were not found. ($P = 0.6657$). Only through the Multiple Comparisons “LSD” Test the S100B content value obtained in all the cecum groups differs significantly from the S100B value obtained in the ascending colon and duodenum regions ($P = 0.0041$ e $P = 0.0304$, respectively).

Extracellular S100B

The S100B protein secretion differed in the treatment animals concerning the control group ($P = 0.0126$). It was observed through the Bonferroni’s Multiple Comparisons Test that the values of extracellular S100B from the tympanic group were significantly lower than the two recovery groups, with $P = 0.0480$ (anti-inflammatory group) and $P = 0.0159$ (only diet group), yet it did not significantly differ from the control group ($P = 0.2233$). The decrease of the quantity of S100B released in the tympanic animals was considered significant when compared to the control groups with LSD test ($P = 0.037$) in the analyzed regions (Figure 03). Although the use of anti-inflammatory showed different results in the analyzed regions, these differences were not considered significant.

Enteral GFAP

We did not find significant differences in the GFAP content in the analyzed intestinal segments among the groups ($P = 0.1469$). We observed that each analyzed region showed varied contents of this protein by region (Figure 4). In these regions, the ascending colon was the only one that presented more elevated values of GFAP content (55%) in the tympanic group when compared to the average of GFAP found in the control group (assumed as 100%), even though the averages did not differ significantly.

Circulating TNF- α

The TNF- α content found in the blood of the chinchillas' portal vein and systemic venous system did not show significant differences between the control, tympanic and recovery groups (values not presented).

Immunohistochemistry

Considering the GFAP protein, we could notice a difference between myenteric and submucous plexuses: it was evident in the three intestinal segments the highest GFAP immunoreaction in the submucous plexus when compared to the myenteric plexus, but only in the duodenum (Figure 5) the immunoreactive GFAP difference was significantly higher in the submucous plexus when compared to the myenteric plexus, in all experimental groups (Figure 6 and 7). The GFAP immunoreactivity was higher in the submucous plexus when compared to the myenteric plexus in all experimental groups, however, no statistical difference was showed (Figures 8 and 9).

The S100B immunoreactivity was also higher in the submucous plexus when compared to the myenteric plexus of the duodenum ($P = 0.0015$) (Figure 10 and 11), as well as in comparison to submucous plexus of the ascending colon ($P = 0.0034$), but only in the controls. In the treatment animals or in the recovery groups the observed difference is not significant. In the ascending colon of the control group, the exact contrary of the duodenum was observed, with a higher expression of immunoreactive S100B protein in the myenteric plexus when compared to the submucous plexus. This optical density score for the S100B immunoreaction was higher in the myenteric plexus of the ascending colon than the other groups; however, the difference was not significant ($P > 0.05$) (Figures 12 and 13). Significant differences were obtained through multiple comparisons with two different tests (Tukey and Bonferroni).

Different from the intracellular S100B content found in the different intestinal segments of the control chinchillas, analyzed by Elisa, the immunoreactions analysis by the tissue optical density did not show any difference between the intestinal segments (Figure 14). The cecum shows lower S100B content than the other regions, but it is only considered significantly lower than the duodenum by the multiple comparison test LSD ($P = 0.005$).

The tympanic colic also did not result in immunoreaction intracellular S100B variation in any region, analyzed by optical density. In these analyses the segments were considered

separately or in sets, as well as analyzing the myenteric and submucous plexuses separately or together. A tendency of a progressive decreasing of the S100B immunoreaction in the duodenum and in the ascending colon, while the S100B immunoreactive level in the ascending colon of the recovery group is more elevated than tympanic group ($P = 0.018$) and similar to the control group, in the duodenum a recovery level of S100B in the recovery group was not observed, being significantly inferior when compared to the level of S100B in the duodenum of controlling animals ($P = 0,0015$ of S100B from AR and $P = 0.0010$ to S100B from DR). The recovery through the use of anti-inflammatory, besides the control diet, did not interfere in the S100B expression when compared to the recovery group with adequate diet only. These few significant differences we found in the optical density level of immunoreactive S100B were only obtained through Multiple Comparisons LSD test.

Discussion

Due to the ability of the enteric glial cells (EGC) to proliferate and to release several substances, such as neurotrophins, growth factors and proinflammatory cytokine, the EGCs can influence the immune response, contributing to the mucosal surface protection, working as an intermediate cellular component between the immune and the nervous systems throughout the gastrointestinal tract (GIT) (Esposito *et al.*, 2007; Von Boyen e Steinkamp, 2010; Yu e Li, 2014). However, in *in vivo* experiments, alterations of the EGCs glial markers are not always observed under inflammatory situations in rodents, or the alterations are reported as decreasing in the expression of glial proteins or glial activity indicators (Rosenbaum *et al.*, 2016; Franceschi *et al.*, 2017). It is important to differentiate the inflammatory conditions, evaluating the expression of different cytokine, for instance, especially in this complex context of experimental *in vivo* condition.

The TNF- α content measured in the blood of both portal vein and systemic circulation did not significantly differ in the studied groups. The analysis of the presence of this cytokine in systemic level was chosen due to the fact that the TNF α is one of the signaling molecules responsible for the activation of the neuroendocrine immunomodulation triggered by the central nervous system (Wilder, 1995; Elenkov *et al.*, 2000; Pavlov *et al.*, 2003). Even though the absence of the TNF α systemic variation may indicate a low sensibility to the used approach in relation, for instance, to an analysis of intestine tissue TNF α we should also consider that this proinflammatory cytokine was analyzed two weeks after the beginning of the tympanic

diet or seven days after the clinical symptoms of the tympanic colic have started (Martinez-Pereira *et al.*, 2014). Maybe the TNF α level was not so elevated anymore, since this cytokine can be produced and secreted in a larger quantity in the acute inflammatory phase and, depending on the type of inflammatory response, the level of this cytokine can decrease in subacute or chronic processes (Heinrich *et al.*, 1990; Gruys *et al.*, 2005). The histological alterations observed in the intestinal mucosa under tympanic colic condition indicate a subacute inflammatory process in the chinchillas (Martinez-Pereira *et al.*, 2014). Another reason for choosing this cytokine as evidence of an inflammatory process was based on the results of the necropsy carried on in a previous study, when a macrophage infiltration was found among the histopathological characteristics in tympanic chinchillas (Martinez-Pereira *et al.*, 2014), as the TNF α is recognizably released by the macrophages (Baker *et al.*, 2012). In despite of the major presence of macrophages in the intestine of tympanic animals, the TNF α level was not elevated in the circulation of the portal vein. However, we lacked an analysis of the enteric tissues to confirm the increased presence or not of this proinflammatory marker. Anyway, apparently the developed inflammation by the tympanic colic protocol must be different from an inflammatory bowel disease (IBD), in which the TNF α production remains elevated, participating in the chronic injury established in these conditions (Nenci *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 2012).

The immunological profile of the inflammatory process due to tympanic colic is a process that needs to be known so that the pathology can be assisted and a possible pharmacological intervention for the treatment can be evaluated, whether in chinchillas or in other mammals that can also be affected by the tympanic colic or acute abdomen, such as horses. Other inflammatory markers, such as the transforming growth factor β (TGF β), for instance, can also be investigated. The TGF β release is also observed during the chronic inflammation process and alterations in level or responsiveness of the TGF β have been described in human intestinal inflammatory diseases and in animal models for intestinal inflammation (Beck *et al.*, 2003; Gyires *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015). It is proposed that the TGF β can be produced and released by the EGC, contributing to control an eventual proliferation of epithelial cells near the site of inflammation (Neunlist *et al.*, 2007).

Although significant differences were not observed in the glial fibrillary acidic protein (GFAP) content in the intestine of tympanic animals when compared to the control and recovery groups, an increasing in the GFAP has already been related in different intestinal

inflammation protocols that include EGCs cultures exposed to proinflammatory lipopolysaccharide (LPS) and cytokines (Von Boyen *et al.*, 2004), in rats exposed to LPS injection (Franceschi *et al.*, 2017) and in gastrointestinal disorders such as ulcerative colite (Cornet *et al.*, 2001; Von Boyen *et al.*, 2011). In inoculated rats with systemic LPS, the increasing of GFAP was observed after 1 hour of the injection and kept elevated after 24h of the LPS exposition. However, one week after the inflammatory induction with LPS, the level of GFAP did not differ from the animals in the control group (Franceschi *et al.*, 2017). However, under some conditions of subacute or chronic inflammation, an increasing of the enteric GFAP level may not be observed. Apparently, in tympanic colic conditions, in which the clinical symptoms are detected seven days before the tissues are obtained for the GFAP level analysis, an increasing of the GFAP in the analyzed intestinal regions is not observed. In order to confirm if the GFAP expression in the EGCs can be observed at least in the first days of the tympanic colic induction protocol, an acute tympanic group would be necessary, with the anticipation of the animal euthanasia.

The absence of significant alterations in the intestinal glial GFAP level in one week after the tympanic colic manifested its symptoms can be interpreted as absence of response of enteric glial proliferation or absence of hypertrophy of the EGCs cellular processes in response to the tympanic colic. This could indicate a low response of the EGCs towards the inflammatory insult associated with the tympanic colic or the decreasing activity of the EGCs with the continuity of the tympanic colic, avoiding on contributing to a bigger damage in the wall tract in the tympanic colic. Euthanasia within a period of 24 hours after the clinical symptoms of the tympanic colic would clarify if the EGCs response expresses itself only in the inflammatory process or if it is not responsive at all to this kind of insult in chinchillas. The GFAP increasing of expression is not always directly related to the glial proliferation, as, for instance, in other experimental proinflammatory approaches, the GFAP increasing found in the response to the induction by proinflammatory interleukin or by the TNF α cytokine was not attributed to a possible enteric glial proliferation (Rühl *et al.*, 2001; Von Boyen *et al.*, 2004). In any case, the similar TNF α level between the tympanic and the control animals on the 18th day (fifteen days after the beginning of the tympanic diet) is according to the unaltered enteric GFAP level in the chinchillas. This direct relation between the GFAP and TNF α has been described in astrocytes, which are highly responsive to the TNF α (Hu *et al.*, 2000), with astrogliosis evidence in the presence of this cytokine (Barna *et al.*, 1990; Balasingam *et al.*,

1994). It is important to consider the possible different glial responses regarding different types of inflammation. Another type of colite experimental, as the one produced by the instilled intracolonic trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) also did not provoke myenteric EGC activation, analyzed both 3 days and 7 days after the TNBS administration (Nasser *et al.*, 2007). Apparently, despite the fact that the tympanic colic causes sites of infarcted areas in the ascending colon, immunity cell migration and inflammatory aspect in the cecum and ascending colon (Martinez-Pereira *et al.*, 2014), this colite model in chinchillas did not result in reactive gliosis in the enteric plexus, considering the absence of significant difference of GFAP expression in the GIT with the experimental conditions utilized. Although tympanic colic causes some alterations in the GIT wall, verified in the histopathological analysis, it was unclear whether this injury reaches the enteric nervous layers. If the alterations are not related to the ENS, the absence of glial response would be justified. Some difficulties inherent to the antibody analysis procedure should also be considered. Structural alterations that affect the antibody acknowledgment to the GFAP are described, for instance, the phosphorylation, without necessarily involving alterations in its content (Tramontina *et al.*, 2007).

Since we found different GIT responses to the tympanic colic, which mainly affected the cecum and ascending colon (Martinez-Pereira *et al.*, 2014), the analyses were made in a comparative way in three different intestinal regions. Several pathologies affect the GIT in a heterogeneous way. Analyses in patients with Chagas disease reveal that the neuronal and glial damage initiated by the parasite and the immunological response by the chronic aspect of the disease do not affect the whole intestine (Da Silveira *et al.*, 2009). The possible different responses can be explained by the functional heterogeneous profile of the EGCs throughout the GIT. Two (Hanani, 1994) or four (Boesmans *et al.*, 2015) different subtypes of myenteric EGCs in mice were recognized, probably originated from a common precursor; however, according to the local GIT context, they express different structural and biochemical profiles (Boesmans *et al.*, 2015). Based on the proposal of an EGC profile throughout the GIT, we found, in a previous study, a variation in the EGCs response to the induction of *in vivo* inflammation in the different GIT segments in rats (Franceschi *et al.*, 2017).

In a previous study in chinchillas, we did a whole-mount preparation of the myenteric plexus in the intestinal segments in order to better understand the architecture of the enteric ganglia network and the distribution of the interganglionic strands (Franceschi, 2011). Differently from this approach, in this study, we used transversal sections, so that we did not

exclude the mucosa and submucosa layers. Since the immunostaining to GFAP and S100B stains the cytoplasmatic glial projections and the cellular glial body, making the individual cellular identification difficult, we did an analysis by optical densitometry of immunoreaction in order to obtain a semi-quantitative comparison of the expression of these proteins between the submucosal and myenteric plexus in a general way and not only of the activity inside the enteric ganglia. This analysis revealed, in the animals in the control group, a quantity significantly higher in the GFAP expression of the submucosal plexus than in the myenteric plexus. In the duodenum, this difference is more accentuated (an average of 50% higher in the submucosa). In the ascending colon this difference is lower (an average of 24% higher in the submucosa). These differences of proportion of the immunoreactive GFAP are also present in the treated animals. Exclusively, when we analyzed the number of intraganglionic glia in other species (guinea pig and humans), we found a significantly higher number of EGCs in the myenteric plexus in comparison to the submucosal plexus (Hoff *et al.*, 2008). However, the authors admit that the counting of only intraganglionic EGCs does not reveal a general glia index, because the majority of glial cells are in extraganglionic areas, constituting the larger and smaller networks, not only in the myenteric plexus but also in the submucosal plexus (Hoff *et al.*, 2008). Therefore, we can suppose that the expressive GFAP quantity in the EGCs of the submucosa layer must also be attributed to the extraganglionic areas of the submucosal plexus. The studies that describe the distribution and density of the enteric glial cell, and its variations of response to stimulus, are mainly performed in myenteric plexus preparations, excluding the mucosa and submucosa layers (Hanani, 1994; Fekete *et al.*, 1999; Nasser *et al.*, 2007; Boesmans *et al.*, 2015), in a way that there are few studies in which we could establish comparisons with other animal species in order to investigate the submucosa EGC distribution, as well the myenteric EGCs.

In comparative quantitative analysis between the submucosal and myenteric plexus in the small intestine of mice, the number of neurons in the submucosal ganglions was significantly higher in the oral portions than in the caudal portions (Gabella, 1987), associated with the decreasing thickness of the submucosa and mucosa layers of the duodenum when compared to the jejunum and ileum. We found a similar organization of these layers in chinchillas (Franceschi, 2011). Although a neuronal quantification was not performed, the GFAP immunoreactive quantity is significantly higher in the submucosa layer of the duodenum than in the cecum or in the ascending colon. This could indicate that the number of glial cells

(or glial cells that express GFAP), and possibly neurons, in the submucosal plexus may be higher in the duodenum than in the cecum and ascending colon.

The S100B immunostaining was also significantly higher in the submucosal plexus when compared to the myenteric plexus in the duodenum of the control chinchillas, what contributes to the idea of a probable higher number of enteric glial cells in the submucosal plexus than in the myenteric plexus in the duodenum. However, the higher expression of S100B in a layer can reflect the variable physiological conditions along the luminal surface or of the functional characteristics of the different intestinal segments. Functional differences would explain, for instance, a higher S100B quantity in the myenteric plexus of the ascending colon when compared to the submucosal plexus in this same segment or to the myenteric plexus of the other intestinal segments in the control chinchillas. If the basal conditions reveal different glial responses through the different expression of their markers throughout the enteric plexus, the imbalance situations of the homeostasis, with an inflammation provoked by gas accumulation in response to the diet alteration, would also lead, possibly, to the different glia responses throughout the different regions of the enteric plexus.

The S100B protein participates extensively in the appearance and progression of the inflammatory status, since it organizes a great variety of signal activation mechanisms, directly correlated with the level of severity of the intestinal degenerative processes (Chow and Gulbransen, 2017). Ascending colon and duodenum segments in patients with celiac disease (Esposito *et al.*, 2007) or ulcerative colite (Cirillo *et al.*, 2009)) resulted in increased expression and releasing of S100B by the EGCs. Based on these reports we supposed that the inflammatory process caused by the tympanic colic can also lead to an increased EGCs activity and the increasing of S100B expression and releasing. However, under tympanic colic conditions, this effect was not observed. The level of S100B protein did not alter nor in the duodenum nor in the ascending colon, while the cecum of the tympanic chinchillas, on the contrary, presented a decrease in the intracellular S100B content. On the other hand, the S100B secretion was lowered in the three intestinal segments in the tympanic chinchillas. It is evident that, although the experimental tympanic colic may have caused structural alterations in the intestinal wall (Martinez-Pereira *et al.*, 2014), we could not confirm if the tympanic colic led to the increase of S100B production or if it could indicate an increasing in the enteric glia activity. The decrease of intracellular S100B in the cecum of tympanic chinchillas was not accompanied of GFAP decreasing in the same conditions, what probably does not indicate a

EGCs loss in the inflammatory process. The great diversity in the cell population in the different GIT regions could be a factor that would be influencing the local response to the inflammation. The lymphocytes' population is one of the types of cells that shows great variation throughout the GIT. In humans, for instance, the cecum has a larger population of Th17, Th22 and Treg, but not of Th1 and Th2 in comparison to the small intestine, while in mice it is the opposite, the Th17 is higher in ileum when compared to the cecum (Wolff *et al.*, 2012). The different functions of intestinal segments imply a differentiated lymphocytes' distribution in the cecum. This could explain the lower EGCs response in the cecum of the animals submitted to the tympanic colic induction protocol. However, the lack of general knowledge about the cellular constitution in the different GIT regions of chinchillas makes it difficult to comprehend the obtained results and leaves the hypothesis in the uncertain field of speculations.

The microbiota associated to the mucosa is potentially responsible for the pro- or anti-inflammatory responses (Round e Mazmanian, 2009) and their relation to the proper functioning of the immune system should be considered as one of the factors to the variable *in vivo* responses of the EGCs to the inflammatory insult among the intestinal segments. The variable bacterial distribution in the different GIT segments supports the idea that the different local physiological conditions (intestinal motility, pH, redox potential, nutrients and secretions of the host) perform selective pressures on the microbiota formation (Gu *et al.*, 2013; Koboziev *et al.*, 2014; Donaldson *et al.*, 2016). For example, only in the cecum an abundance of proteobacteria specimen was found, distinguishing their microbiota profile from the other intestinal segments (Gu *et al.*, 2013). Descriptions of strains of gram-negative and positive, bacillus and anaerobic bacteria were already obtained from faeces or cecum of *Chinchilla lanigera* (Worthington e Fulghum, 1988; Kitahara *et al.*, 2013). Although the functional meaning of the microbial diversity and density is not known, this differentiation found throughout the GIT could also contribute to the differentiated responses throughout the GIT towards the diet alterations and the gas accumulation. However, studies about the microbiota type and its modifications in inflammatory conditions is still scarce. Such investigation would be necessary, since few studies report the presence of opportunistic bacteria as *Escherichia coli* (Diaz *et al.*, 2013) and *Clostridium perfringens* (Lucena *et al.*, 2011) in infection conditions and death of these animals.

The *C. lanigera* species has a well-developed cecum in comparison to other rodents, presenting a spiralled saccular segment, followed by a tubular part connected to a long ascending colon (De Castro *et al.*, 2010). The remarkable characteristic of the tympanic colic is the accentuated distension of the cecum wall, due to the accumulation of excessive gas produced during the fermentative digestion (Franceschi, 2011). In the tympanic animals, the AChE activity reduced in different neuronal types, supposedly motor neurons, was observed in the cecum and ascending colon. However, the recovery of the control conditions was obtained, reestablishing the proper diet, especially in the cecum region of the recovery animals (Franceschi, 2011), that could suggest a resistance of these neurons to the deleterious processes of the inflammation in chinchilla cecum. The cecum and the ascending colon possess, yet, another peculiar characteristic: the existence of a longitudinal sulcus throughout the ascending colon mucosa in the chinchillas, which is responsible to return water and bacteria, along with the mucus, to the cecum, resulting in a fluid concentration, bacteria and nitrogen-rich matter in the cecum (Holtenius e Björnhag, 1985). These components are regularly reintroduced in the colon, so the bacteria and nitrogen compounds are recycled. Furthermore, the chinchillas' cecum has a bacterial metabolism similar to the rumen, which uses the bacterial proteins produced in the cecal fermentation (Worthington e Fulghum, 1988). These characteristics may influence in the resistant profile to inflammatory alterations of this segment, turning it less susceptible to homeostasis modifications in comparison to the other analyzed segments. In conclusion, it would be interesting to investigate if the distinct bacterial profiles among the intestinal segments of the chinchillas influence the EGCs homeostasis, as well as comparing possible variations of these profiles after the establishment of the inflammation condition due to the tympanic colic and its recovery process.

The tympanic colic or acute abdomen, caused by abrupt diet changes, can induce gastrointestinal inflammation and lead horses (Tinker *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 2002) or chinchillas (Hoefler, 1994; Schaeffer e Donnelly, 1997) to death. However, we demonstrated, in *Chinchilla lanigera*, that it is possible to reverse this pathology by reestablishing the appropriated diet, even without an anti-inflammatory treatment. The lesser responsiveness of the enteric glial cells, or its absence, to the experimental tympanism-induced inflammation can indicate the existence of several protection mechanisms in the enteric system, even under imbalanced conditions, in the GIT physiology in *Chinchilla lanigera*.

References

- BAKER, J. et al. Medicinal lavender modulates the enteric microbiota to protect against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 7, p. G825-G836, 2012. ISSN 0193-1857.
- BALASINGAM, V. et al. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 846-856, 1994. ISSN 0270-6474.
- BARNA, B. P. et al. Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. **Journal of neuroimmunology**, v. 30, n. 2, p. 239-243, 1990. ISSN 0165-5728.
- BASSOTTI, G. et al. Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. **Journal of clinical pathology**, v. 58, n. 9, p. 973-977, 2005. ISSN 0021-9746.
- BASSOTTI, G. et al. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? **Laboratory investigation**, v. 87, n. 7, p. 628-632, 2007. ISSN 0023-6837.
- BECK, P. L. et al. Transforming growth factor- β mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. **The American journal of pathology**, v. 162, n. 2, p. 597-608, 2003. ISSN 0002-9440.
- BOESMANS, W. et al. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. **Glia**, v. 63, n. 2, p. 229-241, 2015. ISSN 1098-1136.
- BONDURAND, N. et al. Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. **Development**, v. 130, n. 25, p. 6387-6400, 2003. ISSN 0950-1991.
- BROWN, I. A. et al. Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. **CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 1, p. 77-91, 2016. ISSN 2352-345X.
- CABARROCAS, J.; SAVIDGE, T. C.; LIBLAU, R. S. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. **Glia**, v. 41, n. 1, p. 81-93, 2003. ISSN 1098-1136.
- CHOW, A. K.; GULBRANSEN, B. D. Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 2, p. G145-G152, 2017. ISSN 0193-1857.
- CIRILLO, C. et al. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 21, n. 11, p. 1209, 2009. ISSN 1365-2982.
- CORNET, A. et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13306-13311, 2001. ISSN 0027-8424.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enterogial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. **Human pathology**, v. 40, n. 2, p. 244-251, 2009. ISSN 0046-8177.

DE CASTRO, T. et al. Morphological, morphometric and topographical description of the digestive tract in *Chinchilla lanigera*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 86-94, 2010. ISSN 1413-9596.

DIAZ, L. L.; LEPHERD, M.; SCOTT, J. Enteric Infection and Subsequent Septicemia due to Attaching and Effacing *Escherichia coli* in a Chinchilla. **Comparative medicine**, v. 63, n. 6, p. 503-507, 2013. ISSN 1532-0820.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20-32, 2016. ISSN 1740-1526.

ELENKOV, I. J. et al. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000. ISSN 0031-6997.

ESPOSITO, G. et al. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. **Gastroenterology**, v. 133, n. 3, p. 918-925, 2007. ISSN 0016-5085.

FEKETE, E. et al. Different distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive cells and their relations with nitrergic neurons in the human fetal small intestine. **Histology and histopathology**, v. 14, n. 3, p. 785-790, 1999. ISSN 1699-5848.

FERRI, G.-L. et al. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. **Nature**, v. 297, n. 5865, p. 409-410, 1982. ISSN 0028-0836.

FRANCESCHI, R. D. C. **Caracterização morfológica e neuroquímica do plexo mientérico no intestino de *Chinchilla lanigera* (rodentia: chinchillidae) e avaliação de suas alterações sob cólica timpânica experimental**. 2011. Dissertation (Master). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRANCESCHI, R. D. C. et al. Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein. **Neuroscience research**, 2017. ISSN 0168-0102.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012. ISSN 1759-5045.

GABELLA, G. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. **Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 425-436, 1981. ISSN 0306-4522.

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987. ISSN 0306-4522.

GONÇALVES, S.; JULLIAND, V.; LEBLOND, A. Risk factors associated with colic in horses. **Veterinary Research**, v. 33, n. 6, p. 641-652, 2002. ISSN 0928-4249.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 6, n. 11, p. 1045, 2005.

GU, S. et al. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e74957, 2013. ISSN 1932-6203.

GYIRES, K.; VIKTORIA TOTH, E.; ZOLTAN ZADORI, S. Gut inflammation: current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 7, p. 1063-1081, 2014. ISSN 1381-6128.

HANANI, M. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. **Cell and tissue research**, v. 278, n. 1, p. 153-160, 1994. ISSN 0302-766X.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical journal**, v. 265, n. 3, p. 621, 1990.

HIRONAKA, R. **Feedlot finishing of cattle**. Minister of Supply and Services, 1992. ISBN 0662194098.

HOEFER, H. L. Chinchillas. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 103-111, 1994. ISSN 0195-5616.

HOFF, S. et al. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. **Journal of Comparative Neurology**, v. 509, n. 4, p. 356-371, 2008. ISSN 1096-9861.

HOLTENIUS, K.; BJÖRNHAG, G. The colonic separation mechanism in the guinea-pig (*Cavia porcellus*) and the chinchilla (*Chinchilla laniger*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 82, n. 3, p. 537-542, 1985. ISSN 0300-9629.

HU, S. et al. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. **Neuroimmunomodulation**, v. 7, n. 3, p. 153-159, 2000. ISSN 1021-7401.

IM, E. et al. Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 4, p. G490-G497, 2012. ISSN 0193-1857.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. **Nature**, v. 286, n. 5774, p. 736-737, 1980. ISSN 0028-0836.

KITAHARA, M. et al. *Parabacteroideschinchillae* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3470-3474, 2013. ISSN 1466-5034.

KOBOZIEV, I. et al. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 122-133, 2014. ISSN 0891-5849.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-99, 2008. ISSN 0165-0270.

LOMAX, A.; FERNANDEZ, E.; SHARKEY, K. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 17, n. 1, p. 4-15, 2005. ISSN 1365-2982.

LUCENA, R. B. et al. Necrotizing enteritis associated with *Clostridium perfringens* Type B in chinchillas (*Chinchilla lanigera*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1071-1074, 2011. ISSN 0100-736X.

MARTINEZ-PEREIRA, M. A. et al. Experimental model of tympanic colic (acute abdomen) in chinchillas (*Chinchilla lanigera*). **Laboratory animal research**, v. 30, n. 3, p. 136-141, 2014. ISSN 1738-6055.

MATSUMOTO, K. et al. Role of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels in visceral nociception and hypersensitivity. **Experimental neurology**, v. 285, p. 41-50, 2016.

NARDIN, P. et al. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). **Neurochem Res**, v. 34, n. 9, p. 1603-11, Sep 2009. ISSN 1573-6903 (Electronic) 0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288274> >.

NASSER, Y. et al. Expression of a functional metabotropic glutamate receptor 5 on enteric glia is altered in states of inflammation. **Glia**, v. 55, n. 8, p. 859-872, 2007. ISSN 1098-1136.

NENCI, A. et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. **Nature**, v. 446, n. 7135, p. 557-561, 2007. ISSN 0028-0836.

NEUNLIST, M. et al. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 1, p. G231-G241, 2007. ISSN 0193-1857.

NEUNLIST, M. et al. Enteric glial cells: recent developments and future directions. **Gastroenterology**, v. 147, n. 6, p. 1230-1237, 2014. ISSN 0016-5085.

NEUNLIST, M. et al. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. **Journal of internal medicine**, v. 263, n. 6, p. 577-583, 2008. ISSN 1365-2796.

PAVLOV, V. A. et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Molecular medicine**, v. 9, n. 5-8, p. 125, 2003.

ROSENBAUM, C. et al. Activation of myenteric glia during acute inflammation in vitro and in vivo. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151335, 2016. ISSN 1932-6203.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 313-323, 2009. ISSN 1474-1733.

RÜHL, A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 17, n. 6, p. 777-790, 2005. ISSN 1365-2982.

RÜHL, A.; TROTTER, J.; STREMMEL, W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 13, n. 1, p. 95-106, 2001. ISSN 1365-2982.

SAVIDGE, T. C. et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1344-1358, 2007. ISSN 0016-5085.

SAVIDGE, T. C.; SOFRONIEW, M. V.; NEUNLIST, M. Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. **Laboratory investigation**, v. 87, n. 8, p. 731-736, 2007. ISSN 0023-6837.

SCHAEFFER, D.; DONNELLY, T. Disease problems of guinea pigs and chinchillas. **Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery**. WB Saunders Co., Philadelphia, Pa, p. 260-281, 1997.

SHEN, Y.; ZHANG, C.; CHEN, Y. TGF- β in inflammatory bowel diseases: a tale of the Janus-like cytokine. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 25, n. 4, 2015. ISSN 1045-4403.

STEINKAMP, M. et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1748-1757, 2003. ISSN 0016-5085.

TINKER, M. K. et al. Prospective study of equine colic incidence and mortality. **Equine veterinary journal**, v. 29, n. 6, p. 448-453, 1997. ISSN 2042-3306.

TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 282-6, May 15 2007. ISSN 0165-0270 (Print)

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2010. ISSN 1741-0533.

VON BOYEN, G. B. et al. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 3, 2011. ISSN 1471-230X.

VON BOYEN, G. B. T. et al. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 222-228, 2004. ISSN 0017-5749.

WILDER, R. L. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. **Annual review of immunology**, v. 13, n. 1, p. 307-338, 1995. ISSN 0732-0582.

WINSTON, J. H.; LI, Q.; SARNA, S. K. Paradoxical regulation of ChAT and nNOS expression in animal models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 4, p. G295-G302, 2013.

WOLFF, M. J. et al. TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41373, 2012. ISSN 1932-6203.

WORTHINGTON, J. M.; FULGHUM, R. S. Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolian gerbil and the chinchilla. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1210-1215, 1988. ISSN 0099-2240.

YU, Y.-B.; LI, Y.-Q. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 32, p. 11273, 2014.

Figures

Figure 1. Response of abdominal sensitivity to a mechanical force transducer (von Frey test) in *Chinchilla lanigera*. The von Frey test, in milli-Newtons (mN), was conducted on D4, D11, D18, D25 and D38. Data presented as mean \pm SD (n=8/group). Repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) and the Tukey test (post-hoc) were applied. Asterisk indicates $p < 0.05$, when the tympanic and recovery groups are compared with the control group.

Figure 2. S100B content and distribution in intestinal regions of *Chinchilla lanigera*. Values expressed as percentages compared to the control (100%), represented by the line. S100B content in the regions of the duodenum (D), cecum (C) and ascending colon (AC), measured by ELISA and expressed in ng/ μ g protein. Values of S100B are mean and standard error in the tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) and analgesic recovery (AR; n=8) groups.

Figure 3. Changes in the *ex-vivo* S100B secretion in intestinal regions of *Chinchilla lanigera* after *in vivo* tympanic protocol exposure. Values expressed as percentages compared to the control (100%), represented by the line. S100B secretion in the regions of the the duodenum (D), cecum (C) and ascending colon (AC), measured by ELISA and expressed in ng/mL protein. Values of S100B are mean and standard error in the tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) and analgesic recovery (AR; n=8) groups.

Figure 4. GFAP content and distribution in intestinal regions of *Chinchilla lanigera*. Values expressed as percentages compared to the control (100%), represented by the line. GFAP content in the regions of the the duodenum (D), cecum (C) and ascending colon (AC), measured by ELISA and expressed in ng/mL protein. Values of GFAP are mean and standard error in the tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) and analgesic recovery (AR; n=8) groups.

Figure 5. Mean (\pm SD) of GFAP immunolabeling in the submucous (SP) and myenteric (MP) plexus in duodenum of *Chinchilla lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups. * $p < 0.05$ relative to immunolabeling between submucous and myenteric plexus.

Figure 6. Mean (\pm SD) of GFAP immunolabeling in the submucous (SP) and myenteric (MP) plexus in cecum of *Chinchilla Lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups.

Figure 7. Mean (\pm SD) of GFAP immunolabeling in the submucous (SP) and myenteric (MP) plexus in ascending colon of *Chinchilla lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups.

Figure 8. Mean (\pm SD) of GFAP immunolabeling in the duodenum (D), cecum (C) and ascending colon (AC) of *Chinchilla lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups.

Figure 9: Immunohistochemistry for GFAP of enteric slices from *Chinchilla lanigera*. Photomicrographs showing GFAP immunoreactive cells in the myenteric plexus (MP) and submucosus plexus (SM) from chinchilas. In the control group: (D) duodenum, (C) cecum and

(AC) ascending colon. The treatment groups: tympanic, diet recovery and analgesic recovery. Immunohistochemical GFAP: the SM showed pronounced activation in all experimental groups, however, no statistical difference was showed. Scale bar = 50 μ m.

Figure 10. Mean (\pm SD) of S100B immunolabeling in the submucous (SP) and myenteric (MP) plexus in duodenum of *Chinchilla lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups. * p <0.05 relative to immunolabeling between submucous and myenteric plexus.

Figure 11: Immunohistochemistry for S100B of enteric slices from *Chinchilla lanigera*. Photomicrographs showing S100B immunoreactive cells in the myenteric plexus (MP) and submucosus plexus (SM) from chinchilas. In the control group: (D) duodenum, (C) cecum and (AC) ascending colon. The treatment groups: tympanic, diet recovery and analgesic recovery. Immunohistochemical S100B: SM showed pronounced activation in duodenum and cecum relative to immunolabeling between submucous and myenteric plexus (p <0.05) and showed a pronounced activation in all experimental groups, however, no statistical difference was showed. Scale bar = 50 μ m

Figure 12. Mean (\pm SD) of S100B immunolabeling in the submucous (SP) and myenteric (MP) plexus in cecum of *Chinchilla lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups. * p <0.05 relative to immunolabeling between submucous and myenteric plexus.

Figure 13. Mean (\pm SD) of S100B immunolabeling in the submucous (SP) and myenteric (MP) plexus in ascending colon of *Chinchilla lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups. * p <0.05 relative to immunolabeling between submucous (SP) and myenteric plexus (MP).

Figure 14. Mean (\pm SD) of S100B immunolabeling in the duodenum (D), cecum (C) and ascending colon (AC) of *Chinchilla lanigera*, for the control (C; n=8), tympanic (T; n=8), diet recovery (DR; n=8) or analgesic recovery (AR; n=8) groups.

Figure 1

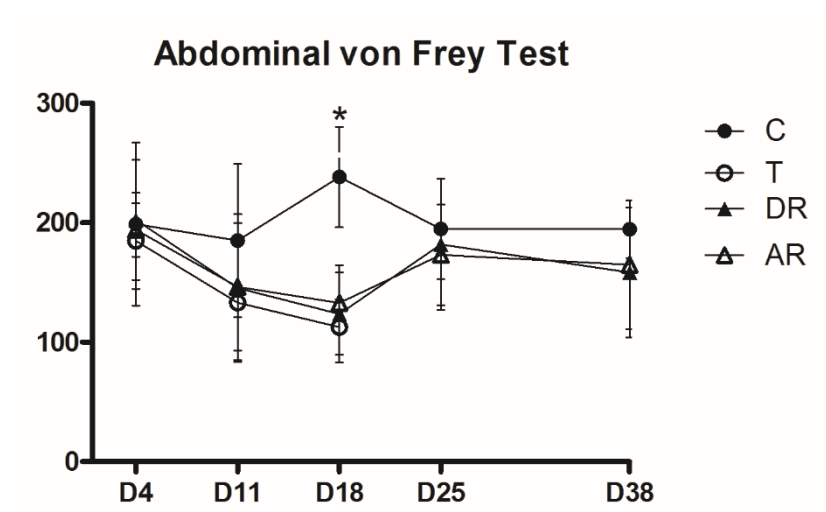


Figure 2

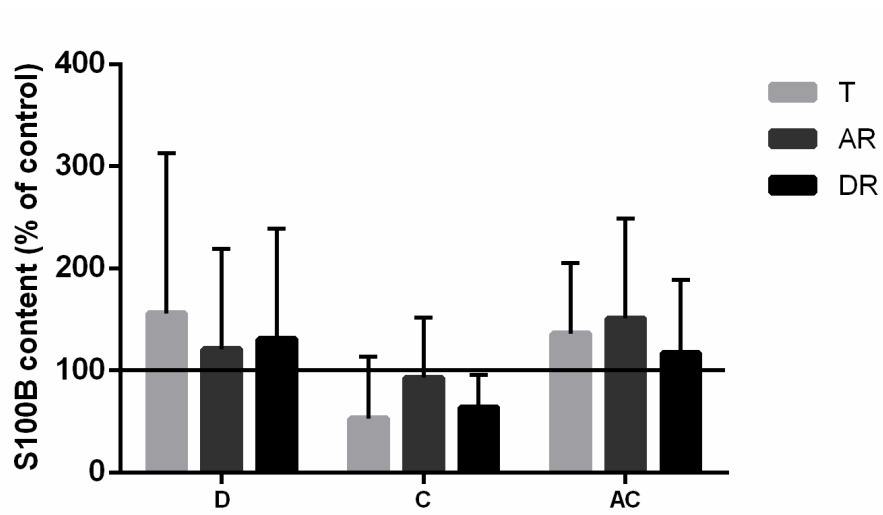


Figure 3

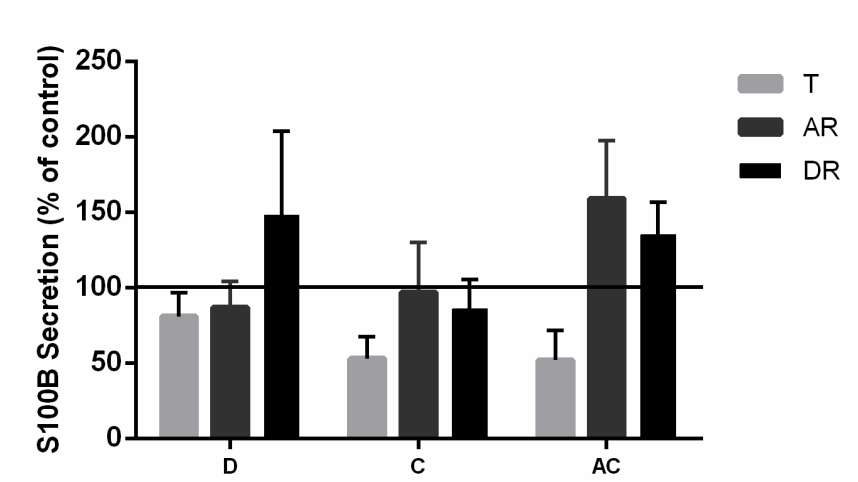


Figure 4

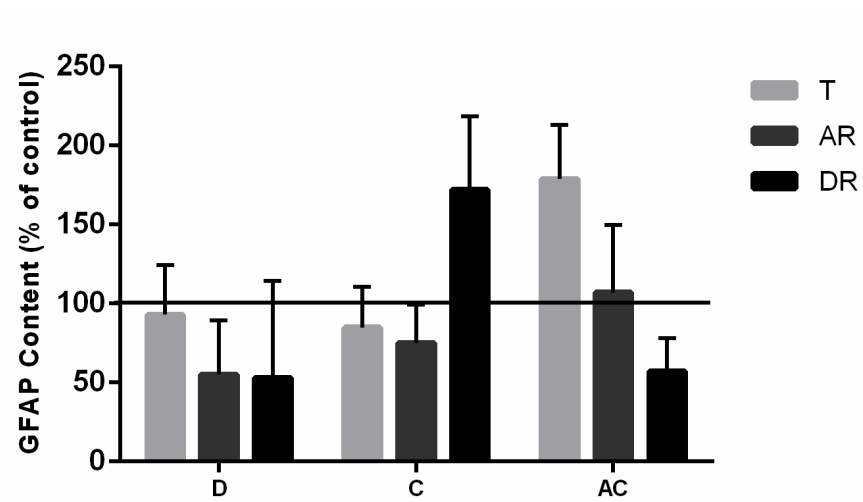


Figure 5

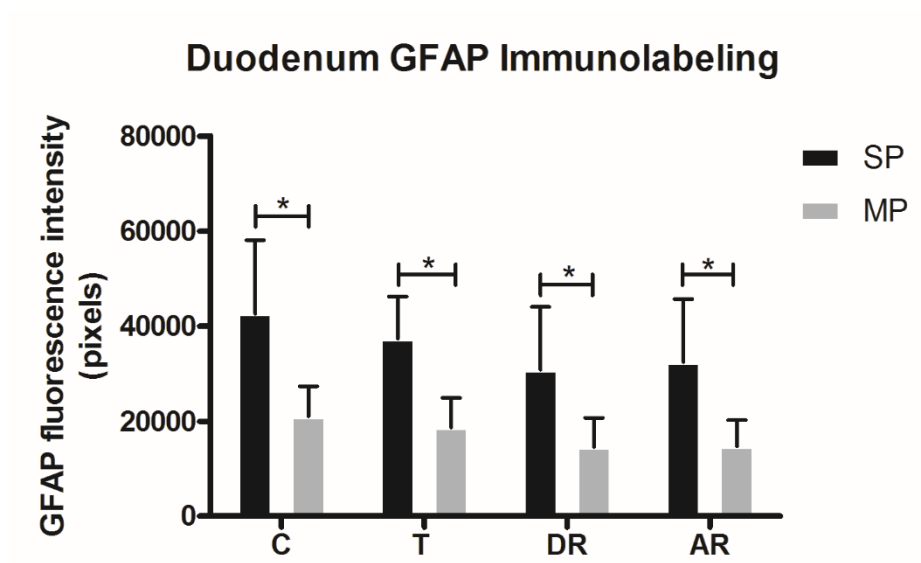


Figure 6

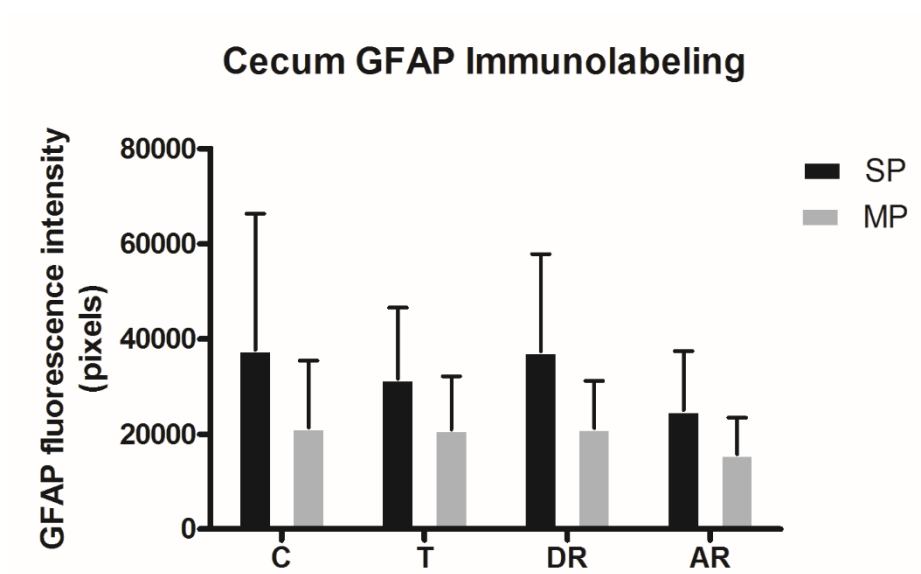


Figure 7

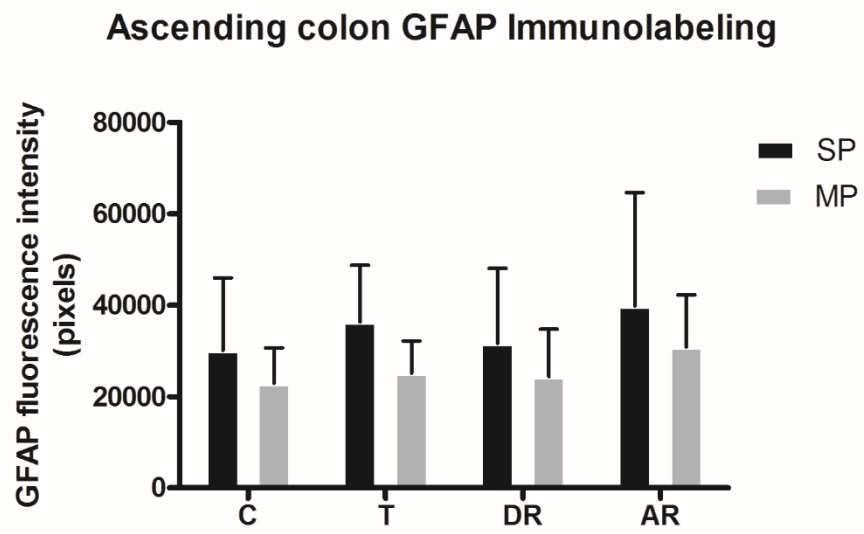


Figure 8

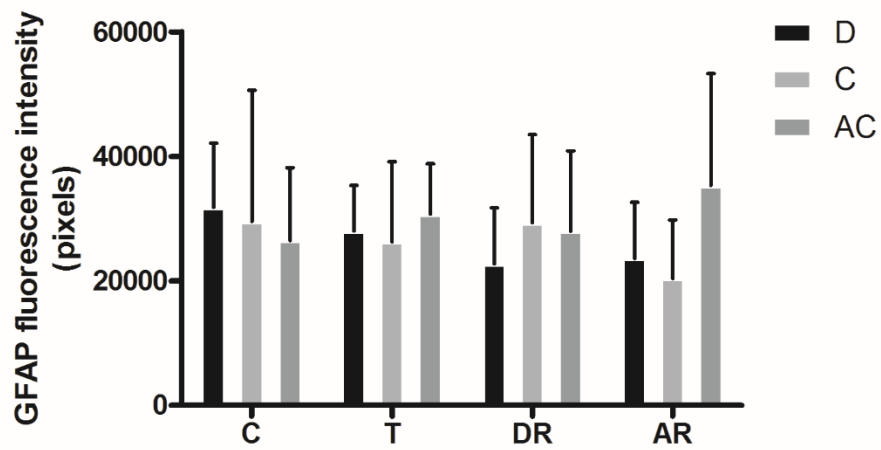


Figure 9

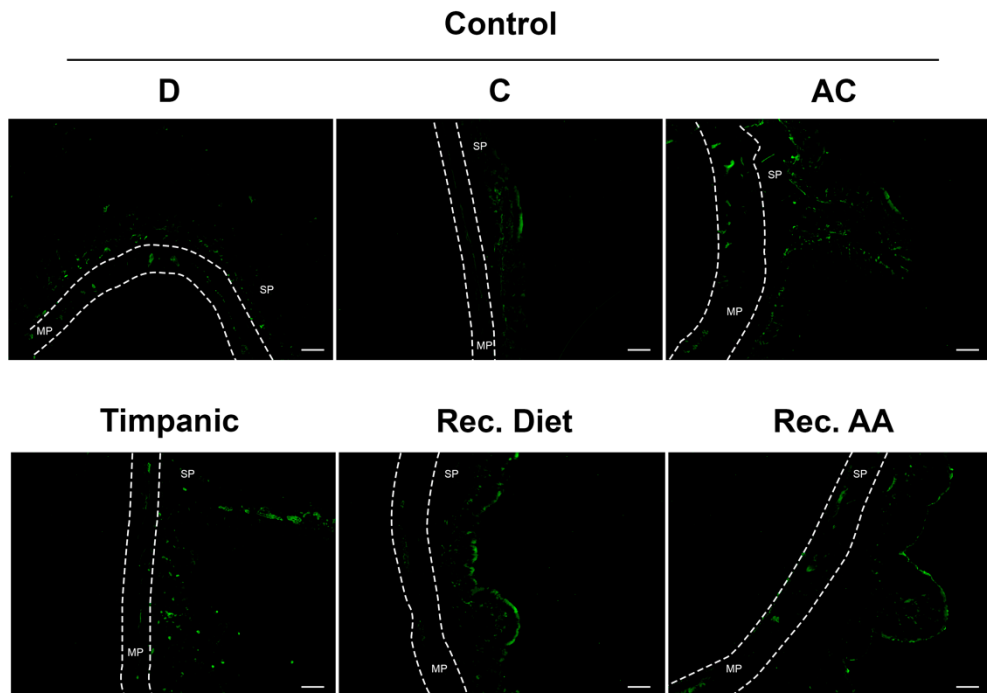


Figure 10

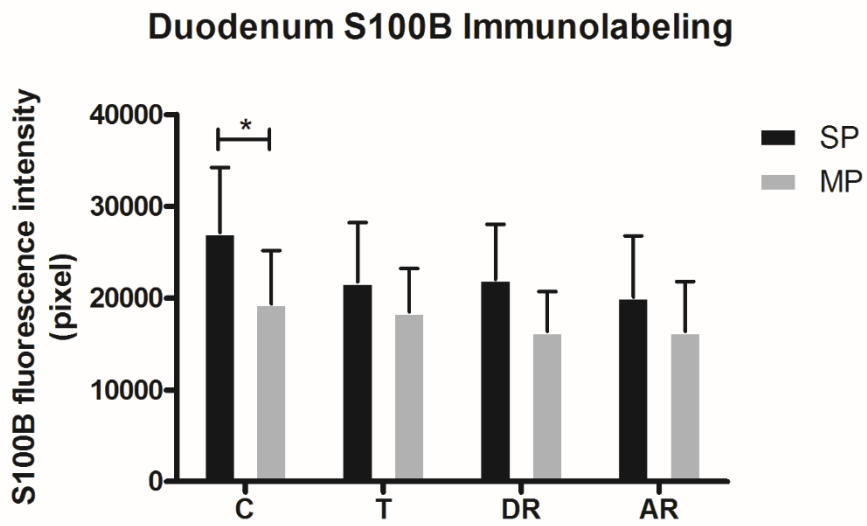


Figure 11

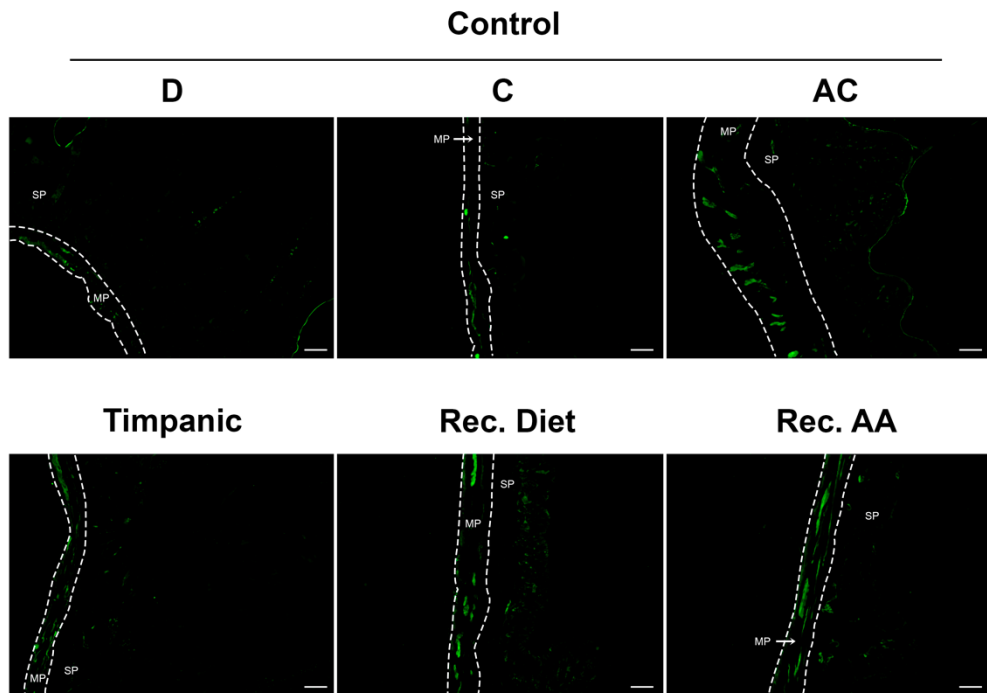


Figure 12

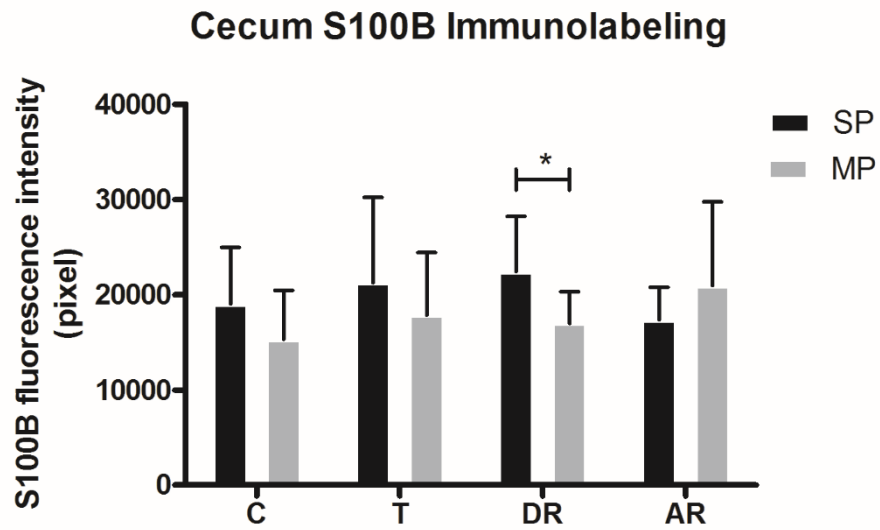


Figure 13

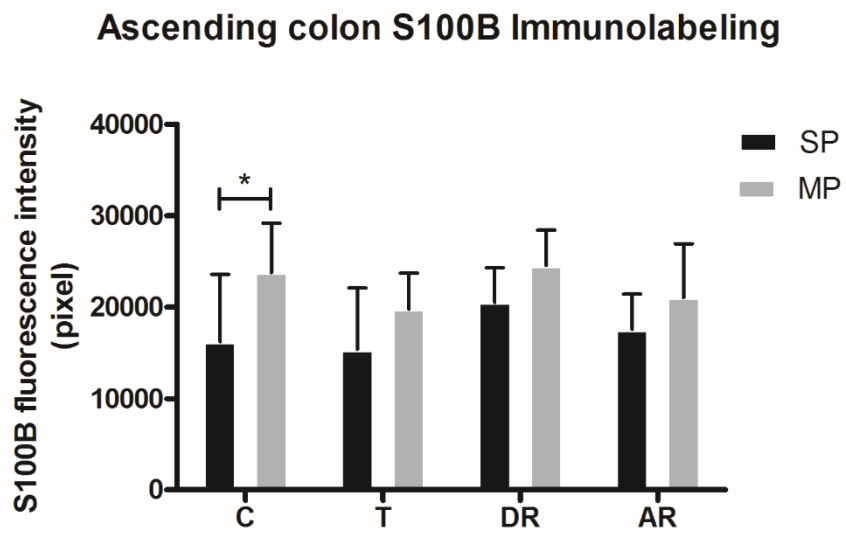
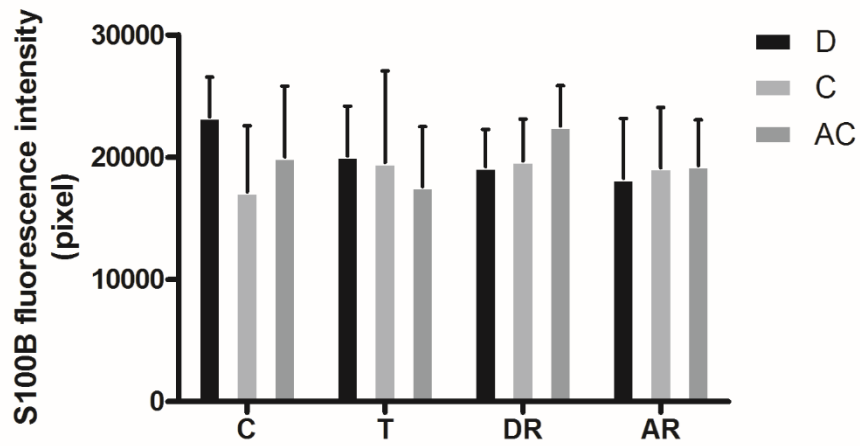


Figure 14



DISCUSSÃO

Apesar do sistema imunitário intestinal ser considerado especial por ser exposto constantemente a inúmeros antígenos dos alimentos, de bactérias residentes e de microrganismos invasores, gerando um estado de "inflamação fisiológica" muito controlada (Wittig e Zeitz, 2003), já está bem estabelecido que inflamações no TGI também causam mudanças tanto estruturais quanto funcionais nesse sistema. Ainda, que as respostas no SNE variam de acordo com o tipo e extensão do processo inflamatório, que por consequência depende da natureza do estímulo (Collins, 1996; Sharkey & Kroese, 2001; Lomax et al., 2005).

Além da função da glia entérica no desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação dos neurônios, por sua capacidade de proliferação e liberação de diversas substâncias, como neurotrofinas, fatores de crescimento e citocinas anti e pró-inflamatórias, as CEG também contribuem para a resposta imunitária, protegendo a superfície mucosa e atuando como um componente celular intermediário entre o sistema imunológico e o SN ao longo do TGI (Bush, 1998; Esposito et al., 2007, von Boyen & Steinkamp, 2010; Yu & Li, 2014). As CEG possuem mecanismos moleculares potencialmente capazes de desencadear imunidade inata no intestino (Turco et al., 2014), sendo consideradas fundamentais na regulação de eventos inflamatórios intestinais (Cirillo et al., 2011; Neunlist et al, 2014). Em situações de colite a CEG aumenta a liberação de GDNF (fator neurotrófico derivado da glia), que possui propriedades anti-apoptóticas e limitam as lesões epiteliais que ocorrem durante uma inflamação (Steinkamp et al., 2003). Além de desempenhar um papel ativo na fisiologia e fisiopatologia do TGI, bem como suas implicações em doenças do sistema digestório (Neunlist et al, 2014), também estão relacionadas à neurotransmissão entérica (Bassotti et al., 2007), controle da motilidade (Aubé et al., 2006) e da secreção gastrointestinal, fluxo sanguíneo, captação de nutrientes, homeostase do TGI através da manutenção e conservação da integridade da barreira mucosa e proteção contra a invasão de patógeno (Rühl, 2004; Matteoli, 2011; Yu e Li, 2014; Uesaka et al., 2016). Agentes nocivos que possam afetar a integridade das células glias e imunitárias do TGI comprometem a homeostase, levando a disfunções do TGI (Neunlist et al, 2014).

A interação entre o complexo sistema imunitário da mucosa intestinal com placas de Peyer, folículos linfoides na mucosa do cólon, linfócitos na lâmina própria e linfócitos intraepiteliais podem criar sistemas locais de proteção da parede intestinal e respostas

diferenciadas regionais a estímulos luminiais ou sistêmicos. Com base nesta hipótese, as nossas análises foram realizadas de forma comparativa em três diferentes regiões intestinais, porque encontramos respostas diferenciadas do TGI ao timpanismo, o qual afetou principalmente o ceco e o cólon ascendente (Martinez-Pereira et al., 2014). Com base nisso, adicionalmente à literatura que demonstra existir uma resposta inflamatória menor nas porções mais rostrais do intestino delgado (Gulbransen & Sharkey, 2012) e visando realizar uma comparação dos diferentes tipos de inflamação desenvolvidos por distintos protocolos, optamos por analisar as mesmas regiões, tanto nos ratos submetidos ao LPS sistêmico como nas chinchilas sob timpanismo provocado pela dieta, ou seja, uma alteração iniciada no lúmen intestinal.

Ao compararmos as análises histológicas dos dois modelos de protocolos utilizados nos dois trabalhos, observamos respostas distintas nos segmentos intestinais analisados. O duodeno foi a região menos afetada e o ceco foi o mais afetado em todos os momentos e doses, enquanto o cólon proximal manteve-se em uma pontuação intermediária. A administração de LPS intraperitoneal causou uma resposta inflamatória intestinal dependente da dose, tempo e região nos ratos. As análises histológicas dos efeitos de diferentes doses de LPS em ratos revelaram que a menor dose de LPS ($0,25 \text{ mg kg}^{-1}$) não foi suficiente para induzir um estado inflamatório à 1h, visto que as três regiões analisadas não diferiram do controle, com apenas uma discreta perda de organização nas criptas intestinais. Com a maior dose de LPS ($2,5 \text{ mg kg}^{-1}$) foi observada uma inflamação moderada em todas as regiões entéricas, em todos os tempos, sendo o dano à cripta mais intenso no grupo 24h. Foi observado uma lesão visível na mucosa do duodeno, ceco e cólon dos ratos 24 horas e 7 dias após o tratamento com LPS, sendo o duodeno o segmento menos suscetível a essa resposta inflamatória. Houve um aumento evidente de linfócitos, células plasmáticas e no tamanho dos nódulos linfáticos mesmo com a menor dose de LPS ($0,25 \text{ mg kg}^{-1}$). Estes resultados diferenciados conforme a região entérica estão de acordo com o encontrado na literatura durante um quadro de inflamação intestinal induzida por LPS (Im et al., 2012). Ainda, trabalhos prévios mostraram alterações no íleo às 2 ou 4 horas após injeção intravenosa de LPS com doses mais baixas do que as usadas em nosso estudo (Crouser et al., 1997; Lobo et al., 2003). Nesses trabalhos não foi avaliada a histologia intestinal em períodos de tempo mais longos após a administração do LPS. No entanto, em modelos de endotoxemia (sepsis) em ratos, as alterações histopatológicas graves são encontradas após a administração de LPS (Gao et al., 2015) e estas são mantidas

por alguns dias (Yue et al., 2013). Assim, esses resultados demonstram a necessidade de também serem realizadas análises em períodos mais longos após a administração de LPS *in vivo*.

Os efeitos histopatológicos do protocolo de indução de CT nas chinchilas, desenvolvido anteriormente por nosso grupo de pesquisa, também foram diferenciados nas distintas regiões do TGI. As alterações histológicas se caracterizaram por um infiltrado inflamatório mais denso nas criptas do ceco e do cólon ascendente, confinados principalmente à mucosa, caracterizando um processo inflamatório subagudo nesses animais. Áreas infartadas também foram observadas nos vasos mesentéricos em todo o intestino dos animais timpânicos. Entretanto, esses danos foram revertidos nos animais do grupo recuperado, vinte dias após o regularização da dieta, os quais não apresentaram áreas infartadas nos vasos sanguíneos mesentéricos (Martinez-Pereira et al. 2014).

Com relação ao duodeno ser menos suscetível à resposta inflamatória desencadeada pelo LPS, consideramos que tal fato possa estar relacionado à distribuição regional de células imunitárias. As populações de linfócitos de TH17, TH22 e TReg são mais expressas no ceco humano em relação ao intestino delgado ou ao cólon, em contraste com os ratos, que expressam mais TH17 no íleo do que no intestino grosso (Wolff et al., 2012). Não encontramos estudos comparativos semelhantes para ratos, mas se a frequência de linfócitos supressores de inflamação é maior no intestino delgado de ratos do que no ceco, como ocorre em camundongos, isso explicaria a maior resposta no ceco do que no duodeno de ratos tratados com LPS. Uma resposta inflamatória menor nas porções mais rostrais do intestino delgado já foi observada em um estudo que usou uma abordagem inflamatória mais severa (Gulbransen & Sharkey, 2012). Ainda, a distribuição desigual das fosfatases alcalinas (AP) ou do seu nível de atividade nos enterócitos de várias partes intestinais também pode ser o motivo das diferentes respostas nos três segmentos intestinais. AP desfosforila um dos grupos de fosfatos tóxicos da fração lipídica A de LPS, diminuindo a inflamação (Poelstra et al., 1997; Bentala et al., 2002). A atividade intestinal de AP em roedores é inversamente proporcional à densidade bacteriana no intestino, enquanto a atividade enzimática é maior no duodeno e progressivamente menor no jejuno e no íleo (Lallès, 2010). O cólon exibe uma atividade de AP ainda menor do que o intestino delgado (Lev e Griffiths, 1982).

É provável que uma atividade aumentada da AP em resposta tanto ao LPS i.p. quanto ao efeito da CT, e que as características do TGI dos roedores herbívoros, como a *Chinchilla*

lanigera, tais como o trato muito longo, o ceco volumoso e o trânsito intestinal lento (Quinton, 2005), tenham influenciado para o desenvolvimento da doença nesses segmentos. Ainda, por tratar-se de uma inflamação com focos específicos na parede intestinal de algumas regiões, é provável que a grande diversidade na população celular nas diferentes regiões do TGI poderia ser um fator que estaria influenciando a resposta local à inflamação, através de mecanismos de controle inflamatórios locais e pelas características próprias do desenvolvimento da doença em áreas mais específicas. Como já descrito, a população de linfócitos é um dos tipos celulares que varia muito ao longo do TGI. Assim, uma diferença na distribuição de linfócitos supressores de inflamação no ceco, por exemplo, em relação ao intestino delgado, poderia explicar a menor resposta das CEG no ceco de animais submetidos ao protocolo de indução de CT. Além disso, uma menor resposta inflamatória nos segmentos do intestino delgado, neste caso o duodeno, já era esperada visto que, o aumento da sensibilização abdominal nos animais resulta de uma distensão acentuada nas paredes do ceco e do cólon, acompanhada da presença de focos isquêmicos nessas regiões. No entanto, a falta de conhecimento geral sobre a constituição celular das diferentes regiões do TGI de chinchilas dificulta uma melhor compreensão dos resultados obtidos e mantém as hipóteses no plano inseguro das especulações.

Além dos componentes dos sistemas imunes inato e adaptativos que contribuem para a proteção da superfície da mucosa, outro componente importante da homeostase do trato GI são as CEG. Como anteriormente referido, essas células atuam como um componente celular intermediário entre o sistema imunológico e o sistema nervoso através do TGI (Esposito et al., 2007; von Boyen & Steinkamp, 2010; Yu & Li, 2014). Existem evidências do estado dinâmico de CEG durante a vida adulta, podendo as células gliais do plexo mientérico e do submucoso serem renovadas em animais adultos (Joseph et al., 2011; Laranjeira et al., 2011; Kabouridis et al., 2015).

Como já descrito, as CEG expressam marcadores gliais, tais como GFAP, S100B e os fatores de transcrição SOX8, SOX9 e SOX10, e alterações na expressão dos níveis desses marcadores gliais tem sido observadas em vários distúrbios gastrointestinais associados a disfunções de barreira, como distúrbios intestinais inflamatórios (Clairembault et al., 2014; Grubišić & Gulbransen, 2016). Em nosso estudo avaliamos a expressão de dois marcadores de atividade glial, GFAP e S100B intra e extracelular, em resposta tanto à administração de um fator inflamatório, LPS, de forma sistêmica em ratos, como pela administração de uma dieta

que desencadeasse um distúrbio luminal (CT), resultando também em alteração de natureza inflamatória diretamente sobre a parede intestinal em chinchilas. Embora os distúrbios pudessem ser confirmados por alterações morfológicas indicadoras de processos inflamatórios, essas alterações morfológicas nem sempre foram seguidas por alterações concomitantes na expressão de GFAP e S100B das CEG em resposta aos estímulos inflamatórios utilizados.

Apostando na diversidade de CEG nos diferentes segmentos intestinais dos animais em geral, observamos que o conteúdo de proteína S100B basal, tanto nos ratos tratados com veículo quanto nas chinchilas do grupo controle, foi maior no cólon em relação ao ceco e duodeno desses animais. No entanto, é importante esclarecer que, neste momento, não podemos concluir se a diferença no conteúdo de S100B entre as regiões intestinais seja devido à existência de número maior de células S100B positivas ou à expressão aumentada desta proteína. De qualquer forma, diferenças funcionais da glia entérica encontrada entre os diferentes segmentos intestinais reforçam a importância de se observar os efeitos de patologias nas diferentes regiões do TGI, o que comumente não encontramos na maioria dos trabalhos experimentais. Mesmo que a glia entérica tenha uma origem comum, produzidas a partir do mesmo progenitor, espera-se que ao longo da vida adulta se estabeleçam subtipos de CEG, resultando em uma plasticidade fenotípica de acordo com sua localização no TGI e contexto fisiológico variável (Boesmans et al., 2014). Esse é mais um aspecto de similaridade entre as CEG e os astrócitos, visto que a astrogliose reativa exibe heterogeneidade de acordo com regiões do SNC, da morfologia celular ou da sinalização celular, entre outros aspectos (Anderson et al., 2014). Assim, essa heterogeneidade nas células gliais pode estar interferindo na regulação das respostas imunes e inflamatórias. Na literatura são descritas diversas patologias que afetam de forma heterogênea o TGI. A análise de pacientes com doença de Chagas revelou que a destruição neuronal e glial iniciada pelo parasita e a resposta imunitária responsável pelo aspecto crônico da doença não afetava todo o intestino (da Silveira et al., 2009). As possíveis respostas diferenciadas poderiam ser explicadas pelo perfil heterogêneo funcional das CEG ao longo do TGI. Foram reconhecidos dois (Hanani & Reichenbach, 1994) ou quatro (Boesmans et al., 2014) subtipos diferentes de CEG mioentéricas em camundongos. Com base na proposta de um perfil diferenciado das CEG ao longo do TGI, não foi surpresa uma variação de resposta das CEG nas distintas regiões do TGI dos ratos submetidos ao LPS.

Nas três regiões analisadas dos ratos houve aumento na S100B intracelular após 24 horas da administração da maior dose de LPS, em associação com o maior escore de inflamação. As CEG ao serem ativadas por um processo inflamatório intestinal, assim como os astrócitos quando submetidos à astrogliose reativa no SNC, apresentam sinalização e aumento do influxo de cálcio, além de alterações morfológicas e aumento na expressão e/ou secreção das proteínas GFAP e S100B. Sabe-se que a proteína S100B participa extensivamente no aparecimento e na progressão do estado inflamatório. O aumento da secreção da S100B pela glia contribui para o desenvolvimento da inflamação através da ativação de receptores para produtos finais de glicação avançada. Estes, por sua vez, levam a produção de NO, formação de espécies reativas de oxigênio, aumento do estresse oxidativo no ambiente local e dano neuronal. A S100B extracelular, em concentração micromolar, é necessária para obtenção de efeitos pró-inflamatórios, enquanto a secreção basal S100B à nível nanomolar produz efeitos neuroprotetores (Chow & Gulbransen, 2017). Curiosamente, apesar de existir aumento local de S100B durante a inflamação do trato GI, já foi observado diminuição nos níveis séricos de S100B em pacientes com CU (Celikbilek et al., 2014). Se supõe que tal diminuição ocorra devido a danos causados pela exposição ao estresse inflamatório prolongado pelas CEG que secretam S100B. Ainda, dependendo da viabilidade das CEG, podem ocorrer oscilações nos níveis séricos de S100B ao longo do tempo da IBD, podendo tais mudanças ser úteis na determinação da cronicidade da inflamação (Chow & Gulbransen, 2017). Para Chow & Gulbransen (2017) tais ações aparentemente contraditórias podem estar relacionadas à quantidade de secreção e de concentração extracelular de produtos gliais, como se observa na secreção de S100B, ou à via de sinalização, diretamente correlacionadas com a gravidade de processos degenerativos intestinais, pela qual as CEG são ativadas.

Embora uma resposta inflamatória já esteja visível no ceco após 1 hora da dose mais alta de LPS, um aumento detectável de S100B só pode ser observado poucas horas depois. Além disso, após uma semana, enquanto o tecido ainda apresentava alterações morfológicas, especialmente no cólon proximal, os níveis da proteína S100B retornam a níveis basais ou níveis ligeiramente inferiores aos do controle neste ponto de tempo. Esses resultados estão em contraste com o nível basal de expressão da proteína S100B maior no cólon proximal. O escore histopatológico do cólon foi menor do que no ceco e a recuperação da resposta inflamatória foi mais lenta, uma vez que, após uma semana depois da injeção de LPS, o cólon ainda apresentava sinais de inflamação, embora a atividade concomitante das CEG não tenha

sido observada. Aparentemente, estes resultados indicam uma possível resistência do cólon a alterações agudas ou subagudas pelo LPS, em relação ao ceco ou ao intestino delgado, como também foi encontrado 2h após aplicação de LPS via enema retal em camundongos (Im et al., 2012). Este efeito é atribuído aos mecanismos de proteção intrínseca do cólon, como o estabelecimento de uma barreira com secreção de anticorpos IgA e de muco produzido por células caliciformes do epitélio colônico (Johansson et al., 2011; Im et al., 2012). Quando, entretanto, o LPS é administrado de forma sistêmica, o cólon poderá ser afetado por outras formas, humorais ou neurais. Cabe ressaltar ainda que no trabalho de Im e colaboradores (2012) foram utilizadas doses diárias de LPS, via enema retal, por dois ou cinco dias e os resultados analisados no intervalo de até 10 dias após o início do tratamento. Isso significa que tanto a aplicação por via diferenciada da intraperitoneal, utilizada em nosso trabalho, quanto o tempo de análise dos tecidos, possam ter ocasionado resultados contrários entre os estudos.

Doenças como colite ulcerativa (Cirillo et al., 2009) ou doença celíaca (Esposito et al., 2007) resultam em expressão e liberação aumentadas de S100B pelas CEG. Com base em dados como esses, supomos que o processo inflamatório provocado pela CT pudesse levar à maior atividade da glia entérica e ao aumento da expressão e liberação de S100B pelas CEG, porém, não foi observado este efeito sob o timpanismo. Encontramos, inclusive, diminuição do conteúdo intracelular de S100B no ceco nos animais timpânicos. Quando medido ex-vivo, a secreção de S100B entérico nas chinchilas timpanizadas também não diferiu significativamente do grupo controle nos três segmentos intestinais. Mesmo que o timpanismo provoque alterações estruturais na parede intestinal das chinchilas, encontramos uma variabilidade tão grande nas respostas glias entéricas destes animais que não ficou evidente ou significativo algum efeito do timpanismo sobre as células glias do TGI.

Diferentemente das alterações no conteúdo intracelular S100B, as modificações no nível de secreção S100B nas três regiões intestinais dos ratos não foram significativas. Embora a concentração intracelular de S100B tenha aumentado nas três regiões intestinais, não verificamos aumentos extracelulares semelhantes de S100B nos diferentes tempos com as distintas doses de LPS. A administração de LPS induziu um aumento apenas nas fatias do ceco no tempo de 24 h. Este aumento ex-vivo da secreção de S100B no ceco foi confirmado pela avaliação da integridade celular, medida pela atividade de LDH extracelular. O aspecto morfológico com escore de inflamação mais alto no ceco, em comparação com duodeno e

cólon, coincidiu com as maiores porcentagens de aumento na secreção de S100B, nas 24 horas pós-endotoxina, em relação aos outros segmentos intestinais dos animais tratados. Se considerarmos que a secreção de S100B pode levar a uma maior expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) e peroxidação lipídica (Esposito et al., 2007; Turco et al., 2014) capaz de induzir inflamação (De Filippis et al., 2011), isso poderia explicar a maior resposta inflamatória na mucosa do ceco em resposta à presença de altas doses de LPS. O nível elevado de secreção de S100B não se mantém, retornando aos níveis basais mesmo que os tecidos ainda mostrem alguns aspectos de inflamação. Em estudos *in vitro* o aumento da expressão da proteína S100B pelas CEG na presença de LPS já havia sido observada (De Filippis et al., 2011; Esposito et al., 2007; Turco et al., 2014). Nossos dados demonstrando alterações nos níveis intracelulares e extracelulares de S100B no intestino são os primeiros obtidos após a administração sistêmica de LPS. Embora os dados *in vivo* estejam sujeitos a uma alta variabilidade da resposta inflamatória, foi possível observar alterações neste marcador de atividade enterotípica. Outra limitação dos resultados *in vivo* é a variabilidade da população CEG, com subtipos de CEG morfológica e quimicamente diferenciáveis. Esses subtipos estão localizados em diferentes regiões da parede intestinal, respondendo de forma diferente às citocinas (Tjwa et al., 2003). A expressão de seus marcadores (GFAP, S100B e Sox10) é muito dinâmica, mudando constantemente ao longo do tempo (Boesmans et al., 2014).

Como a proteína S100B é produzida no intestino apenas pelos CEG (Ferri et al., 1982), as alterações significativas no S100B intracelular deveriam ser seguidas por alterações na secreção de proteínas. No entanto, como já descrito anteriormente, mesmo em culturas de astrócitos, a variação intracelular em S100B nem sempre é seguida por alterações na secreção da proteína (Ziegler et al., 2004; Goncalves et al., 2008; Leite et al., 2008). Em nosso estudo não encontramos variação expressiva na secreção de S100B entérica em resposta ao desafio sistêmico de endotoxina e não observamos aumento da produção de S100B nas chinchilas indicando um aumento da atividade da glia entérica frente ao protocolo de CT. Há poucos estudos para doenças do TGI associadas com a regulação positiva de S100B, indicando o envolvimento da liberação de proteína S100B nas respostas inflamatórias do intestino humano (Cirillo et al., 2011; Esposito et al., 2007; Turco et al., 2014). Em contraste, um estudo demonstrou uma diminuição no nível S100B no soro em pacientes com colite ulcerativa (Celikbilek et al., 2014). No entanto, neste momento, não é possível ter certeza de quanto a

S100B entérica contribui para os níveis séricos de S100B, pois outras fontes dessa proteína podem estar envolvidas (Goncalves et al, 2008).

Com relação à expressão da proteína GFAP, os resultados mostraram-se variáveis nos diferentes modelos de roedores e nos protocolos experimentais utilizados nestes estudos. Assim como as alterações encontradas para S100B, o LPS também foi capaz de induzir um aumento na GFAP intestinal dos ratos em todas as regiões entéricas 24 h após a injeção da dose mais alta de LPS. Curiosamente, no ceco, observamos um aumento no GFAP à 1h após o LPS, também na dose mais alta. Corroborando com estes resultados, o conteúdo aumentado de GFAP foi detectado no sistema entérico em distúrbios gastrointestinais, como colite ulcerativa (Cornet et al., 2001; von Boyen et al., 2011) e em culturas de CEG expostas ao LPS (von Boyen et al., 2004). Além disso, observamos uma variação regional do GFAP para a exposição LPS *in vivo*. Usando a mesma dose elevada de LPS, Rosenbaum et al (2016) encontraram níveis aumentados de expressão do gene GFAP na camada muscular duodenal e colônica às 4 h após a injeção. O ceco não foi analisado por estes autores. No duodeno e cólon proximal encontramos um aumento do conteúdo de GFAP apenas às 24h após a injeção de LPS. Aparentemente, uma resposta rápida de CEG para exposição a LPS pode durar 24 horas de condição de inflamação. O aumento agudo e específico do conteúdo de GFAP na primeira hora após a exposição ao LPS no ceco pode envolver mudanças estruturais no GFAP (por exemplo, fosforilação) que afetam o reconhecimento de anticorpos do GFAP e não necessariamente seu conteúdo (Tramontina et al., 2007).

O timpanismo por alteração alimentar brusca não provocou diferenças significativas no conteúdo de GFAP no intestino de chinchilas timpânicas em relação às controles ou recuperadas. Aparentemente, sob algumas condições inflamatórias subagudas ou crônicas pode não ser observado um aumento nos níveis de GFAP entérico. A ausência de alteração significativa no nível de GFAP glial intestinal após uma semana de manifestação de sintomas de CT pode ser interpretada como ausência de respostas de proliferação enteroglial ou de hipertrofia dos processos celulares das CEG frente ao timpanismo. Isso poderia indicar uma baixa resposta das CEG frente ao insulto inflamatório associado à CT ou uma diminuição da atividade das CEG com a continuidade do timpanismo, evitando contribuir, dessa forma, um comprometimento maior da parede do TGI ao timpanismo. Deve-se considerar, também, que na condição de CT prolongada, os sintomas clínicos são detectados 7 dias antes da obtenção dos tecidos para a análise do nível de GFAP. Para conferir se a resposta das CEG de chinchilas

se manifesta apenas inicialmente no processo inflamatório ou não é, de fato, responsiva a este tipo de insulto, sob condição de inflamação aguda, seria necessário um grupo timpânico agudo, com antecipação da morte dos animais até no máximo 24h após o início dos sintomas clínicos do timpanismo. Cabe ressaltar que em experimentos *in vivo*, entretanto, nem sempre é possível se observar alterações dos marcadores gliais das CEG sob situações inflamatórias em roedores, ou, então, as alterações são relatadas como diminuição da expressão de proteínas gliais (Rosenbaum et al., 2016). Especialmente neste contexto complexo de condição experimental *in vivo*, é importante a diferenciação das condições inflamatórias, avaliando a expressão de diferentes citocinas, por exemplo.

Aparentemente, mesmo que o timpanismo provoque focos de áreas infartadas no cólon ascendente, migrações de células imunitárias e aspecto inflamatório no ceco e cólon ascendente (Martinez-Pereira et al., 2014), este modelo de colite em chinchila não resultou em gliose reativa do plexo entérico, considerando a ausência de diferença significativa de expressão de GFAP nas áreas do TGI, pelos métodos de análise utilizados. Mesmo que o timpanismo provoque algumas alterações agudas na parede do TGI, verificadas na análise histopatológica, não temos certeza se essas alterações implicariam em lesões do sistema nervoso entérico em si, o que talvez justificaria a ausência de resposta glial. Algumas dificuldades inerentes ao procedimento de análise por anticorpos também devem ser consideradas. Em estudo anterior foram observadas modificações estruturais que afetaram o reconhecimento de anticorpos ao GFAP. Tais variações não foram acompanhadas de mudanças no conteúdo de GFAP (Tramontina et al., 2007). Nem sempre o aumento da expressão de GFAP pode ser relacionado diretamente à proliferação glial, como, por exemplo, em outras abordagens de situações experimentais pró-inflamatórias, nas quais o aumento de GFAP, encontrado em resposta à indução por interleucina pró-inflamatória ou pela citocina TNF α , não foi atribuído a uma possível proliferação da glia entérica (Von Boyen et al., 2004; Rühl et al., 2001).

O conteúdo de TNF α mensurado no sangue tanto da veia porta como sistêmico das chinchilas não diferiu significativamente entre os grupos estudados. A ausência da variação sistêmica de TNF α pode indicar uma baixa sensibilidade ao ensaio utilizado em relação, por exemplo, a uma análise tecidual intestinal desta citocina. Também devemos considerar a possibilidade do tempo em que esta citocina pró-inflamatória foi analisada, ou seja, duas semanas após o início da dieta dos timpânicos ou 7 dias após o início dos sintomas clínicos do

timpanismo. É possível que o nível de TNF α já não estivesse mais elevado, já que esta citocina pode ser produzida e secretada em maior quantidade na fase aguda inflamatória e, dependendo do tipo de resposta inflamatória, o nível desta citocina pode diminuir em processos subagudos ou crônicos (Heinrich et al., 1990; Gruys et al., 2005). As alterações histológicas observadas na mucosa intestinal resultantes da CT indicam um processo inflamatório subagudo nas chinchilas (Martinez-Pereira et al., 2014).

Outro motivo da escolha desta citocina como evidência de um processo inflamatório foi baseado nos resultados da necropsia realizada em trabalho anterior, quando foi observado entre as características histopatológicas um infiltrado de macrófagos nas chinchilas timpânicas (Martinez-Pereira et al., 2014), pois o TNF α é reconhecidamente liberado por macrófagos (Baker et al., 2012). Apesar da maior presença de macrófagos no intestino dos animais timpanizados, o nível de TNF α não estava elevado na circulação da veia porta. Faltou, entretanto, a análise diretamente dos tecidos entéricos para confirmar a presença aumentada ou não deste marcador pró-inflamatório. De qualquer forma, aparentemente a inflamação desenvolvida pelo protocolo de CT deve ser distinta de uma IBD (doença inflamatória intestinal), na qual a produção de TNF α segue elevada, participando da lesão crônica estabelecida nestes quadros (Nenci et al., 2007; Baker et al., 2012). Poderíamos ter escolhido outros marcadores inflamatórios, como o fator β de transformação do crescimento (TGF β), por exemplo. A liberação de TGF β também é observada durante o processo de inflamação crônica e alterações nos níveis ou na responsividade do TGF β têm sido descritas em doença inflamatória intestinal humana e em modelos animais de inflamação intestinal (Beck et al., 2003; Gyires et al., 2014; Shen et al., 2015). Propõe-se, inclusive, que TGF β possa ser produzido e liberado pela glia entérica, contribuindo para controlar uma eventual proliferação de células epiteliais de sua vizinhança (Neunlist et al., 2007).

Ainda, o perfil imunológico do processo inflamatório decorrente do timpanismo é um processo que precisa ser conhecido para acompanhamento da patologia e estudo da possibilidade de intervenção farmacológica adequada para o tratamento, seja em chinchilas ou em outros mamíferos também afetados pela CT ou abdômen agudo, como os cavalos.

Uma hipótese que sugerimos para compreender os diferentes resultados encontrados é em relação aos diferentes perfis bacterianos que compõem a microbiota intestinal. Já está bem estabelecido que a microbiota intestinal é crítica para a defesa contra agentes patogênicos invasores, estando envolvida na manutenção de um estado de alerta através do

controle de mediadores inflamatórios potentes e no desenvolvimento a longo prazo de respostas imunes intestinais, bem como que tratamentos com antibióticos afetam diversas vias envolvidas na resposta à infecção (Antunes et al., 2011). A homeostase das CEG da mucosa pode ser controlada pela diversidade da população bacteriana intestinal, não só pelo número de microorganismos (Kabouridis et al., 2015).

A espécie *C. lanigera* apresenta o ceco bastante desenvolvido em comparação a outros roedores, apresentando uma porção sacular espiralada, seguida de uma porção tubular que se continua em um cólon ascendente longo (Castro et al., 2010). A característica marcante da CT é a distensão acentuada da parede do ceco, devido ao acúmulo dos gases produzidos em excesso durante a digestão fermentativa (Franceschi, 2011). O ceco e o cólon ascendente possuem, ainda, mais uma característica peculiar, a existência de um sulco longitudinal ao longo da mucosa do cólon ascendente das chinchilas, responsável por devolver ao ceco água e bactérias juntamente com o muco, resultando em uma concentração de fluidos, bactérias e compostos nitrogenados no ceco (Holtenius & Björnhag, 1985). Esses componentes são periodicamente reintroduzidos no cólon, reciclando assim bactérias e compostos nitrogenados. Além disso, o ceco das chinchilas possui um metabolismo bacteriano semelhante ao do rúmen, utilizando as proteínas bacterianas produzidas na fermentação cecal (Worthington & Fulghum, 1988). Essas características podem influenciar no perfil resistente a alterações inflamatórias deste segmento, tornando o mesmo menos suscetível a modificações da homeostase em comparação aos outros segmentos analisados.

A microbiota associada à mucosa é potencialmente responsável por respostas pró- ou anti-inflamatórias e sua relação com o funcionamento apropriado do sistema imunitário (Round & Mazmanian, 2009) merece ser considerada com um dos fatores para que as respostas enterogliais *in vivo* a danos inflamatórios difiram entre os segmentos intestinais. A dominância bacteriana variável nos diferentes segmentos do TGI apoia a ideia de que as diferentes condições fisiológicas locais (motilidade intestinal, pH, potencial redox, nutrientes e secreções do hospedeiro) exerçam pressões seletivas sobre a formação da microbiota (Gu et al., 2013; Donaldson et al., 2015; Koboziev et al., 2014). Por exemplo, foi encontrada apenas no ceco uma abundância de espécimes de Proteobacteria, distinguindo o seu perfil de microbiota dos demais segmentos intestinais em camundongos (Gu et al., 2013). Descrição de 94 linhagens de bactérias Gram-negativas, anaeróbicas, bacilos e Gram-positivas já foram obtidas de fezes ou de ceco de *Chinchilla lanigera* (Worthington & Fulghum, 1988; Kitahara et

al., 2013). Ainda que não se saiba o significado funcional da diversidade e densidade microbiana, essa diferenciação encontrada ao longo do TGI também poderia contribuir para as respostas diferenciadas ao longo do TGI frente a alterações de dieta e no acúmulo de gases. Entretanto, a literatura quanto ao tipo e modificações da microbiota em quadros inflamatórios ainda é escassa para essa espécie, sendo necessária uma investigação detalhada, pois os poucos estudos reportam-se a bactérias oportunistas como a *Escherichia coli* (Diaz et al., 2013) e o *Clostridium perfringens* (Lucena et al., 2011 e 2012), descritas em quadros de infecção e morte destes animais.

Em trabalho anterior em chinchila, realizamos uma abordagem wholemout do plexo mioentérico dos segmentos intestinais para obter melhor entendimento da distribuição ganglionar e arquitetura das redes entéricas interganglionares (Franceschi, 2011). Diferentemente desta abordagem, utilizamos neste trabalho secções transversais para não excluirmos as camadas mucosa e submucosa. E como a imuno-histoquímica para GFAP e S100B cora as projeções citoplasmáticas gliais, além do corpo celular glial, dificultando a identificação individual cada célula glial, realizamos análise por densitometria óptica da imunorreação para obtermos uma comparação semiquantitativa da expressão destas proteínas entre os plexos submucoso e mioentérico de forma geral e não apenas da atividade dentro de gânglios entéricos. A análise imuno-histoquímica evidenciou nas chinchilas controles uma quantidade significativamente maior de GFAP imunorreativa em células do plexo submucoso do que no mioentérico. No duodeno, esta diferença foi mais acentuada (em média 50% maior na submucosa). No cólon ascendente esta diferença foi menor (em média, 24% maior na submucosa). Essas diferenças na proporção de GFAP imunomarcada também se observam nos animais tratados. Quando foi analisado o número de CEG exclusivamente intraganglionares em outras espécies (guinea pig e humanos), encontrou-se um número substancialmente maior de CEG no plexo mioentérico em relação ao plexo submucoso (Hoff et al., 2008). Entretanto, os autores admitem que a contagem apenas de CEG intraganglionares não revela a real quantidade de CEG, pela expressiva quantidade de elementos gliais extraganglionares, constituindo as redes maiores e menores, tanto do plexo mioentérico como submucoso (Hoff et al., 2008). Portanto, podemos supor que a expressiva quantidade de GFAP que encontramos nas CEG da camada submucosa deve estar distribuída também em partes extraganglionares do plexo submucoso. Os trabalhos que descrevem a distribuição e densidade de células gliais entéricas, e variações destas em

resposta a estímulos, são realizados principalmente em preparações de plexo mioentérico, excluindo as camadas mucosa e submucosa (Boesmans et al., 2014; Hanani & Reichenbach 1994; Nasser et al., 2007; Fekete et al., 1999, entre outros), de maneira que há muito poucos trabalhos para podermos estabelecer comparações com outras espécies de animais sobre a distribuição de CEG submucosa, além da mioentérica. Em análises quantitativas comparativas entre plexo mioentérico e submucoso em intestino delgado de camundongos, foi descrito um número consideravelmente maior de neurônios nos gânglios submucosos nas porções orais do intestino delgado do que nas caudais (Gabella, 1987), relacionado com a decrescente espessura das camadas submucosa e mucosa do duodeno em relação ao jejuno e íleo. Encontramos uma variação na espessura das camadas mucosa e submucosa similar em chinchilas (Franceschi, 2011). Ainda que não tenha sido realizada uma quantificação neuronal, a quantidade de GFAP imunomarcada significativamente maior na camada submucosa do duodeno em comparação ao ceco ou ao cólon ascendente, poderia indicar que o número de células gliais (ou de células gliais que expressam GFAP), e possivelmente de neurônios, do plexo submucoso deve ser maior no duodeno que no ceco e no cólon ascendente de *Chinchilla lanigera*.

A imunomarcção de S100B também foi significativamente maior no plexo submucoso em relação ao mioentérico do duodeno das chinchilas controles, o que contribui para a ideia de um provável número maior de células gliais entéricas no plexo submucoso que no mioentérico do duodeno. No entanto, a expressão maior de S100B mais evidente em uma sub-região ou camada pode ser um reflexo das condições fisiológicas variáveis junto à superfície luminal ou das características funcionais dos diferentes segmentos, o que levariam, por exemplo, à maior quantidade de S100B no plexo mioentérico do cólon ascendente em relação ao submucoso ou ao mioentérico dos demais segmentos de chinchilas controles. Se as condições basais revelam diferentes respostas gliais através da expressão diferenciada de seus marcadores ao longo do plexo entérico, as situações de desequilíbrio da homeostase, como uma inflamação provocada por acúmulo de gases em resposta a alterações da dieta, também levariam, possivelmente, a respostas diferenciadas da glia ao longo das diferentes regiões do plexo entérico. Não conseguimos demonstrar, entretanto, que CT experimental resulte em alterações diferenciadas da expressão de S100B glia entérica ao longo do TGI, com exceção de uma resposta diminuída de S100B no ceco de chinchilas timpanizadas em relação ao controle.

Uma dificuldade encontrada na realização de experimentos com chinchilas, e que pode ter influenciado na obtenção de diferenças que mostrassem ser significativas nos testes estatísticos aplicados, é a variabilidade dos animais, que é muito maior que a encontrada nos ratos fornecidos pelo CREAL da UFRGS. Mesmo que as chinchilas sejam fornecidas pela mesma Cabanha, os animais mostravam variações de tamanho e de peso, além do gênero.

A abordagem experimental escolhida em ambos trabalhos, inflamação sistêmica ou inflamação, provocada pela dieta, sobre todo o trato digestório, expôs a variabilidade das respostas obtidas. E isso decorre, provavelmente, da heterogeneidade das células gliais e de suas interações com demais elementos da parede do trato digestório, sejam nervosos, imunitários ou epiteliais. Essa interação dinâmica deve ser sempre levada em conta quando buscamos a translação de uma abordagem experimental específica, *in vitro* ou *ex-vivo*, para a análise nos indivíduos.

CONCLUSÕES

Concluindo, nossos resultados apontam que as células gliais entéricas respondem a situações inflamatórias, tanto desenvolvida localmente, junto à parede do TGI, como a processo inflamatório sistêmico, como o provocado por injeção intraperitoneal de LPS.

Doses elevadas (mas inferiores a um quadro de sepse) de LPS intraperitoneal em ratos podem levar à ativação das CEG. Pode-se supor que essa ativação influencie as respostas imunitárias, possivelmente amplificando-as, agindo como um componente celular intermediário entre SNE e o sistema imunológico. Os efeitos do LPS sistêmico podem ser observados em alterações estruturais na parede intestinal até mesmo por uma semana. Mesmo que o pico de S100B e GFAP entérico tenha sido observado 24 h após a injeção, indicando atividade glial aumentada, esse efeito pode ter, indiretamente, contribuído para a manutenção do aspecto alterado da parede intestinal por mais dias.

O timpanismo experimental em *Chinchilla lanigera*, caracterizado por focos de inflamação local, resulta em menor responsividade, ou sua ausência, das células gliais entéricas a essa inflamação. Este resultado pode indicar que mesmo que a parede intestinal mostre alterações compatíveis com quadro inflamatório, as CEG podem não responder a danos inflamatórios dessa natureza ou, então, a variabilidade de resposta dos grupos de chinchilas utilizadas não nos permitiu detectar diferenças significativas pelos procedimentos realizados.

E finalmente, demonstramos que um efeito inflamatório sistêmico pode ter consequências específicas e heterogêneas no trato gastrointestinal, com algumas regiões intestinais mais resistentes a alterações do que outras regiões. Entre tantas diferenças existentes entre os segmentos intestinais, as células gliais funcionalmente distintas podem estar contribuindo para essa heterogeneidade funcional.

PERSPECTIVAS

A partir dos resultados encontrados no presente trabalho novas questões são formuladas, abrindo a possibilidade de novos estudos, utilizando os dois modelos experimentais aqui apresentados.

1. Investigar se os distintos perfis bacterianos entre os segmentos intestinais das chinchilas influenciam a homeostase das CEG, bem como comparar possíveis variações desses perfis após o estabelecimento do quadro de inflamação oriundo da CT e seu processo de recuperação ou frente a outros agentes pró-inflamatórios como o LPS.

2. Realizar estudos sobre a constituição celular das diferentes regiões do TGI de chinchilas para auxiliar no entendimento das respostas inflamatórias observadas na CT;

3. Pesquisar outros marcadores inflamatórios locais no TGI, como por exemplo o fator β de transformação do crescimento (TGF β), para compreender melhor os efeitos da CT nas diferentes partes do TGI de chinchilas.

4. Realizar estudos farmacológicos nas chinchilas, por meio de ensaios *ex vivo*, buscando compreender melhor a progressão do processo inflamatório oriundo da CT e, eventualmente, auxiliar em novas opções de tratamento terapêutico para este quadro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M. A.; AO, Y.; SOFRONIEW, M. V. Heterogeneity of reactive astrocytes. **Neuroscience letters**, v. 565, p. 23-29, 2014. ISSN 0304-3940.

ANITHA, M. et al. GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 344, 2006.

ANTONIO, S. D. D. et al. Body composition prediction and net macroelements requirements (Chinchilla lanigera). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 548-553, 2007. ISSN 1413-7054.

ANTUNES, L. Caetano M. et al. Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1494-1503, 2011.

AUBE, A. C. et al. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. **Gut**, v. 55, n. 5, p. 630-637, 2006. ISSN 0017-5749.

BAKALETZ, L. O. Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention. **Expert review of vaccines**, v. 8, n. 8, p. 1063-1082, 2009. ISSN 1476-0584.

BAKER, J. et al. Medicinal lavender modulates the enteric microbiota to protect against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 7, p. G825-G836, 2012. ISSN 0193-1857.

BALASINGAM, V. et al. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 846-856, 1994. ISSN 0270-6474.

BAR, K. et al. Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. **Gastroenterology**, v. 112, n. 4, p. 1381-1385, 1997. ISSN 0016-5085.

BARNA, B. P. et al. Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. **Journal of neuroimmunology**, v. 30, n. 2, p. 239-243, 1990. ISSN 0165-5728.

BASSOTTI, G. et al. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? **Laboratory investigation**, v. 87, n. 7, p. 628-632, 2007. ISSN 0023-6837.

_____. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 13, n. 30, p. 4035, 2007.

BECK, P. L. et al. Transforming growth factor- β mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. **The American journal of pathology**, v. 162, n. 2, p. 597-608, 2003. ISSN 0002-9440.

BEKYÜREK, T.; LIMAN, N.; BAYRAM, G. Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Laboratory animals**, v. 36, n. 1, p. 51-60, 2002. ISSN 0023-6772.

BENTALA, H. et al. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. **Shock**, v. 18, n. 6, p. 561-566, 2002. ISSN 1073-2322.

BOESMANS, W. et al. Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 2, 2013. ISSN 1365-2982.

_____. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. **Glia**, v. 63, n. 2, p. 229-241, 2015. ISSN 1098-1136.

BOESMANS, W. et al. Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 2, 2013. ISSN 1365-2982.

BORGES, B. et al. Glial cell activity is maintained during prolonged inflammatory challenge in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 8, p. 784-791, 2012. ISSN 0100-879X.

BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y. K.; PAHAN, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4930-4939, 2006. ISSN 0270-6474.

BROWN, I. A. et al. Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. **CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 1, p. 77-91, 2016. ISSN 2352-345X.

BRUN, P. et al. Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 145, n. 6, p. 1323-1333, 2013. ISSN 0016-5085.

BUCHINSKY, F. J. et al. Virulence phenotypes of low-passage clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* assessed using the chinchilla laniger model of otitis media. **BMC microbiology**, v. 7, n. 1, p. 56, 2007. ISSN 1471-2180.

BURNS, A. J. Migration of neural crest-derived enteric nervous system precursor cells to and within the gastrointestinal tract. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 2-3, p. 143-150, 2003. ISSN 0214-6282.

BUSH, T. G. Enteric glial cells. An upstream target for induction of necrotizing enterocolitis and Crohn's disease? **Bioessays**, v. 24, n. 2, p. 130-140, 2002. ISSN 1521-1878.

BUSH, T. G. et al. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 189-201, 1998. ISSN 0092-8674.

BUSSO, J. et al. Electroejaculation in the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*): effects of anesthesia on seminal characteristics. **Research in veterinary science**, v. 78, n. 1, p. 93-97, 2005. ISSN 0034-5288.

BUSSO, J. M. et al. Assessment of urine and fecal testosterone metabolite excretion in *Chinchilla lanigera* males. **Animal reproduction science**, v. 86, n. 3, p. 339-351, 2005. ISSN 0378-4320.

_____. Noninvasive monitoring of ovarian endocrine activity in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **General and comparative endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 288-297, 2007. ISSN 0016-6480.

CABARROCAS, J.; SAVIDGE, T. C.; LIBLAU, R. S. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. **Glia**, v. 41, n. 1, p. 81-93, 2003. ISSN 1098-1136.

CARDIA, D. F. F. et al. An Oxyurid Nematode Identified in a Pet Chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 25, n. 4, p. 311-313, 2016. ISSN 1557-5063.

CARDOSO, F. L. et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 82, 2015. ISSN 1742-2094.

CARLETON, M.; MUSSER, G. Order Rodentia. In: WILSON, D. e REEDER, D. (Ed.). **Mammal species of the World: A taxonomic and geographic reference**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p.312-529.

CEVIK-DEMIRKAN, A. et al. Gross morphological features of plexus brachialis in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 78, n. 1, p. 21-24, 2007. ISSN 1019-9128.

CELIKBILEK, A. et al. The serum S100B level as a biomarker of enteroglia activation in patients with ulcerative colitis. **International journal of inflammation**, v. 2014, 2014. ISSN 2090-8040.

CHACALTANA, F. D. Y. C.; PIGATTO, J. A. T.; DENARDIN, I. T. Assessment of intraocular pressure in chinchillas of different age groups using rebound tonometry. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1466-1471, 2016. ISSN 0103-8478.

CHOW, A. K.; GULBRANSEN, B. D. Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 2, p. G145-G152, 2017. ISSN 0193-1857.

CIRILLO, C. et al. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 21, n. 11, p. 1209, 2009. ISSN 1365-2982.

_____. S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 10, p. 1261, 2011.

_____. Proinflammatory stimuli activates human-derived enterogial cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 9, 2011. ISSN 1365-2982.

CLAIREMBAULT, T. et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 130, n. 6, p. 805-815, 2014. ISSN 1471-4159.

_____. Enteric glial cells: new players in Parkinson's disease? **Movement Disorders**, v. 30, n. 4, p. 494-498, 2015. ISSN 1531-8257.

COELHO-AGUIAR, J. D. M. et al. The enteric glia: identity and functions. **Glia**, v. 63, n. 6, p. 921-935, 2015. ISSN 1098-1136.

COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1683-1699, 1996. ISSN 0016-5085.

COQUENLORGE, S. et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 202, 2014. ISSN 1742-2094.

CORNET, A. et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13306-13311, 2001. ISSN 0027-8424.

CORTÉS, A.; MIRANDA, E.; JIMÉNEZ, J. Seasonal food habits of the endangered long-tailed chinchilla (*Chinchilla lanigera*): the effect of precipitation. **Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 67, n. 3, p. 167-175, 2002. ISSN 1616-5047.

CORTÉS, A.; ROSENMAN, M.; BOZINOVIC, F. Water economy in rodents: evaporative water loss and metabolic water production. **Revista chilena de historia natural**, v. 73, n. 2, p. 311-321, 2000. ISSN 0716-078X.

CROSSLEY, D.; DUBIELZIG, R.; BENSON, K. **Caries and odontoclastic resorptive lesions in a chinchilla (*Chinchilla lanigera*)**: British Medical Journal Publishing Group 1997.

CROUSER, E. D. et al. Ischemia/reperfusion injury to the ileum does not account for the ileal VO₂-DO₂ alterations induced by endotoxin. **Journal of critical care**, v. 12, n. 4, p. 200-207, 1997. ISSN 0883-9441.

CUNNINGHAM, C.; SANDERSON, D. J. Malaise in the water maze: Untangling the effects of LPS and IL-1 β on learning and memory. **Brain, behavior, and immunity**, v. 22, n. 8, p. 1117-1127, 2008. ISSN 0889-1591.

D'OVIDIO, D. et al. Survey of *Hymenolepis* spp. in pet rodents in Italy. **Parasitology research**, v. 114, n. 12, p. 4381-4384, 2015. ISSN 0932-0113.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. **Human pathology**, v. 40, n. 2, p. 244-251, 2009. ISSN 0046-8177.

DE ARAUJO, A.; CAMPOS, R. Systematization, distribution and territory of the middle cerebral artery on the brain surface in chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 38, n. 1, p. 12-17, 2009. ISSN 1439-0264.

DE CASTRO, T. et al. Morphological, morphometric and topographical description of the digestive tract in *Chinchilla lanigera*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 86-94, 2010. ISSN 1413-9596.

DE CASTRO, T. F. et al. Formação do sistema venoso portal em *Chinchilla lanigera*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 44-48, 2007. ISSN 1678-4456.

DE FILIPPIS, D. et al. Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28159, 2011. ISSN 1932-6203.

DE GIORGIO, R. The human enteric nervous system in health and disease. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 192, p. 3-4, 2015. ISSN 1566-0702.

DE MAGISTRIS, L. et al. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 51, n. 4, p. 418-424, 2010. ISSN 0277-2116.

DE OLIVEIRA GAMBA, C. et al. Sistematização dos territórios nervosos do plexo braquial em chinchila (*Chinchilla lanigera*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 4, p. 283-289, 2007. ISSN 1678-4456.

DIAZ, L. L.; LEPHERD, M.; SCOTT, J. Enteric Infection and Subsequent Septicemia due to Attaching and Effacing *Escherichia coli* in a Chinchilla. **Comparative medicine**, v. 63, n. 6, p. 503-507, 2013. ISSN 1532-0820.

DIELEMAN, L. A. et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. **Clinical and experimental immunology**, v. 114, n. 3, p. 385, 1998.

DOGIEL, A. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere [German]. **Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abt Jg**, p. 130–158, 1899.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20-32, 2016. ISSN 1740-1526.

DONNELLY, T. M.; BROWN, C. J. Guinea pig and chinchilla care and husbandry. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 7, n. 2, p. 351-373, 2004. ISSN 1094-9194.

DULAC, C.; LE DOUARIN, N. M. Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 14, p. 6358-6362, 1991. ISSN 0027-8424.

DUNCAN, M. et al. Cannabinoid CB 2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, n. 1, p. G78-G87, 2008. ISSN 0193-1857.

ELENKOV, I. J. et al. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000. ISSN 0031-6997.

ESPOSITO, G. et al. Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- α activation. **Gut**, p. gutjnl-2013-305005, 2013. ISSN 0017-5749.

_____. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. **Gastroenterology**, v. 133, n. 3, p. 918-925, 2007. ISSN 0016-5085.

FEKETE, E. et al. Different distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive cells and their relations with nitrergic neurons in the human fetal small intestine. **Histology and histopathology**, v. 14, n. 3, p. 785-790, 1999. ISSN 1699-5848.

FERRI, G.-L. et al. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. **Nature**, v. 297, n. 5865, p. 409-410, 1982. ISSN 0028-0836.

FLETCHER, E. L.; CLARK, M. J.; FURNESS, J. B. Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. **Cell and tissue research**, v. 308, n. 3, p. 339-346, 2002. ISSN 0302-766X.

FORBES, M. L. et al. Strain-specific virulence phenotypes of *Streptococcus pneumoniae* assessed using the Chinchilla laniger model of otitis media. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e1969, 2008. ISSN 1932-6203.

FOX, L.; SNYDER, L. B.; MANS, C. Comparison of dexmedetomidine–ketamine with isoflurane for anesthesia of chinchillas (*Chinchilla lanigera*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 312-316, 2016. ISSN 1559-6109.

FRANCESCHI, R. D. C. **Caracterização morfológica e neuroquímica do plexo mientérico no intestino de Chinchilla lanigera (rodentia: chinchillidae) e avaliação de suas alterações sob cólica timpânica experimental**. 2011. Dissertation (Master). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRANCESCHI, R. D. C. et al. Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein. **Neuroscience research**, 2017. ISSN 0168-0102.

FRANCHI, V.; ALEUY, O. A.; TADICH, T. A. Fur chewing and other abnormal repetitive behaviors in chinchillas (*Chinchilla lanigera*), under commercial fur-farming conditions. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 11, p. 60-64, 2016. ISSN 1558-7878.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012. ISSN 1759-5045.

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987. ISSN 0306-4522.

GABELLA, G.; GAIA, E. Cell proliferation in Auerbach's plexus of the growing rat, in experimental conditions. **Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale**, v. 43, n. 23, p. 1584-1586, 1967. ISSN 0037-8771.

GAO, X. et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the intestine damage in endotoxemic rats. **Journal of Surgical Research**, v. 195, n. 1, p. 211-218, 2015. ISSN 0022-4804.

GEBOES, K. et al. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 103, n. 2, p. 439-447, 1992. ISSN 0016-5085.

GERSHON, M. D. Behind an enteric neuron there may lie a glial cell. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 9, p. 3386, 2011.

GOMES, P. et al. ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 21, n. 8, p. 870, 2009. ISSN 1365-2982.

GONÇALVES, C. A.; LEITE, M. C.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 755-763, 2008.

GONÇALVES, S.; JULLIAND, V.; LEBLOND, A. Risk factors associated with colic in horses. **Veterinary Research**, v. 33, n. 6, p. 641-652, 2002. ISSN 0928-4249.

GRANT, K. Rodent nutrition: digestive comparisons of 4 common rodent species. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 17, n. 3, p. 471-483, 2014. ISSN 1094-9194.

GRIFFIN, W. S. T. Inflammation and neurodegenerative diseases. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 470S-474S, 2006. ISSN 0002-9165.

GRUBIŠIĆ, V.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 2, p. 557-570, 2017. ISSN 1469-7793.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 6, n. 11, p. 1045, 2005.

GU, S. et al. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e74957, 2013. ISSN 1932-6203.

GUERRA, M. C. et al. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 128, 2011. ISSN 1742-2094.

GULBRANSEN, B. Colloquium Series on Neuroglia in Biology and Medicine from Physiology to Disease. **Enteric Glia**, p. 1-72, 2014.

GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 136, n. 4, p. 1349-1358, 2009. ISSN 0016-5085.

_____. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 11, p. 625-632, 2012. ISSN 1759-5045.

GYIRES, K.; VIKTORIA TOTH, E.; ZOLTAN ZADORI, S. Gut inflammation: current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 7, p. 1063-1081, 2014. ISSN 1381-6128.

HANANI, M. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. **Cell and tissue research**, v. 278, n. 1, p. 153-160, 1994. ISSN 0302-766X.

HANSEN, M. B. The enteric nervous system I: organisation and classification. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 105-113, 2003. ISSN 1600-0773.

HAO, M. M.; YOUNG, H. M. Development of enteric neuron diversity. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 7, p. 1193-1210, 2009. ISSN 1582-4934.

HAREL, N. et al. Three distinct auditory areas of cortex (AI, AII, and AAF) defined by optical imaging of intrinsic signals. **Neuroimage**, v. 11, n. 4, p. 302-312, 2000. ISSN 1053-8119.

HEFFNER, R. S.; HEFFNER, H. E. Behavioral hearing range of the chinchilla. **Hearing research**, v. 52, n. 1, p. 13-16, 1991. ISSN 0378-5955.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical journal**, v. 265, n. 3, p. 621, 1990.

HIRONAKA, R. **Feedlot finishing of cattle**. Minister of Supply and Services, 1992. ISBN 0662194098.

HOEFER, H. L. Chinchillas. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 103-111, 1994. ISSN 0195-5616.

HOFF, S. et al. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. **Journal of Comparative Neurology**, v. 509, n. 4, p. 356-371, 2008. ISSN 1096-9861.

HOLMBERG, B. J. et al. Taenia coenurus in the orbit of a chinchilla. **Veterinary ophthalmology**, v. 10, n. 1, p. 53-59, 2007. ISSN 1463-5224.

HOLTENIUS, K.; BJÖRNHAG, G. The colonic separation mechanism in the guinea-pig (*Cavia porcellus*) and the chinchilla (*Chinchilla laniger*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 82, n. 3, p. 537-542, 1985. ISSN 0300-9629.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 7, p. 3749-3752, 1999. ISSN 0022-1767.

HU, S. et al. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. **Neuroimmunomodulation**, v. 7, n. 3, p. 153-159, 2000. ISSN 1021-7401.

HULLAR, T. E.; WILLIAMS, C. D. Geometry of the semicircular canals of the chinchilla (*Chinchilla laniger*). **Hearing research**, v. 213, n. 1, p. 17-24, 2006. ISSN 0378-5955.

IFUKU, M. et al. Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 197, 2012. ISSN 1742-2094.

IM, E. et al. Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 4, p. G490-G497, 2012. ISSN 0193-1857.

JÄNIG, W. The enteric nervous system. In: (Ed.). **The integrative action of the autonomic nervous system: Neurobiology of homeostasis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. cap. 5, p.168-207.

JIMÉNEZ, J. E. The extirpation and current status of wild chinchillas *Chinchilla lanigera* and *C. brevicaudata*. **Biological Conservation**, v. 77, n. 1, p. 1-6, 1996. ISSN 0006-3207.

JOHANSSON, M. E.; LARSSON, J. M. H.; HANSSON, G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4659-4665, 2011. ISSN 0027-8424.

JOHNSON-DELANEY, C. A. Anatomy and physiology of the rabbit and rodent gastrointestinal system. *Proc. Assoc. Avian Vet*, 2006. p.9-17.

JONES, H. G. et al. Sound frequency-invariant neural coding of a frequency-dependent cue to sound source location. **Journal of neurophysiology**, v. 114, n. 1, p. 531-539, 2015. ISSN 0022-3077.

JOSEPH, N. M. et al. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 9, p. 3398, 2011.

KABOURIDIS, P. S. et al. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. **Neuron**, v. 85, n. 2, p. 289-295, 2015. ISSN 0896-6273.

KIMPE, A. et al. **Isolation of Listeria ivanovii from a septicemic chinchilla (Chinchilla lanigera)**: British Medical Journal Publishing Group 2004.

KISS, R. et al. Development and progression of malignancy in human colon tissues are correlated with expression of specific Ca²⁺-binding S100 proteins. **Histology and histopathology**, v. 16, n. 3, p. 707-712, 2001. ISSN 1699-5848.

KITAHARA, M. et al. Parabacteroideschinchillae sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3470-3474, 2013. ISSN 1466-5034.

KLEINSCHMIDT, S.; NOLTE, I.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Structural and functional changes of neuronal and glial components of the feline enteric nervous system in cats with chronic inflammatory and non-inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 3, p. e129-e135, 2011. ISSN 0034-5288.

KOBOZIEV, I. et al. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 122-133, 2014. ISSN 0891-5849.

KRAMMER, H. et al. The enteric nervous system—what can we learn from morphology. **Z Gastroenterol**, v. 2, n. Suppl, p. 5-13, 1997.

KRISHNAMURTI, C.; KITTS, W.; SMITH, D. C. The digestion of carbohydrates in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Canadian journal of zoology**, v. 52, n. 10, p. 1227-1233, 1974. ISSN 0008-4301.

LALLÈS, J. P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutrition reviews**, v. 68, n. 6, p. 323-332, 2010. ISSN 1753-4887.

LANGLEY, J. N. The autonomic nervous system (Pt. I). Cambridge, 1921.

LANGNER, G.; ALBERT, M.; BRIEDE, T. Temporal and spatial coding of periodicity information in the inferior colliculus of awake chinchilla (*Chinchilla laniger*). **Hearing research**, v. 168, n. 1, p. 110-130, 2002. ISSN 0378-5955.

LARANJEIRA, C.; PACHNIS, V. Enteric nervous system development: recent progress and future challenges. **Autonomic Neuroscience**, v. 151, n. 1, p. 61-69, 2009. ISSN 1566-0702.

LAVOIE, E. G. et al. Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 4, p. G608-G620, 2011. ISSN 0193-1857.

LEAL, M.; FRANÇA, L. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 509-518, 2009. ISSN 0093-691X.

LEAL, M. C.; FRANÇA, L. R. Postnatal Sertoli and Leydig cell proliferation and the establishment of puberty and sexual maturity in *Chinchilla lanigera* (Rodentia, Chinchillidae). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 6, p. 665-673, 2008. ISSN 1448-5990.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-99, 2008. ISSN 0165-0270.

LEV, R.; GRIFFITHS, W. C. Colonic and small intestinal alkaline phosphatase. **Gastroenterology**, v. 82, n. 6, p. 1427-1435, 1982. ISSN 0016-5085.

LEVECKE, B. et al. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A, B, C and E infections in pet chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in Flanders (Belgium). **Veterinary parasitology**, v. 177, n. 1, p. 166-170, 2011. ISSN 0304-4017.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, 2006. ISSN 0028-0836.

LIU, W.; YUE, W.; WU, R. Effects of diabetes on expression of glial fibrillary acidic protein and neurotrophins in rat colon. **Autonomic Neuroscience**, v. 154, n. 1, p. 79-83, 2010. ISSN 1566-0702.

LOBO, S. M. et al. Gut mucosal damage during endotoxic shock is due to mechanisms other than gut ischemia. **Journal of applied physiology**, v. 95, n. 5, p. 2047-2054, 2003. ISSN 8750-7587.

LOMAX, A.; FERNANDEZ, E.; SHARKEY, K. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 17, n. 1, p. 4-15, 2005. ISSN 1365-2982.

LUCENA, R. B. et al. Necrotizing enteritis associated with *Clostridium perfringens* Type B in chinchillas (*Chinchilla lanigera*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1071-1074, 2011. ISSN 0100-736X.

_____. Diseases of chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 529-535, 2012. ISSN 0100-736X.

MACEACHERN, S. J. et al. Nitric oxide regulation of colonic epithelial ion transport: a novel role for enteric glia in the myenteric plexus. **The Journal of physiology**, v. 589, n. 13, p. 3333-3348, 2011. ISSN 1469-7793.

MANI, V. et al. Growth and development symposium: endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. **Journal of animal science**, v. 90, n. 5, p. 1452-1465, 2012. ISSN 1525-3163.

MANS, C.; JEKL, V. Anatomy and disorders of the oral cavity of chinchillas and degus. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 19, n. 3, p. 843-869, 2016. ISSN 1094-9194.

MARGOLIS, K. G.; GERSHON, M. D. Enteric neuronal regulation of intestinal inflammation. **Trends in neurosciences**, v. 39, n. 9, p. 614-624, 2016. ISSN 0166-2236.

MARTINEZ-PEREIRA, M.; RICKES, E. The spinal nerves that constitute the lumbosacral plexus and their distribution in the chinchilla. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 82, n. 3, p. 150-154, 2011. ISSN 1019-9128.

MARTINEZ-PEREIRA, M. A. et al. Experimental model of tympanic colic (acute abdomen) in chinchillas (*Chinchilla lanigera*). **Laboratory animal research**, v. 30, n. 3, p. 136-141, 2014. ISSN 1738-6055.

MASTROMONACO, G. F. et al. Non-invasive endocrine monitoring of ovarian and adrenal activity in chinchilla (*Chinchilla lanigera*) females during pregnancy, parturition and early post-partum period. **General and comparative endocrinology**, v. 213, p. 81-89, 2015. ISSN 0016-6480.

MATTEOLI, G. Enteric glial cells: new players in mucosal defence against bacteria? **Gut**, p. gut. 2010.231019, 2011. ISSN 0017-5749.

MCCLAIN, J. L. et al. Ca²⁺ responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. **Gastroenterology**, v. 146, n. 2, p. 497-507. e1, 2014. ISSN 0016-5085.

METZGER, M. Neurogenesis in the enteric nervous system. **Archives italiennes de biologie**, v. 148, n. 2, p. 73-83, 2010. ISSN 0003-9829.

MIAMPAMBA, M.; SHARKEY, K. A. c-Fos expression in the myenteric plexus, spinal cord and brainstem following injection of formalin in the rat colonic wall. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 77, n. 2, p. 140-151, 1999. ISSN 0165-1838.

MIAMPAMBA, M. et al. Intracisternal TRH analog induces Fos expression in gastric myenteric neurons and glia in conscious rats. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. G979-G991, 2001. ISSN 0193-1857.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. GFAP in health and disease. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421-443, 2011. ISSN 0301-0082.

MITTAL, R.; COOPERSMITH, C. M. Redefining the gut as the motor of critical illness. **Trends in molecular medicine**, v. 20, n. 4, p. 214-223, 2014. ISSN 1471-4914.

MOORE, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 19, n. 6, p. 739-744, 1965. ISSN 0006-291X.

MORTON, D. J. et al. Reduced severity of middle ear infection caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* lacking the hemoglobin/hemoglobin-haptoglobin binding proteins (Hgp) in a chinchilla model of otitis media. **Microbial pathogenesis**, v. 36, n. 1, p. 25-33, 2004. ISSN 0882-4010.

MURAKAMI, M.; OHTA, T.; ITO, S. Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1 β from enteric glial cells. **Journal of neuroscience research**, v. 87, n. 9, p. 2095-2104, 2009. ISSN 1097-4547.

NAGAHAMA, M. et al. L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. **Neurosignals**, v. 10, n. 5, p. 336-340, 2001. ISSN 1424-862X.

NAGLIĆ, T. et al. Outbreak of *Salmonella enteritidis* and isolation of *Salmonella sofia* in chinchillas (*Chinchilla laniger*). **The Veterinary Record**, v. 152, n. 23, p. 719-720, 2003. ISSN 0042-4900.

NASSER, Y.; HO, W.; SHARKEY, K. A. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 495, n. 5, p. 529-553, 2006. ISSN 1096-9861.

NASSER, Y. et al. Expression of a functional metabotropic glutamate receptor 5 on enteric glia is altered in states of inflammation. **Glia**, v. 55, n. 8, p. 859-872, 2007. ISSN 1098-1136.

NELSON, D. A.; KIESTER, T. E. Frequency discrimination in the chinchilla. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 64, n. 1, p. 114-126, 1978. ISSN 0001-4966.

NENCI, A. et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. **Nature**, v. 446, n. 7135, p. 557-561, 2007. ISSN 0028-0836.

NEUNLIST, M. et al. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 1, p. G231-G241, 2007. ISSN 0193-1857.

_____. Enteric glial cells: recent developments and future directions. **Gastroenterology**, v. 147, n. 6, p. 1230-1237, 2014. ISSN 0016-5085.

_____. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. **Journal of internal medicine**, v. 263, n. 6, p. 577-583, 2008. ISSN 1365-2796.

NIEDBAŁA, P. et al. Influence of Selected Extenders for Liquid Storage at 4°C of Breeding Chinchilla (*Chinchilla lanigera*) Semen on Sperm DNA Integrity. **Folia biologica**, v. 63, n. 4, p. 279-287, 2015. ISSN 0015-5497.

OZDEMIR, V.; ÇEVİK-DEMİRKAN, A.; TURKMENOĞLU, I. The right coronary artery is absent in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 37, n. 2, p. 114-117, 2008. ISSN 1439-0264.

PASTERNAK, A. et al. Interstitial cells of Cajal—systematic review. **Folia morphologica**, v. 75, n. 3, p. 281-286, 2016. ISSN 1644-3284.

PAVLOV, V. A. et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Molecular medicine**, v. 9, n. 5-8, p. 125, 2003.

PEREYRA, M. L. G. et al. An outbreak of acute aflatoxicosis on a chinchilla (*Chinchilla lanigera*) farm in Argentina. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 20, n. 6, p. 853-856, 2008. ISSN 1040-6387.

PETRONETO, B. S. et al. Protozoários intestinais em chinchilas (*Chinchilla lanigera*) criadas em cativeiro, na região serrana do estado do Espírito Santo, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 1, p. 65-70, 2015. ISSN 1981-5484.

PIENKOWSKI, M.; HARRISON, R. V. Tone frequency maps and receptive fields in the developing chinchilla auditory cortex. **Journal of neurophysiology**, v. 93, n. 1, p. 454-466, 2005a. ISSN 0022-3077.

_____. Tone responses in core versus belt auditory cortex in the developing chinchilla. **Journal of Comparative Neurology**, v. 492, n. 1, p. 101-109, 2005b. ISSN 1096-9861.

POELSTRA, K. et al. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. **The American journal of pathology**, v. 151, n. 4, p. 1163, 1997.

QI, M. et al. Zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in pet chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in China. **Parasitology international**, v. 64, n. 5, p. 339-341, 2015. ISSN 1383-5769.

_____. Multilocus genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* in pet chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in China. **Veterinary parasitology**, v. 208, n. 3, p. 113-117, 2015. ISSN 0304-4017.

QUINTON, J.-F. **Novos Animais de Estimação-Pequenos Mamíferos**. Editora Roca, 2005. ISBN 8572415793.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Elsevier Health Sciences, 2006. ISBN 0702039918.

RAO, M.; GERSHON, M. D. Bugs, guts, and glia: how microbiota influence enteric gliogenesis and migration. **Neuron**, v. 85, n. 2, p. 229-230, 2015. ISSN 0896-6273.

RODRIGUES, D. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 2, 2011. ISSN 1365-2982.

ROSENBAUM, C. et al. Activation of myenteric glia during acute inflammation in vitro and in vivo. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0151335, 2016. ISSN 1932-6203.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 313-323, 2009. ISSN 1474-1733.

RÜHL, A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 17, n. 6, p. 777-790, 2005. ISSN 1365-2982.

RÜHL, A.; FRANZKE, S.; STREMMEL, W. IL-1 β and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 13, n. 1, p. 89-94, 2001. ISSN 1365-2982.

RÜHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. Enteric glia. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, n. s1, p. 44-49, 2004. ISSN 1365-2982.

RÜHL, A.; TROTTER, J.; STREMMEL, W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 13, n. 1, p. 95-106, 2001. ISSN 1365-2982.

SASSELLI, V.; PACHNIS, V.; BURNS, A. J. The enteric nervous system. **Developmental biology**, v. 366, n. 1, p. 64-73, 2012. ISSN 0012-1606.

SCHAEFFER, D.; DONNELLY, T. Disease problems of guinea pigs and chinchillas. **Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery**. WB Saunders Co., Philadelphia, Pa, p. 260-281, 1997.

SHARKEY, K. A. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 3, p. 918, 2015.

SHARKEY, K. A.; KROESE, A. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 1, p. 79-90, 2001. ISSN 1097-0185.

SHARKEY, K. A.; PARR, E. J.; KEENAN, C. M. Immediate-early gene expression in the inferior mesenteric ganglion and colonic myenteric plexus of the guinea pig. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2755-2764, 1999. ISSN 0270-6474.

SHEN, Y.; ZHANG, C.; CHEN, Y. TGF- β in inflammatory bowel diseases: a tale of the Janus-like cytokine. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 25, n. 4, 2015. ISSN 1045-4403.

SHIMIZU, K. et al. Altered gut flora are associated with septic complications and death in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, n. 4, p. 1171-1177, 2011. ISSN 0163-2116.

SHOFNER, W. P. Perception of the periodicity strength of complex sounds by the chinchilla. **Hearing research**, v. 173, n. 1, p. 69-81, 2002. ISSN 0378-5955.

SOARES, R. M. et al. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 3, p. 344-348, 2011. ISSN 0304-4017.

SPOTORNO, A. E. et al. Chinchilla laniger. **Mammalian species**, p. 1-9, 2004. ISSN 1545-1410.

STAEBLER, S. et al. First description of natural *Echinococcus multilocularis* infections in chinchilla (*Chinchilla laniger*) and Prevost's squirrel (*Callosciurus prevostii borneoensis*). **Parasitology research**, v. 101, n. 6, p. 1725-1727, 2007. ISSN 0932-0113.

STAN, F. et al. Comparative anatomical study of the large intestine in rabbit and chinchilla. **Bulletin UASVM Veterinary Medicine**, v. 71, n. 1, p. 2014, 2014.

STEINKAMP, M. et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1748-1757, 2003. ISSN 0016-5085.

STENKAMP-STRAHM, C. et al. High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine. **Autonomic Neuroscience**, v. 177, n. 2, p. 199-210, 2013. ISSN 1566-0702.

SULLIVAN, S. M. GFAP variants in health and disease: stars of the brain... and gut. **Journal of neurochemistry**, v. 130, n. 6, p. 729-732, 2014. ISSN 1471-4159.

UESAKA, T. et al. Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut. **Developmental biology**, v. 417, n. 2, p. 158-167, 2016. ISSN 0012-1606.

THACKER, M. et al. The relationship between glial distortion and neuronal changes following intestinal ischemia and reperfusion. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 11, 2011. ISSN 1365-2982.

TINKER, M. K. et al. Prospective study of equine colic incidence and mortality. **Equine veterinary journal**, v. 29, n. 6, p. 448-453, 1997. ISSN 2042-3306.

TJWA, E. T. et al. Interleukin-1 β activates specific populations of enteric neurons and enteric glia in the guinea pig ileum and colon. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 285, n. 6, p. G1268-G1276, 2003. ISSN 0193-1857.

- TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 162, n. 1, p. 282-286, 2007. ISSN 0165-0270.
- TURCO, F. et al. Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. **Gut**, p. gutjnl-2012-302090, 2013. ISSN 0017-5749.
- VERONESI, F. et al. Occurrence of *Giardia duodenalis* infection in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) from Italian breeding facilities. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 2, p. 807-810, 2012. ISSN 0034-5288.
- VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2010. ISSN 1741-0533.
- VON BOYEN, G. B. et al. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 3, 2011. ISSN 1471-230X.
- VON BOYEN, G. B. T. et al. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 222-228, 2004. ISSN 0017-5749.
- VOSS, U. et al. Enteric neuropathy can be induced by high fat diet in vivo and palmitic acid exposure in vitro. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81413, 2013. ISSN 1932-6203.
- WITTIG, B.; ZEITZ, M. The gut as an organ of immunology. **International journal of colorectal disease**, v. 18, n. 3, p. 181-187, 2003. ISSN 0179-1958.
- WILDER, R. L. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. **Annual review of immunology**, v. 13, n. 1, p. 307-338, 1995. ISSN 0732-0582.
- WOHLSEIN, P. et al. Spontaneous human herpes virus type 1 infection in a chinchilla (*Chinchilla lanigera* f. dom.). **Acta neuropathologica**, v. 104, n. 6, p. 674-678, 2002. ISSN 0001-6322.
- WOLFF, M. J. et al. TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41373, 2012. ISSN 1932-6203.
- WORTHINGTON, J. M.; FULGHUM, R. S. Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolian gerbil and the chinchilla. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1210-1215, 1988. ISSN 0099-2240.
- XIAO, W.-D. et al. The protective effect of enteric glial cells on intestinal epithelial barrier function is enhanced by inhibiting inducible nitric oxide synthase activity under lipopolysaccharide stimulation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 46, n. 2, p. 527-534, 2011. ISSN 1044-7431.

YU, Y.-B.; LI, Y.-Q. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 32, p. 11273, 2014.

YUE, C. et al. Lipopolysaccharide-induced failure of the gut barrier is site-specific and inhibitable by growth hormone. **Inflammation Research**, v. 62, n. 4, p. 407-415, 2013. ISSN 1023-3830.

ZHANG, W. et al. Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. **Glia**, v. 42, n. 3, p. 252-262, 2003. ISSN 1098-1136.

ZIEGLER, D. R. et al. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. **Neuroscience research**, v. 50, n. 4, p. 375-379, 2004. ISSN 0168-0102.