



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANELISE FRANCIOSI

**ASSOCIAÇÃO DA AGRECANA NA INERVAÇÃO DO CÓLON
DE CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS E COM COLITE
INDUZIDA POR SULFATO DE DEXTRANA SÓDICA**

Londrina
2018

ANELISE FRANCIOSI

**ASSOCIAÇÃO DA AGRECANA NA INERVAÇÃO DO CÓLON
DE CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS E COM COLITE
INDUZIDA POR SULFATO DE DEXTRANA SÓDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Patologia Experimental da
Universidade Estadual de Londrina como
requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida
Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto
Miqueloto

Londrina
2018

ANELISE FRANCIOSI

**ASSOCIAÇÃO DA AGRECANA NA INERVAÇÃO DO CÓLON DE
CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS E COM COLITE INDUZIDA POR
SULFATO DE DEXTRANA SÓDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Patologia Experimental da
Universidade Estadual de Londrina como
requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida
Araújo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 06 de julho de 2018.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais José Luiz Franciosi e Maria de Fátima Veloso Franciosi, a minha irmã Lidiane Franciosi, ao amigo e mestre Tacito Graminha Campos, a amiga Nathália Maria Fioretto Campos, a minha amiga Fabiana Mori, ao meu orientador Eduardo José de Almeida Araújo e co-orientador Carlos Alberto Miqueloto.

AGRADECIMENTOS

“Pai, eu quero te amar, tocar o teu coração; E me derramar aos teus pés; Mais perto eu quero estar, Senhor; E te adorar com tudo que eu sou; E te render glória e aleluia”

Senhor Deus, Senhor de todas as coisas, me destes o dom da vida, a graça de querer salvar vidas e ajudar as pessoas, conheceis bem meu coração vontade e força! Agradeço a vós por ser minha força e refúgio, por não me deixar só e não me deixar abalar durante as dificuldades e caminhos estreitos da vida!

“Eu me consagro a Ti, Mãe de Deus e minha; Eu me consagro a ti, Mestre e Rainha; Acaso não sabeis, que eu sou da imaculada?; Acaso não sabeis, tenho uma advogada!”

Maria Santíssima, levastes meus sonhos aos pés de Jesus, e assim estou aqui hoje! Intercessora poderosa, dou graças a toda a sua obra e ao seu amor para com seus filhos.

“Percebe e entende que os melhores amigos; São aqueles que estão em casa, esperando por ti; Acredita nos momentos mais difíceis da vida; Eles sempre estarão por perto, pois só sabem te amar; E se por acaso a dor chegar, ao teu lado vão estar; Pra te acolher e te amparar; Pois não há nada como um lar”

A minha família preciosa, que conhece e entende cada pedacinho de todo esse sonho, agradeço pelas noites de sono perdido, por todo momento de desespero que foi alcançado com afago, por todo tempo compartilhado com o trabalho, pela paciência de entender o “não posso”, e dedico as vitórias os meus pais José Luiz Franciosi e Maria de Fátima Veloso Franciosi e minha irmã Lidiane Franciosi, aos meus padrinhos que me acompanharam em oração.

Aos primos Luana Ariadnes Veloso Silva Mancini, Eric Mancini, Angela Maria e Marcos Antônio (*in memoriam*) que encararam meus sonhos como se fossem deles

e me encojaram a seguir.

“Se eu tentasse definir o quão especial tu és pra mim; Palavras não teriam fim; Definir o amor não dá; Então direi apenas obrigado; E sei que entenderás; Precioso és para Deus e para mim; Se acaso precisar podes contar comigo; Precioso és para Deus e para mim; Que a fé de Deus nos faça eternos amigos”

Ao mestre e amigo Tacito Graminha Campos, por me mostrar com gestos que quando fazemos o que amamos colhemos frutos para a vida toda, apostar em mim, me encorajar a seguir esse caminho, me mostrar o quão capaz nós somos e que sozinhos não fazemos nada, me alegro em orgulhá-lo.

A amiga Nathália Maria Fioretto Campos, por se fazer presente em cada dificuldade e conquista, pelo seu incentivo incomparável, amor e decisão para que me sentisse amada e acolhida.

A mestre e amiga Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori por estar ao meu lado assegurando que este caminho árduo ficasse mais florido e tranquilo.

As amigas Marianny Kosan, Isabela Nonis Luis e Geisica Talita de Souza Watanabe pelo incentivo e encorajamento.

A minha amiga Amanda Ávila, que me acompanha sempre em oração, presente de São Vicente Pallotti e de Nossa Mãezinha. Nós não colocamos limites nos nossos sonhos, colocamos Fé!

A minha amiga Telma Saraiva Santos, por ter me incentivado de todas as formas possíveis, por todo o tempo e energia direcionado esse trabalho, que hoje parece um verdadeiro milagre. A você tenho uma admiração e gratidão para toda a vida!

Aos meus colegas de laboratório, Renata Streck Fernandes, Joana D’arc Mendes de Lima, Camila Cristina Alves Machado, Camila Regina Basso, Silvia Ortigoza, Heloísa Bergoc, Talitha Massi Carlos, Cristiano Correa Bacarin e Paulo da Silva Watanabe pelo companheirismo.

As minhas amigas que foram presentes do mestrado Ana Paula Franco Punhagui e Rafaela Erthal, que com amizade, companheirismo e alegria deixaram nossas aulas,

seminários e horas de estudo livres, proveitosas e mais interessantes. Espero que essa amizade ultrasse esses dois anos.

Ao meu orientador Eduardo José de Almeida Araújo, pela coragem de designar um trabalho tão almejado em minhas mãos, por confiar que eu o desempenharia com êxito e por estar sempre pronto a ensinar e ajudar no que fosse preciso.

Ao co-orientador Carlos Alberto Miqueloto por dedicar seu tempo a nos ensinar e acompanhar nosso trabalho

FRANCIOSI, Anelise. **Associação da agrecana na inervação do cólon de camundongos saudáveis e com colite induzida por sulfato de dextrana sódica.** 2018. 84 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A agrecana (ACAN) é uma proteoglicana presente na matriz extracelular (MEC) pertencente à família das hialectinas. Estudos têm demonstrado que a ACAN pode gerar cicatrizes gliais em casos de lesão cerebral. Além disso, estudos recentes demonstram que a ausência de alguns componentes da MEC (tenascina X e ácido hialurônico) no sistema nervoso entérico (SNE) tem sido associada a distúrbios gastrointestinais. No entanto, não se tem conhecimento sobre a presença da ACAN no SNE e sua possível relação com distúrbios gastrointestinais, principalmente em quadros inflamatórios. Assim, o objetivo desta dissertação foi verificar se ACAN está associada à inervação do cólon de camundongos saudáveis ou com retocolite ulcerativa (RCU) induzida por sulfato de dextrana sódica (DSS). Inicialmente, quantificou-se o mRNA para ACAN em dois estratos intersticiais: mucosa + submucosa e muscular + serosa de camundongos saudáveis por intermédio da técnica de PCR-RT. Na sequência, avaliou-se a presença e localização da ACAN utilizando-se a técnica de imunofluorescência com dupla marcação de ACAN e componentes neuronais, como o óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e colina acetiltransferase (ChAT). Por fim, comparou-se o padrão de marcação da ACAN no plexo mioentérico entre camundongos saudáveis e camundongos com RCU. Os resultados de PCR mostraram que a mucosa + submucosa tem maior quantidade de mRNA para ACAN em relação à muscular + serosa. A imunoreatividade para ACAN foi observada no epitélio de revestimento da mucosa, aparentemente sem associação com específicos tipos celulares. A ACAN também foi visualizada de forma associada a neurônios entéricos, principalmente no plexo mioentérico. Todos os corpos celulares de neurônios mioentéricos apresentaram imunoreatividade para ACAN. ACAN estava ausente em prolongamentos neuronais. Cerca de 30% desses neurônios ACAN⁺ eram nitrérgicos e outros 30% eram colinérgicos. Agregados de ACAN foram observados na matriz extracelular, principalmente dentro dos gânglios mioentéricos. Imunomarcagem também foi observada em neurônios aferentes que inervam o cólon, presentes em gânglios de raiz dorsal - GRD (T3, L1, L6, S1). Parte dos neurônios ACAN⁺ de GRDs eram positivos para o marcador de via nociceptiva: CGRP (*calcitonin gene-related peptide*). A RCU provocou redução significativa do número de agregados de ACAN ($p < 0,05$). Por outro lado, RCU não alterou a relação entre ACAN e neurônios mioentéricos. Conclui-se que ACAN está presente no cólon de camundongos saudáveis e com RCU, incluindo corpos celulares de neurônios intrínsecos e extrínsecos a essa região do tubo digestório. RCU reduziu a quantidade de agregados de ACAN, mas sua presença permaneceu inalterada ao redor dos corpos celulares de neurônios.

Palavras-chave: Agrecana. Matriz extracelular. Sistema nervoso entérico. Rede perineuronal. Retocolite ulcerativa.

Franciosi, Anelise. **Aggrecan associated with the colonic innervation of healthy mice and dextran sulfate sodium-induced colitis mice.** 2016.84 p. Dissertation (Doctorate Degree in Biological Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Aggrecan (ACAN) is present in the extracellular matrix proteoglycan (ECM), which belongs to the hyalactin family. Studies have shown that the ACAN can create glial scarring in cases of brain damage. In addition, recent studies show that the absence of some components of ECM (tenascin x and hyaluronic acid) in the enteric nervous system (ENS) has been associated with gastrointestinal disorders. However, it is unknown whether ACAN is present in ENS and its possible relationship with gastrointestinal disorders, especially in inflammatory frames. Thus, the objective of this study was to verify if acan is associated with the colonic innervation of healthy or colitis mice. Initially, we quantified the mRNA for ACAN in two layers: mucosa + submucosa and external muscle + serosa of healthy mice using rt-PCR technique. Further, the presence and location of the ACAN was investigated using the double immunofluorescence technique for ACAN and neuronal components. Finally, it was compared the labeling of ACAN in the myenteric plexus of healthy and colitis mice. The PCR results showed that the mucous layer + submucosa had more amount of mRNA for ACAN than external muscle + serosa layer. The immunoreactivite to ACAN was observed in the mucosal lining epithelium, apparently without association with specific cell type. ACAN was also associated with enteric neurons, mainly in the myenteric plexus. All myenteric cell bodies had epithelial to ACAN. ACAN was absent in neuronal extensions. About 30% of these were nitrergic neurons and other 30% were cholinergic. Aggregates of ACAN were observed in the ECM mainly inside of the myenteric ganglia. Was also observed in epithelial afferent neurons in dorsal root ganglia localized-DRG (t13, l1, l6, s1) that innervate the colon. Part of ACAN⁺ DRG neurons was positive for the marker of nociceptive pathway: *calcitonin gene-related peptide* (CRGP). Colitis has result in significant reduction of aggregates of ACAN ($p < 0.05$). On the other hand, colitis has not changed the relationship between ACAN and myenteric neurons. It is concluded that ACAN is present in the colon of healthy and colitis mice, including cell bodies of intrinsic and extrinsic neurons that innervate the distal gut. Colitis reduced the amount of aggregates of ACAN, but its presence was unchanged around the neuronal cell bodies.

Keywords: Aggrecan. Extracelular matrix. Enteric nervous system. Perineuronal nets.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1:

- Figure 1 -** Expression and immunofluorescence of aggrecan (ACAN) in the colon of healthy mice. A- The mRNA for ACAN is expressed in mucosa + submucosa and muscle + serosa of large intestine of healthy mice. Values were normalized in relation to constitutive gene: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). B- Photomicrography of colon of healthy mice. Immunoreactivity for ACAN (red) and Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5) or Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) or Choline Acetyltransferase (ChAT) (green). Myenteric neurons (arrow) with immunoreactivity to ACAN, PGP9.5 (B'), nNOS (B'') and ChAT (B'''). ACAN in the epithelium is indicated by arrowheads. Scale bar: 40 μ m. (*=13%)79
- Figure 2 -** Dorsal Root Ganglia (DRG) of healthy mice. Relative number (%) of positive neurons to aggrecan (ACAN), calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the thoracolumbar (A) and lumbosacral (B) DRGs of healthy mice. Photomicrography of thoracolumbar (A') and lumbosacral (B') DRG illustrating the labeling of ACAN (red) and CGRP (green). Small neurons are indicated by letter "S", medium neurons by the letter "M" and large neurons by the letter "L". Scale bar: 40 μ m. One-way ANOVA and the Tukey's Multiple Comparison Test80
- Figure 3 -** Colonic parameters of healthy and colitis mice. A – Disease Activity Index of dextran sulfate sodium-induced colitis. B – number of aggregates of aggrecan (ACAN) in whole mount of colonic external muscle in healthy and colitis mice (arrowhead). Note the absence of ACAN in neuronal extensions (arrow). Cholinergic varicosities (ChAT) and aggregates ACAN in whole mounts of colonic external of healthy (control) and colitis mice. Note the absence of colocalization between ACAN and cholinergic

varicosities (arrow). Count of immunoreactive neurons to ACAN and β -tubulin III (D), neuronal Nitric Oxide Synthase - nNOS (E) and Choline Acetyltransferase (F) in whole mount of colonic external muscle of healthy (control) and colitis mice. Photomicrographs illustrating colocalization (arrowhead) between ACAN and β -tubulin III (D' and D''), nNOS (E' and E'') and ChAT (F' and F''). Scale bar: 20 μ m. (*=34,14%) Chi-squared test and One-way ANOVA test followed by Tukey test.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAN	Agrecana
ACh	Acetilcolina
ADAMTS	Desintegrinas e Metaloproteinases com Domínios de Trombospondina
AH	Ácido Hialurônico
BCAN	Brevicana
Células M	Células com micropregas
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related peptide</i>
ChAT	Choline Acetiltransferase
cmd	Cartilage matrix deficiency
CN	Cristas Neurais
CS	Condroitina Sulfato
CSPGs	Proteoglicanos de sulfato de condroitina
DC	Doença de Crohn (DC)
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DRG	Dorsal Root Ganglia
DSS	Sulfato de Dextrana Sódica
EGF	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
GAGs	Glicosaminoglicanas
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GRD	Gânglios de Raiz Dorsal
HABR	Sítio de Ligação para o Ácido Hialurônico
HSPGs	Proteoglicanos de sulfato de heparano
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-23	Interleucina 23
iNOS	Óxido Nítrico Induzível
IPANs	Neurônios Aferentes Primários Intrínsecos
IKB	Proteína reguladora que inibe NF-KB
MAC	Complexo de ataque a membrana
MBL	Manose Receptora de Manana
MEC	Matriz Extracelular

MMPs	Metaloproteinase de matriz
NCAN	Neurocana
NE	Elastase Neutrófila
NKA	Neuroquinina A
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOD	Receptores Semelhantes a NOD
OA	Osteoartrite
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR-RT	Reação em cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real
PGP9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
PGs	Proteoglicanas
PTP	Fosfacana
RCU	Retocolite Ulcerativa
RPN	Rede Perineuronal
SED	Espondiloepifisária tipo Kimberley
SEMD	Displasia Espondiloepimetafisária
SMAD	Receptores SMAD
SN	Sistema Nervoso
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNAP	Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático
SNAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SP	Substância P
TGFβ	Fator de crescimento transformante – β
TGI	Trato Gastrointestinal
Th1	Linfócitos T helper 1
Th17	Linfócito T helper 17
Th2	Linfócitos T helper 2
TKs	Taquicininas

TLR 2	Receptores Semelhantes a TOLL do tipo 2
TLR 4	Receptores Semelhantes a TOLL do tipo 4
TLRs	Receptores Semelhantes a TOLL
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico
VCAN	Versicana
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1 Doença Inflamatória Intestinal	19
1.2 Retocolite Ulcerativa (RCU).....	20
1.3 Modelos experimentais de indução de Doença Inflamatória Intestinal	22
1.4 Colite e SNE	24
2 Matriz Extracelular	26
2.1 Aspectos Gerais	26
2.2 MEC e inflamação	29
2.3 Matriz Extracelular no Tecido Nervoso	31
2.4 MEC no tecido nervoso e inflamação	34
2.5 Agrecana	35
2.6 Agrecana e Inflamação.....	37
3 Inervação do Trato Gastrointestinal	39
4 O Sistema Nervoso Entérico	40
2 OBJETIVO	50
2.1 Objetivos Gerais	50
2.1.1 Objetivos Específicos	50
3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA DA INTRODUÇÃO	51
4 ARTIGO CIENTÍFICO	63
COLITIS DOES NOT CHANGE THE ASSOCIATION BETWEEN AGGREGAN AND THE COLONIC INNERVATION OF MICE	
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
ANEXOS	83
ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) ofício circular 032/2015, processo nº1454.2015.....	84

INTRODUÇÃO

Há muito tempo existe dificuldade de diagnosticar doenças de cunho multifatoriais, as quais podem ser manifestadas em pacientes de características genéticas diferentes, que têm hábitos alimentares e esportivos diferentes ou até aqueles que possuem alguns fatores hormonais ou imunológicos deficientes.

Essa dificuldade também é visível quando se trata da doença inflamatória intestinal (DII), que também é multifatorial. A DII é classificada em duas vertentes, a doença de Chron (DC), mais frequente no intestino delgado, e a retocolite ulcerativa (RCU), que acomete predominantemente o cólon.

Estudos sobre o assunto foram surgindo e, mais recentemente, viu-se que a matriz extracelular (MEC) está intimamente ligada a processos inflamatórios semelhantes a esses, já que sua degradação e remodelação tecidual, na maioria das vezes distingue a forma da doença. Podendo ser a chave para a progressão da doença, ou até mesmo uma possibilidade a cerca da etiologia.

Além disso, estudos clínicos recentes têm demonstrado uma possível relação de sintomatologia dos pacientes com doenças relacionadas a componentes da MEC, como por exemplo o colágeno, e distúrbios do trato gastrointestinal (TGI).

Guiados por esse caminho, mergulhamos em um componente específico da MEC, que desempenha um papel muito importante no tecido cartilaginoso, e SNC quando presente em uma estrutura que envolve alguns neurônios, conhecida como rede perineuronal. Assim, o objetivo primário desse estudo era identificar a Agrecana (ACAN), uma proteoglicana membro da família de hialectinas, no cólon de camundongos saudáveis.

Este trabalho tem sua estrutura dividida em dois capítulos, sendo um capítulo composto pelo referencial teórico e outro, pelo artigo científico.

Para isso traçamos os seguintes objetivos:

- ❖ Avaliar a relação da agrecana com a inervação do cólon de camundongos saudáveis ou com retocolite ulcerativa induzida por

Sulfato de Dextrana Sódica (DSS).

- ❖ Investigar a expressão e a associação da agrecana com a inervação do cólon de camundongos saudáveis.
- ❖ Avaliar se a inflamação causada por Sulfato de Dextrana Sódica (DSS) altera a aorganização da agrecana e sua associação com a inervação do cólon de camundongos.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Doença Inflamatória Intestinal

Nos últimos anos houve um aumento considerável de casos de doenças inflamatórias intestinais, elencando assim essas doenças como um problema de saúde pública (XAVIER; PODOLSKY, 2007). As DII foram classificadas de acordo com suas duas principais formas: a doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU), as quais são descritas como processos inflamatórios crônicos recidivantes que divergem entre si (ZHANG; LI, 2014).

A DC é uma inflamação não contínua que pode lesionar qualquer região do TGI, porém é mais comum que ocorra no intestino delgado, mais precisamente na porção terminal do íleo ou na região perianal. Pode acometer qualquer camada do TGI, e é comumente associada a complicações como abscessos, fístulas e restrições. Por outro lado, a RCU é caracterizada por uma inflamação que acomete a mucosa e é frequentemente limitada ao cólon, com curso recidivante, remitente e pode afetar apenas o reto ou progredir para envolvimento do lado esquerdo ou pancolônico (KAPPELMAN, et al., 2013; ABRAHAM; CHO, 2009). De modo geral, a etiologia da DII pode ser de cunho multifatorial, podendo ser desencadeada por uma suscetibilidade genética, o ambiente externo, a microbiota intestinal e as respostas imunológicas que estão envolvidas e fielmente integradas na patogênese da DII (DANESE; FIOCCHI, 2006; KUGATHASAN; FIOCCHI, 2007; PODOLSKY, 2002).

A suscetibilidade genética a doença foi avaliada através de estudos que associam o genoma por análises do material genético de pacientes e desse modo, foi possível identificar polimorfismos de nucleotídeos únicos relacionados a doença (GAYA, et al., 2006; DUERR, 2007).

Assim como os fatores genéticos, os fatores ambientais também são considerados de risco para DII, como o tabagismo, a dieta, as drogas, a geografia, o estresse social e o elemento psicológico (LOFTUS, 2004). E ainda, os fatores imunológicos também foram considerados como causa das manifestações das DII. Estudos demonstraram que as células de padrão Th17 que são capazes de

secretarem e serem estimuladas pela interleucina 23 (IL-23), estão intimamente ligadas à patogênese da DII que apresenta um perfil de suscetibilidade aos genes IL- 23R, IL- 12B, JAK2 e STAT3, identificados na RCU e CD (ANDERSON, et al., 2011; BRAND, 2009). Esse processo altamente inflamatório que caracteriza as DII também é relacionado ao defeito na funcionalidade da interleucina 10 (IL-10), tanto na DC quanto na RCU (TREMELLINGM, et al., 2007).

Quanto à imunologia envolvida na patogênese da DII, possivelmente as disfunções de vias da resposta imune inata e adaptativa contribuem para a evolução da resposta inflamatória intestinal em pacientes com DII. Diante de estudos realizados frente as respostas imunológicas, além do padrão de resposta Th17 já descrito a cima, viu-se que o padrão de resposta também é uma diferença entre as duas formas de DII, sabe-se que a DC tem sido conduzida por uma resposta de padrão Th1 (COBRIN; ABREU, 2005), já a RCU foi associada a uma reposta notavelmente modulada para o padrão Th2 (TARGAN; KARP, 2005).

1.2 Retocolite ulcerativa e MEC

Durante um estado inflamatório, como observado na DII, os fibroblastos (presentes mucosa intestinal) em conjunto ao infiltrado leucocitário alteram a remodelação e a degradação da MEC em fragmentos (MORTENSEN, et al., 2017), facilitando a atividade de protease, metaloproteinases de matriz (MMPs) (NAGASE; WOESSNER, 1998) e elastase neutrofílica (NE) (ADEYEMI, 1985; BONNANS, et al., 2014; BENNIKE, et al., 2015; MORTENSEN, et al., 2017).

Estudos têm demonstrado que as enzimas proteolíticas são os principais contribuintes para a quebra e a reconstituição da MEC em processos fisiológicos e também em condições patológicas (LIOTTA; STETLER-STEVENSON, 1991). Também são amplamente distribuídas nos tecidos do TGI e estão relacionadas a processos de inflamação gastrintestinal (PLEBANI, et al., 1995), remodelação tecidual (HERSZÉNYI, et al., 1997), angiogênese (HERSZÉNYI, et al., 1999) e cicatrização de feridas (HERSZÉNYI, et al., 2008).

No entanto, esse envolvimento com a inflamação e a remodelação tecidual não está restrito apenas às enzimas proteolíticas mencionadas acima. Assim como

tais, as MMPs têm um papel importante no processo de remodelação tecidual que ocorre durante processos inflamatórios (BAUGH, et al., 1999; VON LAMPE, et al., 2000; MONTELEONE, et al., 2006; RAVI, et al., 2007). Diversos autores relatam o envolvimento da colagenase tipo IV, da metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) (também conhecida como gelatinase B) em processos inflamatórios (VON LAMPE, et al., 2000) e remodeladores em DII (NELSON, et al., 2000; KIRKEGAARD, et al., 2004; STALLMACH, et al., 2000).

Um estudo recente demonstrou que a MEC no epitélio intestinal é afetada pela inflamação crônica na DII, resultando no aumento da renovação tecidual e liberação de fragmentos de tecido para a circulação (MORTENSEN, et al., 2015). A expressão da MMP-9 na mucosa intestinal acontece de forma significativa na RCU, e aumenta de forma gradativa de acordo com a gravidade da inflamação (LAKATOS, et al., 2012).

Alguns constituintes da MEC expressos no trato do colo intestinal humano, como colágeno de biglicano, elastina e colágeno do tipo V, são relevantes em relação a DII, por estimularem a resposta imune inata por receptores de membrana (MIKULA, et al., 2011; NASTASE, et al., 2012; BENNIKE, et al., 2015; MORTENSEN, et al., 2017).

A forma clínica das DII também é influenciada em parte pela remodelação, deposição de alguns componentes da MEC pelos miofibroblastos (forma clínica caracterizada pela fibrose intestinal – aparente em 5% dos pacientes com RUC) e a degradação da MEC (forma clínica caracterizada pelas fístulas) (SHIMSHONI, et al., 2015). As fístulas, pequenos espaços no tecido, são encontradas nos locais onde a MEC foi degradada. Entretanto, no caso do intestino, a fibrose tecidual é um sinal de inflamação crônica local, geralmente causada pela via TGF- β 1 / Smad (LATELLA, 2017).

Em camundongos, a desregulação da resposta imune inata em relação à interação de células da mucosa com a microbiota contribui para as DII e para RCU experimental (LOHR, et al., 2012). Essa resposta imune se dá pelo reconhecimento dos patógenos por receptores de superfície da membrana celular (com TLR e NOD), e alguns estudos identificaram o funcionamento de alguns componentes da MEC e

seus produtos de degradação semelhantes ao desses receptores, como por exemplo o AH e o colágeno de biglicano que estimulam a resposta imune inata mediada por TLR 2 e 4 (KAWAI; AKIRA, 2010; LOHR, et al., 2012). Assim como a mindin, outro componente da MEC, que é capaz de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e modular o recrutamento de células inflamatórias (HE, et al., 2004).

1.3 Modelos experimentais de indução de Doença Inflamatória Intestinal

Para uma melhor compreensão dos mecanismos patológicos que envolvem as DII, bem como para investigar a farmacocinética e a eficácia pré-clínica de alternativas terapêuticas, são utilizados modelos experimentais em animais. Por ser um grupo de doenças heterogêneas, muitos modelos foram desenvolvidos para que as diferentes vias de modulação e reparação fossem avaliadas. Estes incluem modelos induzidos por compostos químicos, transferência adotiva de células T, colite espontânea e animais geneticamente modificados (DEVOSS; DIEHL, 2014; RANDHAWA et al., 2014).

Entre os modelos disponíveis, os químicos são os mais comumente utilizados por oferecerem boa reprodutibilidade e facilidade de desenvolvimento. Nesse contexto, os agentes químicos exógenos amplamente administrados para indução de colite experimental são: ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (DA SILVA et al., 2010; DE ALMEIDA, SÁNCHEZ-HIDALGO; MARTÍN, 2013); sulfato de dextrana sódica (DSS) (DHARMANI, LEUNG; CHADEE, 2011; CHEAH et al., 2013), e ácido acético (MOUSAVIZADEH et al., 2008; ZABIHI, 2017).

A inflamação intestinal induzida pela administração de TNBS é difusa e transmural, e têm como principal característica o aumento da infiltração de leucócitos, a formação de edema e ulcerações. Para a realização da indução, o TNBS é dissolvido em álcool, e administrado por via retal. O álcool utilizado como veículo, auxilia na indução da doença devido a capacidade de quebrar a barreira mucosa. Este modelo de indução é melhor associado á doença de Crohn em

humanos, devido ao seu perfil de resposta inflamatória, padrão TH1 (RANDHAWA, et al., 2014).

Dos modelos químicos amplamente utilizados, a colite experimental induzida pela administração intrarretal de ácido acético apresenta semelhança com a doença humana em termos patogênicos, histológicos e inflamatórios (NAKHAI et al., 2007; BITIREN et al., 2010; HARTMANN et al., 2012). Tanto em situações clínicas, quanto em situações experimentais, a lesão colônica apresenta infiltração de neutrófilos (JURJUS, KHOURY e REIMUND, 2004), inflamação difusa na mucosa (CLOSA; FOLCH-PUY, 2004), vasodilatação, edema, ulcerações na submucosa e redução das células caliciformes (NAKHAI et al., 2007; HARTMANN et al., 2012). Nesse modelo também é possível observar liberação de citocinas pró-inflamatórias (LUO et al., 2010) e mediadores lipídicos secretados pelos neutrófilos (RANDHAWA et al., 2014).

O modelo experimental de RCU induzida por DSS leva a sintomas semelhantes aos observados na doença humana. Para a indução, geralmente, de 2 a 5% de DSS é adicionado na água potável dos animais por um período de 5 a 9 dias consecutivos. Após esse período, os animais são submetidos à eutanásia para avaliação dos parâmetros inflamatórios e danos histológicos. Com este modelo, é possível observar perda de peso, hemorragia retal e alteração na consistência das fezes (sendo esses, os critérios utilizados para determinar o índice de atividade da doença – DAI) (Murthy, 1993). Estudos realizados com DSS demonstram que esta substância afeta principalmente o intestino grosso, provocando erosões com perda progressiva do epitélio superficial, causando aumento da permeabilidade da mucosa colônica (RANDHAWA, et al., 2014).

Evidências recentes demonstram a participação do sistema nervoso (SN) concomitantemente ao Sistema Imunológico na evolução destas patologias (GEBBOES; COLLINS; 1998; LOMAX et al., 2005; VASINA, BARBARA; TALAMONTI, 2006; BOISSÉ et al., 2009). Assim, é consideravelmente possível que a motilidade intestinal alterada observada pela indução destes modelos experimentais seja realmente resultante de alterações na inervação do TGI (LOMAX, PRADHANANGA; BERTRAN, 2017).

1.4 Colite e Sistema Nervoso Entérico (SNE)

Através dos modelos experimentais utilizados para a indução da RCU e em biópsias de pacientes diagnosticados com a doença (FONTGALLAND et al., 2014; DEL VALLE-PINERO et al., 2015), foi possível observar distúrbios motores que sugerem modificações dos componentes neuromusculares entéricos, como por exemplo, em células intersticiais de Cajal, em neurônios entéricos e em células musculares lisas (KOON et al., 2010; BERNARDINI et al., 2012; WINSTON; LI, 2013; ZHAO et al., 2013; ABAD et al., 2015; UTSUMI et al., 2016; RAHMAN et al., 2016). Estes distúrbios podem ser associados a variações da inervação do TGI durante a inflamação do cólon, podendo ser explicadas pela alta densidade de receptores associados aos neurotransmissores e as suas ações sobre esse tecido (WISTON, LI; SARNA, 2013).

Mediante estas descobertas em relação aos distúrbios motores, Moynes et al., (2014) elencaram os principais efeitos da RCU em relação ao SNE: a perda generalizada de neurônios, o aumento da densidade axonal, as alterações no conteúdo neuroquímico, a hiperexcitabilidade dos neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs) e alterações na vasodilatação e/ou secreção de substâncias.

A inflamação na região colônica é ativada mediante envolvimento de neurônios sensoriais extrínsecos e intrínsecos, capazes de impulsionar os reflexos de dor e os mecanismos inflamatórios locais, como por exemplo vasodilatação, extravassamento do plasma e nocicepção (ENGEL et al., 2011). Alterações na expressão de nNOS, acarretam em disfunção na motilidade intestinal, sintomas que pode ser observado em RCU humana (SUNG et al., 2006), e modelos experimentais murinos (WISTON, LI; SARNA, 2013; RAHMAN; ROBINSON; JOVANOVSKA, 2015).

Em camundongos, os neurônios entéricos, as células musculares lisas e as células imunológicas entéricas regulam a motilidade e o processo inflamatório intestinal através dos sinais químicos que recebem (acetilcolina - Ach, óxido nítrico - NO, entre outros). Dessa maneira, as alterações que ocorrem em relação à secreção

e absorção de neurotransmissores resultantes do processo inflamatório, podem afetar o mecanismo de regulação deste processo, causando alterações funcionais no TGI (SARNA, 2006; SARNA, 2010; SHI, WISTON; SARNA 2011).

Muitas características observadas na parede gastrointestinal durante procesos inflamatórios são resultantes de alterações nos níveis de NO e colina acetiltransferase (ChAT). Do mesmo modo que a administração exógena destes neurotransmissores pode ser responsável pela restauração das funções e proteção da mucosa através da manutenção do fluxo sanguíneo, inibição da adesão de plaquetas e leucócitos, modulação do estresse oxidativo e estabilização da proteína reguladora que inibe NF-KB (I κ B) (ALICAN; KUBES, 1996).

Pesquisas em modelos de colite experimental espontânea e induzidas por DSS não demonstram alteração quantitativa de neurônios nitrérgicos e colinérgicos no plexo mientérico (WINSTON; LI, 2013; RAHMAN et al., 2015), porém, a redução da densidade das fibras nervosas positivas para o óxido nítrico neuronal sintase (nNOS) e ChAT pode indicar diminuição da liberação dos neurotransmissores com possíveis implicações funcionais a longo prazo (RAHMAN et al., 2015).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando ácido acético como via de indução da colite e utilizando o macador pancreal Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5), demonstraram que a estrutura do SNE foi preservada mesmo na colite. Devido ao processo inflamatório, ocorreu um aumento das dimensões do cólon (comprimento, diâmetro, área total) e peso do cólon (edema) (BELÉM, et al., 2016; FERNNANDES, et al., 2017). Também foram observadas fibras nNOS⁺ inervando várias estruturas. Contudo, a colite induzida por DSS em camundongos provocou aumento da produção de óxido nítrico após 6 horas de indução. Esse caráter inflamatório induzido pelo DSS provocou uma regulação positiva do neuropeptído Y (NPY) e também o aumento das fibras nNOS⁺ (FERNANDES, et al., 2017).

2 Matriz Extracelular

2.1 Aspectos Gerais

A matriz extracelular (MEC) é um complexo macromolecular e se encontra

distribuída entre os tecidos e ao redor das células do organismo. Oferece condições adequadas para o crescimento e diferenciação celular, garantindo a sobrevivência destas células em diversos tecidos. A MEC é responsável pelo suporte físico, que confere integridade e elasticidade aos tecidos (ROZARIO, 2010).

A MEC é constituída basicamente por macromoléculas pertencentes a quatro categorias, sendo elas: glicosaminoglicanas (GAGs) e proteoglicanas (PGs), proteínas fibrosas de função estrutural e glicoproteínas adesivas, responsáveis pela adesão e migração celular. O colágeno e a elastina são exemplos de proteínas fibrosas que constituem a MEC. A fibronectina, a laminina e as tenascinas, também encontradas na MEC, desempenham função de adesão e migração celular (POTTS, 1996; ALBERTS, 1997; CURRAN, 2000; BORNSTEIN, 2002).

Alguns componentes da MEC, como, as GAGs e PGs, são moléculas altamente hidrolíticas e participam da formação de uma matriz hidratada que ocupa grandes espaços nos tecidos (POTTS, 1996; ALBERTS, 1997; CURRAN, 2000; BORNSTEIN, 2002). A MEC atua em eventos chaves que ocorrem durante o desenvolvimento, a manutenção tecidual e em doenças (MIQUELOTO; ZORN, 2007), atuando também na homeostase tecidual (ALBERTS, 1997).

A MEC compreende todo o espaço existente entre as células dos tecidos conjuntivos. Entre os epitélios e o tecido conjuntivo, existe uma especialização da MEC denominada de Membrana Basal (MB), que separa fisicamente estes dois tecidos (ALBERTS, 1997; WILSON, 1997, ALBERTS et al., 2010, BONNANS et al., 2014).

Como conceito de MB, elas são consideradas pequenas lâminas de matriz extracelular que contorna epitélios, fibras musculares, vasos sanguíneos e nervos periféricos. Atualmente as MB são consideradas estruturas mais sofisticadas, tanto na composição, morfologia e função (Nakamura et al., 2010). As MB apresentam estruturas de adesão específicas que conectam os epitélios, via integrinas de um lado (TOOLE, 2001; CORD, 2002), e o tecido conjuntivo adjacente ao outro lado, via Fibronectina, Fibrilas de Ancoragem (colágeno tipo VII) e microfibrilas de fibrilina.

Quanto à morfologia das MB, é constituída de uma rede de colágeno (tipo IV), ao qual se associam a proteoglicana Perlecano (HSPG) e as glicoproteínas Laminina e Entactina/Nidogênio (ALBERTS; BONNANS et al., 2014). Localizado entre os tecidos epiteliais e conjuntivos, as MB apresentam de 40 a 120 nm de espessura, sendo visível apenas a nível de microscopia eletrônica (ALBERTS, 1997).

Além disso as MB atuam no desenvolvimento e manutenção dos epitélios. (Nakamura et al., 2010). As MB também têm como funções de barreira seletiva para substâncias transitarem entre os dois tecidos, bem como influencia a migração, diferenciação, proliferação das células epiteliais durante o desenvolvimento (ALBERTS, BORNSTEIN, 2002, MIQUELOTO; ZORN, 2007). Quando estas células perdem o contato com a MB, elas sofrem apoptose (BORNSTEIN, 2002).

Em relação a matriz intersticial, que se encontra ao redor das células no interstício e no tecido conjuntivo, é basicamente constituída por colágeno do tipo I, II ou III, dependendo do tecido, e a fibronectina e diversas outras proteoglicanas – Versicana, Agrecana, Decorina, Biglicana entre outras (BONNANS et al., 2014). Algumas das proteínas já citadas, como tipos de colágenos, são classificados com as principais proteínas estruturais da MEC, sendo divididos em formas fibrilares (colágenos I e III, V e XI) e não fibrilares. A presença das fibras colágenas nessa estrutura complexa proporciona resistência à tração a MEC, controlando a distensibilidade dos tecidos (BONNANS et al., 2014).

Da mesma forma que o colágeno, as glicoproteínas, como as lamininas, elastina, fibronectinas, trombosplastinas, tenascinas e nidogênio, têm funções diversas e desempenham seu papel na constituição da MEC, envolvidos na interação das células (BONNANS, et al., 2014).

Tendo em vista essa estrutura complexa, os diversos componentes da MEC são classificados de várias formas, como por exemplo a família das hialectinas. Os membros dessa família de proteoglicanos são constituídas de sulfato de condroitina, os quais possuem sítios de ligação para o ácido hialurônico (AH), bem como para outros subgrupos de hialectinas. Fazem parte dessa classe de PG: a agrecana (ACAN), as quatro variedades de versicana (VCAN), neurocana (NCAN) e brevicana (BCAN) (SCHAEFER, 2014).

As PGs interagem com a MEC e também apresentam a capacidade de interagir entre si. O AH, um glicosaminoglicano composto por unidades de ácido β -1,4-D-glucurônico e um dissacarídeo de β -1,3-D-N-acetilglucosamina (WEISSMAN; MEYER, 1954). É abundante na pele e nos tecidos conectivos, e é considerado um dos principais componentes da MEC (LEACH, et al., 2004).

A NCAN, uma molécula típica do tecido nervoso e um dos principais tipos de proteoglicana no cérebro, composta por domínios homólogos, os quais apresentam uma região central do tipo mucina, uma extensão C-terminal e outra extensão N-terminal (GALTREY, 2007; DITYATEV; SCHACHNER, 2003). Participa da migração celular, do crescimento axonal (GALTREY, 2008), da modulação da adesão celular, inibição do crescimento de neuritos (KWOK, 2014) e é ativada no desenvolvimento e na maturação do sistema nervoso (SN). Comumente é sintetizada por neurônios e células da glia (GALTREY, 2008; DITYATEV; SCHACHNER, 2003).

A VCAN possui quatro isoformas e está presente em vários tecidos, incluindo o cérebro (THEOCHARIS, 2008). Estruturalmente, quase todas as isoformas de VCAN incluem um domínio N-terminal (G1), uma região de anexo GAG e um domínio C-terminal (G3). A exceção é representada pela isoforma V3, que não possui regiões de anexos GAG (THEOCHARIS, 2008), mas ainda assim mantém sua capacidade de se ligar ao AH através do domínio G1 e interagir com receptores de fatores de crescimento de fibroblastos (EGF) através dos subdomínios EGF de G3 (MATSUMOTO et al., 2016). E da mesma forma que a NCAN, a VCAN interage com outros componentes MEC através dos seus três domínios estruturais. Com base nas interações mediadas pelos domínios G1 e G3, VCAN é capaz de regular a invasão celular e a metástase (YEE, et al., 2007).

A BCAN é outra hialectina específica do sistema nervoso central (SNC) e têm várias isoformas segregadas. A primeira dessas isoformas é decorada com 1-3 cadeias de condroitina sulfato (CS), a segunda não é glicosilada e a terceira é ligada à membrana através de uma âncora GPI que resulta de um splicing alternativo e carece do terminal C típico das hialectina (GARY, et al., 1998). A expressão de mRNA de BCAN no cérebro é controlada espacial e temporariamente e a maior expressão coincide com períodos de mobilidade celular glial, como o

desenvolvimento durante a gliogênese e após lesão cerebral induzida experimentalmente (VIAPIANO, 2006).

2.2 MEC e inflamação

Estudos recentes sobre o papel das hialectinas na no processo inflamatório têm enfoque principalmente na versicana, devido à sua regulação positiva em vários distúrbios inflamatórios periféricos, aumentando significamente a inflamação (WIGHT, 2017). A isoforma V1 da VCAN é profundamente regulada em regiões de infiltrado inflamatório, como durante a inflamação pulmonar (KANG, et al., 2009).

Sabe-se também que o efeito da MEC sobre o sistema imunológico se dá pelo comprimento e a sulfatação dos GAGs de sulfato de condroitina. Estudos utilizando cultura de monócitos CS-A sulfatados comprovaram a secreção de citocinas como a interleucina 1 β (IL-1 β), a proliferação de células B (RACHMILEWITZ; TYKOCINSKI, 1998) e a regulação de moléculas co-estimulatórias presentes nas células dendríticas, assim como o aumento da atividade do NF- κ B (YANG, et al., 2002; ZHANG, et al., 2015).

Os GAGs também foram relacionados a processos inflamatórios, participando da resposta imune inata, através do tráfego intracelular do MHC de classe II e na apresentação de antígenos (ROSAMOND, et al., 1987). Participam da resposta imune adaptativa através do aumento das respostas das células T (NAUJOKAS, et al., 1993). Por mais que esses estudos tenham elucidado uma boa parte da participação da MEC no processo inflamatório, ainda são necessárias mais informações relacionadas à ação dessa estrutura complexa sobre os linfócitos T. Por esse motivo, em um estudo utilizando camundongos deficientes em condroitina-6-sulfotransferase, enzima que catalisa a sulfatação dos GAGs, percebeu-se uma diminuição do número de linfócitos T *naive* presentes no baço. Isso pode sugerir uma relação do sulfato de condroitina com a produção de quimiocinas ou outros fatores de sobrevivência aos linfócitos T periféricos (UCHIMURA, et al., 2002).

Em outros estudos realizados com cultura de células esplênicas de camundongos, foi observado que os proteoglicanos de sulfato de condroitina

(CSPGs) têm a capacidade de influenciar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e interleucina-12 (IL-12) (ZHANG, et al., 2015, AKIYAMA, et al., 2004; WANG; ROEHRL, 2002). Os CSPGs, como a ACAN, também podem iniciar a ativação do sistema complemento (Melin FÜRST, et al., 2013), e respostas autoimunes. Em humanos, o sulfato de condroitina altamente sulfatado foi associado a reações anafiláticas graves (KISHIMOTO, et al., 2008).

Mediante os processos inflamatórios nos quais a MEC se envolve, é primordial que haja uma reconstrução desses componentes dos tecidos essenciais às células. Essa reconstrução e remodelação ocorre constantemente por meio dos próprios componentes da MEC, através da degradação, síntese, remontagem e modificação química (LU, et al., 2011). Os processos que levam à remodelação são severamente regulados para garantir a homeostase tecidual, principalmente frente a lesões celulares. Os constituintes da MEC proveniente da sua clivagem podem regular a arquitetura e influenciar no comportamento celular (HYNES, 2009).

Também existem alguns fatores de crescimento e moléculas de comunicação intracelular como por exemplo: metaloproteinases, citocinas, mucinas, lectinas do tipo C, galectinas, e enzimas modificadores da MEC, que apesar de serem associadas a MEC, não fazem parte dos seus constituintes e suas funções, porém são de extrema importância no processo de remodelação (BONNANS et al., 2014). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são as principais enzimas envolvidas no processo de degradação da MEC. São produzidas em forma de preteínases solúveis e em condições normais tem uma baixa atividade, mas essa atividade tende a aumentar em processos de reparo tecidual em tecidos doentes ou inflamados (BONNANS et al., 2014).

O remodelamento descrito pode ocorrer de forma desregulada levando a condições patológicas, promovendo a progressão do evento patológico, como o câncer e a fibrose, que podem ser desencadeados a partir da deposição exagerada da MEC, assim com uma rigidez extrema desse material (FRANTZ et al., 2010). Outro exemplo proveniente desse processo é a osteoartrite, que está associada a degradação excessiva da MEC (ZHEN et al., 2014).

Esse rearranjo tem sido reportado em desordens degenerativas e psiquiátricas como alzheimer e esquizofrenia (BONNEH-BARKAY; WILEY, 2009; PANTAZOPOULOS et al., 2010; DAUTH, 2016). A mudança seletiva da MEC presente no tecido nervoso é essencial para a homeostase cerebral e para a regulação das desintegrinas e metaloproteínas com domínios de trombospondina (ADAMTS) MMPs (ZIMMERMANN; DOURS-ZIMMERMANN, 2008).

2.3 MEC no Tecido Nervoso

No SN, a MEC dá origem a uma MB que envolve o cérebro e os vasos sanguíneos (TIMPL et al., 1979; TIMPL, BROWN, 1996; ERICKSON; COUCHMAN, 2000). Ela se desenvolve como uma malha molecular amorfa e difusa complexa, que ocupa o espaço entre as células do tecido nervoso e contribui para o seu desenvolvimento estrutural e funcional. Ela também pode estar associada à superfície celular ou envolvida na forma líquida ao redor dos neurônios (MURAKAMI e OHTSUKA, 2003; GALTREY et al., 2008; KWOK et al., 2011), sendo capaz de promover o suporte para células (HAGIHARA et al., 1999; CARULLI et al., 2006; DEEPA et al., 2006).

Assim como as PGs, as GAGs compõem a MEC de e são expressas durante o desenvolvimento do SN e no SN de adultos (SANES, 1989; REICHARDT; TOMASELLI, 1991; VENSTROM e REICHARDT, 1993; MILNER; CAMPBELL, 2002; NAKAMOTO et al., 2004). Também são descritas como um dos principais constituintes da matriz no SNC (DEEPA et al., 2006; KWOK et al., 2012).

Estudos foram realizados a fim de descrever a complexa composição da MEC no SNC. E segundo esses, os principais compostos descritos são os CSPGs, AH, proteínas de ligação e a tenascina R (Tn-R) (KOPPE, et al., 1997; CARULLI, et al., 2007; KWOK, et al., 2010; DEEPA, et al., 2006; MIAO, et al., 2014). Através destes estudos, constatou-se que a rede perineuronal apresenta uma composição molecular heterogênea (KARETKO; SKANGIEL-KRAMSKA, 2009). No SNC, a MEC possui CSPGs como componentes (fig. 1) (WANG; FAWCETT, 2012).

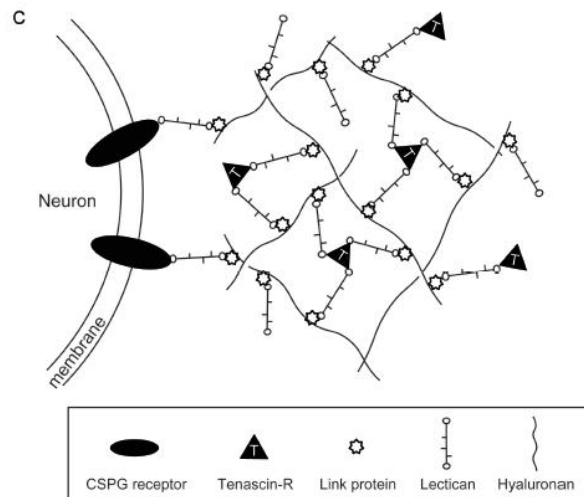


Figura. 1. Estrutura e composição da RPN no SNC. (adaptado de MIAO, *et al.*, 2014)

A MEC que se encontra ao redor dos neurônios se torna uma estrutura estável, densa e altamente especializada conhecida como rede perineuronal (RPN), que também é formada pelo AH, diversas hialectinas, proteínas de ligação, receptores de membrana e proteínas adesivas (MURAKAMI; OHTSUKA, 2003; GALTREY *et al.*, 2008; KWOK *et al.*, 2011). No espaço extracelular ocorre uma interação entre CSPGs e cadeias polímeras de AH na superfície das células. As proteínas envolvidas nesse processo estabilizam as interações entre CSPGs e AH, e ainda, através do domínio C-terminal das PGs, ocorre a interação das hialectinas e PTP com as CSPGs, que são capazes de se ligarem à proteína trimérica Tn-R, originando a estrutura altamente organizada denominada RPN (MIAO, *et al.*, 2014).

Durante seu desenvolvimento, a primeira composição da RPN se dá pela maior expressão de ACAN e fosfocana. Após seu desenvolvimento, seus componentes se assemelham aos da MEC, sendo de extrema importância e se expressando de forma ressaltante no SNC (GU *et al.*, 2007; GALTREY *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2009; ABASKHAROUN *et al.*, 2010).

A ACAN é a proteoglicana que ocorre em todos os tipos de RPN. No entanto a VCAN, NCAN, BCAN e fosfacana (PTP) encontram-se em apenas alguns modelos de RPN descritos na literatura (MIAO, *et al.*, 2014). A glicosilação diferencial da ACAN contribui em grande grau para a heterogeneidade molecular da RPN (MATTHEWS, *et al.*, 2002). A digestão enzimática das proteínas de ligação (AH ou

CSPGs) resulta em perda completa de RPN, o que evidencia a importância de cada componente na manutenção de sua integridade estrutural (CARULLI, et al., 2009).

Em alguns casos, a estrutura da RPN não é estática, mas é sensível às mudanças direcionadas pelas experiências sensoriais em animais adultos (WANG; FAWCETT, 2012). Além disso, a alta sensibilidade da RPN tem um importante papel na plasticidade neuronal (CARULLI, et al., 2011).

A RPN é considerada uma malha com fendas, sendo análoga a outras estruturas que envolvem subconjuntos de neurônios (CELIO, et al., 1998; HOCKFIELD, et al., 1983; ZAREMBA, et al., 1989; CELIO, et al., 2004). Além das PG, produtos dos neurônios e células gliais podem participar da formação da RPN. Quanto a sua distribuição no tecido nervoso, a RPN ocorre de maneira desigual pelo córtex, hipocampo, hipotálamo, tronco encefálico e medula espinal de várias espécies e é formada ao redor de muitos tipos de neurônios, principalmente excitatórios e GABAérgicos inibitórios (BRUCKNER, et al., 2000; MATTHEWS, et al., 2002; ALPAR, et al., 2006; WEGNER, et al., 2003; MIAO, et al., 2014).

A RPN também está envolvida no funcionamento de tipos específicos de neurônios e também na plasticidade neuronal em indivíduos adultos (DITYATEV; SCHACHNER, 2003; PIZZORUSSO, et al., 2006; GALTREY; FAWCETT, 2007; KOWK et al., 2011; KOWK et al., 2014), bem como na estabilização de sinapses após o nascimento, na neuroproteção e no tamponamento iônico (BRUCKNER et al., 2000; DITYATEV; SCHACHNER, 2003; LAU et al., 2013).

Assim como o SNC, o sistema nervoso autônomo (SNA) desempenha um papel de suma importância na regulação de processos relacionados à homeostase fisiológica e a resposta a estímulos agudos geradores de estresse. Sua funcionalidade foi por muitas vezes considerada como independente de outros sistemas adaptativos. O SNA é essencial para a regulação, integração e desenvolvimento de vários processos entre diversos sistemas fisiológicos, sendo composto por três ramos distintos: o sistema nervoso simpático (SNS), o sistema nervoso parassimpático (SNP) e o sistema nervoso entérico (SNE) (CIRMANOVA et al., 2008; CONFAVREUX et al., 2009; ELENKOV et al., 2000; GANTA et al., 2004; HAMRICK et al., 2008).

Segundo Furness (2006), o SNA possui vias eferentes do SNC como dois neurônios em série, um neurônio pré-ganglionar e pós-ganglionar. E a informação sensorial provém da periferia para o SNC através dos neurônios aferentes primários da coluna vertebral e do crânio.

2.4 MEC no tecido nervoso e inflamação

Os componentes da MEC podem conduzir processos neuroinflamatórios caracterizados pela infiltração de leucócitos no SNC e a ativação de várias células imunes (SOROKIN, 2010). Muitos desses eventos estão relacionados à onipresença dos CSPGs neste local (STEPHENSON; YONG, 2018).

Durante o processo inflamatório no SNC, mediadores inflamatórios, células nervosas, células do sistema imune ativado que podem estar infiltradas no local e a produção de protease levam a profundas modificações na MEC. Diversos tipos celulares têm a capacidade de superregular os CSPG após lesões, como os astrócitos, neurônios, oligodendrócitos e macrófagos (STEPHENSON YONG, 2018; HEINDRYCKX; LI, 2018).

Burnside e Bradbury (2014) demonstraram que após os processos de lesão ocorre uma regulação positiva de neurocana, brevicana e versicana, e uma diminuição da ACAN. Estas mudanças nas hialectinas têm padrões temporais e espaciais distintos e as alterações pós-lesão podem persistir por semanas (BEGGAH, et al., 2005; JONES, et al., 2003). Um estudo recente observou que uma mistura de CSPG contendo ACAN, VCAN, NCAN e PTP aumentou significativamente a produção de IL-1 β na micróglia, assim como reduziu a fagocitose e a migração dessa célula (DYCK, et al., 2018).

Para a compreensão da participação dos CSPG em processos inflamatórios no SNC, foi utilizado um modelo experimental in vivo, no qual os animais possuíam um processo inflamatório desmielinizante proveniente da esclerose múltipla e encefalomielite autoimune experimental (EAE) e assim foi possível observar um aumento da expressão de ACAN, BCAN e VCAN (isoforma V1), e redução de VCAN (isoforma V2), no pico da gravidade clínica (STEPHENSON, et al., 2018). Observou-

se também que a NCAN, a ACAN e a VCAN foram reguladas em torno da extremidade das lesões cerebrais ativas, associadas à astrogliose e à macrófagos (SOBEL; AHME, 2001).

2.5 Agrecana

A ACAN, é uma PG da MEC presente no SNC e na rede perineuronal (RPN), descrita como um dos principais componentes da cartilagem (WATANABE et al., 1998). É fundamental para a função cartilaginosa e para o desenvolvimento do esqueleto, por desenvolver um agregado no tecido cartilaginoso e por ser um componente molecular da cartilagem no processo de ossificação endocondral (WATANABE et al., 1998). Essa PG possui alta hidrofília, promovendo a formação de uma matriz hidratada e um inchaço hidrodinâmico, o qual é o mecanismo base para a propriedade viscoelástica da cartilagem e articulações (HEINEGARD; SAXNE, 2011; STANTON et al., 2011; TROEBERG e NAGASE, 2012).

Em sua estrutura molecular, a ACAN apresenta um eixo proteico com três domínios de interação com outras moléculas (Fig 2). O domínio G1, localizado na porção N-terminal da molécula, possui sítio de ligação para o ácido hialurônico – HABR para organizar o agregado (HEINEGARD, 2009); o G2 é característico e único da ACAN e sua função ainda não está elucidada, e o domínio G3, na região C-terminal, permite a ligação da ACAN com outras hialectinas como as versicanas, fatores de crescimento, proteínas de adesão, proteínas adesivas como as tenasinas através do domínio de lectina C (ASPBERG et al., 1997; DAY, et al., 2004). Além disso, esse domínio também trabalha no processo de pós-tradução da proteína nuclear da ACAN e sua secreção (VERTEL et al., 2004). A interação destas proteínas leva a formação de agregados na cartilagem, bem como em outros tecidos, onde a ACAN é capaz de promover o inchaço hidrodinâmico, essencial para a sustentação (ASPBERG, 2012).

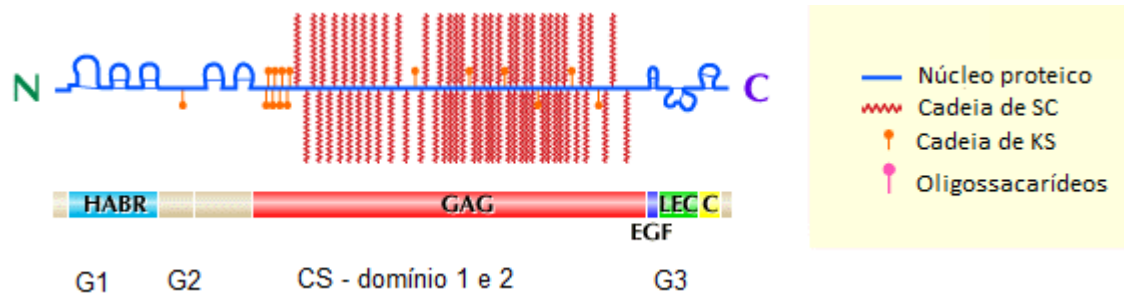


Figura. 2. Estrutura Molecular da ACAN. N – porção N terminal. C – porção C terminal. HABR – Região de ligação com o ácido hialurônico. GAG – Glicosaminoglicanos. EGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos. LEC C – Região de ligação com proteínas que contém lectina C. SC- Sulfato de condroitina. KS – Sulfato de queratan.

(adaptado de <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/proteoglycan/PGA03E.html>)

Estudos sobre o mapeamento de algumas proteínas da MEC em regiões distintas do cérebro (ZIMMERMANN; DOURS-ZIMMERMANN, 2008; MORAWSKI et al., 2012), assim como análises quantitativas de CSPG (PANTAZOPOULOS *et al.*, 2008) e também um estudo de análise semiquantitativa da distribuição de ACAN e AH em cérebro de camundongos (COSTA et al., 2007), demonstraram que em cada região há uma diferença na expressão destas proteínas.

Dauth, et al., (2016) demonstrou que a ACAN foi expressa de maneira elevada na RPN presente no isocórtex. E assim como outras hialectinas, como a BCAN, desempenha um importante papel na formação da memória quando presentes no hipocampo. Para tal participação dessa PG na formação da memória, ocorre um *splicing* após a transcrição do seu gene, formando a isoforma E, identificada em cérebro de humanos e inclusive em casos de oligodendroglioma (VIRGININO, et al., 2009).

Foi observado também que a expressão de proteína de ligação e ACAN por alguns neurônios é um evento primordial para a formação da RPN. Isso se deu através de um estudo utilizando medula espinal de ratos após o período pós-natal até a vida adulta, onde observou-se a associação de ACAN com os neurônios que possuíam RPN, demonstrando a presença da ACAN desde a formação da RPN (GALTREY et al., 2008). A presença da ACAN neste estudo, foi associada a neurônios motores na região ventral da medula, e a neurônios consideravelmente maiores na região dorsal da medula. Sendo assim, viu-se que a presença da ACAN

é essencial no SNC, de modo que se encontra presente em toda a extensão da RPN, indicando que está relacionada a subpopulações específicas de neurônios (GALTREY et al., 2008).

2.6 Agrecana e Inflamação

A molécula de ACAN é clivada em várias partes, de forma bem definida. Dessa forma, o domínio G3 que se encontra localizado na porção C-terminal e outras partes variáveis dessa porção são liberados do tecido cartilaginoso para o líquido sinovial. Ainda que a clivagem da molécula aconteça, o domínio G1 permanece no tecido por um período mais longo, devido a sua ligação ao AH (PAULSSON et al., 1987; DUDHIA et al., 1996). Em um estudo foi observado que essa clivagem de ACAN ocorre por meio das agrecanases, sendo uma das causas de doenças articulares, como por exemplo, a artrite reumatoide e a osteoartrite. Também foi descrito que através da estrutura principal, a ACAN é capaz de ativar o sistema complemento, induzindo a formação do complexo proteico C5b-9 solúvel, denominado complexo de ataque de membrana - MAC (WANG et al., 2011).

Um segundo estudo foi realizado para elucidar a possibilidade de ativação das vias do complemento. A partir disso, foi demonstrado que a ACAN pode induzir a ativação da via clássica do complemento. Isso se deve ao fato de que fragmentos que possuem lectina do tipo C presentes na estrutura da ACAN induzem a deposição de proteínas C4b e C3b do sistema complemento (Fig 3) (FURST et al., 2013).

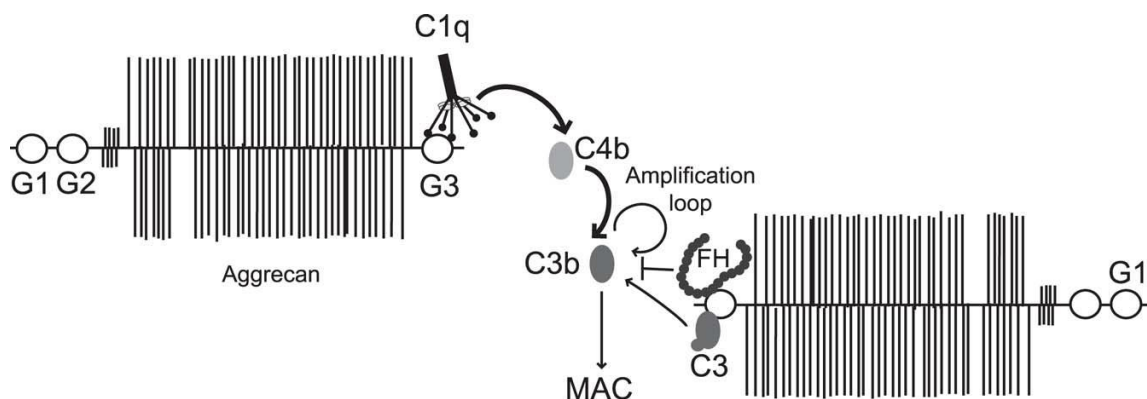


Figura. 3. Representação esquemática da interação da ACAN com o sistema complemento (FU"RST *et al.*, 2013).

A proteína C1 do complemento, também possui forte ligação por fragmentos de lectina do tipo C presentes no eixo proteico da ACAN. As proteínas C1 e C4b são responsáveis pela ativação da via clássica do complemento, deste modo, esta via também é ativada pela interação da ACAN com essas proteínas. Devido à interação da ACAN com a C3b, também é possível ativar a via alternativa do complemento (FU"RST *et al.*, 2013). Em contrapartida, nenhum dos ativadores da via das lectinas, como a manose receptora de manana (MBL), ficolina 2 ou ficolina 3 foram depositados nos fragmentos do domínio G3 de ACAN, demonstrando a ausência de ativação da via das lectinas (FU"RST *et al.*, 2013).

A ACAN é associada a outras doenças inflamatórias, como a osteoartrite (ASPBERG, 2012), nesse caso, a quebra da ACAN no tecido inflamado ocorre mediante a ativação da expressão de MMPs que contribui para a degradação da MEC na cartilagem. Essa ativação é decorrente do aumento de citocinas pró-inflamatórias, como exemplo: IL-1 β , também considerada como um dos principais iniciadores da osteoartrite (OA). A IL-1 β é produzida por diversas células, inclusive por condrócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais, sendo altamente encontrada na cartilagem articular danificada durante o início e progressão da OA, também foi notada a detecção de IL-1 β em líquido sinovial e articular (MOOS, *et al.*, 1999; LEFEBVRE, *et al.*, 1990; HASEEB e HAQQI, 2013). Conforme os processos mencionados, Fan *et al.* (2005) demonstraram através do seu estudo que o aumento da IL-1 β e o elevado nível de apoptose dos condrócitos humanos são responsáveis por aumentar a síntese de ACAN nestas células e em fibroblastos sinoviais durante a AO.

Assim como a presença da molécula de ACAN, sua ausência também foi relacionada aos processos inflamatórios, como na condrodysplasia autossômica recessiva, uma deficiência da matriz cartilaginosa (cmd) causada pela ausência de ACAN no tecido cartilaginoso (RITTENHOUSE *et al.*, 1978; KIMATA *et al.*, 1981). Uma série de características físicas foram associadas a esse processo, como por exemplo, o nanismo desproporcional, a fissura palatina e até morte dos animais com

deleção do gene de ACAN logo após o nascimento devido a problemas respiratórios relacionados à cartilagem respiratória alterada (KIMATA et al., 1983).

Além da condrodisplasia, foi identificada uma série alélica de mutações da ACAN que resultam em amplo espectro fenotípico incluindo displasia espondiloepimetáfisária (SEMD) (TOMPSON et al., 2009), displasia espondiloepifisária tipo Kimberley (SED) (GLEGHORN et al., 2005), osteocondrite dissecante familiar (STATTIN et al., 2010) e síndromes de estatura associadas à maturação óssea acelerada (NILSSON et al., 2014).

3 Inervação do Trato Gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é composto pelo estômago, intestino delgado, intestino grosso e reto. As porções intestinais são divididas em duodeno, jejuno e íleo (intestino delgado), e ceco, cólon ascendente, cólon transversal (em humanos), cólon descendente e cólon sigmoide (em humanos), (intestino grosso). Além dessa composição, o TGI conta com uma série de órgãos associados, como fígado, pâncreas, vesícula biliar e glândulas celulares (SAFFREY, 2013; VANUYTSEL, et al., 2013).

Os intestinos apresentam, em conjunto, aproximadamente 8,5 metros de comprimento em humanos e 30 centímetros em camundongos. Cerca de 80% desse comprimento é relativo ao intestino delgado, ficando o intestino grosso com a menor porção. Essas duas porções do intestino são anatomicamente e funcionalmente diferentes. (STANDRING; GRAY, 2008; AXELSSON et al., 1996; FOONG et al., 2012).

A mucosa, estrutura presente nos órgãos do TGI, possibilita a interação com o ambiente. No intestino delgado, a mucosa apresenta vilosidades, protuberâncias que se estendem para o lúmen e logo após o nascimento dão origem às criptas. As vilosidades são cercadas por invaginações epiteliais, denominadas criptas de Lieburkuhn (CLEVERS, 2013). No entanto, o intestino grosso é composto apenas de criptas e pelo epitélio superficial (VANUYTSEL, et al., 2013). O TGI resiste a muitas alterações do meio externo devido à intensa capacidade de renovação celular do epitélio intestinal. Por meio desse processo é possível renovar todas as

células do eixo das criptas-vilosidades em até 7 dias nos humanos (POTTEN; LOEFFLER, 1990) e em 3 dias no caso de camundongos (CHENG; BJERKNES 1983).

As vilosidades são constituídas por uma camada de epitélio pós-mitótico simples, e logo abaixo desse epitélio, na lâmina própria, encontram-se os capilares e vasos linfáticos responsáveis pelo transporte de nutrientes absorvidos (CLEVERS, 2013). Os enterócitos absorventes ou em células secretoras, que podem ser classificadas em células caliciformes secretoras de muco; células enteroendócrinas capazes de secretar hormônios; células de Paneth antimicrobianas, que secretam lisozimas e defensinas; células de tufo com secreção de opóides e células microfold (células M) que sobrepõem as placas de Peyer (CLEVERS, 2013). Ainda em relação a composição celular, o TGI contém o maior número de células neurais e o mais complexo sistema de neurônios fora do SNC (SAFFREY, 2013).

Para que o trato gastrointestinal funcione corretamente, existe a necessidade de comunicação entre o cérebro e os componentes nervosos espalhados pelo corpo. Essa comunicação é mediada por vários hormônios, metabólitos e sinais neurais aferentes que tem relação com a alimentação (CUMMINGS; OVERDUIN, 2007). Sabe-se que os alvos desses sinais são neurônios presentes no hipotálamo e algumas estruturas relacionadas a esses neurônios que integram essas informações a fim de gerar uma representação central do estado fisiológico (CLEMMENSEN et al., 2017).

A comunicação mencionada acima é estabelecida também por fibras do sistema nervoso autônomo simpático e sistema nervoso autônomo parassimpático em conjunto com os plexos mioentérico e submucoso. Já as funções básicas do intestino, como o controle da atividade peristáltica e da secreção de enzimas digestivas, assim como o controle do fluxo sanguíneo, são primeiramente reguladas pela rede intrínseca de gânglios entéricos. Os neurônios que estão presentes nestes gânglios têm a capacidade de controlar os movimentos peristálticos do intestino de modo independente do resto do sistema nervoso (FURNESS, 2006).

4 O Sistema Nervoso Entérico

Para realizar suas funções, o TGI necessita de um controle eficiente que seja capaz de sincronizar a atividade muscular e a secreção de enzimas para a hidrólise de partículas alimentares macroscópicas (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013). O SNE é um excelente mediador desses processos. Para tal, o TGI possui uma rede de neurônios e de células da glia dentro da parede gastrointestinal, responsável pelo controle da maioria dos aspectos da função intestinal. Porém, essas funções desempenhadas pelo SNE não ocorrem de forma totalmente autônoma (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013).

O SNE é derivado das cristas neurais (CN), que consiste em uma população celular altamente migratória e proliferativa originada da junção da placa neural e da ectoderma adjacente. Essas células invadem o intestino e migram através do mesênquima (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013). Os precursores do SNE são originados dos segmentos vagal e sacral do tubo neural (DURBEC, et al., 1996; BURNS; LE DOUARIN, 1998; LE DOUARIN; TEILLET, 1973; YNTEMA; HAMMOND, 1954).

Desse modo, sabe-se que a formação do SNE necessita de uma extensa migração celular, proliferação celular controlada, regulação da diferenciação celular, crescimento de neuritos direcionado e a formação de uma rede de neurônios interconectados (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013).

O SNE é composto por pequenas agregados de corpos celulares de neurônios denominados ganglios entéricos, além das conexões neurais entre esses gânglios e fibras nervosas que fornecem as inervações efetoras aos tecidos, incluindo o músculo da parede intestinal, o tecido epitelial, vasos sanguíneos intrínsecos e células endócrinas gastroenteropancreáticas. São aproximadamente 5×10^8 neurônios, e esses neurônios possuem mais que 15 classes funcionais compreendendo uma gama abundante de neurotransmissores, padrões de projeção e propriedades elétricas (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013; FURNESS, 2006). O número total de neurônios entéricos em seres humanos é superior ao total de todos os neurônios presentes em gânglios simpáticos e parasimpáticos combinados e, possivelmente, igual ao número de neurônios na medula espinal (FURNESS, 2006).

Os neurônios que compõem o SNE podem sofrer alterações quanto a sua quantidade, ou até mesmo serem extintos, caracterizando as aganglionoses. Crianças com aganglionose intestinal desenvolvem sintomas como constipação, vômitos, dor abdominal e insuficiência de crescimento e podem até ir a óbito (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013). Devido a complexidade do desenvolvimento do SNE e sua função, há a necessidade de diversas moléculas responsáveis pelo controle da regulação da morfogênese deste sistema. Deste modo, uma interrupção de um ou mais desses sinais contribui para um espectro de doenças (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013). Os neurônios entéricos são necessários para que o relaxamento ativo do músculo liso intestinal aconteça. Deste modo, o intestino agangliônico é contraído tonicamente, causando obstrução funcional (LAKEL; HEUCKEROTH, 2013).

O SNE promove o controle neuronal da função gastrointestinal, e isto acontece devido a esse sistema ser integrado gerando interações entre reflexos entéricos locais, os reflexos que passam por gânglios simpáticos e os que passam pelo intestino e voltam através das inervações através do SNC (FURNESS, 2012). A organização do SNE e suas vias neuronais para e do intestino não seguem os conceitos convencionais de organização do sistema nervoso (FURNESS, 2012).

Estudos descrevem, por exemplo, que os axônios de neurônios cujos corpos celulares pertencem ao SNE (conhecidos como neurônios intestínofugais) projetam suas fibras nervosas para os gânglios simpáticos, para o pâncreas, a vesícula biliar e a traqueia, onde os sinais são transmitidos para a medula espinal e por fim para o tronco cerebral (FURNESS, 2006).

A partir de suas projeções (Fig 4) o SNE desempenha inúmeras funções, como a determinação de padrões de movimento do trato gastrointestinal, controle da secreção de suco gástrico, modificação de absorção de nutrientes, regulação do movimento do fluido através do epitélio do revestimento, estabilização do fluxo sanguíneo local, e interação entre o sistema imunológico e o endócrino (FURNESS, 2006). Em conjunto às células gliais, o SNE também é responsável por contribuir na manutenção da integridade da barreira epitelial entre a luz do órgão e suas células e tecidos existentes no interior da parede intestinal (TOUMI, et al., 2003; SAVIDGE, et al., 2007). Devido às inúmeras funções que podem ser desempenhadas por esse ramo do SNA, é possível que o SNE venha a falhar. Como consequência dessa

falha, pode ocorrer o desenvolvimento de neuropatias entéricas, classificadas em neuropatias congênitas ou de desenvolvimento, neuropatias esporádicas e adquiridas, que são aquelas que podem ser associadas a outros processos patológicos e neuropatias iatrogênicas ou induzidas por drogas (FURNESS, 2012). O SNE atua de diversas formas ao longo do TGI para garantir a coordenação muscular e inervação das vias originadas deste sistema.

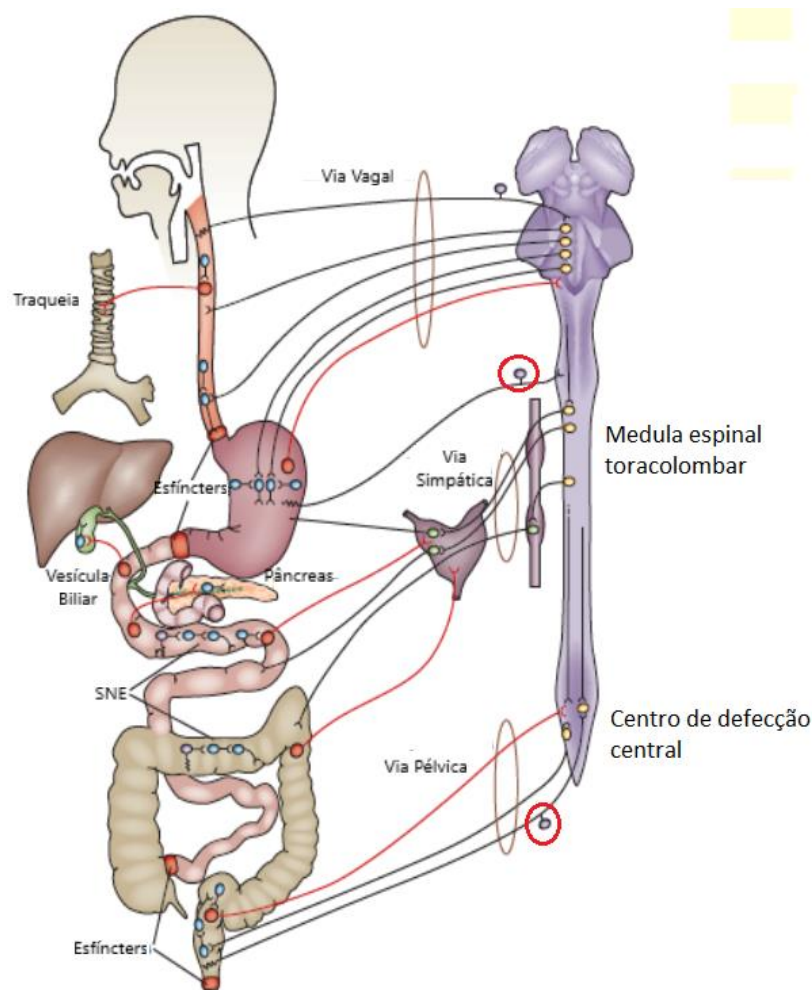


Figura 4. Inervações do TGI. (Adaptado de FURNESS, 2012).

O movimento de propulsão que ocorre em várias regiões do TGI pode causar uma falha na transmissão mediada por óxido nítrico de neurônios entéricos. Que por sua vez pode causar estenose pilórica hipertrófica na porção final do cólon (RIVERA, et al., 2011).

O controle da atividade de propulsão no intestino delgado e grosso é dependente de reflexos realizados por meio de impulsos do SNE. Através de outros estudos sabe-se que o intestino delgado depende inteiramente do SNE para direcionar seus padrões de movimento, sendo eles a propulsão anterógrada rápida de conteúdo (peristaltismo), os movimentos de mistura (segmentação), a propulsão anterógrada lenta (o complexo mioelétrico migratório, MMC) e retropropulsão (expulsão de substâncias nocivas associadas ao vômito) (HASLER, 2003).

O SNE controla a motilidade do intestino delgado e grosso (FURNESS, 2006), com exceção do reflexo da defecação, o qual é controlado pelo SNC por intermédio das inervações de origem lombossacral (DE GROAT, et al., 1981).

Para que os movimentos de contração e relaxamento descritos acima aconteçam, é necessária harmonia entre os inúmeros tipos neurônios identificados nas inervações do TGI. Os exemplos desses neurônios são os sensoriais intrínsecos (neurônios aferentes primários intrínsecos, conhecidos como IPANs), os interneurônios e os neurônios motores excitatórios e inibitórios que inervam os músculos (Fig 5) (BAYLISS, 1898; FURNESS, 2006).

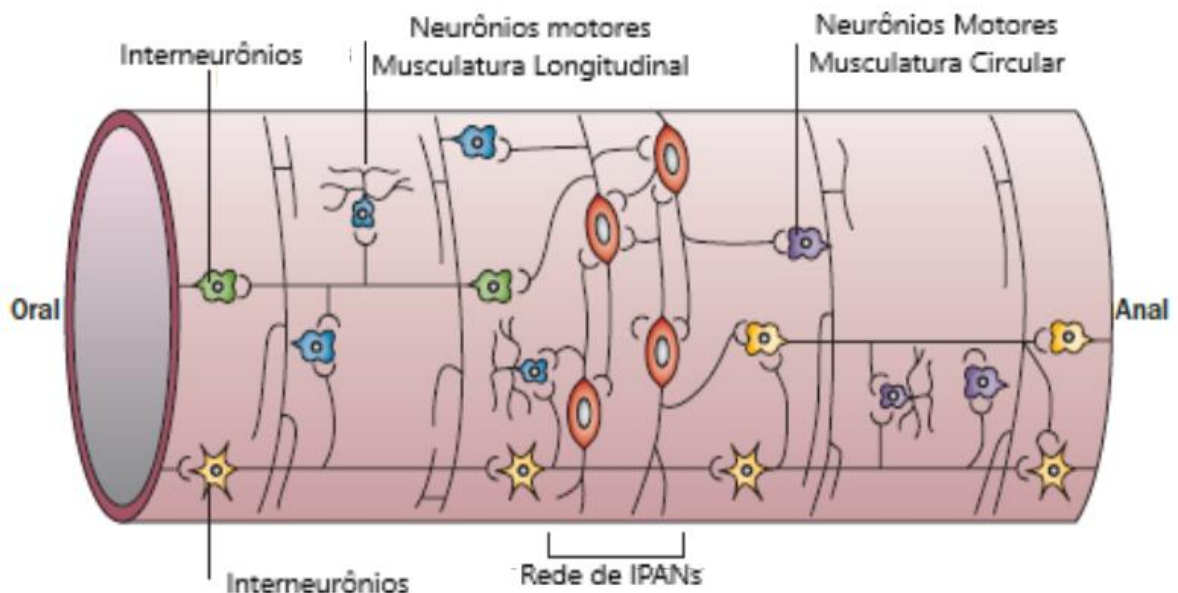


Figura 5. Circuitos nervosos de controle da motilidade no intestino. IPANs – Neurônios aferentes primários intrínsecos (Adaptado de FURNESS, 2006).

Os IPAN são responsáveis por responderem às mudanças na química orquestrada no lúmen dos órgãos na distorção mecânica da mucosa e na distorção mecânica direta de seus prolongamentos na musculatura externa que também pode excitar alguns neurônios unipolares (KIRCHGESSNER, et al., 1992; BERTRAND, et al., 1997; KUNZE, et al., 1998; FURNESS, et al., 1998; FURNESS, et al., 2004; SPENCER; SMITH, 2004; SPENCER, et al., 2006; MAZZUOLI; SCHEMANN, 2009).

Existem características semelhantes entre os IPANs entéricos e os neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro dos gânglios da raiz dorsal (GRD), que promovem as conexões no SNC. Do mesmo modo que acontece com os neurônios aferentes primários de GRD, os IPANs entéricos são polimodais e alguns deles tendem a ser nociceptores (FURNESS, et al., 2004; LAWSON, 2005).

Os neurônios entéricos se encontram em gânglios interconectados, os quais formam plexos ganglionados ou aganglionados (Fig. 6) (LOMAX, PRADHANANGA; BERTRAND, 2017). Os plexos ganglionados são o submucoso e o mioentérico. O plexo submucoso se encontra inserido na camada submucosa, e é responsável pela modulação das atividades secretomotoras do epitélio e dos vasos sanguíneos intrínsecos. Por sua vez, o plexo mioentérico, localizado entre as duas camadas musculares lisas, a muscular circular e a muscular longitudinal, provêm a inervação motora excitatória ou inibitória para parede do TGI. Nestes dois plexos, três componentes de fibras são descritos: o plexo primário, o plexo secundário e o plexo terciário (FURNESS, 2006).

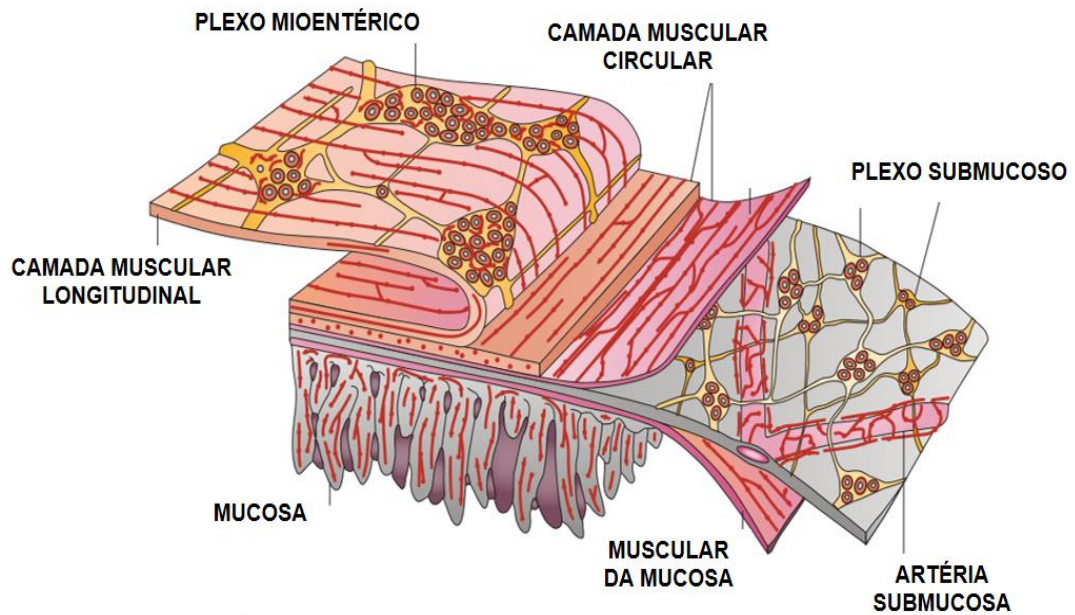


Figura 6: Organização do SNE em humanos e outros mamíferos (Adaptado de FURNESS, 2006).

Além dos plexos ganglionados, o SNE também é composto por plexos não ganglionados, os quais possuem apenas fibras nervosas. Esses são responsáveis pela interação neural entre as camadas da parede dos órgãos, possibilitando o funcionamento adequado do TGI. Porém, algumas diferenças nessas estruturas são observadas de acordo a região do TGI e a espécie. (BREHMER, 2006; FURNESS, 2006; BREHMER et al., 2010; FURNESS, 2016).

Assim como os neurônios que compõe o SN como um todo, os neurônios entéricos e os neurônios extrínsecos que se conectam ao TGI liberam múltiplos transmissores que podem ser um transmissor primário e transmissores subsidiários ou moduladores de transmissão (FURNESS, 2012).

A acetilcolina (ACh) é comumente secretada pelos neurônios, e é sintetizada pela enzima Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT) (DALE e FELDBERG, 1934; DIKSHIT, 1938). Os neurônios que expressam ACh podem divergir quanto a morfologia e uma boa parte desses neurônios também co-expressam taquicinas (TKs), como substância P (SP), e neuroquinina A (NKA) (COSTA, BROOKES; HENNIG, 2000).

A ACh liberada pelos neurônios motores excitatórios do plexo mioentérico

desempenham papel muito significativo da transmissão excitatória para os músculos da parede intestinal, pois são capazes de interagir com receptores muscarínicos M2 e M3 presentes na musculatura lisa e nas células intersticiais de Cajal presentes nessa região (LECCI, SANTICIOLI; MAGGI, 2002; GOYAL, 2013). Esse neurotransmissor promove o relaxamento muscular mediante sua ligação ao receptor muscarínico M2, levando a inibição da enzima adenilato ciclase, responsável pelo relaxamento. Porém, ao se ligar ao receptor M3, via fosfolipase C β , a ACh promove a liberação de Ca²⁺, resultando em contração muscular (LECCI, SANTICIOLI; MAGGI, 2002).

Além de neurotransmissores excitatórios, no SNE ocorre a secreção neurotransmissores inibitórios: óxido nítrico (NO), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o ATP, que inclusive participam da motilidade. Mas, não do mesmo modo. Geralmente promovem os reflexos de relaxamento na região distal da parede muscular, com intenção de impulsionar o conteúdo presente no lúmen a diante. Devido a essa atividade, a inibição dos reflexos motores excitatórios tem a capacidade de diminuir a velocidade do trânsito intestinal, em razão da predominância dos reflexos inibitórios responsáveis pelo relaxamento da musculatura. Por conseguinte, se as vias inibitórias forem bloqueadas, as vias excitatórias terão prevalência, resultando na contração muscular na região, aumentando a velocidade do trânsito intestinal, e assim sucessivamente (SHAHBAZIAN; HOLZER, 2000; LECCI, SANTICIOLI; MAGGI, 2002).

O NO é uma molécula de sinalização muito importante em diversas funções biológicas. Sua produção ocorre por meio de três enzimas: a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS1), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3) (ARNOLD et al. 1977; GRUETTER et al. 1979; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

A produção dessas enzimas pode ser essencial para a regulação de muitas funções homeostáticas da mucosa do TGI como a manutenção da permeabilidade epitelial, a produção de muco e a modulação das respostas imunológicas. Além do mais, o NO é um importante neurotransmissor primário secretado por neurônios motores entéricos inibitórios (KONO et al., 2004; BULT et al., 1990; SANDERS; WARD, 1992; SUNG et al., 2006; MATSUYOSHI et al., 2010; PELLETIER et al.,

2010; MANE et al., 2014)

Uma das enzimas produtoras (nNOS) pode estar associada à membrana ou livre no citosol de neurônios entéricos. E através da técnica de imunohistoquímica/imunofluorescência é possível marcar essa enzima com o auxílio de anticorpos anti-nNOS (MATSUYOSHI et al., 2010; CAPUTI et al., 2017). A liberação do NO após a junção sináptica na musculatura lisa do TGI pode causar respostas divergentes de hiperpolarização, devido ao seu potencial inibitório, promovendo no relaxamento muscular (LIES et al., 2015).

Em um ensaio clínico realizado em Londres por pesquisadores da *Queen Mary University of London* foi observado que alguns pacientes que apresentavam problemas relacionados a articulação ou alguma deficiência de colágeno, como por exemplo portadores da síndrome da hiper mobilidade articular, também desenvolveram algum tipo de desordem gastrointestinal relacionada as disfunções de evacuação, como a constipação e diarreia. Esses pacientes apresentavam sintomas como dores abdominais, alteração dos hábitos intestinais e refluxo gastrointestinal, além de um histórico de dor crônica, muitas vezes generalizada, como a fibromialgia. (ZARATE, et al., 2010; FIKREE, et al., 2015).

Segundo estudos do mesmo grupo, pacientes com deficiência de tenascina X também apresentavam sintomas de desordens gastrointestinais e demonstraram que esta glicoproteína da MEC está associada a funções do SNE do cólon. Visto isso, o grupo de pesquisa mencionado direcionou seus estudos a caracterização da MEC no trato gastrointestinal (TGI) e por conseguinte no SNE.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação de agrecana com a inervação do cólon de camundongos saudáveis ou com retocolite ulcerativa induzida por Sulfato de Dextrana Sódica (DSS).

2.2 Objetivos Específicos

Investigar a expressão e a associação da agrecana com a inervação do cólon de camundongos saudáveis.

Avaliar se a inflamação causada por Sulfato de Dextrana Sódica (DSS) altera a organização da agrecana e sua associação com a inervação do cólon de camundongos.

REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

ABRAHAM, Clara; CHO, Judy H. **Inflammatory bowel disease**. The New England Journal Medicine 361: 2066-2078, 2009.

ADEYEMI, Edward O; NEUMANN, Stefii; CHADWICK, VS; HODGSON, HJF; PEPYS, Mark B. **Circulating human leucocyte elastase in patients with inflammatory bowel disease**. Gut. 26, 1985.

ALBERTS, Bruce. **Biologia Molecular da célula**. 3ª ed. Artes Médicas: Porto Alegre-RS; 1294p, 1997.

ALICAN, Inci; KUBES, Paul. **A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction**. The American Journal of Physiology. 270(2 Pt 1):G225-37, 1996.

ASPBERG, Anders. **The different roles of aggrecan interaction domains**. Journal of Histochemistry Cytochemistry. 60(12):987–96, 2012.

BANDTLOW, Christine E; ZIMMERMANN, Dieter R. **Proteoglycans in the developing brain—new conceptual insights for old proteins**. Physiological Reviews Rev 80:1267–1290, 2000.

BENNIKE, Tue Bjerg; CARLSEN, Thomas Gelsing; ELLINGSEN, Torkell; BONDERUP, Ole Kristian; GLERUP, Henning; BØGSTED, Martin; CHRISTIANSEN, Gunna; BIRKELUND, Svend; STENSALLE, Allan; ANDERSEN, Vibeke. **Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies**. Inflammatory Bowel Diseases. 0: 1, 2015.

BONNANS, Caroline; CHOU, Jonathan; WERB, Zena. **Remodelling the extracelular matrix in developement and disease**. Nature Reviewa Mollecular Cell Biology. 15(12): 786–801, 2014.

BORNSTEIN, Paul; SAGE, Ehlene. **Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function**. Current Opinion in Cell Biology. 14:608-16, 2002.

BROOKES, Steven J; EWART, WR; WINGATE, David L. **Intracellular recordings from myenteric neurons in the human colon.** The Journal of Physiology 390: 305-318, 1987.

BRUCKNER, Gert; HAUSEN, D; HARTIG, Wolfgang; DRLICEK, Marcus; ARENDT, T; BRAUER, K. **Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease.** Neuroscience. 92(3): 791–805, 1999.

BRUCKNER, Gert; GROSCHE, Jens; SCHMIDT, Sandra; HARTIG, Wolfgang, MARGOLIS, Richard U; DELPECH, Bertrand; SEIDENBECHER, Constanze I; CZANIERA, Reiner; SCHACHNER, Melitta. **Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R.** Journal of Comparative Neurology. 428: 616-629, 2000.

BURNS, Allan J; THAPAR, Nikhil. **Advances in ontogeny of the enteric nervous system.** Neurogastroenterology & Motility. 18: 876-887, 2006.

CARULLI, Daniela; RHODES, Kate E; BROWN, David J; BONNERT, Timothy P; POLLACK, Scott J; OLIVER, Kevin; STRATA, Piergiorgio; FAWCETT, James W. **The composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components.** Journal of Comparative Neurology. 494:559-577, 2006.

CARULLI, Daniela; PIZZORUSSO, Tommaso; KWOK, Jessica C; PUTIGNANO, Elena; POLI, Andrea; FOROSTYAK, Serhiy; ANDREWS, Melissa R; DEEPA, Sathyaseelan S; GLANT, Tibor T; FAWCETT, James W. **Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity.** Brain 2010; 133(Pt 8): 2331– 2347.

CIRMANOVA, Veronika; BAYER, Milan; STARKA, Luboslav; ZAJICKOVA, Katerina. **The effect of leptin on bone: an evolving concept of action.** Physiological Research. 57 (Suppl 1):S143–151, 2008.

CLEVERS, Hans. **The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment.** Cell 154, July 18, 2013.

CONFAVREUX, Cyrille B; LEVINE, Robert L; KARSENTY, Gerard. **A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms.** *Molecular and Cellular Endocrinology*. 310:21–29, 2009.

COOPER, HS; MURTHY, SN; SHAH, RS; SEDERGRAN, DJ. **Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 69(2):238–49, 1993.

CORD, Brakebusch; BOUVARD, Daniel; STANCHI, Fabio; SAKAI, Takao; FÄSSLER, Reinhard. **Integrins in invasive growth.** *The Journal of Clinical Investigation*. 109(8): 999-1006, 2002.

COSTA, Marcello; BROOKES, Simon J.H; HENNIG, Grant W. **Anatomy and physiology of the enteric nervous system.** *Gut*, v. 47, n. suppl 4, p. iv15-iv19, 2007.

CURRAN, S; MURRAY, GI. **Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis.** *European Journal of Cancer*; 36: 1261-630, 2000.

DAUTH, Stephanie; GREVESSE, Thomas; PANTAZOPOULOS, Harry; CAMPBELL, Patrick H; MAOZ, Ben M; BERRETTA, Sabina; PARKER, Kevin Kit. **Extracellular Matrix Protein Expression Is Brain Region Dependent.** *The Journal of Comparative Neurology*. 524:1309–1336, 2016.

DAY, Joanna M; OLIN, Anders I; MURDOCH, Alan D; CANFIELD, Ann; SASAKI, Takako; TIMPL, Rupert; HARDINGHAM, Timothy E; ASPBERG, Anders. **Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins.** *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 12511–12518, 2004.

DITYATEV, Alexander; SCHACHNER, Melitta. **Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity.** *Nature Reviews Neuroscience*. 4: 456-468, 2003.

DUDHIA, Jayesh; DAVIDSON, Catherine M; WELLS, Terri M; VYNIOS, Demis H; HARDINGHAM, Timoty E; BAYLISS, Michael T. **Age-related changes in the content of the C-terminal region of aggrecan in human articular cartilage.** *Biochemical Journal.* 313 (Pt 3): 933–940, 1996.

ELENKOV, Ilia J; WILDER, Ronald L; CHROUSOS, George P; VIZI, ESylvester. **The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system.** *Pharmacological Reviews.* 52:595–638, 2000.

FERANDES, Renata Streck. *Efeitos da Vimpocetina sobre o Sistema nervosa entérico de camunsongos com colite induzida por ácido acético.* 2017. 101f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2017.

FRANTZ, Christian; STEWART, Kathleen M; WEAVER, Valerie M. **The extracellular matrix at a glance.** *Journal of Cell Science.* 123:4195–4200, 2010.

FRISBY, Claudine L; FRASER, Robert J; SCHIRMER, Murray B; YEOH, Eric K; BLACKSHAW, Laurence Ashley. **Roles of muscarinic receptor subtypes in small intestinal motor dysfunction in acute radiation enteritis.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 293:G121-127, 2007.

FOONG, Jaime Pei Pei; NGUYEN, Trung V; FURNESS, John B; BORNSTEIN, Joel C; YOUNG, Heather M. **Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development.** *The Journal of Physiology.* 590: 2375-2390, 2012.

FURNESS, Camilla Melin; MORGELIN, Matthias; VADSTRUP, Kasper; HEINEGARD, Dick; ASPBERG, Anders; BLOM, Anna M. **The C-Type Lectin of the Aggrecan G3 Domain Activates Complement.** *Plosone.* v.8, 2013.

FURNESS, John B; COSTA, Marcello. **The Enteric Nervous System.** New York: Churchill Livinestone. Neuroscience. 1987.

FURNESS, John B. **The Enteric Nervous System**. Malden, Blackwell Publishing, 2006.

FURNESS, John B. **The Enteric Nervous System and Neurogastroenterology**. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 9, 286–294. 2012.

GANTA, Chanran K; BLECHA, Frank; GANTA, Roman R; HELWIG, Bryan G; COBER, Richard; PARIMI, Sujatha; FELS, Richard J; MUSCH, Timothy I; KENNEY, Michael J. **Hyperthermia-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system**. *Physiological Genomics*. 19:175–183, 2004.

GALTREY, Clare M; FAWCETT, James W. **The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system**. *Brain Research. Rev* 54: 1-18, 2007.

GALTREY, Claire M; KWOK, Jessica C F; CARULLI, Daniela; RHODES, Kate E; FAWCETT, James W. **Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord**. *European Journal of Neuroscience*. 27:1373-1390, 2008.

HAGIHARA, Kazuki; MIURA, Ryu; KOSAKI, Rika; BERGLUND, Erik; RANSCHT, Barbara; YAMAGUCHI, Yu. **Immunohistochemical evidence for the brevicin-tenascin-R interaction: Colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain**. *Journal of Comparative Neurology*. 410:256-264, 1999.

HAMRICK, Mark W; FERRARI, Sergio Livio. **Leptin and the sympathetic connection of fat to bone**. *Osteoporos International*. 19:905–912, 2008.

HE, You-Wen; LI, Hong; ZHANG, Jun; HSU, Chia-Lin; LIN, Emily; ZHANG, Nu; GUO, Jian; FORBUSH, Katherine A; BEVAN, Michael J. **The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens**. *Nature Immunology*. 2004.

HEINEGARD, Dick. **Proteoglycans and more—from molecules to biology.** International Journal of Experimental Pathology. 90: 575–586, 2009.

HEINEGARD, Dick; SAXNE, Tore. **The role of the cartilage matrix in osteoarthritis.** Nature Reviews Rheumatology. 7:50–56, 2011.

HYNES, Richard O. **The extracellular matrix: not just pretty fibrils.** Science. 326:1216–1219, 2009.

JONES, Frederick Scheetz; JONES, Peter Lloyd. **The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodelling.** Developmental Dynamics. 218:235-259, 2000.

JURJUS, Abdo R; KHOURY, Naim N; REIMUND, Jean-Maire. **Animal models of inflammatory bowel disease.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 50(2):81-92, 2004.

KANG, Yu-Ming; MA, Ying; ZHENG, Jin-Ping; ELKS, Carrie; SRIRAMULA, Srinivas; YANG, Zhi-Ming, FRANCIS, Joseph. **Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension.** Cardiovascular Research. 82:503–512, 2009.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.** Nature Immunology. 2010.

KOPPE, Gerlinde; BRUCKNER, Gert; HARTIG, Wolfgang; DELPECH, Bertrand; BIGL, Volker. **Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections.** The Histochemical Journal. 29:11-20, 1997.

LOHR, Kristin; SARDANA, Hardik; LEE, Seakwoo; WU, Feng; HUSO, David L; HAMAD, Abdel Rahim; CHAKRAVARTI, Shukti. **Extracellular matrix protein lumican regulates inflammation in a mouse model of colitis.** Inflammatory Bowel Disease. 18(1): 143–151, 2012.

KWOK, Jessica CF; DICK, Gunnar; WANG, Difei; FAWCETT, James W. **Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair.** *Development Neurobiology*. 71: 1073-1089, 2011.

KWOK, Jessica CF; HELLER, Janosch P; ZHAO, Rong-Rong; FAWCETT, James W. **Targeting inhibitory chondroitin sulphate proteoglycans to promote plasticity after injury.** *Methods in Molecular Biology*. 1162: 127-138, 2014.

KUNZE, Wolfgang A A; FURNESS, John B. **The enteric nervous system and regulation of intestinal motility.** *Annual Review of Physiology*. 61, 117–142, 1999.

LATELLA, Giovanni. **Redox Imbalance in Intestinal Fibrosis: Beware of the TGF β -1, ROS, and Nrf2 Connection.** *Digestive Diseases and Sciences*. 63(2):312-320, 2018.

LAU, Lorraine W; CUA, Rowena; KEOUGH, Michael b; HAYLOCK-JACOBS, Sarah; YONG, Wee V. **Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination.** *Nature Reviews Neuroscience*. 14: 722–729, 2013.

LEACH, Jennie B; SCHMIDT, Christine E. **Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds.** *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 779–789, 2004.

LI, Peng; RAITCHEVA, Denitza; HAWES, Michael L; MORAN, Nance; YU, Xin; WANG, Zhengxin; MATTHEWS, Gloria L. **Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms.** *Osteoarthritis Cartilage*. 20(11):1336–1346, 2012.

LU, Pengfei; TAKAI, Ken; WEAVER, Valerie M; WERB, Zena. **Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3:a005058, 2011.

MEYER, K; LINKER, A; RAPPORT, Mm. **The production of monosaccharides from hyaluronic acid by β -glucuronidase.** The Journal of Biological Chemistry. 192:275-281, 1951.

MILNER, Richard; CAMPBELL, Iain L. **The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS.** Journal of Neuroscience Research. 69: 286–291, 2002.

MIKULA, Michal; RUBEL, Tymon; KARZYMARSKI, Jakub; GORYCA, Krzysztof; DADLEZ, Michal; OSTROWSKI, Jerzy. **Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors.** Functional and Integrative Genomics. 11: 215±224, 2011.

MIQUELOTO, Carlos Alberto; ZORN, Telma M. **Characterization and distribution of hyaluronan and the proteoglycans decorin, biglycan and perlecan in the developing embryonic mouse gonad.** Journal of Anatomy. 211(1):16-25, 2007.

MORAWSKI, M; BRUCKNER, Gert; Jager C; et al. **Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's Disease.** Neuroscience 169: 1347-1363, 2010.

MORTENSEN, Joachim Høg; GODSKESEN, Line Elbjerg; JENSEN, Michael Dam; VAN HAAFTEN, Wouter Tobias; KLINGE, Lone Gabriels; OLINGA, Peter; DIJKSTRA, Gerard; KJELSEN, Jens; KARDSAL, Morten Asser; BAY-JENSEN, Anne-Christine; KRAG, Aleksander. **Fragments of Citrullinated and MMP-degraded Vimentin and MMP-degraded Type III Collagen Are Novel Serological Biomarkers to Differentiate Crohn's Disease from Ulcerative Colitis.** Journal of Crohn's and Colitis. v123, 2015.

MORTENSEN, Joachim Høg; MANON-JENSEN, Tina; JENSEN, Michael Dam; HAËGGLUND, Per; KLINGE, Lone Gabriels; KJELDTSEN, Jens; KRAG, Aleksander; KARSDAL, Morten Asser; BAY-JENSEN, Anne-Christine. **Ulcerative colitis, Crohn's disease, and irritable bowel syndrome have different profiles of extracellular matrix turnover, which also reflects disease activity in Crohn's disease.** PLoS ONE. 12 (10): e0185855, 2017.

MOYNES, Derek M; LUCAS, Graydon H; BEYAK, Michael J; LOMAX, Alan E. **Effects of inflammation on the innervation of the colon.** Toxicologic Pathology. 42(1):111-7, 2014.

MURAKAMI, Takuri; OHTSUKA, Aiji. **Perisynaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord.** Archives of Histology and Cytology 66: 195-207, 2003.

NAGASE, Hideaki; WOESSNER, JFrederic Jr. **Matrix metalloproteinases.** Current opinion in chemical biology. 2: 466±471, 1998.

NASTASE, Madalina V; YOUNG, Marian F; SCHAEFER, Lilliana. **Biglycan: A Multivalent Proteoglycan Providing Structure and Signals.** Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 60: 963±975, 2012.

O'TOOLE, Edel A. **Extracellular matrix and keratinocyte migration.** Experim Dermatol; 26: 525-30, 2001.

PANTAZOPOULOS, Harry; WOO, Tsung-Ung; LIM, Maribel P; LANGE, Nicholas; BERRETTA, Sabina. **Extracellular matrix-glia abnormalities in the amygdala and entorhinal cortex of subjects diagnosed with schizophrenia.** Archives of General Psychiatry. 67:155–166, 2010.

PAULSSON, Mats; MORGELIN, Matthias; WIEDEMANN, Hanna; BEARDMORE-GRAY, Matthew; DUNHAM, David; HARDINGHAM, Timothy; HEINEGARD, Dick; TIMPL, Rupert; ENGEL, Jurgen. **Extended and globular protein domains in cartilage proteoglycans.** Biochemical Journal. 245: 763–772, 1987.

PIZZORUSSO, Tommaso; MEDINI, Paolo; LANDI, Silvia; BALDINI, Sara; BERARDI, Nicolletta; MAFFEI, Lamberto. **Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 103:8517-8522, 2006.

POTTEN, Christopher S; LOEFFLER, Markus. **Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt.** Developmental biology. 110:1001–1020, 1990.

POTTS, Jennifer R; CAMPBELL, Iain D. **Structure and functions of fibronectin modules.** Matrix Biology. 15: 313-20, 1996.

REICHARDT, Louis F; TOMASELLI, Kevin J. **Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development.** Annual Review of Neuroscience. 14: 531–570, 1991.

ROZARIO, Tania; DESIMONE, Douglas W. **The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view.** Developmental Biology. 341:126–140, 2010.

SANES, Joshua R. **Extracellular matrix molecules that influence neural development.** Annual Review of Neuroscience. 12: 491–516, 1989.

SAFFREY, M Jill. **Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system.** Age (Dordr). 36:1019–1032, 2013.

SHI, Xuan-Zheng; WINSTON, John H; SARNA, Sushil K. **Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis.** American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology. 300(1):G41-51, 2011.

SHIMSHONI, Elee; YABLECOVITCH, Doron; BARAM, Liran; DOTAN, Iris; SAGI, Irit. **ECM remodelling in IBD: innocent bystander or partner in crime? The emerging role of extracellular molecular events in sustaining intestinal inflammation.** Gut Vol 64 No 3, 2015.

STANDRING, S; GRAY, HA. **Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice.** 40th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008.

STANTON, Heather; MELROSE, James; LITTLE, Christopher B; FOSANG, Amanda J. **Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases.** *Biochimica and Biophysica Acta.* 1812:1616–1629, 2011.

STEPHENSON, Erin L; YONG, Wee V. **Pro-inflammatory roles of chondroitin sulfate proteoglycans in disorders of the central nervous system.** *Matrix biology.* 2018.

THEOCHARIS, Achilleas D. **Versican in health and disease.** *Connective Tissue Research.* 49(3-4): 230–234, 2008.

TROEBERG, Linda; NAGASE, Hideaki. **Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis.** *Biochimica and Biophysica Acta.* 1824:133–145, 2012.

VANUYTSEL, Tim; SENGER, Stefania; FASANO, Alessio; SHEA-DONOHUE, Terez. **Major Signaling Pathways in Intestinal Stem Cells.** *Biochimica and Biophysica Acta.* 1830(2): 2410–2426, 2013.

VASINA, Valentina; BARBARA, Giovanni; TALAMONTI, Luighia; STANGHELLINI, Vincenzo; CORINALDESI, Roberto; TONINI, Marcellho; De PONTI, Fabrizio; De GIORGIO, Roberto. **Enteric neuroplasticity evoked by inflammation.** *Autonomic Neuroscience.* 30;126-127:264-72, 2006.

VENSTROM, Kristine A; REICHARDT, Louis F. **Extracellular matrix. 2: Role of extracellularmatrix molecules and their receptors in the nervous system.** *The FASEB Journal* 7: 996–1003, 1993.

VERTEL, Barbara M; GRIER, Bonnie L; LI, Heng; SCHWARTZ, Nancy B. **The chondrodystrophy, nanomelia: biosynthesis and processing of the defective aggrecan precursor.** *Biochemical Journal.* 301 (Pt 1): 211–216, 2004.

WANG, Qian; ROZELLE, Aandrew L; LEPUS, Christin M; SCANZELLO, Carla R; SONG, Jason J; LARSEN, D Meegan; CRISH, James F; BEBEK, Gurkan; RITTER, Susan Y; LINDSTROM, Tamsim M; HWANG, Inyong, WONG, Heidi H; PUNZI, Leonardo; ENCARNACION, Angelo; SHAMLOO, Mehrdad; GOODMAN, Stuart B; WYSS-CORAY, Tony; GOLDRING, Steven R; BANDA, Nirmal K; THURMAN, Joshua M; GOBEZIE, Reuben; CROW, Mary K; HOLERS, V Michael; LEE, David M; ROBINSON, William H. **Identification of a central role for complement in osteoarthritis.** *Nature Medicine.* 17: 1674–1679, 2011.

WILSON, David F; DE-JUN, Jiang; PIERCE, Angela M; WIEKIN, Ole W. **Oral cancer: role of basement membrane in invasion.** *Australian Dental Journal* 44(2):93-7, 1999.

WINSTON, John H; LI, Qingjie; SARNA, Sushil 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.* 15;305(4):G295-302, 2013.

YEE, Albert JM; AKENS, Margarate B; YANG, Bing L; FINKESLSTEIN, Joel; ZHENG, Peng-Sheng; DENG, Zhaogiong; BURTON, Yang. **The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis.** *Breast Cancer Research.* 9(4): article R42, 2007.

ZARATE, Natalia; FARMER, Adam D; GRAHAME, Rodney; MOHAMMED, Sahar D; Knowles C H; SCOTT, S Mark; AZIZ, Qasim. **Unexplained gastrointestinal symptoms and joint hypermobility: is connective tissue the missing link?** *Neurogastroenterology Motility.* 22:252-e78, 2010.

ZHEN, Gehau; CAO, Xu. **Targeting TGF β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis.** *Trends in Pharmacological Science.* 35:227–236, 2014.

ZIMMERMANN, Deter R, DOURS-ZIMMERMANN, Maria T. **Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge.** *Histochemistry Cell Biology.* 130:635–653, 2008.

This paper will be submitted as an ORIGINAL ARTICLE to the Anais of International Journal of Experimental Pathology.

COLITIS DOES NOT CHANGE THE ASSOCIATION BETWEEN AGGREGAN AND THE COLONIC INNERVATION OF MICE

COLITIS, AGGREGAN AND COLONIC INNERVATION.

Anelise Franciosi¹; Telma Saraiva dos Santos¹; Renata Streck Fernandes¹; Cristiano Correa Bacarin¹; Joana D'arc de Lima Mendes¹; Paulo Watanabe¹; Laurence Ashley Blackshaw³; Carlos Alberto Miqueloto^{2*}; Eduardo José de Almeida Araújo^{1*}

¹ Department of Histology, State University of Londrina, Brazil; ² Department of Biology, State University of Londrina, Brazil; ³Wingate Institute for Neurogastroenterology, Queen Mary University, United Kingdom.

*These authors are sharing the senior authorship.

Address for correspondence

Prof. Eduardo José de Almeida Araújo

Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina,

Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 Km 380,

CEP 86051-990 Londrina, PR, Brazil

e-mail: ejaaraujo@gmail.com

Abstract:

This study had two objectives: 1) to investigate the presence of aggrecan in the colonic innervation of healthy mice and, if positive, 2) to evaluate the possible alterations on the localization of ACAN in inflamed colon of mice. The first was reached using PCR real time and immunofluorescence assays in the colon and dorsal root ganglia of healthy mice. The second objective was achieved using immunofluorescence assays in Dextran Sodium Sulfate Sodium induced inflamed colon. Our results showed that aggrecan is associated with the colonic innervation and colitis reduced the quantity of aggrecan aggregates without changing the association with the myenteric plexus. We conclude that aggrecan is present in the intrinsic and extrinsic neurons that innervate the colon and colitis does not change this association.

Key words: aggrecan, extracellular matrix; inflammatory bowel diseases; ulcerative colitis; enteric nervous system.

1. INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic and relapsing inflammation that affects the gastrointestinal tract (GIT), including Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD)⁽¹⁾. IBD is considered a public health problem due to the increasing incidence in a productive age group (20 to 30 years) in both industrialized and developing countries, with significant personal and social impacts⁽¹⁾.

In UC, the inflammatory response releases cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α , which stimulate the recruitment of inflammatory leukocytes increasing tissue lesion and perpetuating chronic inflammation^(3,4). This aberrant and sustained immune response is thought to be the main cause of the tissue injury and, for this reason, has been the main field of researching for treatments, which have exhibited limited efficacy. On this way, the effort of investigations for colitis treatments have neglected the main component undergoing physical rupture of the colonic tissue: the extracellular matrix (ECM). In fact, tissue damage is a hallmark of IBD progression and severity. During this progression, fibrosis and fistulae can be formed and both phenomena correspond to modifications on ECM molecules producing. Furthermore, abdominal pain, diarrhea and constipation are common symptoms reported by IBD patients, these marks are related to innervation of the GIT and ECM can affect the function of enteric neurons⁽⁴⁾. Thus, the relation between IBD, ECM and innervation of the GIT need to be explored.

ECM in the central nervous system (CNS) serves as scaffold for cells and also as modulator during the development and cell survival in adults⁽⁵⁾. ECM is present everywhere CNS, but it becomes more compacted around the cell body and proximal neurites of some group of neurons. This compacted ECM is named perineuronal net (PNN)⁽⁶⁾. PNN is essential for the maintenance of the proper brain function, providing both structural support and modulating intercellular communication⁽⁷⁾. PNN is also necessary to conserve the integrity and limited plasticity of synapses, as well as to protect against oxidative stress^(8, 9, 10).

Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), like aggrecan (ACAN), are ECM molecules usually found in PNNs^(11, 12, 13). ACAN is expressed predominantly by neurons in later stages of development, mainly postnatally⁽¹⁴⁾. This CSPG has a pivotal role in organizing the neural extracellular space by binding hyaluronan to the cell surface through interactions with link proteins and tenascins^(15, 16, 17). ACAN is crucial for homeostasis of the nervous tissue since it contributes to the high-rate synaptic transmission and mechanical stabilization of the contact between group of neurons⁽¹⁸⁾. Its remodeling in neurological diseases has demonstrated that this CSPG impacts the function of the injured tissue and its repairing^(17, 19). During CNS damage, inflammation impairs CSPGs production⁽²⁰⁾, including a decrease in ACAN⁽²¹⁾. On this way, traumatic brain/spinal cord injury and multiple sclerosis can alter the ACAN expression, which can drive long-term detrimental consequences, not only due to its role as barrier molecule, but also due to its capacity to enhance inflammatory cascades⁽²⁰⁾.

In addition, there are a poor number of investigations regarding the composition and organizing of the ECM in the extrinsic (sympathic and parasympathic) and intrinsic (enteric nervous system) innervation of the colon^(22, 23, 4). Considering that ECM biology is such a large, integral and dynamic part of the tissue, it should not be neglected when approaching any disease, especially IBD. Thus, our study had two objectives: 1) to investigate the expression and localization of ACAN in the colonic innervation of healthy mice 2) to evaluate the possible alterations on the localization of ACAN in inflamed colon of colitis mice.

2. MATERIALS AND METHODS

Ethical approval. All experimental procedures of this study were aproved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the State University of Londrina, Brazil (protocol n. 032/2015), and were performed in accordance with the Brazilian guidelines of the care and use of laboratory animals. C57Bl/6 mice from the *Centro Multidisciplinar para InvestigaçãO Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório* (CEMIB, UNICAMP, Brazil), males, 9-12 weeks old, were kept in an animal house with light-dark cycle of 12 hours and controlled temperature of 23°C. Tap water and chow (Nuvilab CR1, Nutrient Nuvitl Ltda.®, Curitiba, Brazil) were

provided *ad libitum*. Animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/kg, Dopalen® 11.6%, Sespo Industry and Commerce Ltda, Paulinia, Brazil, IM) and xylasine hydrochloride (10 mg/kg, Anasedan® 2.3%, Sespo Industry and Commerce Ltda, Paulinia, Brazil) via intramuscular. Then, saline and 4% paraformaldehyde was perfused through the cardiac left ventricle. Mice died during this process when they were unconscious. All efforts were made to minimize suffering and number of animals used in this study.

Step 1A - Expression of aggrecan. The colon of 10 healthy mice was collected. The colonic wall was split into two parts: mucosa + submucosa and external muscle + serosa, which were kept in different tubes with Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). The RNA of each sample was extract using the PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, Carlsbad, CA, EUA). The GoScript RT System Kit (Promega, Fitchburg, WI, EUA) was used to convert the RNA in cDNA, using the primers: CAGCAGCACCATCACAGAGT (sense) and TTTCTGCTGTCTGGGTCTCC (antisense). Quantitative RT-PCR was performed to estimate the quantity of mRNA for ACAN using the method $\Delta\text{CT} - 2^{\Delta\text{CT}}$, considering the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as house keeper.

Step 1B - Localization of aggrecan in the colon innervation. OCT frozen sections of thoracolumbar (T13-L1) and lumbosacral (L6-S1) dorsal root ganglia (DRG) and whole colon of five healthy mice were used to identify whether aggrecan (ACAN) was associated with neuronal structures that innervate the colon. This identification was performed by the double-labelling immunofluorescence assay using a rabbit primary antibody against ACAN (Novus Biologicals, NB100-74350) together with goat antibodies against neuronal markers: calcitonin gene-related peptide - CGRP (ABCAM – ab36001, marker for sensitive neuron for pain), neuronal nitric oxide synthase - nNOS (Genetex – GTX89962, marker of inhibitory motor neuron), choline acetyltransferase - ChAT (Merk Millipore – AB144P, marker of excitatory motor neuron) and mouse antibody against Protein gene product 9.5 - PGP9.5 (ABCAM – ab8189, general marker for neurons). The secondary antibodies used were: 568 Donkey anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific/INVITROGEN - A10042), 488 Donkey anti-goat (Thermo Fisher Scientific/INVITROGEN– A11055) e 488 Donkey anti-mouse (Thermo Fisher Scientific/INVITROGEN – A21202). The presence of

ACAN in the extrinsic colonic innervation was evaluated in sections of DRG. Fifty neurons immunoreactive to ACAN and CGRP in DRG per mouse were measured. Then, this number of neurons were distributed into three classes: small ($1 - 909.2 \mu\text{m}^2$), medium ($909.32 - 1504.58 \mu\text{m}^2$) and large ($1504.58 - 2098.70 \mu\text{m}^2$) for thoracolumbar, and small ($1 - 1058.89 \mu\text{m}^2$), medium ($1058.89 - 1808.26 \mu\text{m}^2$) and large ($1808.26 - 2557.63 \mu\text{m}^2$) for lumbosacral. The presence of aggrecan in the intrinsic innervation of the colonic wall (enteric nervous system) was observed qualitatively in sections and quantitatively in whole mounts containing the myenteric plexus. The whole mounts were divided into 6 parts, and counted 100 neurons in parts 2 and 4. One-way ANOVA and the Tukey's Multiple Comparison Test were used to compare the number of small, medium and large DRG neurons. Besides, the number of myenteric neurons immunoreactive to ACAN was counted in 100 ganglia of each mouse ($n = 5$) and descriptive statistics was used to analyse these data.

Step 2 - Colitis and distribution of aggrecan-associated colonic neuronal structures. In order to evaluate whether inflammation (colitis) can alter the distribution of ACAN -associated colonic neuronal structures, a group of five mice has drunk 3% of dextran sulfate sodium (DSS - (molecular weight 36-45 kDa) diluted in tap water for 7 days (colitis group). Another group of five mice kept drinking tap water free of DSS for 7 days (control group). Scores for weight loss, stool consistency and blood presence in stool were used to calculate the Disease Activity Index (DAI) as suggested by Moynes et al. (2014)⁽²⁵⁾. Both group were euthanized as described above. The colon was removed and whole-mounts containing the longitudinal muscle layer and the myenteric plexus were submitted to the double-labelling immunofluorescence assay using a rabbit primary antibody against ACAN (Novus Biologicals, NB100-74350) together with antibodies against neuronal markers: β -tubulin III (AVES LABS - TUJ raised in chicken) as general neuronal marker, nNOS (Genetex – GTX89962 raised in goat) for nitrergic neurons and ChAT (Merk Millipore – AB144P raised in goat) for cholinergic neurons. The number of neurons present in 100 myenteric ganglia was counted per mouse from each group. Chi-squared test was used to compare the groups. Besides, ACAN aggregates were counted in $20.77389 \mu\text{m}^2$ of the colonic muscle of each mouse. One-way ANOVA test followed by Tukey test were used to compare the groups.

3. RESULTS

Aggrecan is expressed in the colon and is associated with its innervation

The Fig. 1A shows the RT-PCR results of this study. It was observed that ACAN was expressed in the colon of healthy mice. There were 11.92% more mRNA for ACAN in the mucosa + submucosa than the external muscle + serosa ($p < 0.05$). The presence of ACAN core protein was confirmed by the immunofluorescence. ACAN was strongly present underneath epithelium cells in the mucosa. Myenteric neuronal cell bodies immunoreactive to PGP9.5 were also positive for ACAN (Fig. 1B', B'' and B'''), but it was absent in neuronal prolongaments immunoreactive to β -tubulin. Part of the ACAN-positive cell bodies were nitrergic neurons (Fig. 1B'') and part were cholinergic (Fig. 1B'''). It was rare to observe aggrecan in submucosal neurons (data no shown). ACAN was also observed in association with extrinsic neuronal structures. We found that most of cell bodies in both thoracolumbar (Fig. 2A and A') and lumbosacral (Fig. 2B and B') DRG were positive for ACAN. In addition, part of neurons was immunoreactive to CGRP (46.25 %). Small neurons positive for ACAN and CGRP were more prevalent, followed by the medium-sized and ultimately larger neurons. This distribution was similar between the levels of DRGs.

Colitis reduced the quantity of aggrecan aggregates without changing the association with the colonic myenteric plexus

Experimental colitis was induced by the exposition to DSS, which was confirmed by the Disease Activity Index (DAI) as shown on the Fig. 3A. In whole mount preparations containing the longitudinal muscle layer and the myenteric plexus, the immunofluorescence assay revealed the presence of ACAN in two forms: aggregates in the EMC and associated with cells. ACAN aggregates were concentrated mainly in myenteric ganglionic regions (Fig. 3B). Few ACAN aggregates were observed far from the ganglia (Fig. 3B). The analysis of colocalization between ACAN and neuronal varicosities (β -tubulin III and VChAT) confirmed that ACAN aggregates were not varicosities, i.e., they did not make part of neuronal structures (Fig. 3C). Furthermore, ACAN was clearly observed associated with all myenteric cell bodies (Fig. 3D, E and F). Parts of these neurons (30.23%) was nitrergic (Fig. 3E) and another part (34.96%) was cholinergic (Fig. 3F). Colitis reduced intensely the amount of ACAN

aggregates in whole-mount preparations (Fig. 3B''). However, all myenteric neurons remained positive for ACAN (Fig. 3D'', E'' and F'') and the proportion of nitrenergic (Fig. 3E'') or cholinergic (Fig. 3F'') myenteric neurons positive for ACAN did not change because the inflammation.

4. DISCUSSION

In this report, we showed that ACAN was present in the colon of healthy mice. First, we analysed the quantity of mRNA for ACAN by layers and we found more mRNA in the mucosa + submucosa than in the external muscle + serosa. The immunofluorescence assays confirmed the presence of ACAN in most of colonic wall layers. In the mucosa, ACAN was associated mainly with epithelium cells. ACAN has been described as a structural proteoglycan important in mediating cell-cell and cell-matrix interactions in the connective tissue^(25, 26). Interestingly, we observed ACAN between epithelium cells, which there is no previous description on the literature. Further studies should confirm whether ACAN is involved in cell-cell adhesion or other functions in the intestinal lining epithelium. On this way, it is possible that ACAN may be involved in the control of cellular proliferation, since Yui et al. (2018)⁽²⁷⁾ demonstrated that ECM is specially involved in intestinal epithelial repairing after disruption. In fact, many elements influence the number of colonic epithelial cells such as products secreted by the enteric nervous system. For example, glial-derived neurotrophic factor (GDNF) secreted by glial cells is able to control apoptosis of colonic epithelial cells⁽²⁸⁾ and the ECM is able to confine GDNF^(28, 29). In addition, colorectal cancer cells can use the ECM around enteric neuron to migrate to other regions⁽³⁰⁾. However, there is no evidence that ACAN is involved in the interaction between epithelial cells and enteric neurons, since we did not find ACAN in neuronal extensions in the colonic wall. Actually, we did not find ACAN in extension of extrinsic or intrinsic enteric neurons at all. Immunofluorescence assays revealed ACAN only in cell bodies forming an envelop surrounding this neuronal part.

ACAN is a unique hyalectins and is one of the main components of the perineuronal net (PNN) in the central nervous system⁽¹⁴⁾. That is crucial for the survival and development of neurons. One study has shown that the impairment of the PNN causes lack of neuroprotective effects, which may be involved in the

pathology of the neurodegenerative disorders⁽²⁰⁾. Partial or total lack of PNN leads to reduction of synaptic activity and plasticity^(8, 10), neuronal plasticity, as well as loss of protection against oxidative stress⁽⁹⁾ and other promotes of neurodegenerative diseases⁽¹⁹⁾. Despite the importance of PNN, it is unknown if there is a similar structure around enteric neurons.

Considering the colonic intrinsic innervation, we found strong ACAN staining in all enteric cell bodies, indicating that this ECM molecule is essential for the composition of the extracellular matrix inside enteric ganglia. Filpa et al. (2017)⁽²²⁾ observed the presence of hyaluronan inside and coating myenteric ganglia of Sprague-Dawley rats. Besides, they also demonstrated that one of its producing enzymes (hyaluronan synthase 2 – HAS2) is not expressed by every myenteric neuron. Their and our results together provide evidences of a perineuronal sheath enveloping myenteric neurons as the first demonstrations of the similitude between the PNN of the CNS and ENS, at least in rodents. We suggest that ACAN is necessary, at least, to attach the neuronal cell body to the structures surrounding these cells. The neighbourhood of enteric neuronal cell body consists of enteric glial cells and part of other neurons⁽³¹⁾. Thus, it is possible to consider that ACAN is absolutely necessary to keep the spatial organization inside the enteric ganglia. In addition, considering the role of ACAN in synapses of the CNS⁽⁵⁾, this proteoglycan probably is also necessary to stabilize synapses with the enteric neuronal cell body. It is poorly understood the composition and role of the ECM inside the myenteric ganglia in adults.

The few existing investigations have demonstrated the importance of the ECM during the development of the ENS⁽³²⁾. These studies allowed us to realize that failure in EMC molecules can explain some aganglionosis that can happen in the distal gut of newborns, such as what observed in patients with Hirschsprung's disease⁽³³⁾. In addition, Raghavan and Bitar (2014)⁽³⁴⁾ have demonstrated that the differentiation of neuronal progenitor cells from rabbit jejunum into specific neuronal subtypes (nitroergic and cholinergic) is influenced by the ECM microenvironment, specially collagen fibres types I and IV. Our study revealed that about 30% of the ACAN⁺ myenteric cell bodies were nitroergic and other 30% were cholinergic, but the literature is empty regarding the association between ACAN and enteric neurons.

Nitroergic and cholinergic neurons consist the main neuronal subtypes in the myenteric plexus. Most of these neurons are motoneurons, i.e., they are responsible to induce relaxation or contraction of the external muscle layer⁽³⁵⁾. We found that all nitroergic and cholinergic myenteric neurons were positive for ACAN, which means that this ECM molecule is indispensable for survival of these cells.

Considering the colonic afferent innervation, some DRG neurons was immune-reactive to ACAN and CGRP. CGRP is a neuropeptide associated with stimuli for pain from the colon⁽³⁶⁾. As ECM is necessary for synaptic plasticity and stabilization^(37, 38), these ACAN⁺/CGRP⁺ neurons probably needed ACAN to keep in touch with other neurons inside the DRG. Thus, it seems that part of the CGRP⁺ neurons which innervate the colon is dependent of ACAN to perform their physiological function. Physiological tests using knockout mice for ACAN should be performed in order to investigate how ACAN could influence the function of the extrinsic and intrinsic innervation of the colon.

In this study, we also demonstrated that colitis reduced the quantity of ACAN aggregates without compromising its association with myenteric neurons. ACAN binds to hyaluronan with support of link protein and tenascins forming large aggregated complexes at the cell surface⁽⁴⁰⁾. ACAN is described as one of the constituents of PNN in the CNS⁽⁴²⁾. Suttkus et al (2004)⁽⁴³⁾ provided evidences that ACAN has neuroprotective properties when central neurons are submitted to oxidative stress, i.e., ACAN is necessary to protect neurons from the death. It probably can explain why all nitroergic and cholinergic myenteric neurons kept surrounded with a ACAN in inflamed colon as observed in this study. On this way, when hyaluronan and HAS2 were evaluated in inflamed colon of rats, Filpa et al. (2017)⁽²³⁾ observed increasing in the expression of HAS2 and in the quantity of hyaluronan. Besides, they also found loss of the structured organization of the ECM inside the myenteric ganglia. It suggests that the presence of some ECM molecule surrounding the myenteric cell bodies is mandatory to keep their neuroprotective role as demonstrated in both humans and experimental animal models⁽⁴⁴⁾. Thus, all these data provide evidences that the tenacity or alteration of some perineuronal molecules might be involved in mechanisms of myenteric neuronal survival during the inflammatory challenge.

In conclusion, in this study we demonstrated that ACAN is an essential proteoglycan, which surrounds cell bodies of intrinsic and extrinsic neurons that innervate the colon. In addition, we found that DSS-induced colitis does not change the perineuronal coating performed by ACAN in myenteric neurons.

5. Acknowledgment

This paper is part of the master dissertation of the first author. The authors thank to the grant (CAPES/PVE process number: 88881.068190/2014-01) and to the master scholarship of Anelise Franciosi the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil).

6. References

1. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine* 2009; 361: 2066-2078.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142 46–54.
3. Witaicenis A, Luchini AC, Hiruma-lima CA, Felisbino SL, Justulin JR LA, Garrido-mesa N, Utrilla P, Gálvez J, Di Stasi LC. Mechanism and effect of escu in an experimental animal model of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Inflamm.* 2013; 11 433–446.
4. Aktar R, Peiris M, Fikree A, Cibert-Goton V, Walmsley M, Tough IR, Watanabe P, Araujo EJA, Mohammed SD, Delalande JM, Bulmer DC, Scott SM, Cox HM, Voermans NC, Aziz Q, Blackshaw LA. The extracellular matrix glycoprotein

- Tenascin-X regulates peripheral sensory and motor neurones. *Am J Physiol.* 2018.
5. DYCK MS, KARIMI-ABDOLREZAEI S. 2015. Chondroitin sulfate proteoglycans: Key modulators in the developing and 3 pathologic central nervous system. *Exp Neurol* 1996; 19p; 4C.
 6. Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. Perineuronal Net Formation And Structure In Aggrecan Knockout Mice. *Neuroscience* 2010; 1314–1327.
 7. Frischknecht R, Seidenbecher C. Brevican: A key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 1051–1054.
 8. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, MAffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 2002; 298(5596), 1248-1251.
 9. Morawski M, Brückner MK, Riederer P, Brückner G, Arendt T. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol* 2004; 188(2), 309-315.
 10. Gogolla N, Caroni P, Lüthi A, Herry C. Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. *Science* 2009; 325(5945), 1258-1261.
 11. Kwok JCF, Dick G, Wang D, et al. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* 2011; 71: 1073-1089.
 12. Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: A different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 17789–17800.

13. Miao Q, YE Q, Zhang X. Perineuronal net, CSPG receptor and their regulation of neural plasticity. *Acta Physiol Sinica* 2014; 66(4): 387–397.
14. Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci* 2002; 22(17): 7536–7547.
15. Matsui F, Nishizuka M, Yasuda Y, Aono S, Watanabe E, Oohira A. Occurrence of a N-terminal proteolytic fragment of neurocan, not a C-terminal half, in a perineuronal net in the adult rat cerebrum. *Brain Res* 1998; 790(1–2): 45–51.
16. Hagihara K, Miura R, Kosaki R, Berglund E, Ranscht B, Yamaguchi Y. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 1999; 410(2): 256–264.
17. Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, et al. The composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* 2006; 494:559-577.
18. Morawski M, Bruckner G, Jager C, et al. Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's Disease. *Neuroscience* 2010; 169: 1347-1363.
19. Galtrey CM, Kwok JC, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2008; 27(6) 1373-1390.
20. Stephenson Erin L; Yong Wee V. Pro-inflammatory roles of chondroitin sulfate proteoglycans in disorders of the central nervous system. *Matrix biology*. 2018.

21. Burnside ER, Bradbury EJ. Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40(1) 26-59.
22. Lin T, Zhang W, Fan Y, Mulholland M. Interleukin-1 β and Interleukin-6 Stimulate Matrix Metalloproteinase-9 Secretion in Cultured Myenteric Glia. *J Surg Res* 2007; 137, 38–45.
23. Filpa V, Bistoletti M, Caon I, Moro E, Grimaldi A, Moretto P, Baj A, Giron MC, Karousou E, Viola M, Crema F, Frigo G, Passi A, Giaroni C, Vigetti D. Changes in hyaluronan deposition in the rat myenteric plexus after experimentally-induced colitis. *Nature* 2017; 7: 17644.
24. Moynes DM, Lucas GH, Beyak MJ, Lomax AE. Effects of inflammation on the innervation of the colon. *Toxicologic Pathology*. 2014; 42(1):111-7, 2014.
25. Aspberg A. The different roles of aggrecan interaction domains. *Jornal of Histochemistry Cytochemistry*. 2012; 60(12):987–96.
26. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica and Biophysica Acta*. 2012. 1824:133–145.
27. Yui S, Azzolin L, Maimets M, Pedersen MT, Fordham RP, Hansen SL, Larsen HL, Guiu J, Alves MRP, Rundsten CF, Johansen JV, Li Y, Madsen CD, Nakamura T, Watanabe MA, Nielsen OH, Schweiger PJ, Piccolo S, Jensen KB. YAP/TAZ-Dependent Reprogramming of Colonic Epithelium Links ECM Remodeling to Tissue Regeneration. *Stem Cell* 2018; 22, 1–15.
28. Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, Von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig I, Adler G, Reinshagen M. Glial-Derived Neurotrophic Factor Regulates Apoptosis in Colonic Epithelial Cells. *GASTROENTEROLOGY* 2003; 124:1748–1757.

29. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted. *Physiol Rev.* 2007 January ; 87(1): 69–98.
30. Xiong Y, Liu L, Zhu S, Zhang B, Qin Y, Yao R, Zhou H, Gao DS. Precursor N-cadherin mediates glial cell line-derived neurotrophic factor-promoted human malignant glioma. *Oncotarget* 2017; Vol. 8, (No. 15), pp: 24902-24914.
31. Duchalais E, Guilluy C, Nedellec S, Touvron M, Bessard A, Touchefeu Y, Bossard C, Boudin H, Louarn G, Neunlist M, Van Landeghem L. Colorectal Cancer Cells Adhere to and Migrate Along the Neurons of the Enteric Nervous System. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018; Vol. 5, No. 1.
32. FURNESS John B. The Enteric Nervous System and Neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2012; 9, 286–294.
33. Simon-assmann P, Kedinger M, DE Arcangelis A, Rousseau V, Simo P. Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia.* 1995; 29; 51(9-10):883-900.
34. Kessmann J. Hirschsprung's Disease: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2006; Vol. 74, No. 8.
35. Raghavan S, Bitar KN. The influence of extracellular matrix composition on the differentiation of neuronal subtypes in tissue engineered innervated intestinal smooth muscle sheets. *Biomaterials* 2014; 35(26): 7429–7440.
36. Kunze WAA, Furness, JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 1999; 61:117–42.
37. Robinson DR, Mcnaughton PA, Evans ML, Hicks GA. Characterization of the primary spinal afferent innervation of the mouse colon using retrograde labelling. *J Neurogastroenterol Motil* 2004; 16(1):113-24.

38. Zimmermann Dr, Dours-Zimmermann Mt. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 2008; 130:635–653.
39. Syková E, Nicholson C. Diffusion in Brain Extracellular Space. *Physiol Ver* 2008; 88(4): 1277–1340.
40. Heinegard Dick. Proteoglycans and more—from molecules to biology. *International Journal of Experimental Pathology*.2009; 90: 575–586.
41. Aspberg Anders. The different roles of aggrecan interaction domains. *Jornal of Histochemistry Cytochemistry*. 2012; 60(12):987–96.
42. Day JM, Olin AI, Murdoch AID, Canfield A, Sasaki T, Timpl R, Hardingham TE, ASPBERG A. Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 12511–12518.
43. Watanabe H, Kimata K, Line S, Strong D, Gao LY, Kozak CA, Yamada Y. Mouse cartilage matrix deficiency (*cmd*) caused by 7 bp deletion in the aggrecan gene. *Nature* 1994, v7.
44. Suttikus A, Rohn S, Weigel S, Glo"ckner P, Arendt T, Morawski M. 2014. Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis* 2004; 5, e1119.
45. Suttikus A, Morawski M, Arendt T. Protective Properties of Neural Extracellular Matrix. *Mol Neurobiol*. 2016; 53(1):73-82.

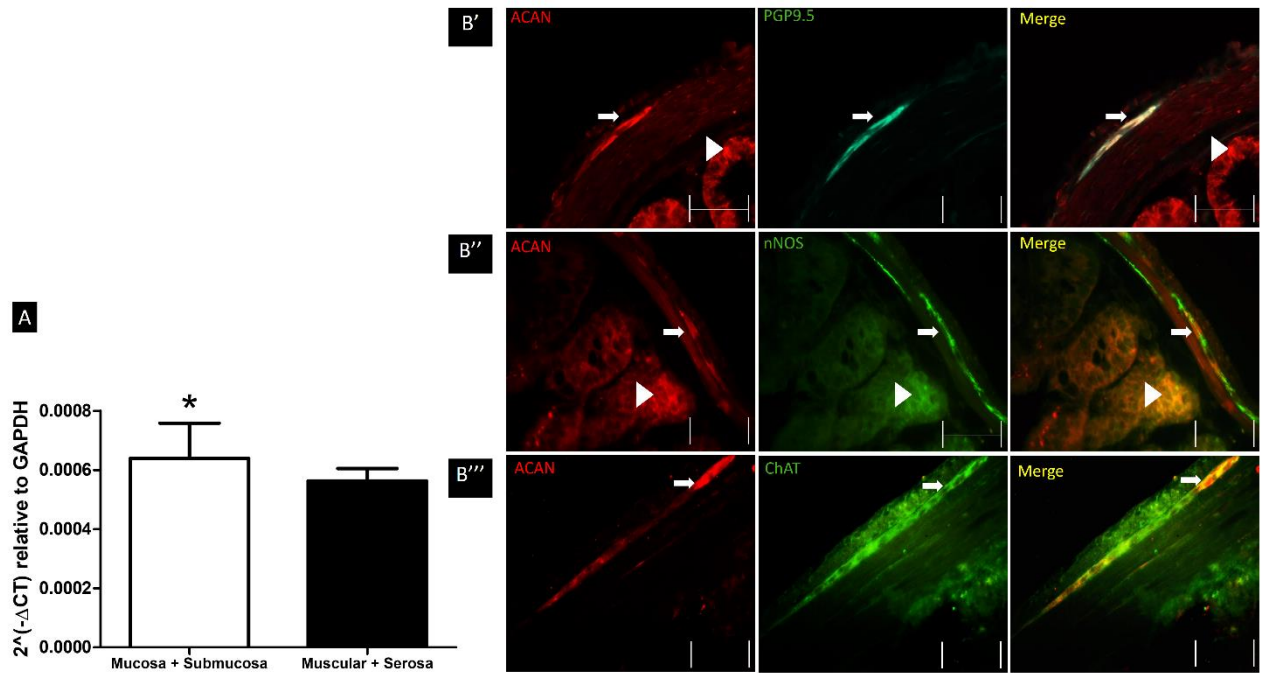


Figure 1. Expression and immunofluorescence of aggrecan (ACAN) in the colon of healthy mice. A- The mRNA for ACAN is expressed in mucosa + submucosa and muscle + serosa of large intestine of healthy mice. Values were normalized in relation to constitutive gene: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). B- Photomicrography of colon of healthy mice. Immunoreactivity for ACAN (red) and Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5) or Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) or Choline Acetyltransferase (ChAT) (green). Myenteric neurons (arrow) with immunoreactivity to ACAN, PGP9.5 (B'), nNOS (B'') and ChAT (B'''). ACAN in the epithelium is indicated by arrowheads. Scale bar: 40 μ m. (*=11.92%)

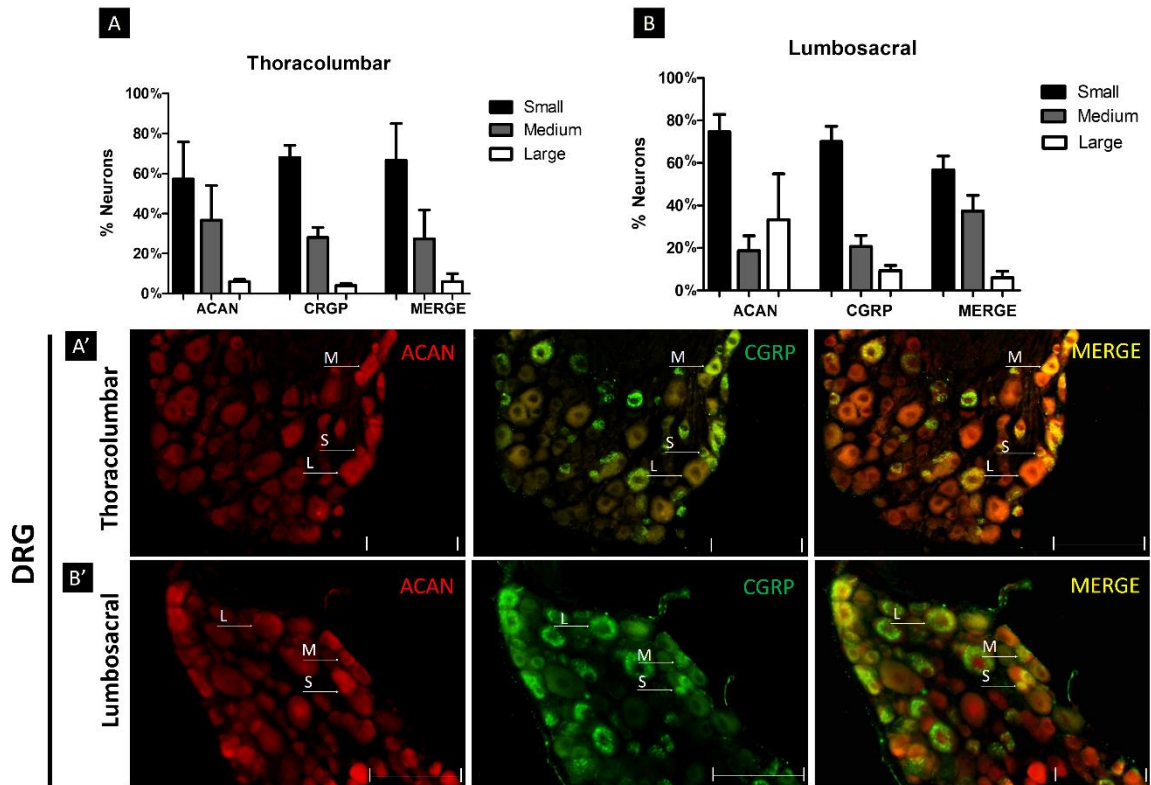


Figure 2. Dorsal Root Ganglia (DRG) of healthy mice. Relative number (%) of positive neurons to aggrecan (ACAN), calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the thoracolumbar (A) and lumbosacral (B) DRGs of healthy mice. Photomicrography of thoracolumbar (A') and lumbosacral (B') DRG illustrating the labeling of ACAN (red) and CGRP (green). Small neurons are indicated by letter "S", medium neurons by the letter "M" and large neurons by the letter "L". Scale bar: 40 μ m. One-way ANOVA and the Tukey's Multiple Comparison Test.

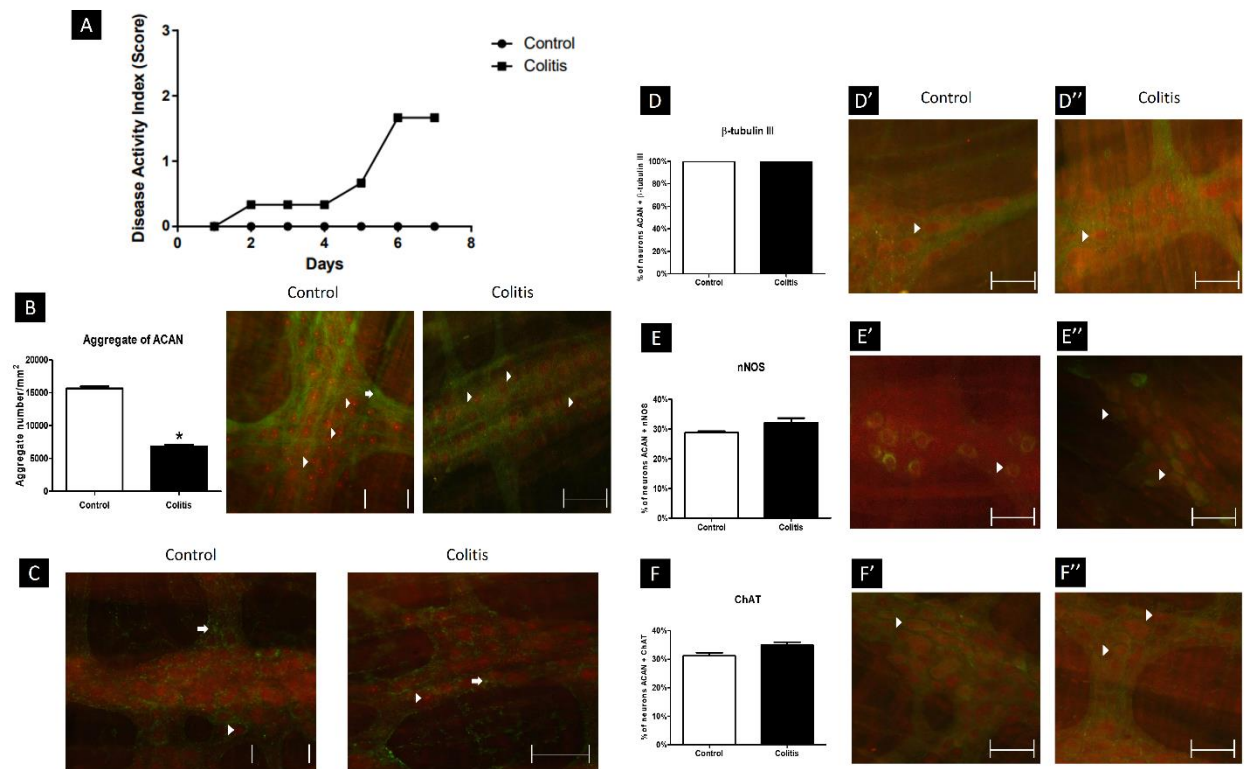


Figure 3. Colonic parameters of healthy and colitis mice. A – Disease Activity Index of dextran sulfate sodium-induced colitis. B – number of aggregates of aggrecan (ACAN) in whole mount of colonic external muscle in healthy and colitis mice (arrowhead). Note the absence of ACAN in neuronal extensions (arrow). C- Cholinergic varicosities (ChAT) and aggregates ACAN in whole mounts of colonic external of healthy (control) and colitis mice. Note the absence of colocalization between ACAN and cholinergic varicosities (arrow). Count of immunoreactive neurons to ACAN and β -tubulin III (D), neuronal Nitric Oxide Synthase - nNOS (E) and Choline Acetyltransferase (F) in whole mount of colonic external muscle of healthy (control) and colitis mice. Photomicrographs illustrating colocalization (arrowhead) between ACAN and β -tubulin III (D' and D''), nNOS (E' and E'') and ChAT (F' and F''). Scale bar: 20 μ m. (*=34,14%) Chi-squared test and One-way ANOVA test followed by Tukey test.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Utilizando como base as informações disponíveis na literatura científica, sabemos que a ACAN é uma proteoglicana essencial para a MEC, principalmente no tecido cartilaginoso, onde promove a sustentação de células cartilaginosas. ACAN também se encontra na rede perineuronal, e se destaca nesse local devido à sua participação na formação da memória, ou ainda pela neuroproteção que ela confere a neurônios em processos patológicos no SNC, como por exemplo na doença de Alzheimer. A ausência dessa proteoglicana na MEC leva a deficiências musculares congênitas, e sua ausência na RPN pode levar a progressão do Alzheimer ou da esquizofrenia.

Por intermédio do presente estudo demonstramos que ACAN está na MEC ao redor de todos os neurônios mioentéricos, incluindo suas duas principais subpopulações: nitrérgicos e colinérgicos. Prolongamentos de neurônios foram observados com marcação da proteína beta-tubulina III, porém essas estruturas celulares não demonstraram associadas à ACAN.

Observamos também a quebra de agregados de ACAN na Retocolite Ulcerativa (RCU), corroborando com resultados descritos na literatura. Porém a associação da ACAN com corpos celulares de neurônios entéricos não é afetada. Isso demonstrou que a ACAN pode ser imprescindível a sobrevivência de neurônios entérico e também pode ser campo para investigação de tratamentos de pacientes com essa doença inflamatória intestinal.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) ofício circular 032/2015, processo nº 1454.2015.56.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 032/2015

Londrina, 01 de Abril de 2015

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 10 de Março de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**O papel da rede perineural sobre o sistema nervoso motor e sensorial de humanos e camundongos**” registrado sob processo CEUA nº1454.2015.56, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 450 camundongos sendo 150 camundongos C57BL/6, machos/fêmeas, com 50 dias de idade, com peso entre 20-25g e provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e 300 camundongos *Knockout* de linhagem a definir segundo experimentos inclusos neste projeto, com 50 dias de idade, peso de 20 a 25g e adquiridos comercialmente. As matrizes dos camundongos *Knockout* serão importadas do Reino Unido e o coordenador do projeto é responsável pela documentação necessária. O projeto tem como objetivo avaliar o papel da rede perineuronal (RPN) para o funcionamento de neurônios sensoriais e motores utilizando o sistema nervoso entérico com modelo. Para tanto, os animais serão anestesiados e submetidos à inalação, em câmara, de vapor de halotano (1%), oxigênio (14%) e nitrogênio (86%) para a coleta do material biológico visando análise por PCR e haverá aprofundamento anestésico (halotano 5%) até observação de parada cardiorrespiratória. Após a comprovação da ausência de reflexos, será feita perfusão cardíaca com solução salina a 32°C até completa remoção do sangue presente no interior dos vasos, a perfusão de paraformaldeído tamponado a 4% (70mL/animal) e os animais serão submetidos a procedimentos para a remoção dos órgãos que posteriormente serão avaliados. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 36 meses.

Cumpre orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo

Coordenador do Projeto

Departamento de Histologia

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Chefe do Departamento de Histologia e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

08 ABR 2015

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL