



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA STRECK FERNANDES

**EFEITOS DA VIMPOCETINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO
ENTÉRICO DE CAMUNDONGOS COM COLITE INDUZIDA
POR ÁCIDO ACÉTICO**

Londrina
2017

RENATA STRECK FERNANDES

**EFEITOS DA VIMPOCETINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO
ENTÉRICO DE CAMUNDONGOS COM COLITE INDUZIDA
POR ÁCIDO ACÉTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida
Araújo

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Fernandes, Renata Streck.

EFEITOS DA VIMPOCETINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE CAMUNDONGOS COM COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO / Renata Streck Fernandes. - Londrina, 2017.
102 f. : il.

Orientador: Eduardo José de Almeida Araújo.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Sistema nervoso entérico - Tese. 2. Colite experimental - Tese. 3. Vimpocetina - Tese. I. de Almeida Araújo, Eduardo José . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

RENATA STRECK FERNANDES

**EFEITOS DA VIMPOCETINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO
ENTÉRICO DE CAMUNDONGOS COM COLITE INDUZIDA
POR ÁCIDO ACÉTICO**

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

Profa. Dra. Debora de Mello Gonçalves
Sant'Ana
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si

(Aos meus pais Hugo e Deliani que me apoiaram desde o primeiro momento, disfarçando diariamente a dolorida sensação da saudade e provendo todo apoio emocional e financeiro necessário para essa etapa)

É sobre saber que em algum lugar, alguém zela por ti

(Às minhas irmãs Patrícia, Fernanda e Juliana - e aos meus cunhados -, que compreenderam que a ausência, por mais difícil que fosse, era necessária. E que, de diferentes maneiras, sempre me fizeram acreditar que estava no caminho certo)

É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz

(À Deus, aos guias e a minha fé, que foram minha âncora nesse mar da vida)

É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós

(Aos amigos que nunca mediram esforços para mostrar que eu não estava sozinha em Londrina, entenderam minhas angústias, sofreram comigo e me fizeram rir em tantos momentos: Paola, Júnior, Nádia, Silvia, Heloisa, Luana, Vanessa, Larissa, Fernanda Paschoal, Anelise, Camila, Joana, Andreia, Renata, Paulo Botura, Mariana, Paulo, Willian, Glauca, Cristiane, Josiane, Paula, Kátia)

É saber se sentir infinito

Num universo tão vasto e bonito, é saber sonhar

(Aos meus afilhados pelo amor puro e sincero demonstrado a cada chegada no Rio Grande do Sul, os quais me fazem viver a melhor versão de mim:
Júlia, Helena, Sofia e Marco André)

Então fazer valer a pena

Cada verso daquele poema sobre acreditar

(Às pessoas que sempre acreditaram no meu potencial e incentivaram cada novo passo, acompanhando diariamente o meu crescimento pessoal e profissional durante 4 anos. Que foram essenciais, mesmo distantes fisicamente, em um dos períodos mais difíceis dessa caminhada: Jerusa Barrios e Juliane Golfetto)

Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu

É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu

(Ao meu orientador prof. ° Eduardo Araújo que nunca deixou que a minha insegurança fosse motivo para desistir; que me mostrou que “crescer” dói, mas é necessário; que teve muita paciência diante de todos os altos e baixos característicos de uma libriana e sempre esteve disponível para me ouvir)

É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações

E assim ter amigos contigo em todas as situações

(Às minhas amigas/irmãs que sempre estiveram de braços abertos fazendo parecer que não estivemos separadas nem por um dia e, que aguardavam ansiosamente pela próxima visita: Sha, Mari, Lu, Cati, Fe, Fran, Ju, Ale, Debora e Sirlei)

A gente não pode ter tudo

Qual seria a graça do mundo se fosse assim?

Por isso eu prefiro sorrisos

E os presentes que a vida trouxe para perto de mim

(Àquela amizade de 20 anos que, independentemente de qualquer situação, eu sempre pude contar! Que sempre tinha uma palavra de carinho para acalmar minhas angústias, medos e a saudade de casa: Fernanda Cervo).

Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar

E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar

Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais

Porque quando menos se espera, a vida já ficou pra trás

(À minha dinda do coração que sempre esteve disponível para ajudar no que fosse necessário para que essa etapa fosse concluída e não mediu esforços para que eu me sentisse acolhida ao chegar em Santa Maria: Dinda Celi)

Segura teu filho no colo

Sorria e abraça os teus pais enquanto estão aqui

Que a vida é trem bala, parceiro

E a gente é só passageiro prestes a partir”

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.” (Paulo Beleki)

FERNANDES, Renata Streck. **Efeitos da vimpocetina sobre o sistema nervoso entérico de camundongos com colite induzida por ácido acético**. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A colite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) compreendem um grupo de doenças inflamatórias intestinais (DII) crônicas com etiologia multifatorial. Atualmente, as DII são consideradas um problema de saúde pública devido a incidência crescente em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, principalmente em idade produtiva (20-40 anos). Apesar do mecanismo multifatorial descrito, a plasticidade neuronal também parece estar implicada na patogênese das DII, ocasionando disfunções na motilidade e implicações imunológicas. As terapias utilizadas atualmente visam o controle da inflamação a fim de prevenir o comprometimento intestinal e reduzir os sintomas debilitantes das DII. Entretanto, não são capazes de reverter os danos resultantes da cronicidade da doença, além de apresentarem diversos efeitos colaterais a longo prazo. Nesse cenário, as DII representam uma área de grande interesse para a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Diante do quadro inflamatório observado em modelos experimentais de colite, a supressão das células do sistema imunológico e dos mediadores pró-inflamatórios parece desempenhar um papel chave no tratamento da doença. Nesse contexto, a vimpocetina torna-se um alvo promissor. A vimpocetina é um fármaco nootrópico que, recentemente, foi demonstrado como um potente anti-inflamatório devido ao seu mecanismo bloqueador da via do fator de transcrição NFκB. Diante do exposto, objetivou-se avaliar se a administração de vimpocetina (30 mg/kg, via oral) é capaz de exercer efeitos protetores sobre a estrutura do plexo mioentérico do cólon de camundongos com colite induzida por ácido acético. Para tal, camundongos Swiss receberam, via intrarretal, 200 µL de ácido acético 7,5% (pH 2,5). Os camundongos foram tratados, via oral, com vimpocetina (30 mg/kg, 150 µL) ou veículo (80% salina + 20% tween 20) 2 horas antes e 4, 10 e 16 horas depois da indução da colite. Todos os camundongos foram submetidos à eutanásia 18 horas após a indução da colite por ácido acético, realizada a laparotomia e coleta do cólon distal. As amostras foram processadas para coloração histológica com hematoxilina e eosina e para as técnicas de imunofluorescência em cortes congelados e preparados totais contendo o plexo mioentérico. A população geral de neurônios entéricos foi evidenciada através da marcação da enzima ubiquitina-hidrolase, presente no citoplasma dos neurônios, com anti-PGP9.5. Para marcação das subpopulações foram utilizados anticorpos contra as enzimas óxido nítrico sintase (nNOS), acetil colintransferase (ChAT) e anti peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e substância P (SP). Dados histológicos demonstraram a indução da colite através dos danos a integridade da mucosa, inchaço da submucosa e infiltração de células imunológicas na parede do cólon. Os resultados de imunofluorescência mostraram a integridade do plexo mioentérico no cólon inflamado, com hipertrofia do corpo celular da população total de neurônios e atrofia da subpopulação nitrérgica (nNOS+), além do aumento das fibras VIP+ e SP+, principalmente na camada muscular. O tratamento com a vimpocetina exerceu efeito protetor parcial em relação às alterações histopatológicas e morfométricas, mas não foi capaz de controlar as alterações quanto ao aumento de fibras SP+ e VIP+ nos camundongos com colite. Conclui-se que a dose de 30 mg/kg de vimpocetina

desempenha baixo efeito protetor no sistema nervoso entérico de camundongos com colite experimental induzida por ácido acético.

Palavras-chave: Colite. Sistema Nervoso Entérico. Anti-inflamatório.

FERNANDES, Renata Streck. **Effects of vinpocetine on the enteric nervous system of mice with acid acetic-induced colitis**. 2017. 102 p. Dissertation (Masters in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (RCU) and Crohn's disease (CD) comprise a group of chronic intestinal inflammatory diseases (IBD) with multifactorial aetiology. Currently, IBD is considered a public health problem due to increasing incidence in both sexes and in all age groups, especially in productive age (20-30 years old). Despite the multifactor mechanism already described, neuronal plastic also appear to be implicated in the pathogenesis of IBD, causing motility dysfunctions and immunological implications. Current therapies are aimed at controlling inflammation to prevent intestinal involvement and reduce the debilitating symptoms of IBD. However, they are not capable of reversing chronic damage, besides having several long-term side effects. Thus, IBD represents an area of great interest for researching and development of drugs. Considering the inflammatory response observed in experimental models of colitis, the suppression of immune cells and proinflammatory mediators seems to play a key role in the treatment of the disease. In this sense, vinpocetine becomes a promising treatment. Vimpocetin is a nootropic drug that has recently been shown to be a potent anti-inflammatory due its blocking mechanism of the NFκB transcription factor pathway. Thus, the goal of this dissertation was to evaluate whether the administration of vinpocetine (30 mg / kg, orally) is capable of exerting protective effects on the colonic myenteric plexus structure of mice with acetic acid-induced colitis. Male and female Swiss mice received 200 μL of 7.5% acetic acid (pH 2.5) via rectum. Mice were treated orally with vinpocetine (30 mg / kg, 150 μl) or vehicle (80% saline + 20% tween 20) 2 hours before and 4, 10 and 16 hours by gavage after colitis induction with acetic acid. All mice were submitted to euthanasia 18 hours after colitis induction in order to collect the distal colon. Samples were processed for the immunofluorescence technique in frozen sections and whole mounts containing the myenteric plexus. General enteric neurons was evidenced by the labelling of the enzyme ubiquitin-hidrolase, present in cytoplasm of the neurorons, with anti-PGP9.5. For the labelling of subpopulations using antibodies against the enzymes nitric oxide synthase (nNOS), acetyl cholinatransferase (ChAT) and vasoactive intestinal peptide (VIP) and substance P (SP) were used. Histological data demonstrated the induction of colitis had successful since it was observed damage to mucosal integrity, submucosal edema, and infiltration of immune cells into the colon wall. The immunofluorescence showed the integrity of the myenteric plexus in the inflamed colon. Colitis caused hypertrophy of general myenteric neurons and atrophy of nitrergic subpopulation, as well as increased the number of VIP+ and SP+ fibres mainly in the external muscle layer. Treatment with vimpocetine exerted a partial protective effect in relation to histopathological and morphometric changes, but it was not able to control the changes in the increase of SP+ and VIP+ fibers in the mice with colitis. It is concluded that 30 mg/Kg vinpocetine plays a low protective effect on the enteric nervous system of mice with acetic acid-induced colitis.

Key words: Colitis. Enteric nervous system. Anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Inervação simpática (azul) e parassimpática (rosa) do trato gastrointestinal através das vias vagais e espinais21
- Figura 2** – Inervação do trato gastrointestinal com interação das vias do SNE, SNA e SNC22
- Figura 3** – Organização do SNE em humanos e mamíferos de médio porte ..25
- Figura 4** – Vias musculares excitatórias (Ach, Taquicininas – TKs e ATP) e inibitórias (NO e VIP).....28
- Figura 5** – Estrutura química da vimpocetina41
- Figura 6** – Diagrama esquemático que descreve como a vimpocetina inibi a resposta inflamatória in vitro e in vivo dependente de NFkB. Tal como indicado, vimpocetina inibe NFkB na resposta inflamatória por direcionamento direto de IKK, independente da sua ação bem conhecida sobre a PDE-1 e regulação de Na⁺, Ca²⁺.....42

ARTIGO

- Figure 1** – Photomicrograph of colonic wall highlighting changes on the intestinal wall layers in acetic acid-induced mice treated with vimpocetine. A and B control grupo. C and D: colitis grupo. E and F: colitis grupo treated with vimpocetine. Observe inflammatory infiltrate in all intestinal layers, mainly in the mucosa and submucosa, loss of the structure of the mucosa (asterisk) and edema in the submucosa layer in colitis mice (C; D) in relation to control (A; B). Treatment with vimpocetine (E; F) preserved the mucosal architecture, reduced infiltration of immune cells, and partially decreased colitis-induced edema. H.E. Magnification 100x (A, C, E) and 200x (B, D, F). M: mucosa; SM: submucosa ...80
- Figure 2** – Photomicrograph of colonic wall highlighting the enteric nervous system in acetic acid-induced mice treated with vimpocetine. A-C: crosssections of colonic wall showing neuronal cell bodies and fibres labelled with PGP9.5.D-F: myenteric plexus containing nitrergic neurons was present in all experimental groups. G-I':

myenteric plexus containing cholinergic neurons was present in all experimental groups. Magnification 100x (A - C) and 400x (D - I). M: mucosa; SM: submucosa; MU: muscular.81

Figure 3 – Photomicrograph of colonic wall highlighting the enteric nervous system in acetic acid-induced mice. A,B: nitrergic innervation in the colonic wall showing myenteric plexus (MP), nerve fibres in the muscularis mucosae (MM) and mucosa (M). C,D: cholinergic innervation in the colonic wall showing myenteric (MP) and submucosal (SMP) plexi. Magnification 100x (A) and 400x (B - D)82

Figure 4 – Photomicrograph of colonic wall highlighting structures of the enteric nervous system in acetic acid-induced mice. A-C: VIPergic innervation was increased in the colitis mice. D-F': SP-containing fibres was also increased in the colitis mice. The treatment with vinpocetine did not protect the ENS. Magnification 200x. M: mucosa; SM: submucosa; MU: muscular 83

Figure 5 – Photomicrograph of myenteric plexus in acetic acidinduced mice treated with vinpocetine. A-C: myenteric plexus labelled with panneuronal marker: PGP9.5. D-F: myenteric plexus labelled for showing nitrergic neurons. Colitis did not change the number of neurons. Magnification 200x84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Antibodies used for immunofluorescence	78
Tabela 2	– Number/cm ² and area of the cell body of myenteric neurons in acetic acid-induced colitis mice treated with vinpocetine	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO

ACh	Acetilcolina
AP1	Proteína ativadora 1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ChAT	Acetil colinotransferase
COX	Ciclo-oxigenase
CU	Colite ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DSS	Sulfato Sódico de Dextrana
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
I κ B	Inibidor de kappa B
I κ K	Complexo I κ B quinase
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-12	Interleucina 12
IL-22	Interleucina 22
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IPANs	Neurônios aferentes primários intrínsecos
LDL	ox Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LED	Diodos emissores de luz
MPO	Mieloperoxidase
MMP 9	Metaloproteínase 9
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NkA	Neuroquinina A
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase

PDE-1	Fosfodiesterase tipo 1
RCU	Retocolite Ulcerativa
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SP	Substância P
TBA	Toxina botulínica tipo A
TCD4	Linfócito T cluster of differentiation 4
TGI	Trato gastrointestinal
TH1	Linfócito T helper 1
TH2	Linfócito T helper 1
TK	Taquicinas
TNBS	Ácido Trinitrobenzóico
TNF- α	Fator alfa de Necrose Tumoral
TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóide
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal
VPAC1	Receptor vasoativo polipeptídio intestinal 1
VPAC2	Receptor vasoativo polipeptídio intestinal 2

ARTIGO

AP1	Activator protein 1
CA	Califórnia
ChAT	Choline acetyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CD	Crohn disease
DNBS	Dinitrobenzene sulfonic acid
DSS	Dextran sulfate sodium
ENS	Enteric nervous system
GIT	Gastrointestinal tract
HE	Hematoxylin and eosin
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN- γ	Interferon gamma
I.M.	Intramuscular
MD	Maryland
MPO	Myeloperoxidase

NFkB	Nuclear factor-kappa beta
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
PBS	Phosphate buffer solution
PGP9.5	Protein gene product 9.5
pH	Potencial hidrogeniônico
SP	Substance P
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TLR 4	Toll Like Receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis fator alfa
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
UC	Ulcerative colitis
USA	United States of America
VIP	Vasoactive intestinal peptide
VPAC1	Receptor vasoactive intestinal peptide 1
VPAC2	Receptor vasoactive intestinal peptide 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	44
2.1	OBJETIVO GERAL	44
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
	REFERÊNCIAS	45
	ARTIGO CIENTÍFICO - VINPOCETINE HAS LOW PROTECTOR EFFECT ON THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN ACETIC ACID-INDUCED COLITIS MICE	61
	CONCLUSÃO	85
	ANEXOS	86
	ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) protocolo 157/2016, processo nº15933.2016	87
	ANEXO B – Normas da Revista: Inflammatory Bowel Diseases	88

1 INTRODUÇÃO

O controle neuronal da função do trato gastrointestinal (TGI) ocorre por meio de diferentes populações de neurônios, cujos corpos celulares podem estar localizados dentro ou fora da parede dos órgãos. Envolve a comunicação entre reflexos locais (dentro da parede intestinal); reflexos extraspínicos, que são originados na parede do órgão e passam por gânglios simpáticos pré-vertebrais, independentemente do sistema nervoso central (SNC); e reflexos dependentes do SNC (TGI-SNC e SNC-TGI) (FURNESS, 2012).

Os gânglios entéricos estão sujeitos a uma constante distorção mecânica devido a contração e relaxamento do TGI (GABELLA, 1990). Esses movimentos musculares, bem como a função neuronal, podem ser modulados por neurotransmissores, os quais sofrem alterações de acordo com o nível de estresse (KIANK, TACHE e LARAUCHE, 2010; LARAUCHE, MULAK, e TACHE, 2012), condição imunológica (ÖHMAN e SIMREN, 2010) e microbiota intestinal (COLLINS, SURETTE e BERCIK, 2012). Esses diferentes estímulos/condições resultam em um conjunto de modificações estruturais e/ou funcionais nos neurônios entéricos e células gliais, denominadas de plasticidade neuronal entérica (LOMAX, FERNANDEZ e SHARKEY, 2005). Dessa maneira, a neuroplasticidade entérica é caracterizada por modificações estruturais e funcionais, a fim de manter a homeostase dos órgãos. Além disso, também tem um papel fundamental na reorganização dos circuitos neuronais visando a restauração das funções intestinais. Essas modificações podem ser fisiológicas, durante o desenvolvimento e envelhecimento, ou consequência de uma condição patológica, como por exemplo na doença inflamatória intestinal (DII) (VASINA, BARBARA e TALAMONTI, 2006). A plasticidade neural pode contribuir para alterações na secreção e motilidade intestinal, levando ao desconforto, dor, diarreia ou constipação observados nas DII (LOMAX, FERNANDEZ, SHARKEY, 2005; BRIERLEY e LINDEN, 2014).

Estudos sobre a plasticidade no sistema nervoso entérico (SNE) são fundamentais para compreender a fisiopatologia de diversas doenças, bem para o desenvolvimento de intervenções farmacológicas (KRUGER *et al.*, 2002). Segundo Brierley e Linden (2014), devido às limitações éticas do desenvolvimento de pesquisa com seres humanos, vários modelos experimentais de inflamação intestinal em animais são utilizados para elucidar os mecanismos relacionados à plasticidade no SNE. Estes, incluem indução por substâncias químicas, por transferência de células T, colite espontânea e utilizando animais geneticamente modificados. Entre eles, os modelos de

colite induzida por produtos químicos como ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), oxazolona, ácido acético e sulfato sódico de dextrana (DSS) são os mais amplamente utilizados (WIRTZ *et al.*, 2007; KOON *et al.*, 2010; ABAD *et al.*, 2015)

1.1 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL: CARACTERIZAÇÃO ETIOLÓGICA, HISTOLÓGICA, EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA

O grande número de células imunológicas entéricas, em constante atividade e exposição ao meio externo, está relacionado a existência de muitas doenças intestinais devido às respostas imunológicas descontroladas no TGI. Pesquisas revelam que predisposição genética, disbiose, respostas imunes exacerbadas e fatores ambientais são conhecidos por promoverem, em conjunto, a desregulação imunológica do TGI, estando assim associados à patogênese das DII (STROBER, FUSS e MANNON, 2007; XAVIER e PODOLSKY, 2007; KASER, ZEISSIG e BLUMBERG, 2010; SUN, NAVA e STAPPENBECK, 2011; DE SOUZA e FIOCCHI, 2016).

A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), as duas principais formas de DII, são inflamações crônicas, remitentes ou progressivas, principalmente do TGI inferior (HIRATA, IHARA E KOIKE, 2016). De uma forma geral, o aparecimento dessas doenças ocorre tipicamente na segunda e terceira década de vida, em ambos os sexos e com recidivas frequentes, afetando a educação, produtividade no trabalho, vida social e qualidade de vida dos pacientes (KWON *et al.*, 2005; ZHU e LI, 2012).

A incidência das DII vem aumentando em todo o mundo, sobretudo em países em desenvolvimento. Portanto, seu controle tornou-se um grande desafio de saúde pública e uma das principais preocupações para a gastroenterologia (LOFTUS, 2004; MOLODECKY *et al.*, 2012; HUTTENHOWER, KOSTIC e XAVIER, 2014).

No Brasil, poucos estudos epidemiológicos estão disponíveis e, em sua maioria, descrevem apenas as características clínicas, sem referência à incidência ou prevalência dessas doenças (SOUZA *et al.*, 2002; MOLODECKY *et al.*, 2012). Atribui-se a isso, o fato dessas doenças não serem de notificação compulsória e a ausência de um diagnóstico correto, uma vez que os prontuários médicos registram altas taxas de diarreias de etiologia bacteriana ou parasitária (DE SOUZA, BELASCO e NASCIMENTO, 2008). Os poucos dados sobre a RCU no Brasil apontam o aumento na incidência entre a população da área urbana nas regiões nordeste, sudeste e centro-

oeste, corroborando com a hipótese da importância da exposição aos fatores ambientais como estilo de vida, hábitos alimentares, fatores psicossociais, obesidade e infecções (VICTORIA, SASSAKI e NUNES, 2009; DELMONDES *et al.*, 2015; PARENTE, *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

Embora tenham características comuns entre as duas principais formas de DII, existem importantes diferenças genéticas e clínicas. Destaca-se que na RCU a inflamação acomete principalmente o reto e colo, em um grau variável e de maneira contínua na mucosa e submucosa. As características histopatológicas incluem infiltrado neutrofílico na lâmina própria e nas criptas, formando microabscessos, ulcerações e perda progressiva das células da cripta. Ao passo que, as principais características da DC são o acometimento de qualquer região do TGI, inflamação descontínua e transmural, agregação de macrófagos e formação de granulomas (ELLRICHMANN *et al.*, 2014)

Sabe-se que durante a inflamação gastrointestinal, há uma ruptura no controle das células efectoras do intestino (células musculares lisas, enterócitos e endotélio vascular), acarretando em alterações na motilidade, fluxo sanguíneo e equilíbrio hídrico. Dessa forma, as manifestações intestinais mais comuns das DII incluem diarreia grave, dor abdominal, hemorragia e perda de fluídos e eletrólitos (GASCHE *et al.*, 2007). Dessa forma, Lomax, Pradhananga e Bertrand (2017) afirmam que o distúrbio funcional, juntamente com a dor, são os responsáveis pelos sintomas debilitantes das DII.

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Para uma melhor compreensão dos mecanismos patológicos que envolvem as DII, bem como para investigar a farmacocinética e 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 e 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 e MARTÍN, 2013); sulfato sódico de dextrana (DSS) (DHARMANI, LEUNG e CHADEE, 2011; CHEAH *et al.*, 2013), e ácido acético (MOUSAVIZADEH *et al.*, 2008; ZABIHI, 2017). Randhawa *et al.* (2014) apresentam uma construtiva revisão bibliográfica sobre os os diversos protocolos utilizando os agentes químicos citados, sendo os principais:

TNBS: A inflamação intestinal induzida pela administração de TNBS é difusa e transmural, caracterizada pelo aumento da infiltração de leucócitos, formação de edema e ulcerações. A indução é realizada dissolvendo o TNBS em álcool com posterior administração via retal. O álcool atua tanto como veículo, como auxilia na indução por quebrar a barreira da mucosa. O perfil inflamatório associado a esse modelo é, predominantemente, via resposta imunológica Th1, envolvendo células T CD4+, IL-12 e TNF- α . Por esse motivo, a indução via TNBS é associado mais comumente à doença de Crohn em humanos.

DSS: O modelo de colite induzida por DSS apresenta morfologia e sintomas semelhantes aos observados na doença humana. Entretanto, apesar de ser considerado de fácil execução, o custo é considerado alto. 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 a eutanásia para avaliação dos parâmetros inflamatórios e danos histológicos. Nesse modelo também se observa a perda de peso, hemorragia retal e consistência das fezes (critérios utilizados para determinar o índice de atividade da doença). Pesquisas apontam que o DSS afeta principalmente o intestino grosso, provocando erosões com perda progressiva do epitélio superficial, deformidades na integridade do epitélio com aumento da permeabilidade da mucosa colônica. A colite aguda induzida pelo DSS é caracterizada por hiperemia, ulcerações, edema moderado a severo, alterações histopatológicas, infiltração de granulócitos e sintomas como diarreia sanguinolenta. Além disso, há um aumento das citocinas pró-inflamatórias no tecido colônico.

Ácido acético: Dos modelos químicos amplamente utilizados, a colite experimental induzida pela administração intrarretal de ácido acético é considerada de fácil desenvolvimento, reprodução e baixo custo. Além disso, apresenta semelhança com a doença humana em termos patogênicos, histológicos e de perfil inflamatório (NAKHAI *et al.*, 2007; BITIREN *et al.*, 2010; HARTMANN *et al.*, 2012). Em ambas as

situações (clínica e experimental), a lesão colônica apresenta infiltração de neutrófilos, inflamação difusa na mucosa, vasodilatação, edema, ulcerações na submucosa e redução das células caliciformes (CLOSA e FOLCH-PUY, 2004; JURJUS, KHOURY e REIMUND, 2004; 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, os quais contribuem para lesão intestinal (RANDHAWA *et al.*, 2014). Embora o modelo experimental não mimetize exatamente a doença humana, a colite experimental induzida pelo ácido acético tem sido amplamente utilizada por reproduzir a fase de recidiva da RCU, ou seja, momento no qual são observados os sintomas (CAGIN *et al.*, 2016; FATTAHIAN *et al.*, 2016; GHASEMI-PIRBALUTI, MOTAGHI e BOZORGI, 2017; SULUVOY, SAKTHIVEL e GURUVAYOORAPPAN, 2017).

Embora seja aceito que a interação dos fatores já mencionados no item 1.1 estejam subjacentes à patogênese das DII, evidências mais recentes demonstram a participação do sistema nervoso em conjunto com o sistema imunológico no curso dessas doenças (GEBOES e COLLINS; 1998; LOMAX *et al.*, 2005; VASINA, BARBARA e TALAMONTI, 2006; BOISSÉ *et al.*, 2009). Portanto, é possível que a motilidade alterada nesses modelos seja realmente resultante de alterações na inervação do TGI (LOMAX, PRADHANANGA e BERTRAN, 2017).

1.3 INERVAÇÃO DO TRATO GASTROINTESTINAL

O trato gastrointestinal (TGI) possui funções essenciais para vida, incluindo secreção de ácido gástrico, digestão, absorção dos nutrientes, movimentos de propulsão e mistura, excreção e interação com o sistema imune intestinal. O controle neural dessas funções ocorre através da interação entre neurônios intrínsecos do sistema nervoso entérico e neurônios extrínsecos do sistema nervoso autônomo (SNA) parassimpático (vias vagais e pélvicas) e simpático (vias torocolombares) (Fig. 1,2) (FURNESS *et al.*, 2014; UESAKA *et al.*, 2016).

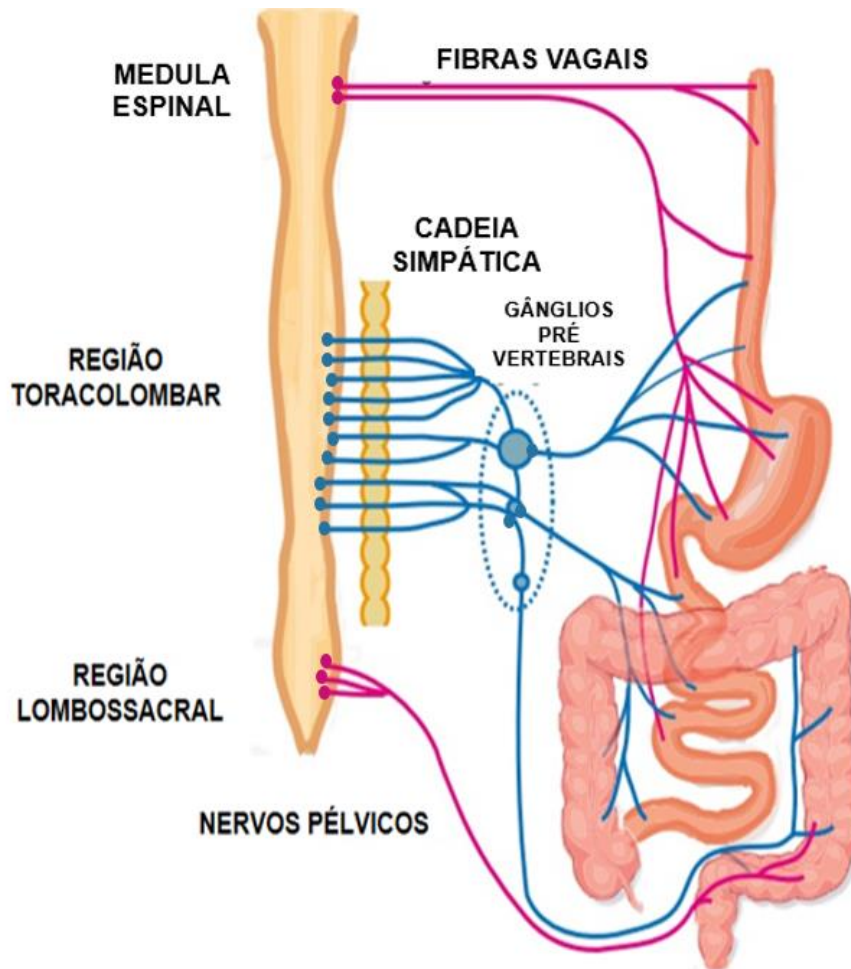


Fig. 1: Inervação simpática (azul) e parassimpática (rosa) do trato gastrointestinal através das vias vagais e espinais (Adaptado de AESAKA *et al.*, 2016)

O TGI difere dos demais órgãos por possuir um sistema nervoso intrínseco, denominado de sistema nervoso entérico (SNE) (TRACEY, 2002; FURNESS *et al.*, 2014). Estudos demonstraram que o SNE é capaz de atuar de forma autônoma no controle da motilidade intestinal. Porém, o SNC desempenha um papel fundamental no controle da motilidade esofágica e gástrica, além de regular a função intestinal perante alterações do estado emocional (BAYLISS e STARLING, 1899).

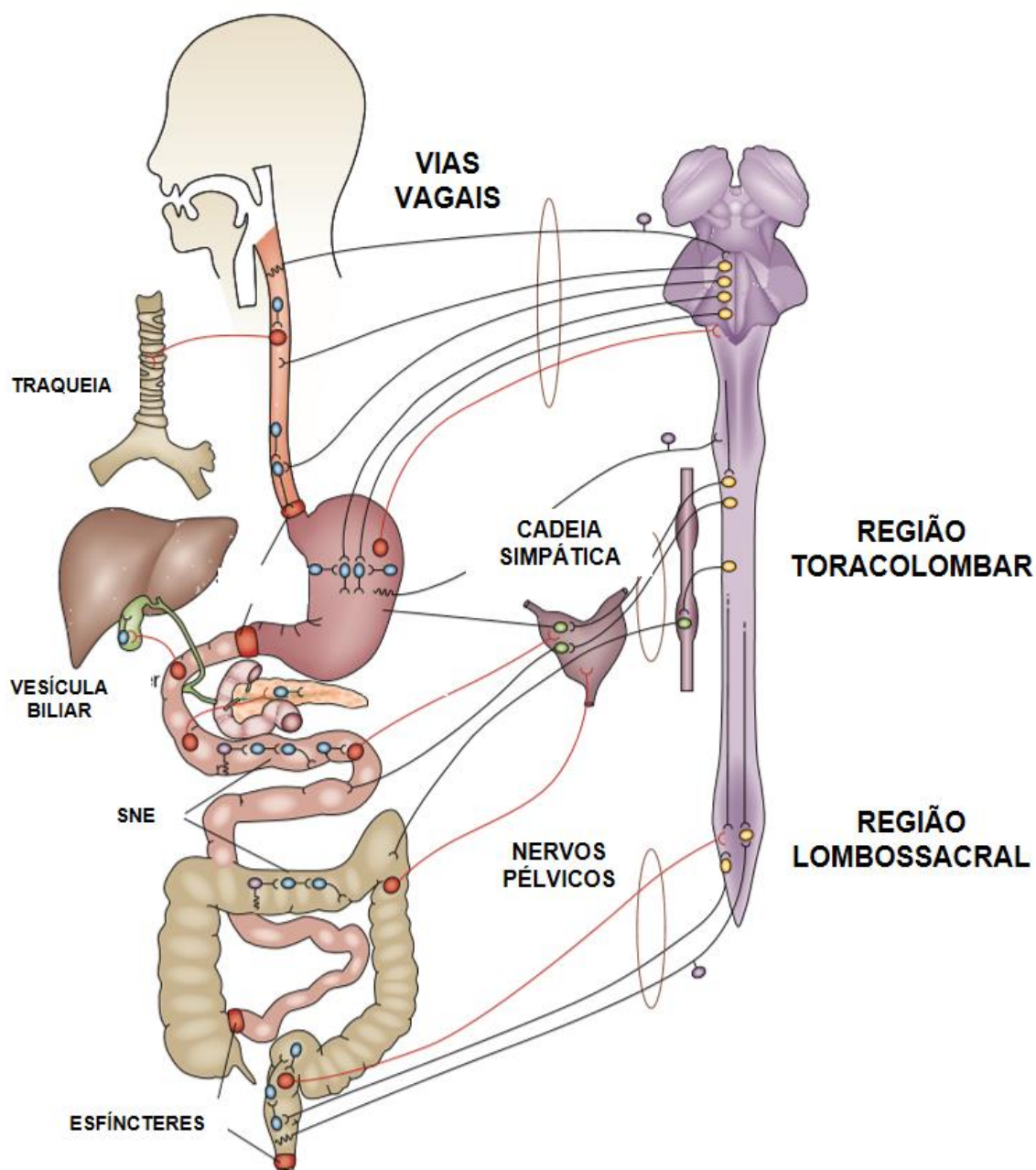


Fig. 2: Interação das vias neurais entéricas com o SNC (Adaptado de FURNESS, 2012).

O estudo descrito nessa dissertação envolveu componentes específicos do SNE, todavia será apresentada uma breve descrição sobre todos os elementos do sistema nervoso autônomo.

1.3.1 SISTEMA NERVOSO PARASSIMPÁTICO (VIAS VAGAIS E NERVOS PÉLVICOS)

A inervação vagal fornece tanto reflexos aferentes (sensitivos) quanto eferentes (motores), principalmente para a porção superior do TGI (esôfago, estômago, intestino delgado proximal, fígado e pâncreas). As informações em relação ao conteúdo luminal, seja a presença de nutrientes ou agentes potencialmente nocivos, são detectadas por células epiteliais glandulares, dentre as quais, as células enteroendócrinas que liberam hormônios sobre as terminações nervosas aferentes vagais (mecanorreceptores, quimiorreceptores ou receptores de tensão, dependendo do órgão), ativando-as indiretamente. Essas vias aferentes vagais são responsáveis por regular o apetite e a saciedade, propulsão esofágica, volume gástrico, atividade contrátil e secreção gástrica (RAYBOULD, 2010; FURNESS *et al.*, 2013; FURNESS *et al.*, 2014).

Schemann e Grundy (1992) descreveram que as vias eferentes vagais têm origem no núcleo motor dorsal do nervo vago e no núcleo ambíguo, podendo estabelecer sinapses em gânglios entéricos (em sua maioria) ou inervar diretamente as células musculares estriadas do esôfago. A eferência vagal é responsável pela propulsão esofágica, através de reflexos iniciados nos mecanorreceptores, os quais detectam o conteúdo luminal e ativam as vias vagais eferentes para relaxar o esfíncter esofágico inferior, proporcionando assim a passagem do alimento. No estômago, ela é responsável pelo aumento do volume gástrico, relaxamento do piloro e aumento da secreção gástrica. As vias eferentes vagais também promovem a contração da vesícula biliar e secreção pancreática (FURNESS *et al.*, 2004).

De forma semelhante à inervação vagal no trato gastrointestinal superior, as vias pélvicas são responsáveis pela aferência e eferência neuronal no intestino grosso distal e reto (porção inferior do TGI). Dessa forma, pode-se afirmar que as fibras sensoriais são responsáveis por receber o estímulo da mucosa ou da parede do órgão, ativando assim a via parassimpática na porção inferior do TGI. As vias eferentes pélvicas exercem importantes funções nos gânglios entéricos do cólon distal e reto, através da modulação da motilidade na região e do controle dos reflexos de defecação (LYNN *et al.*, 2005; BRIERLEY *et al.*, 2004; KYLOH *et al.*, 2011; ZAGORODNYUK *et al.*, 2011).

1.3.2 SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

A conexão simpática entre o SNC e o TGI ocorre através de vias aferentes (com sinapse nos gânglios de raiz dorsal – DRG) e vias eferentes (com sinapses em gânglios celíacos e mesentéricos superior e inferior). Os corpos dos neurônios simpáticos pré-ganglionares tem origem toracolombar e seus axônios projetam-se para fora da medula espinal innervando um grande número de alvos no TGI como gânglios mioentéricos e submucosos, vasos sanguíneos e musculatura dos esfíncteres (FURNESS *et al.*, 2003; LOMAX, 2008).

Nos gânglios mioentéricos, a inervação eferente simpática é responsável por inibir os efeitos excitatórios dos neurônios entéricos que innervam a musculatura do estômago e do intestino, bem como contrair a musculatura dos esfíncteres, o que provoca redução da velocidade do trânsito gastrointestinal. Essas fibras também possuem a capacidade de inibir a secreção, através da inervação dos gânglios submucosos (FURNESS e COSTA, 1974).

Ao passo que os terminais axonais aferentes estão, em sua maioria, em torno das arteríolas na parede do intestino, porém também podem ser encontrados nos gânglios mioentéricos, na lâmina própria da mucosa em todo o TGI e, raramente, nas camadas musculares (GIBBINS *et al.*, 1985; GREEN e DOCKRAY, 1988; BROOKES *et al.*, 2014). As vias aferentes simpáticas (mecanorreceptores) são semelhantes à inervação vagal do estômago e intestino delgado proximal uma vez que respondem a um leve estímulo da mucosa mas não à distensão ou contração do colo, além de incluir fibras de dor (BRIERLEY *et al.*, 2004; KYLOH *et al.*, 2011).

1.3.3 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O sistema nervoso entérico (SNE), inserido na parede do TGI, é composto por agregados de corpos celulares e glías entéricas, denominados gânglios entéricos, os quais são interligados por fibras nervosas. Além disso, a comunicação dos gânglios entéricos com os tecidos efetores do TGI (musculatura, epitélio da mucosa, vasos sanguíneos e células gastroenteropancreáticas) também é realizada através das fibras nervosas (Fig. 3) (FURNESS, 2012).

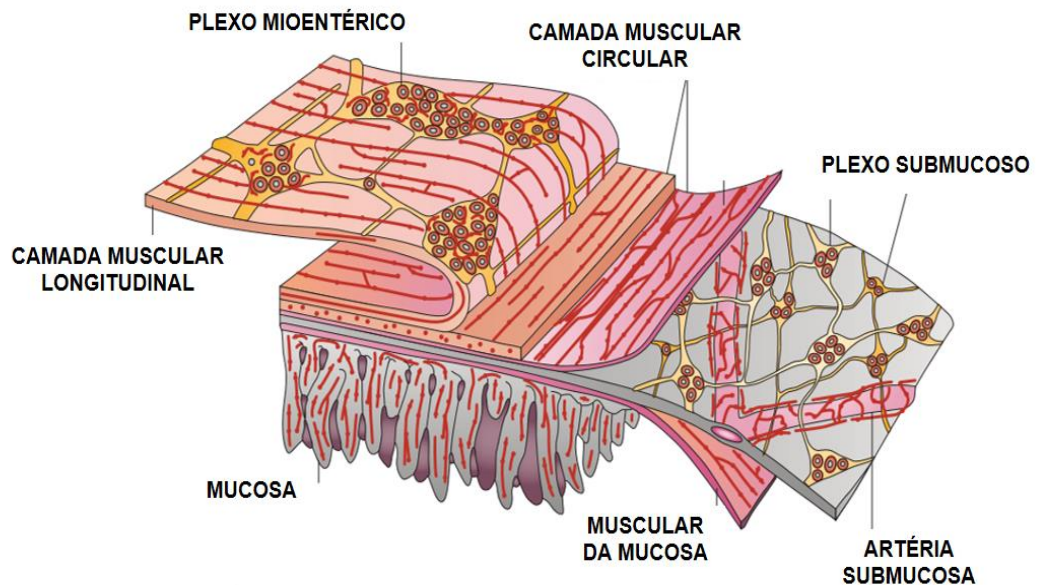


Fig. 3: Organização do SNE em humanos e mamíferos de médio porte (Adaptado de Furness, 2006).

Assim como mencionado por Lomax, Pradhananga e Bertrand (2017), os gânglios entéricos podem estar inseridos em dois locais do TGI, chamados de plexos ganglionados. O plexo mioentérico, localizado entre as camadas musculares lisas circular e longitudinal, fornece inervação motora excitatória ou inibitória para parede do órgão. Enquanto que o plexo submucoso, inserido na camada submucosa, modula as atividades secretoras do epitélio e dos vasos sanguíneos intrínsecos. O SNE também é composto por outros plexos, chamados de não ganglionados, constituídos, portanto, apenas de fibras nervosas. Esses são responsáveis pela interação neural entre todas as camadas da parede dos órgãos, possibilitando assim o funcionamento adequado das funções do TGI.

Algumas diferenças nessa estrutura podem ser observadas de acordo com o órgão e espécie. Entre elas, destaca-se a ausência do plexo submucoso no esôfago e estômago, justificada pelo baixo fluxo de fluídos através do epitélio da mucosa (o que ocorre principalmente nos intestinos) (BREHMER, 2006; FURNESS, 2006; BREHMER *et al.*, 2010; FURNESS, 2016).

O SNE é considerado um circuito neuronal completo por possuir os três tipos de neurônios necessários para a emissão da resposta frente ao estímulo: neurônios aferentes primários intrínsecos, interneurônios e neurônios motores excitatórios e inibitórios. Os reflexos entéricos são iniciados pela ativação de neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs) localizados em ambos os plexos e responsivos às

mudanças químicas e mecânicas dos órgãos (BERTRAND *et al.*, 2000). Os IPANs, por sua vez, inervam os interneurônios, os quais formam conexões com outros neurônios do plexo mioentérico ou submucoso denominados de neurônios motores. Esses, por conseguinte, liberam neurotransmissores para as células efetoras (BORNSTEIN, FURNESS e KUNZE 1994, FURNESS *et al.*, 2003).

Furness (2006) estima que o número total de neurônios entéricos, em seres humanos, seja superior a somatória dos neurônios simpáticos e parassimpáticos, atingindo assim em torno de 400 a 600 milhões (número semelhante a quantidade de neurônios encontrada na medula espinal). Dessa forma, pode-se afirmar que o SNE tem um papel essencial na motilidade do TGI, secreção de substâncias e absorção de água e nutrientes durante o processo de digestão.

Dessa maneira, a motilidade da camada muscular externa é modulada pela inervação do plexo mioentérico e pelas células intericiais de Cajal (HUIZINGA e LAMMERS, 2009; SANDERS *et al.*, 2012). Enquanto que os neurônios motores do plexo submucoso são responsáveis por controlar a secreção de cloreto e água para o lúmen. Esse controle motor é realizado através de neurotransmissores excitatórios e inibitórios. De um modo geral, acetilcolina (ACh) e substância P (SP) mediam a contração, enquanto que o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o óxido nítrico (NO) são responsáveis por modular o relaxamento muscular (FURNESS, 2006). Já os reflexos vasodilatadores do plexo submucoso modulam a função de absorção durante a digestão (VANNER e MACNAUGHTON, 2004) .

Apesar da importância do SNE para as funções vitais do TGI, o SNC exerce uma grande influência nas atividades dos neurônios intrínsecos, modulando os efeitos da inervação nos tecidos efetores. A comunicação entre o SNC e o SNE ocorre por meio da liberação de neurotransmissores, os quais atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares e podem ter seus níveis alterados por outros neuropeptídeos, citocinas, hormônios e drogas. A interação dessas moléculas com seus receptores específicos geram respostas centrais e periféricas, afetando a musculatura, epitélio, endotélio e células imunes do TGI (GROSS e POTHOUKAKIS, 2007).

Conforme a literatura, mais de 20 neurotransmissores foram identificados no SNE e muitos neurônios são capazes de expressar mais de um tipo. Dentre eles, os neurotransmissores que possuem maior importância para os mecanismos fisiológicos e patológicos são acetilcolina, substância P, serotonina, purinas (Adenosina Trifosfato),

aminácidos (glutamato), peptídeos (Peptídeo intestinal vasoativo e neuropeptídeo Y), e óxido nítrico (NO) (XUE *et al.*, 2000; LECCI, SANTICIOLI e MAGGI 2002; LAKE e HEUCKEROTH, 2013).

A seguir uma breve revisão dos neurotransmissores avaliados nessa dissertação e suas funções no plexo mioentérico.

1.3.3.1 ACETILCOLINA

A presença da acetilcolina (ACh) em neurônios entéricos foi descrita pela primeira vez em 1934 no estômago (DALE e FELDBERG, 1934) e da enzima sintetizadora (ChAT) poucos anos após no intestino (DIKSHIT, 1938). A localização de ChAT nos neurônios entéricos foi revelada por Furness *et al.*, (1983) e complementada pela observação em neurônios motores excitatórios em estudos posteriores (BROOKES *et al.*, 1991). Esses neurônios podem possuir diferentes características morfológicas, porém, o código químico é considerado homogêneo, uma vez que todos expressam ACh e uma alta porcentagem também co-expressam taquicinas (TKs), como substância P além de neuroquinina A (NKA) (COSTA, BROOKES e HENNIG, 2000).

A ACh liberada a partir dos neurônios motores excitatórios do plexo mioentérico interagem com receptores muscarínicos M3 e, em menor grau, receptores M2 na musculatura lisa e nas células intericiais de Cajal intramusculares, atuando como um componente significativo da transmissão excitatória para os músculos da parede intestinal (Fig.4) (LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002; GOYAL, 2013). Essa modulação pode ocorrer por diferentes mecanismos de acordo com o receptor ativado. Sendo assim, a contração muscular mediada pela ativação do receptor M3 ocorre via fosfolipase C β e consequente liberação de Ca²⁺ dos compartimentos intracelulares. Ao passo que a ligação da ACh nos receptores M2 inibe a enzima adenilatociclase, inativando os sinais de relaxamento muscular (LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002).

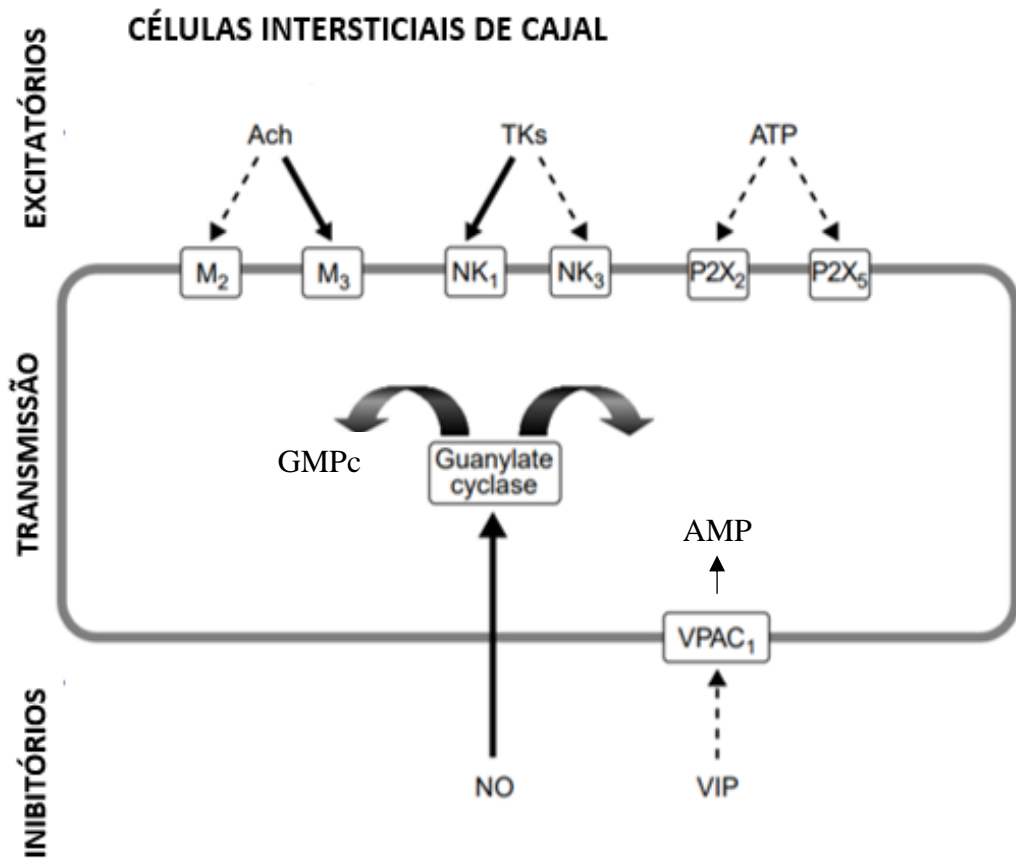


Fig 4: Mecanismos de excitação e inibição da ação muscular (Ach, Taquicinas – TKs e ATP) e inibitórias (NO e VIP)

(Adaptado de LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002)

A importância da ACh para a contração muscular do TGI foi reforçada com estudos atuais utilizando toxina botulínica tipo A (TBA) (ZHAO *et al.*, 2016) e dopamina (AUTERI *et al.*, 2017). Zhao *et al.* (2016) demonstrou que a TBA é capaz de inibir a contração do músculo liso de ratos por impedir a liberação de ACh dos neurônios colinérgicos e também prejudicar a sua transmissão para as células musculares. Efeito semelhante foi observado em camundongos tratados com dopamina, os quais tiveram a motilidade do cólon inibida devido ao bloqueio da liberação ACh via ligação dopamina/receptor D1.

1.3.3.2 SUBSTÂNCIA P

A substância P (SP) é um neuropeptídeo pertencente à família das taquicinas, isolada e purificada pela primeira vez em glândulas pituitárias bovinas (CHANG e

LEEMAN, 1970). A SP é sintetizada por neurônios do SNC (MANTYH, 2002), SNE (LU *et al.*, 2016) e algumas células do sistema imunológico como macrófagos (UTSUMI *et al.*, 2016).

Apesar da predominância do papel de ACh na motilidade, a SP está igualmente distribuída no TGI, exercendo efeitos motores por meio de dos receptores de taquicinina NK1, NK2 e NK3 (SHIMIZU *et al.*, 2008; POOLE *et al.*, 2015; PELLEGRINI *et al.*, 2016) (Fig. 4). Em particular, a ativação do receptor NK1 em neurônios entéricos, células intersticiais de Cajal, epitélio colônico e células imunes, tem demonstrado maior envolvimento na motilidade, secreção e sensibilidade visceral no TGI (POOLE *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2016; UTSUMI *et al.*, 2016).

Em relação a fonte neuronal entérica, a SP pode ser liberada por dois tipos de neurônios: neurônios colinérgicos excitatórios (BARTHÓ, LENARD e PATACCHINI, 1990) e neurônios aferentes primários peptidérgicos (ENGEL *et al.*, 2011). A ativação da inflamação envolve neurônios sensoriais extrínsecos e intrínsecos que impulsionam os reflexos de dor e os mecanismos inflamatórios locais, como vasodilatação, extravassamento do plasma e nocicepção (ENGEL *et al.*, 2011). Nesse sentido, Lapointe *et al.* (2015) destacam a participação do receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1), expresso por neurônios aferentes primários extrínsecos, capazes de responder a uma variedade de estímulos nocivos. A ativação do TRPV1 estimula a liberação de neuropeptídeos como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na mucosa colônica, o que contribui para as respostas inflamatórias. Uma vez secretada, a SP pode exercer efeitos motores excitatórios e atividades pró-inflamatórias como vasodilatação, extravassamento de plasma, migração leucocitária e fibrinogênese (AVERBECK e REEH, 2001; TAN, BORNSTEIN e ANDERSON, 2008; KOON *et al.*, 2010).

1.3.3.3 ÓXIDO NÍTRICO

Assim como os neurotransmissores excitatórios discutidos acima (ACh e SP), os neurotransmissores inibitórios (óxido nítrico, peptídeo intestinal vasoativo e ATP) também participam da motilidade, porém promovendo reflexos de relaxamento na região descentente da parede muscular, visando a propulsão do conteúdo do lúmen no sentido anterógrado (Fig. 4). Diante desse comparativo, é possível concluir que a inibição dos reflexos motores excitatórios é capaz de reduzir a velocidade do trânsito

intestinal uma vez que os reflexos inibitórios (relaxamento) ficam prevaletidos ao longo da parede muscular. Da mesma forma, o bloqueio das vias inibitórias, culmina em predominância das vias excitatórias (contração) na região ascendente, aumentando a velocidade do trânsito intestinal (SHAHBAZIAN e HOLZER, 2000; LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização importante em muitas funções biológicas. No final da década de 70, foi descoberto que três diferentes enzimas (NO sintases) são capazes de produzir o NO: NOS neuronais (nNOS ou NOS1), NOS induzíveis (iNOS ou NOS2) e NOS endoteliais (eNOS ou NOS3) (ARNOLD *et al.* 1977; GRUETTER *et al.* 1979; FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980).

Conforme consta em Kono *et al.*, (2004), o NO pode ser considerado essencial para a regulação de inúmeras funções homeostáticas da mucosa gastrointestinal, como manutenção da permeabilidade epitelial, produção de muco e modulação das respostas inflamatórias. Além disso, o NO é apontado como um importante neurotransmissor primário secretado por neurônios motores entéricos inibitórios (BULT *et al.*, 1990; SANDERS e WARD, 1992; SUNG *et al.*, 2006; MATSUYOSHI *et al.*, 2010; PELLETIER *et al.*, 2010; MANE *et al.*, 2014)

A enzima nNOS pode estar ligada à membrana ou dispersa no citosol dos neurônios entéricos, sendo possível a marcação no plexo mioentérico, através da técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos anti-nNOS (MATSUYOSHI *et al.*, 2010; WISTON, LI e SARNA, 2013; CAPUTI *et al.*, 2017). O NO liberado na musculatura lisa do TGI causa respostas esteriotipadas de hiperpolarização pós juncional, compondo-se de potenciais nitrérgicos inibitórios e resultando no relaxamento muscular (LIES *et al.*, 2015). Por esse motivo, alterações na expressão de nNOS, acarretam em disfunção na motilidade intestinal, sintoma que pode ser observado em colite humana e modelos experimentais murinos (SUNG *et al.*, 2006; WISTON, LI e SARNA, 2013; RAHMAN, ROBINSON e JOVANOVSKA, 2015).

1.3.3.4 PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP)

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é um potente neuropeptídeo originalmente isolado no intestino delgado de porco (SAID e MUTT, 1970). Entretanto, atualmente sabe-se que VIP é normalmente expresso em todas as camadas do TGI, principalmente

no plexo submucoso e lâmina própria e, mais raramente, no plexo mioentérico (ZHAO *et al.*, 2013; ABAD *et al.*, 2015; DEL VALLE-PINERO *et al.*, 2015).

O primeiro estudo de localização, evidenciou a presença de VIP nas células enteroendócrinas do TGI (PORTER, SAID e GANONG, 1983). Entretanto, estudos posteriores mostraram que VIP estava presente apenas em neurônios centrais e periféricos, não sendo mais detectável em células endócrinas (SAID e MUTT, 1970; BRYANT *et al.*, 1976; LARSSON *et al.*, 1979).

No TGI, a distribuição de estruturas VIP⁺ foi examinada em cobaias e ratos (SCHULTZBERG *et al.*, 1978; JESSEN *et al.*, 1980, MALMFORS *et al.*, 1981; KUWAHARA *et al.*, 1983). Esses estudos demonstraram a presença de VIP dentro das diversas camadas da parede gastrointestinal, sendo predominantemente na camada submucosa (plexo submucoso) e com uma tendência para maiores proporções na parte distal do TGI. Em quantidades mais baixas foram marcados neurônios VIP⁺ no plexo mioentérico e, de forma escassa, na camada muscular longitudinal. Segundo esses estudos, em outros locais da parede gastrointestinal, como a lâmina própria, pequenos grupos de células VIP⁺ são encontrados, entretanto com particular importância nessa região por inervar vilosidades, vasos sanguíneos e epitélio.

O VIP exerce diversas funções fisiológicas intestinais como inibição do reflexo peristáltico e na vesícula biliar (efeito motor inibitório), estimulação da secreção intestinal e gástrica (ação secretomotora excitatória), vasodilatação (efeito motor inibitório) e liberação de hormônios do pâncreas (LAKHAN e KIRCHGESSNER, 2010; HARMAR *et al.*, 2012) (Fig. 4).

Essas ações são mediadas através duas proteínas estruturalmente relacionadas com a proteína G, os receptores VPAC1 e VPAC2. Esses receptores são expressos em grupos distintos de células imunes, porém ambos são capazes de estimular sinais bioquímicos intracelulares e mediar diversas respostas imunes (VOICE *et al.*, 2002).

Os receptores VPAC são altamente expressos em células T e macrófagos e, de uma forma menos proeminente, em células dendríticas, mastócitos e neutrófilos. Além disso, os níveis de expressão de VPAC1 e VPAC2 variam de acordo com a célula em que ele está acoplado, ou seja, VPAC 1 é expresso em células T e macrófagos de uma forma constitutiva, enquanto que VPAC2 apresenta relevância funcional somente após ativação (QIAN, HAMMARSTRÖM e DANIELSSON, 2001; LANGER e ROBBERECHT, 2007)

Evidências indicam que VIP desempenha um papel significativo na regulação das funções do sistema imune frente a estímulos inflamatórios, influenciando a migração de células imunes e a geração de citocinas (YADAV e GOETZL, 2008). Nesse sentido, foi verificado, em modelos experimentais de DC, que VIP pode exercer potencial atividade terapêutica em doenças imunes humanas conduzidas pelo padrão Th2. Essa inferência baseia-se em estudos que apontaram que a administração de VIP em animais com DC experimental foi capaz de reduzir a gravidade clínica e histopatológica da doença, além de amenizar a perda de peso e a ocorrência de diarreia (ABAD *et al.*, 2003; ABAD *et al.*, 2005). Complementando os vários efeitos anti-inflamatórios observados anteriormente, Conlin *et al.* (2009) demonstrou que VIP também é capaz de regular a permeabilidade epitelial *in vitro*, melhorando a colite induzida por bactérias devido a proteção da barreira colônica.

Adicionalmente, por ser um potente relaxante muscular (FURNESS, 2006), facilitando a passagem do alimento no intestino, a desregulação de VIP pode ser observada em diferentes distúrbios gastrointestinais (ZHAO *et al.*, 2013; DEL VALLE-PINERO *et al.*, 2015), porém o efeito inflamatório do VIP será abordado a seguir.

1.4 ALTERAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO CAUSADAS PELA COLITE

Os distúrbios motores observados em pacientes com colite ulcerativa, ativa ou em remissão, sugerem modificações dos componentes neuromusculares entéricos (células intersticiais de Cajal, neurônios entéricos e células musculares lisas) e são extensamente examinados em diversos modelos experimentais de colite (KOON *et al.*, 2010; BERNARDINI *et al.*, 2012; WINSTON e LI, 2013; ZHAO *et al.*, 2013; ABAD *et al.*, 2015; UTSUMI ET AL., 2016; RAHMAN *et al.*, 2016) e, menos frequentemente, em biópsias de pacientes (FONTGALLAND *et al.*, 2014; DEL VALLE-PINERO *et al.*, 2015). Essas variações da inervação do TGI durante a colite pode ser explicada pela alta densidade de receptores responsivos aos neurotransmissores e aos seus efeitos.

Nesse sentido, os principais efeitos da colite sobre o SNE foram apontados por Moynes *et al.* (2014) e incluem: perda generalizada de neurônios, aumento da densidade axonal, alterações no conteúdo neuroquímico, hiperexcitabilidade dos IPANs e alterações na vasodilatação e/ou secreção.

A seguir, serão apontadas as alterações no conteúdo neuroquímico dos neurônios durante a colite experimental em camundongos e no curso da doença humana.

1.4.1 ALTERAÇÕES OBSERVADAS 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 (Ach, SP, NO, VIP, entre outros) que recebem. Dessa forma, alterações nos conteúdos neuronais, resultantes do processo inflamatório, afetam o mecanismo regulador desse processo, induzindo alterações funcionais no TGI (SARNA, 2006; SARNA, 2010; SHI, WISTON e SARNA 2011).

1.4.1.1 ÓXIDO NÍTRICO E ACETILCOLINA

Devido às ações já mencionadas de NO e ChAT para o TGI, sabe-se que mudanças nos níveis desses neurotransmissores na parede gastrointestinal resulta em diversas características observadas na inflamação intestinal. Ao passo que a sua administração exógena dos mesmos pode ser responsável pela restauração das funções fisiológicas e proteção da mucosa através da manutenção do fluxo sanguíneo, inibição da adesão de plaquetas e leucócitos, modulação do estresse oxidativo e estabilização do I κ B (ALICAN e KUBES, 1996).

Apesar dessas evidências, estudos atuais não são conclusivos em relação às modificações da inervação dos neurônios nitrérgicos e colinérgicos no plexo mientérico. Pesquisas em modelos de colite experimental espontânea e induzidas por DSS não demonstram alteração quantitativa desses neurônios (WINSTON e LI, 2013; RAHMAN *et al.*, 2015), porém, a redução da densidade das fibras nervosas NOSⁿ⁺ e ChAT⁺ (RAHMAN *et al.*, 2015) pode indicar diminuição da liberação dos neurotransmissores com possíveis implicações funcionais a longo prazo.

De acordo com essa hipótese, os mesmos autores avaliaram que, em animais com prolapso retal (indicativo de maior severidade da doença) houve perda da inervação colinérgica mais proeminente do que em camundongos sem esse sinal clínico (RAHMAN *et al.*, 2016). Dessa forma, a perda de neurônios ChAT⁺ pode acarretar em alterações graves na atividade contrátil retal e amplificação da gravidade da doença, uma vez que fibras colinérgicas possuem um papel anti-inflamatório potente (MATTEOLI e BOECKXSTAENS 2013).

1.4.1.2 SUBSTÂNCIA P (SP)

Conforme exposto anteriormente, a ativação de neurônios aferentes primários peptidérgicos (via receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 – TRPV 1), abundantes na parede do cólon, é acompanhada pela liberação de substância P. Dessa forma, a SP é amplamente expressa na inflamação, resultando em alterações histológicas e agravamento da colite experimental induzida pelo sulfato sódico e dextrana (DSS) em camundongos (ELGEL *et al.*, 2012). Os mecanismos próinflamatórios da SP também foram demonstrados em colite experimental induzida por oxalazone em animais knockout para o neuropeptídeo. Neste mesmo estudo, animais selvagem tiveram os níveis de citocinas próinflamatórias aumentados, enquanto que a proteção em camundongos SP^{-/-} foi indicada pela quantidade diminuída dessas citocinas (ELGEL *et al.*, 2012).

Devido a regulação positiva da SP e do seu receptor (NK1) nas DII, em humanos e animais (STEINHOFF *et al.*, 2014), o impacto da sinalização via SP/NK1R nos neurônios entéricos tornou-se um alvo nas investigações sobre essas doenças em modelos experimentais de colite (POOLE *et al.*, 2015; UTSUMI *et al.*, 2016).

Recentemente, Utsumi *et al.* (2016) demonstrou que a colite experimental induzida por DSS aumentou a imunomarcagem de fibras SP⁺ e o nível de SP no cólon, bem como o número de células positivas para o receptor NK1. Ao passo que, a administração do Aprepitanto (antagonista do NK1R) reduziu significativamente a severidade da colite, a infiltração de leucócitos, o escore histológico e atenuou a liberação dos mediadores inflamatórios.

Esses estudos indicam claramente o papel regulador da interação SP/NK1R para a patogênese da inflamação intestinal. Dessa forma, pesquisas envolvendo a análise de SP tendem a fundamentar os mecanismos da inflamação no cólon e contribuir para o desenvolvimento de possíveis alvos terapêuticos.

1.4.1.3 PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP)

Os efeitos do VIP exógeno e endógeno em modelos murinos de DII foram repetidamente testados e, ao menos em parte, os principais mecanismos de ação foram descritos (DELGADO, 2002; YADAV, CHUAN e GOETZL, 2011; ZHAO *et al.*, 2013; VU *et al.*, 2014; ABAD *et al.*, 2015; DEL VALLE-PINERO *et al.*, 2015). Estudos

imunohistoquímicos realizados por Zhao *et al.* (2013) demonstraram o aumento de fibras VIP⁺ na lâmina própria, camada muscular e plexo mientérico em ratos com colite experimental induzida por DSS. Anteriormente esse aumento no nível de VIP em tecidos inflamados era associado às ações anti-inflamatórias desse neuropeptídeo (DELGADO, POZO e GANEA, 2004; ABAD *et al.*, 2003, GOMARIZ *et al.*, 2005. ABAD *et al.*, 2005; ABAD *et al.*, 2006; ARRANZ *et al.*, 2006,), porém, atualmente, o papel do VIP tem sido controverso e não totalmente esclarecido principalmente nas DII.

Nesse sentido, é possível destacar que em um modelo murino induzido por TNBS, foi demonstrado que a administração de VIP intraperitonal exerceu efeito protetor contra a inflamação na mucosa (ABAD *et al.*, 2003). Em contrapartida, Newman *et al.* (2005) verificou que a infusão contínua de VIP não reduziu as alterações resultantes da colite.

Adicionalmente a esse efeito impreciso do VIP, Vu *et al.*, (2014) revelou que camundongos knockout para VIP (VIP^{-/-}) são notavelmente resistentes à colite induzida por DSS, mostrando pouco ou nenhum dano clínico e histopatológico. Os mesmos autores obtiveram o mesmo resultado ao utilizar camundongos selvagens tratados com antagonistas para o receptor VPAC1, inibindo assim a sinalização VIP/VPAC1 e levando a supressão da inflamação na mucosa colônica.

Baseados nisso, estudos vem demonstrando que a homeostase imune intestinal não é controlada apenas pela quantidade de VIP ligante no tecido mas também pela quantidade e qualidade da expressão dos receptores VPAC 1 e VPAC2 (YADAV, CHUAN e GOETZL, 2011; ABAD *et al.*, 2015).

Nesse cenário, Abad *et al.* (2015) demonstrou que camundongos knockout para VIP, submetidos a colite experimental induzida por TNBS, não desenvolveram a resposta clínica exacerbada esperada. Apesar do grau de infiltração de células imunes no cólon estar aumentado, os animais apresentaram moderada perda de peso, danos histológicos leves e diminuição dos níveis de TNF α e Interleucina 6 (IL-6).

De uma maneira geral, os estudos relatados acima sugerem que nem todas as respostas imunológicas são afetadas da mesma maneira diante da ausência ou presença de VIP, isto é, ele pode ser protetor ou responsável pelo desencadeamento das DII, dependendo, ao menos em parte, do receptor que interagir. Essa hipótese é sustentada pelo estudo de Yadav, Chuan e Goetzl (2011), o qual determinou a importância da ligação do VIP ao receptor VPAC 1 para patogênese das DII e inferiu que o receptor VPAC 2 pode mediar as ações anti-inflamatórias do VIP em colite induzida

por DSS. Nesse estudo, os sinais clínicos, danos histológicos, atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de citocinas pró inflamatórias e expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9) em camundongos deficientes em VPAC1 após administração de DSS foram mais leves em comparação aos animais selvagens submetidos ao mesmo modelo de indução. Ao passo que não houve diferença significativa entre os animais VPAC2^{-/-} e animais selvagens submetidos ao DSS.

Dessa forma, pesquisas adicionais são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos nesses fenótipos, investigando a expressão dos receptores VPAC durante o curso da inflamação durante as DII, possibilitando o desenvolvimento de drogas precisas.

1.4.2 ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM HUMANOS

Pacientes com DII, ou seja, DC e retocolite ulcerativa (RCU) apresentam várias anormalidades estruturais e funcionais no SNE (GEBOES e COLLINS, 1998). Porém, análises atuais das modificações do SNE em humanos não são descritas tão amplamente como nos modelos experimentais em animais.

Duas hipóteses para a escassez de estudos em humanos com DII é a dificuldade de acesso às amostras e a falta de padronização das técnicas para amostras humanas. Dessa forma, as poucas avaliações do SNE em humanos não fornecem um mecanismo bem elucidado a respeito das alterações funcionais e estruturais no TGI.

1.4.2.1 ÓXIDO NÍTRICO E ACETILCOLINA

De acordo com as poucas evidências das alterações no SNE de pacientes com colite, é possível observar a morte de neurônios ChAT⁺ (NEUNLIST *et al.*, 2003; JONSSON *et al.*, 2007). Apesar de escassos, esses resultados estão de acordo com os achados em ratos com colite induzida por DSS (WILSTON *et al.*, 2013).

1.4.2.2 SUBSTÂNCIA P E A ATIVAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1

A SP desempenha um papel proinflamatório essencial através da modulação da migração de leucócitos e do extravassamento de plasma. Esse processo é acompanhado pela hipersensibilidade visceral e pode ser associado a dor aguda em

pacientes com DII, uma vez que o aumento nos níveis da expressão de TRPV1 foi observado em biópsias colônicas (YIANGOU *et al.*, 2001, KUN *et al.*, 2014;).

O aumento da expressão de TRPV1 também foi correlacionado com a gravidade da dor em pacientes com DII em remissão clínica, indicando esse receptor neuronal como um importante preditor de hipersensibilidade visceral (AKBAR *et al.*, 2010). Adicionalmente, um estudo realizado com células TCD4⁺ humanas e animais knockout para TRPV1 demonstrou redução na produção de citocinas inflamatórias, reforçando a importância dessa via para a regulação dos mecanismos envolvidos na dor visceral dos pacientes com DII (BERTIN, 2014).

Estudos mais recentes, realizados com segmentos do colo de pacientes com DII, também verificaram um aumento significativo de TRPV1 e fibras SP⁺ na submucosa nos pacientes com colite ulcerativa (FONTGALLAND *et al.*, 2014). Além disso, também foi demonstrado por esses autores a redução nas fibras nNOS⁺ ocorreu apenas em pacientes com DC, mas não em amostras de RCU. Essa mudança fenotípica vai de encontro aos achados anteriores que demonstraram o direcionamento da subpopulação colinérgica para expressão aumentada de SP frente ao processo inflamatório (NEUNLIST *et al.*, 2003).

1.4.2.3 PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO

Gomariz *et al.* (2005) mostrou que VIP é um componente importante para regulação fisiológica das funções intestinais, entretanto, em condições patológicas, os níveis de VIP foram associados com a atividade clínica em doenças inflamatórias (YUKAMA *et al.*, 2007; FONTGALLAND *et al.*, 2014, DEL VALLE-PINERO *et al.*, 2015). Alguns estudos em modelos animais descrevem um aumento, diminuição ou nenhuma alteração significativa na proporção desse neurotransmissor. Além disso, o potencial de VIP em direcionar o perfil de citocinas padrão Linfócito T helper 1 (Th1) ou Linfócito T helper 1 (Th2) nas DII já foi demonstrado (NIESSNER, 1995; DELGADO, 2002).

Diante desses estudos, YUKAWA *et al.* (2007), examinou pela primeira vez a localização do receptor para VIP no intestino humano. Através de técnicas de imuno-histoquímica, os autores verificaram que o receptor está amplamente expresso em células T inflamatórias infiltrantes na mucosa e lâmina própria dos pacientes com colite ulcerativa ativa. Segundo os autores, a diversidade das células inflamatórias

VPAC1⁺ nos pacientes com DII contribui para as diferenças no padrão de resposta Th1/Th2 na patogênese da DC) e colite ulcerativa, respectivamente. Essa afirmação baseia-se na relação do número de células T VPAC1⁺ e o aumento de Interleucina 4 (IL-4) na mucosa intestinal, refletindo no padrão Th2 nos pacientes com colite ulcerativa. Enquanto que a ativação das citocinas padrão Th1 observados em pacientes com DC, foi associada a marcação da infiltração de macrófagos VPAC1⁺ na mucosa.

A expressão significativamente aumentada de VIP circulante também foi observada em pacientes com a síndrome do intestino irritável, intensificando a hipótese de neuromodulação do neurotransmissor tanto no desenvolvimento quanto na continuação dos sintomas em doenças crônicas do TGI. Entretanto, os autores ressaltam a importância de avaliar os níveis da expressão de VIP na mucosa colônica simultaneamente a dosagem no sangue total devido aos vários fatores potencialmente interferentes, como hormônios intestinais (DEL VALLE-PINERO *et al.*, 2015).

1.5 TRATAMENTOS DE COLITE

Segundo Fiocchi (2014), a escolha de uma terapia apropriada é um dos múltiplos problemas ainda sem resposta no que diz respeito às DII. As alternativas terapêuticas medicamentosas disponíveis atualmente incluem agentes aminossalicílicos (5-ASA), esteroides e fármacos imunossupressores, utilizados para controlar a geração de citocinas e mediadores pró-inflamatórios na mucosa inflamada (BURGER e TRAVIS, 2011; VELIKOVA *et al.*, 2017).

Conforme Moss (2015), desde a introdução do Infliximabe, em 1998, terapias biológicas vêm sendo pesquisadas e utilizadas no tratamento das DII. Colombel, Narula e Biroulet (2016) descrevem que houve uma mudança no foco das estratégias terapêuticas do simples controle dos sintomas e melhoria na qualidade de vida para o bloqueio da progressão da doença, a fim de prevenir o dano e a incapacidade intestinal. Entretanto, os tratamentos atuais visam a doença já estabelecida e, mesmo os agentes mais potentes, não são capazes de prevenir ou reverter danos crônicos. Os autores sugerem que tratar de forma eficaz e precocemente, em um período que denominaram de “janela de oportunidade”, pode bloquear a progressão da doença, bem como os danos intestinais resultantes.

A utilização dos glicocorticóides é limitada pela deficiência na cicatrização da mucosa e pelos efeitos adversos associados ao uso permanente dessa terapia, como

retardo de crescimento, hiperglicemia, retenção de líquidos, alterações do humor e psicose, glaucoma, catarata, acne, atrofia de pele, osteonecrose, osteoporose e miopatia (RUTGEERTS, 2001; MOEENI e DAY, 2011; MRAKOTSKY *et al.*, 2013).

Além das alternativas medicamentosas, a intervenção dietética também vem demonstrando importância no tratamento das DII. Sabe-se que, dentre os fatores ambientais envolvidos na patogênese das DII, a dieta representa um importante componente por ser capaz de influenciar a microbiota intestinal, bem como modular componentes da inflamação intestinal (D'HAENS *et al.*, 2014; HARPER e ZISMAN, 2016). Gunasekeera *et al.* (2016) demonstraram que, em pacientes com doença de Crohn, alguns alimentos (carne bovina, carne de porco, ovo e leite) estimulam a produção de anticorpos IgG4, os quais induzem a degranulação dos mastócitos, resultando na hipersecreção da mucosa, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos e eosinófilos, refletindo na exacerbação da inflamação. Com isso, os autores apontam a dieta de exclusão guiada por IgG4 como um promissor agente adjuvante para melhorar a qualidade de vida e os sintomas em pacientes com DII.

Estudos recentes, desenvolvidos no Laboratório de Neurociência Entérica da UEL, apontam a fototerapia como outra abordagem terapêutica promissora para o tratamento das DII. Belém *et al.* (2016) examinaram o efeito da terapia com diodos emissores de luz (LED) no controle do processo inflamatório induzido por colite em camundongos. Os autores observaram o efeito protetor do LED através de diversos parâmetros inflamatórios como, por exemplo, diminuição do infiltrado inflamatório em todas as camadas intestinais, menor atividade da mieloperoxidase, redução do escore microscópico de dano tecidual e inibição da secreção de citocinas próinflamatórias. Além disso, o tratamento com LED foi capaz de restaurar a velocidade de trânsito intestinal e as dimensões (comprimento, diâmetro e área total) normais do cólon.

Esses resultados direcionam as DII como uma área de grande interesse para a pesquisa e desenvolvimento de terapias alternativas.

1.6 VIMPOCETINA: UMA POSSÍVEL ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA COLITE?

A terapia de manutenção para RCU é essencial para a qualidade de vida do paciente e na redução do agravamento da doença, uma vez que se não tratada apresenta episódios de recidivas 5 vezes maiores, aumentando o risco de desenvolver

câncer colorretal (POTACK, 2008). Esse aumento na pré-disposição está associado à exacerbação das reações imunológicas observadas no quadro ativo da RCU (YU,2009). Dessa forma, controlar a ativação das células imunológicas e a produção excessiva dos mediadores inflamatórios pode desempenhar um papel chave no tratamento da RCU.

Entre os fatores de transcrição envolvidos no processo inflamatório, o fator nuclear de cadeia leve kappa potenciador de células B ativadas (NF- κ B), desempenha um efeito fundamental na expressão dos genes que contribuem para a patogênese das DII. Em condições epiteliais intestinais normais, o NF- κ B (subunidades p65 e p50) está inativo no citoplasma através da ligação com I κ B (subunidade inibitória). Entretanto, frente a diferentes estímulos inflamatórios, a subunidade inibitória é fosforilada, ubiquitinada e conduzida para a degradação via proteossoma, liberando a translocação do NF- κ B para o núcleo. A ligação do fator de transcrição em sítios específicos do DNA específico induz a transcrição de genes pró inflamatórios como Interleucina 1 beta (IL-1 β), Ciclo-oxigenase 2 (COX-2), IL-6, Interleucina 22 (IL-22) e iNOS (DÍAZ-RIVAS *et al.*, 2015; OJEDA *et al.*; 2017; RAJA *et al.*, 2017; TEWARI *et al.*, 2017).

Atualmente, diversos modelos de colite experimental (FENG *et al.*, 2014; RASHIDIAN *et al.*, 2016; JEENGAR *et al.*; 2017; JIN *et al.*, 2017) vem demonstrando o papel regulador do NF- κ B na patogênese da doença através da imunomarcagem da p65 no núcleo, altos níveis no soro e no tecido inflamado de citocinas pró inflamatórias, alta atividade da mieloperoxidase e aumento dos escores histológicos e do índice de atividade da doença. Paralelamente aos efeitos inflamatórios, os autores demonstraram que ao administrar drogas bloqueadoras da via do NF- κ B os sintomas clínicos são aliviados, os parâmetros inflamatórios são reduzidos ou até mesmo extintos, melhorando assim a gravidade da inflamação do cólon. Esses dados contribuem para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para RCU.

Nesse cenário, a vimpocetina torna-se um alvo promissor no tratamento da RCU pois um dos seus mecanismos de ação envolve a inibição da sinalização intracelular via NF κ B. A vimpocetina é um éster etílico sintético produzido a partir da vincamina, um alcaloide extraído da planta *Vinca minor*. O nome químico da vimpocetina é etil de apoincaminato e sua estrutura é mostrada na Figura 5. A Vimpocetina é um sólido branco, com peso molecular de 350,5 g/mol, solúvel em etanol a 100%, dimetilsulfóxido e acetona (LORINCZ, SZASZ e KISFALUDY, 1976).

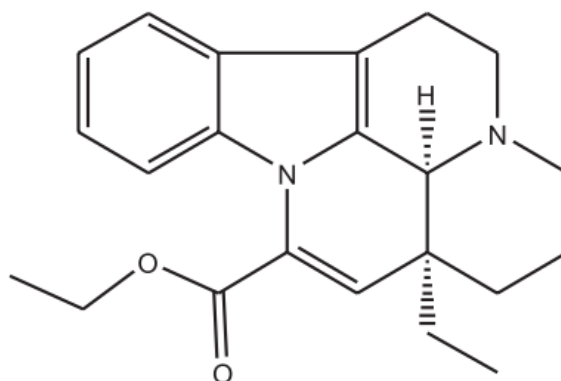


Figura 5: Estrutura química da vimpocetina.

Desde a sua descoberta, a vimpocetina tem sido amplamente utilizada para melhorar a circulação cerebral e função cognitiva e, atualmente, está sendo implementada na dieta como um suplemento para prevenção de desordens cerebrovasculares, como acidente vascular cerebral (AVC), demência e comprometimento de memória (SHANG, 2016; SOLOVYEVA, 2017; SWART *et al.*, 2017). Outros efeitos protetores da vimpocetina são descritos em lesões na retina, testiculares e renais (FATTORI *et al.*, 2017; NIVISON-SMITH *et al.*, 2017; SÖNMEZ *et al.*, 2017).

Importante destacar que estudo em animais demonstrou a sua eficácia na prevenção de lesões da mucosa gástrica induzidas por etanol a 95%, tanto por administração oral quanto intraperitoneal. A atividade anti-úlceras da vimpocetina também foi demonstrada, com redução na secreção de ácido gástrico (NOSALOVA, MACHOVA e BABULOVA, 1993). Não são descritos efeitos colaterais significativos decorrentes do uso da vimpocetina (FEIGIN *et al.*, 2001; SZATMARI e WHITEHOUSE, 2003). A vimpocetina possui diferentes alvos celulares e mecanismos de ação, os quais conduzem a sua atividade vasodilatadora, antioxidante e neuroprotetora bem estabelecida (ZHUANG *et al.*, 2013; WU, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Estudos recentes, (MIYAZAWA *et al.*, 2015; FATTORI *et al.*, 2017) relatam o papel anti-inflamatório da vimpocetina por suprimir a liberação de fatores inflamatórios, tais como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), moléculas de adesão, selectinas e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O mecanismo da vimpocetina envolvido nessa proteção, descrito pela primeira vez por Jeon *et al.*, (2010), é a inibição da ativação do fator de transcrição NF κ B e, subsequente, redução da transcrição de moléculas pró-inflamatórias. Os autores demonstraram que a inibição foi dependente da segmentação

direta de IKK (Fig. 6), de forma independente das ações já estabelecidas da vimpocetina em canais de sódio, cálcio e Fosfodiesterase tipo 1 (PDE-1). Além disso, a adesão de monócitos, quimiotaxia e infiltração de polimorfonucleares, processos considerados críticos durante a inflamação, também foram reduzidos pós tratamento com vimpocetina.

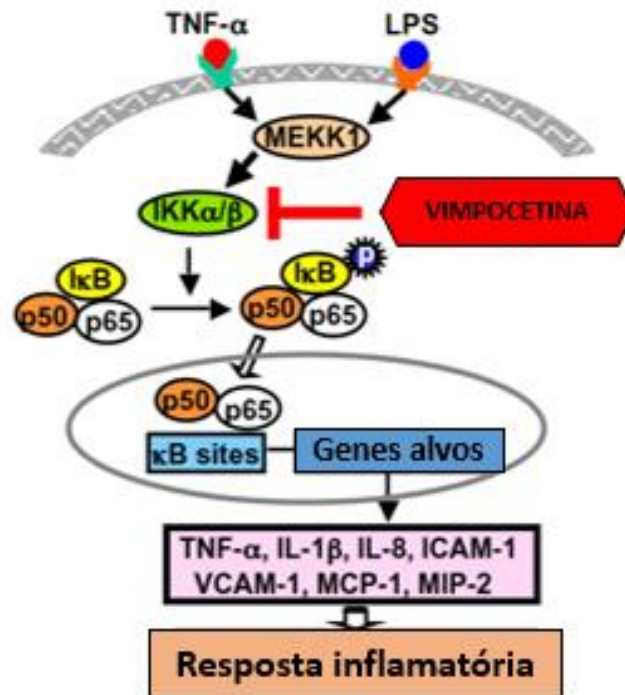


Figura 6: Diagrama esquemático que descreve como a vimpocetina inibe a resposta inflamatória in vitro e in vivo dependente de NFκB. Tal como indicado, vimpocetina inibe NFκB na resposta inflamatória por direcionamento direto de IKK, independente da sua ação bem conhecida sobre a PDE-1 e regulação de Na⁺, Ca²⁺ (Adaptado de Jeon *et al.*, 2010)

Zhuang *et al.*, (2013) observaram que moléculas pró-inflamatórias, como espécies reativas de oxigênio (EROs), IL-6, TNF-α e metaloproteinase-9 (MMP-9), liberados por macrófagos que fagocitaram LDLox, são inibidas pela vimpocetina.

A ativação das micróglia, os macrófagos residentes, constitui um evento inicial para o AVC. Uma vez ativadas, produzem mediadores inflamatórios (óxido nítrico, IL-1β, IL-6 e TNF-α) que contribuem para os danos isquêmicos no cérebro. A vimpocetina foi capaz de inibir a proliferação dessas células por meio de NFκB/AP-1, suprimindo a liberação dos fatores inflamatórios (ZHAO *et al.*, 2011).

A vimpocetina é um derivado sintético da vincamina amplamente comercializada por diversos laboratórios, como Biovea, Source Naturals, Century, Newton-Everett Biotech e Marjan Farma. As formas mais comuns de apresentação disponíveis no mercado são comprimidos de 5, 10 ou 30 mg. Conforme a bula do Vicog® (Marjan Farma), aprovada pela ANVISA em 2015, o medicamento é contraindicado para menores de 14 anos e gestantes sem orientação médica. Entretanto, não há restrições específicas para as demais faixas etárias, sendo bem tolerado nas doses recomendadas. O custo da vimpocetina pode ser considerado baixo, apresentando uma faixa de preço entre R\$ 30,00 e R\$ 50,00 dependendo do laboratório, apresentação e quantidade de comprimidos da embalagem.

As inúmeras evidências do papel anti-inflamatório da vimpocetina no sistema nervoso central, conduziu-nos à hipótese de que ela poderia exercer esses mesmos efeitos protetores em situações patológicas que envolvessem o sistema nervoso periférico, sobretudo em doenças relacionadas com distúrbios gastrointestinais, resultantes de alterações na atividade do sistema nervoso entérico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da administração oral de vimpocetina (30mg/kg) sobre a morfofisiologia do plexo mioentérico do cólon de camundongos com colite experimental induzida por ácido acético.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a densidade populacional e morfometria do corpo celular de neurônios mioentéricos gerais do cólon de camundongos com colite tratados com vimpocetina.
- Avaliar a densidade populacional e morfometria do corpo celular de neurônios mioentéricos nitrérgicos do cólon de camundongos com colite tratados com vimpocetina.
- Examinar a distribuição de fibras nervosas nociceptivas (Sustância P positivas) na parede do cólon de camundongos com colite tratados com vimpocetina.
- Investigar a presença de fibras de neurônios produtores de peptídeo intestinal vasoativo.

REFERÊNCIAS

- ABAD, C., MARTINEZ, C., JUARRANZ, M. G., *et al.* Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 124, n. 4, p. 961-971, 2003.
- ABAD, C., JUARRANZ, Y., MARTINEZ, C., *et al.* cDNA array analysis of cytokines, chemokines, and receptors involved in the development of TNBS-induced colitis: homeostatic role of VIP. **Inflammatory bowel diseases**, v. 11, n. 7, p. 674-684, 2005.
- ABAD, C., CHEUNG-LAU, G., COUTE-MONVOISIN, A. C., *et al.* Vasoactive intestinal peptide-deficient mice exhibit reduced pathology in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 3, p. 203-212, 2015.
- AKBAR, A., YIANGOU, Y., FACER, P., *et al.* Expression of the TRPV1 receptor differs in quiescent inflammatory bowel disease with or without abdominal pain. **Gut**, v. 59, n. 6, p. 767-774, 2010.
- ALICAN, I., KUBES, P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 270, n. 2, p. G225-G237, 1996.
- ARNOLD, W., MITTAL, C., KATSUKI, S. *et al.* Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.
- ARRANZ, A., ABAD, C., JUARRANZ, Y., *et al.* Effect of VIP on TLR2 and TLR4 Expression in Lymph Node Immune Cells During TNBS-Induced Colitis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1070, n. 1, p. 129-134, 2006.
- AUTERI, M., ZIZZO, M. G., AMATO, A., *et al.* Dopamine induces inhibitory effects on the circular muscle contractility of mouse distal colon via D1-and D2-like receptors. **Journal of Physiology and Biochemistry**, p. 1-10, 2017.
- AVERBECK, B., REEH, P. W. Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E 2 from isolated rat skin. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 3, p. 416-423, 2001.
- BARTHÓ, L., LENARD, L., PATACCHINI, R., *et al.* Tachykinin receptors are involved in the "local efferent" motor response to capsaicin in the guinea-pig small intestine and oesophagus. **Neuroscience**, v. 90, n. 1, p. 221-228, 1999.
- BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. The movements and innervation of the small intestine. **The Journal of physiology**, v. 24, n. 2, p. 99-143, 1899.
- BERNARDINI, N. SEGNANI, C., IPPOLITO, C., *et al.* Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 2, p. 318-327, 2012.

- BERTRAND, P. P., KUNZE, W. A. A., FURNESS, J. B., *et al.* The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. **Neuroscience**, v. 101, n. 2, p. 459-469, 2000.
- BITIREN, M., KARAKILCIK, A. Z., ZERIN, M., *et al.* Protective effects of selenium and vitamin E combination on experimental colitis in blood plasma and colon of rats. **Biological trace element research**, v. 136, n. 1, p. 87-95, 2010.
- BOISSÉ, L., CHISHOLM, S. P., LUKEWICH, M. K., *et al.* Clinical and experimental evidence of sympathetic neural dysfunction during inflammatory bowel disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 10, p. 1026-1033, 2009.
- BORNSTEIN, J. C., FURNESS, J. B., KUNZE, W. A. A. Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate?. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 48, n. 1, p. 1-15, 1994.
- BREHMER, A. **Structure of enteric neurons**. Springer Science & Business Media, 2006.
- BREHMER, A., RUPPRECHT, H., NEUHUBER, W. Two submucosal nerve plexus in human intestines. **Histochemistry and cell biology**, v. 133, n. 2, p. 149-161, 2010.
- BRIERLEY, S. M., JONES, R. C. W., GEBHART, G. F., *et al.* Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice. **Gastroenterology**, v. 127, n. 1, p. 166-178, 2004.
- BRIERLEY, S.M., LINDEN, D.R. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 10, p. 611-627, 2014.
- BROOKES, S. J., SPENCER, N. J., COSTA, M., *et al.* Extrinsic primary afferent signalling in the gut. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 5, p. 286-296, 2013.
- BRYANT, M. G., BLOOM, S. R., POLAR, J. M., *et al.* Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. **The Lancet**, v. 307, n. 7967, p. 991-993, 1976.
- BULA Vicog® (Marjan Farma) – Disponível em http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7023402015&pIdAnexo=2786269, acesso em 16 de agosto de 2017.
- BULT, H., BOECKXSTAENS, G. E., PELCKMANS, P. A., *et al.* Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, n. 6273, p. 346-347, 1990.
- BURGER, Daniel; TRAVIS, Simon. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1827-1837. e2, 2011.

CAGIN, Y. F., PARLAKPINAR, H., VARDI, N., *et al.* Effects of dexpanthenol on acetic acid-induced colitis in rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 12, n. 5, p. 2958-2964, 2016.

CAPUTI, V., MARSILIO, I., CERANTOLA, S., *et al.* Toll-Like Receptor 4 Modulates Small Intestine Neuromuscular Function through Nitroergic and Purinergic Pathways. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 350, 2017.

CHANG, M. M., LEEMAN, S. E. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *Journal of Biological Chemistry*, v. 245, n. 18, p. 4784-4790, 1970.

CHEAH, K. Y., BASTIAN, S. E., ACOTT, T. M., *et al.* Grape seed extract reduces the severity of selected disease markers in the proximal colon of dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 4, p. 970-977, 2013.

CLOSA, D., FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB life**, v. 56, n. 4, p. 185-191, 2004.

COLLINS, S. M.; SURETTE, M.; BERCIK, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 735, 2012.

COLOMBEL, J.; NARULA, N.; PEYRIN-BIROULET, L. Management strategies to improve outcomes of patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, v. 152, n. 2, p. 351-361. e5, 2017.

CONLIN, V. S., WU, X., NGUYEN, C., *et al.* Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, n. 4, p. G735-G750, 2009.

COSTA, M.; BROOKES, S.J.H; HENNIG, G.W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, n. suppl 4, p. iv15-iv19, 2000.

DA SILVA, M.S., SÁNCHEZ-FIDALGO, S., TALERO, E., *et al.* Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 467-475, 2010.

DA SILVA, B.C., LYRA, A.C., MENDES, C. M. C., *et al.* The demographic and clinical characteristics of ulcerative colitis in a Northeast Brazilian population. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DALE, H.H., FELDBERG, W. The chemical transmitter of vagus effects to the stomach. **The Journal of physiology**, v. 81, n. 3, p. 320-334, 1934.

DE ALMEIDA, A.B.A., SÁNCHEZ-HIDALGO, M., MARTÍN, A. R. Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L.(Asteraceae) in TNBS colitis model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 300-310, 2013.

DE SOUZA, H.S.P.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13, 2016.

- DE SOUZA, M.M.; BELASCO, A.G.S.; AGUILAR-NASCIMENTO, J.E. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 2008.
- DEL VALLE-PINERO, A. Y., SHERWIN, L. B., ANDERSON, E. M., *et al.* Altered vasoactive intestinal peptides expression in irritable bowel syndrome patients and rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 21, n. 1, p. 155, 2015.
- DELGADO, M. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP–NF- κ B interaction in activated microglia. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 297, n. 5, p. 1181-1185, 2002.
- DELGADO, M., POZO, D., GANEA, D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 249-290, 2004.
- DELMONDES, L.M., NUNES, M. O., AZEVEDO, A. R., *et al.* Clinical and Sociodemographic Aspects of Inflammatory Bowel Disease Patients. **Gastroenterology research**, v. 8, n. 3-4, p. 207, 2015.
- DEVOSS, J., DIEHL, L. Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD) Challenges of Modeling Human Disease. **Toxicologic pathology**, v. 42, n. 1, p. 99-110, 2014.
- D'HAENS, G. R., SARTOR, R. B., SILVERBERG, M. S., *et al.* Future directions in inflammatory bowel disease management☆. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 8, n. 8, p. 726-734, 2014.
- DHARMANI, P., LEUNG, P., CHADEE, K. Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. **PLoS one**, v. 6, n. 9, p. e25058, 2011.
- DÍAZ-RIVAS, J. O., HERRERA-CARRERA, E., GALLEGOS-INFANTE, J. A., *et al.* Gastroprotective potential of *Buddleja scordioides* Kunth Scrophulariaceae infusions; effects into the modulation of antioxidant enzymes and inflammation markers in an in vivo model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 169, p. 280-286, 2015.
- DIKSHIT, B. B. Acetylcholine formation by tissues. **Experimental Physiology**, v. 28, n. 3, p. 243-251, 1938.
- ELLRICHMANN, M., WIETZKE-BRAUN, P., DHAR, S., *et al.* Endoscopic ultrasound of the colon for the differentiation of Crohn's disease and ulcerative colitis in comparison with healthy controls. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 39, n. 8, p. 823-833, 2014.
- ENGEL, M. A., BECKER, C., REEH, P. W., *et al.* Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. **Inflammatory bowel diseases**, v. 17, n. 4, p. 1030-1033, 2011.
- ENGEL, M. A., KHALIL, M., MUELLER-TRIBBENSEE, S. M., *et al.* The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons. **Journal of gastroenterology**, v. 47, n. 3, p. 256-265, 2012.

- FATTAHIAN, E., HAJHASHEMI, V., RABBANI, M., *et al.* Anti-inflammatory Effect of Amitriptyline on Ulcerative Colitis in Normal and Reserpine-Induced Depressed Rats. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 15, n. Suppl, p. 125, 2016.
- FATTORI, V., BORGHI, S. M., GUAZELLI, C. F., *et al.* Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- κ B activation in mice. **Pharmacological research**, v. 120, p. 10-22, 2017.
- FEIGIN, V. L., DORONIN, B. M., POPOVA, T. F., *et al.* Vinpocetine treatment in acute ischaemic stroke: a pilot single-blind randomized clinical trial. **European journal of neurology**, v. 8, n. 1, p. 81-85, 2001.
- FENG, J., GUO, C., ZHU, Y., *et al.* Baicalin down regulates the expression of TLR4 and NF κ B-p65 in colon tissue in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 11, p. 4063, 2014.
- FILOGAMO, G., GABELLA, G. Effects of extrinsic denervation on synapses of myenteric plexus. **Journal of microscopy-oxford**, v. 9, n. 2, p. 281-&, 1970.
- FIOCCHI, C. Integrating omics: the future of IBD?. **Digestive Diseases**, v. 32, n. Suppl. 1, p. 96-102, 2014.
- FONTGALLAND, D., Brookes, S. J., GIBBINS, I., *et al.* The neurochemical changes in the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 26, n. 5, p. 731-744, 2014.
- FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.
- FURNESS, J. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, n. s1, p. 32-38, 2008.
- FURNESS, J.B. *et al.* The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. In: **Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease**. Springer New York, 2014. p. 39-71.
- FURNESS, J.B. *et al.* The enteric nervous system and its extrinsic connections. **Textbook of gastroenterology**, p. 15-39, 1999.
- FURNESS, J.B. *et al.* The gut as a sensory organ. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 1212, p. 729-740, 2013.
- FURNESS, J.B., COSTA, M. **The enteric nervous system**. Edinburgh etc.: Churchill Livingstone, 1987.
- FURNESS, J.B. *et al.* The enteric nervous system and its extrinsic connections. **Textbook of gastroenterology**, p. 15-39, 1999.

- FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.
- GABELLA, Giorgio. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 30, p. S59-S66, 1990.
- GASCHE, C., BERSTAD, A., BEFRITS, R., *et al.* Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 12, p. 1545-1553, 2007.
- GEBOES, K., COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 10, n. 3, p. 189-202, 1998.
- GHASEMI-PIRBALUTI, M., MOTAGHI, E., BOZORGI, H. The effect of menthol on acute experimental colitis in rats. **European journal of pharmacology**, v. 805, p. 101-107, 2017.
- GIBBINS, I. L. *et al.* Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. **Neuroscience letters**, v. 57, n. 2, p. 125-130, 1985.
- GOMARIZ, R. P., ARRANZ, A., ABAD, C., *et al.* Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 2, p. 491-502, 2005.
- GOYAL, R. K. Revised role of interstitial cells of Cajal in cholinergic neurotransmission in the gut. **The Journal of physiology**, v. 591, n. 21, p. 5413-5414, 2013.
- GRHKN, T., DOCKRAY, G. J. Characterization of the peptidergic afferent innervation of the stomach in the rat, mouse and guinea-pig. **Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 181-193, 1988.
- GROSS, K.J., POTHOUKAKIS, C. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 7, p. 918-932, 2007.
- GRUETTER, C. A., BARRY, B. K., MCNAMARA, D. B. *et al.* Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. **Journal of cyclic nucleotide research**, v. 5, n. 3, p. 211-224, 1979.
- GULBRANSEN, B.D.; SHARKEY, K.A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 11, p. 625-632, 2012.
- GUNASEKEERA, V., MENDALL, M. A., CHAN, D., *et al.* Treatment of Crohn's disease with an IgG4-guided exclusion diet: a randomized controlled trial. **Digestive diseases and sciences**, v. 61, n. 4, p. 1148-1157, 2016.
- HARPER, J. W.; ZISMAN, T. L. Interaction of obesity and inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 35, p. 7868, 2016.

HARMAR, A. J., FAHRENKRUG, J., GOZES, I., *et al.* Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 1, p. 4-17, 2012.

HARTMANN, R.M., MARTINS, M., TIEPPO, J., *et al.* Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. **Digestive diseases and sciences**, v. 57, n. 8, p. 2038-2044, 2012.

HIRATA, Y., IHARA, S., KOIKE, K. Targeting the complex interactions between microbiota, host epithelial and immune cells in inflammatory bowel disease. **Pharmacological research**, v. 113, p. 574-584, 2016.

HOLST, M.C., KELLY, J.B., POWLEY, T.L. Vagal preganglionic projections to the enteric nervous system characterized with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **Journal of Comparative Neurology**, v. 381, n. 1, p. 81-100, 1997.

HUIZINGA, J.D., LAMMERS, W.J.E. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 1, p. G1-G8, 2009.

HUTTENHOWER, C., KOSTIC, A.D.; XAVIER, R.J. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 843-854, 2014.

JEENGAR, M. K., THUMMURI, D., MAGNUSSON, M., *et al.* Uridine Ameliorates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

JEON, K. I., XU, X., AIZAWA, T., *et al.* Vinpocetine inhibits NF- κ B-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 21, p. 9795-9800, 2010.

JESSEN, K. R., SAFFREY, M. J., VAN NOORDEN, S., *et al.* Immunohistochemical studies of the enteric nervous system in tissue culture and in situ: localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance-P and enkephalin immunoreactive nerves in the guinea-pig gut. **Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 1717-1735, 1980.

JIN, B. R., CHUNG, K. S., CHEON, S. Y., *et al.* Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

JÖNSSON, M., NORRGÅRD, Ö., FORSGREN, S.. Presence of a marked nonneuronal cholinergic system in human colon: study of normal colon and colon in ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 11, p. 1347-1356, 2007.

JURJUS, A.R., KHOURY, N.N., REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 50, n. 2, p. 81-92, 2004.

KASER, A., ZEISSIG, S., BLUMBERG, R. Inflammatory bowel disease. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 573-621, 2010.

- KIANK, C., TACHÉ, Y., LARAUCHE, M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 1, p. 41-48, 2010.
- KONO, T., CHISATO, N., EBISAWA, Y., *et al.* Impaired nitric oxide production of the myenteric plexus in colitis detected by a new bioimaging system. **Journal of Surgical Research**, v. 117, n. 2, p. 329-338, 2004.
- KOON, H.W., SHIH, D., KARAGIANNIDES, I., *et al.* Substance P modulates colitis-associated fibrosis. **The American journal of pathology**, v. 177, n. 5, p. 2300-2309, 2010.
- KRUGER, G. M, MOSHER, J., BIXBY, S., *et al.* Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 657-669, 2002.
- KUN, J., SZITTER, I., KEMÉNY, Á., *et al.* Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108164, 2014.
- KWON, K. H., MURAKAMI, A., TANAKA, T., *et al.* Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 395-406, 2005.
- KUWAHARA, A., ISHIKAWA, T., MIKAMI, S. *et al.* Distribution of neurons containing immunoreactivity for gastrin-releasing peptide (grp), substance-p, and vasoactive intestinal polypeptide (vip) in the rat gastric wall. **biomedical research-tokyo**, v. 4, n. 5, p. 473-477, 1983.
- KYLOH, M., NICHOLAS, S., ZAGORODNYUK, V. P., *et al.* Identification of the visceral pain pathway activated by noxious colorectal distension in mice. **Frontiers in neuroscience**, v. 5, 2011.
- LAKE, J.I.; HEUCKEROTH, R.O. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 1, p. G1-G24, 2013.
- LAKHAN, S.E., KIRCHGESSNER, A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 37, 2010.
- LANGER, I., ROBBERECHT, P. Molecular mechanisms involved in vasoactive intestinal peptide receptor activation and regulation: current knowledge, similarities to and differences from the A family of G-protein-coupled receptors. 2007.
- LAPOINTE, T. K., BASSO, L., IFTINCA, M. C., *et al.* TRPV1 sensitization mediates postinflammatory visceral pain following acute colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 2, p. G87-G99, 2015.
- LARAUCHE, M, MULAK, A., TACHÉ, Y. Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. **Experimental neurology**, v. 233, n. 1, p. 49-67, 2012.

- LARSSON, L. I., FAHRENKRUG, J., DE MUCKADELL, O. S., *et al.* Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 9, p. 3197-3200, 1976.
- LEANDER, S., HÅKANSON, R., SUNDLER, F. Nerves containing substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalin or somatostatin in the guinea-pig taenia coli. **Cell and tissue research**, v. 215, n. 1, p. 21-39, 1981.
- LECCI, A., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Current opinion in pharmacology**, v. 2, n. 6, p. 630-641, 2002.
- LIES, B., BECK, K., KEPPLER, J., *et al.* Nitrergic signalling via interstitial cells of Cajal regulates motor activity in murine colon. **The Journal of physiology**, v. 593, n. 20, p. 4589-4601, 2015.
- LOFTUS, E.V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504-1517, 2004.
- LOMAX, A. E., FERNANDEZ, E., SHARKEY, K. A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 17, n. 1, p. 4-15, 2005.
- LOMAX, A.E. Anti-inflammatory effects of β 3-adrenoceptors: the burgeoning field of neurogastroimmunology. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, n. 9, p. 967-970, 2008.
- LOMAX, A.E., PRADHANANGA, S.; BERTRAND, P.P. Plasticity of neuroeffector transmission during bowel inflammation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 3, p. G165-G170, 2017.
- LÖRINCZ, C.S., SZASZ, K.; KISFALUDY, L. The synthesis of ethyl apovincamate. *Arzneimittel-Forschung*, v. 26, n. 10a, p. 1907-1907, 1975.
- LU, P. *et al.* The role of substance P in the maintenance of colonic hypermotility induced by repeated stress in rats. **Neuropeptides**, v. 56, p. 75-82, 2016.
- LUO, J., CAO, J., JIANG, X., *et al.* Effect of low molecular weight heparin rectal suppository on experimental ulcerative colitis in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 7, p. 441-445, 2010.
- LYNN, P., ZAGORODNYUK, V., HENNIG, G., *et al.* Mechanical activation of rectal intraganglionic laminar endings in the guinea pig distal gut. **The Journal of physiology**, v. 564, n. 2, p. 589-601, 2005.
- MALMFORS, G., LEANDER, S., BRODIN, E., *et al.* Peptide-containing neurons intrinsic to the gut wall. **Cell and tissue research**, v. 214, n. 2, p. 225-238, 1981.
- MANE N., GIL V., MARTINEZ-CUTILLAS M., *et al.* Differential functional role 693 of purinergic and nitrergic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation. *Acta Physiol* 694 (Oxf) 212: 293-305, 2014.

- BELÉM, M. O., DE ANDRADE, G. M., CARLOS, T.M. *et al.* Light-emitting diodes at 940nm attenuate colitis-induced inflammatory process in mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 162, p. 367-373, 2016.
- MANTYH, P. W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 63, p. 6-10, 2002.
- MATSUYOSHI, H., NAKAGAWA, T., ZHANG, G. X., *et al.* Changes in contractile and electrical activity in the ileum of DSS-induced colitis model W/W^v mutant mice. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, n. 3, p. 143-156, 2010.
- MATTEOLI, G., BOECKXSTAENS, G.E. The vagal innervation of the gut and immune homeostasis. **Gut**, p. gutjnl-2012-302550, 2012.
- MAYER, R., WONG, W. D., ROTHENBERGER, D. A., *et al.* Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. **Diseases of the colon & rectum**, v. 42, n. 3, p. 343-347, 1999.
- MOEENI, V., DAY, A. S. Impact of inflammatory bowel disease upon growth in children and adolescents. **ISRN pediatrics**, v. 2011, 2011.
- MOLODECKY, SOON, S., RABI, D. M., *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54. e42, 2012.
- MOUSAVIZADEH, K. RAHIMIAN, R., FAKHFOURI, G., *et al.* Anti-inflammatory effects of 5-HT receptor antagonist, tropisetron on experimental colitis in rats. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 38, p. 6-7, 2008.
- MOYNES, D. M., LUCAS, G. H., BEYAK, M. J., *et al.* Effects of inflammation on the innervation of the colon. **Toxicologic pathology**, v. 42, n. 1, p. 111-117, 2014.
- MRAKOTSKY, C., FORBES, P. W., BERNSTEIN, J. H., *et al.* Acute cognitive and behavioral effects of systemic corticosteroids in children treated for inflammatory bowel disease. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 19, n. 1, p. 96-109, 2013.
- NAKHAI, L.A., MOHAMMADIRAD, A., YASA, N., *et al.* Benefits of Zataria multiflora Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 43-50, 2007.
- NEUHUBER, W.L., KRESSEL, M., STARK, A., *et al.* Vagal efferent and afferent innervation of the rat esophagus as demonstrated by anterograde Dil and DiA tracing: focus on myenteric ganglia. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 70, n. 1, p. 92-102, 1998.
- NEUNLIST, M., AUBERT, P., TOQUET, C., *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 84-90, 2003.
- NEWMAN, R., CUAN, N., HAMPARTZOUMIAN, T., *et al.* Vasoactive intestinal peptide impairs leucocyte migration but fails to modify experimental murine colitis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 139, n. 3, p. 411-420, 2005.

- NIESSNER, M., VOLK, B. A. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 101, n. 3, p. 428-435, 1995.
- NIVISON-SMITH, L., KHOO, P., ACOSTA, M. L., *et al.* Pre-treatment with vinpocetine protects against retinal ischemia. **Experimental eye research**, v. 154, p. 126-138, 2017.
- NOSÁLOVÁ, V., MACHOVA, J., BABULOVÁ, A. Protective action of vinpocetine against experimentally induced gastric damage in rats. *Arzneimittel-Forschung*, v. 43, n. 9, p. 981-985, 1993.
- O'MEARA, S., NANDA, K.S.; MOSS, A. Antibodies to infliximab and risk of infusion reactions in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2014.
- ÖHMAN, L., SIMRÉN, M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 163-173, 2010.
- OJEDA, M. L., CARRERAS, O., SOBRINO, P., *et al.* Biological implications of selenium in adolescent rats exposed to binge drinking: Oxidative, immunologic and apoptotic balance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2017.
- PARENTE, J.M.L., COY, C.S.R., CAMPELO, V., *et al.* Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 21, n. 4, p. 1197, 2015.
- PELLEGRINI, C., FORNAI, M., COLUCCI, R., *et al.* Alteration of colonic excitatory tachykininergic motility and enteric inflammation following dopaminergic nigrostriatal neurodegeneration. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 146, 2016.
- PELLETIER, A.M., VENKATARAMANA, S., MILLER, K. G., *et al.* Neuronal nitric oxide inhibits intestinal smooth muscle growth. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 6, p. G896-G907, 2010.
- POOLE, D.P., LIEU, T., PELAYO, J. C., *et al.* Inflammation-induced abnormalities in the subcellular localization and trafficking of the neurokinin 1 receptor in the enteric nervous system. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 4, p. G248-G259, 2015.
- PORTER, J. P., SAID, S.I., GANONG, W.F. Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion in vitro: evidence for a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells. **Neuroendocrinology**, v. 36, n. 5, p. 404-408, 1983.
- QIAN, B.F., HAMMARSTRÖM, M.L., DANIELSSON, Å. Differential expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor 1 and 2 mRNA in murine intestinal T lymphocyte subtypes. **Journal of neuroendocrinology**, v. 13, n. 9, p. 818-825, 2001.
- RAHMAN, A. A., ROBINSON, A. M., JOVANOVSKA, V., *et al.* Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. **Cell and tissue research**, v. 362, n. 3, p. 497-512, 2015.

- RAHMAN, A. A., ROBINSON, A. M., JOVANOVSKA, V., A. *et al.* Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. **Cell and tissue research**, v. 362, n. 3, p. 497-512, 2015.
- RAHMAN, A.A., ROBINSON, A. M., BROOKES, S. J., *et al.* Rectal prolapse in Winnie mice with spontaneous chronic colitis: changes in intrinsic and extrinsic innervation of the rectum. **Cell and tissue research**, v. 366, n. 2, p. 285-299, 2016.
- RAJA, S. B., RAJENDIRAN, V., KASINATHAN, N. K., *et al.* Differential cytotoxic activity of Quercetin on colonic cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 92-106, 2017.
- RANDHAWA, P.K., SINGH, K., SINGH, N., *et al.* A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **The Korean journal of physiology & pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 279-288, 2014.
- RASHIDIAN, A., MUHAMMADNEJAD, A., DEHPOUR, A. R., *et al.* Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: the involvement of the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 109-118, 2016.
- RAYBOULD, H.E. Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. **Autonomic Neuroscience**, v. 153, n. 1, p. 41-46, 2010.
- ROBERTS, J.A. *et al.* Oxidative stress disrupts purinergic neuromuscular transmission in the inflamed colon. **The Journal of physiology**, v. 591, n. 15, p. 3725-3737, 2013.
- RUIZ-MIYAZAWA, K. W., ZARPELON, A. C., PINHO-RIBEIRO, *et al.* Vinpocetine reduces carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in mice by inhibiting oxidative stress, cytokine production and NF- κ B activation in the paw and spinal cord. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0118942, 2015.
- RUTGEERTS, P. J. The limitations of corticosteroid therapy in Crohn's disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 15, n. 10, p. 1515-1525, 2001.
- SAID, S.I., MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. **Science**, v. 169, n. 3951, p. 1217-1218, 1970.
- SAID, S.I., ROSENBERG, R.N. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. **Science**, v. 192, n. 4242, p. 907-908, 1976.
- SANDERS, K. M., WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 262, n. 3, p. G379-G392, 1992.
- SANDERS, K.M., KOH, S, RO,S., *et al.* Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 11, p. 633-645, 2012.
- SARNA, S.K. Colonic motility: from bench side to bedside. In: **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function**. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. p. 1-157.

- SARNA, S.K. Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, n. 4, p. G545-G555, 2006.
- SCHEMANN, M., GRUNDY, D. Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 263, n. 5, p. G709-G718, 1992.
- SCHULTZBERG, M., DREYFUS, C. F., GERSHON, M. D., *et al.* VIP-, enkephalin-, substance P-and somatostatin-like immunoreactivity in neurons intrinsic to the intestine: immunohistochemical evidence from organotypic tissue cultures. **Brain research**, v. 155, n. 2, p. 239-248, 1978.
- SHAHBAZIAN, A., HOLZER, P. Regulation of guinea pig intestinal peristalsis by endogenous endothelin acting at ET B receptors. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 80-88, 2000.
- SHANG, Y., WANG, L., LI, Y., *et al.* Vinpocetine improves scopolamine induced learning and memory dysfunction in C57 BL/6J mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 9, p. 1412-1418, 2016.
- SHI, X., WINSTON, J., SARNA, S.K. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 1, p. G41-G51, 2011.
- SHIMIZU, Y., MATSUYAMA, H., SHIINA, T., *et al.* Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 295-311, 2008.
- SOLOVYEVA, E. Y., KARNEEV, A. N., CHEKANOV, A. V., *et al.* Complex application 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine-succinate and vinpocetine in cerebrovascular disorder. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni SS Korsakova**, v. 117, n. 5, p. 103, 2017.
- SÖNMEZ, M. F., OZDEMIR, Ş., GUZEL, M., *et al.* The ameliorative effects of vinpocetine on apoptosis and HSP-70 expression in testicular torsion in rats. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 92, n. 2, p. 92-99, 2017.
- SOUZA, M.H.L., TRONCON, L.E.D.A., RODRIGUES, C.M. *et al.* Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 39, n. 2, p. 98-105, 2002.
- STEINHOFF, M. S., VON MENTZER, B., GEPPETTI, P., *et al.* Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. **Physiological reviews**, v. 94, n. 1, p. 265-301, 2014.
- STROBER, W., FUSS, I., MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 514, 2007.

SULUVOY, J.K., SAKTHIVEL, K. M., GURUVAYOORAPPAN, C. Protective effect of *Averrhoa bilimbi* L. fruit extract on ulcerative colitis in wistar rats via regulation of inflammatory mediators and cytokines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 1113-1121, 2017.

SUN, L., NAVA, G.M., STAPPENBECK, T.S. Host genetic susceptibility, dysbiosis and viral triggers in IBD. **Current opinion in gastroenterology**, v. 27, n. 4, p. 321, 2011.

SUNG, T. S., LA, J. H., KIM, T. W., *et al.* Alteration of nitrenergic neuromuscular transmission as a result of acute experimental colitis in rat. **Journal of veterinary science**, v. 7, n. 2, p. 143-150, 2006

SWART, P. C., CURRIN, C. B., RUSSELL, V. A., *et al.* Early ethanol exposure and vinpocetine treatment alter learning-and memory-related proteins in the rat hippocampus and prefrontal cortex. **Journal of neuroscience research**, v. 95, n. 5, p. 1204-1215, 2017.

SZATMÁRI, S., WHITEHOUSE, P. Vinpocetine for cognitive impairment and dementia. **The Cochrane Library**, 2003.

TAN, L. L., BORNSTEIN, J. C., ANDERSON, C. R. Distinct chemical classes of medium-sized transient receptor potential channel vanilloid 1-immunoreactive dorsal root ganglion neurons innervate the adult mouse jejunum and colon. **Neuroscience**, v. 156, n. 2, p. 334-343, 2008.

TEWARI, P., MANDAL, P., ROY, R., *et al.* A novel function of TLR4 in mediating the immunomodulatory effect of Benzanthrone, an environmental pollutant. **Toxicology Letters**, v. 276, p. 69-84, 2017.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853, 2002.

UESAKA, T., YOUNG, H., PACHNIS, V. Toshihiro *et al.* Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut. **Developmental biology**, v. 417, n. 2, p. 158-167, 2016.

UTSUMI, D., MATSUMOTO, K., AMAGASE, *et al.* 5-HT₃ receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 11, p. 1835-1849, 2016.

VANNER, S.; MACNAUGHTON, W.K. Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, n. s1, p. 39-43, 2004.

VASINA, V., BARBARA, G., TALAMONTI, L. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. **Autonomic Neuroscience**, v. 126, p. 264-272, 2006.

VELIKOVA, T., KYURKCHIEV, D., SPASSOVA, Z., *et al.* Alterations in cytokine gene expression profile in colon mucosa of Inflammatory Bowel Disease patients on different therapeutic regimens. **Cytokine**, v. 92, p. 12-19, 2017.

VICTORIA, C.R., SASSAK, L.Y., NUNES, H.R.C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20-25, 2009.

- VOICE, J., DORSAM, G., CHAN, R.C., *et al.* Immunoeffector and immunoregulatory activities of vasoactive intestinal peptide. *Regulatory peptides*, v. 109, n. 1, p. 199-208, 2002.
- VU, J. P., MILLION, M., LARAUCHE, M., *et al.* Inhibition of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) induces resistance to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 37-47, 2014.
- WINSTON, J.H.; LI, Q., SARNA, S.K. Paradoxical regulation of ChAT and nNOS expression in animal models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 4, p. G295-G302, 2013.
- WIRTZ, S., NEUFERT, C., WEIGMANN, B., *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature protocols**, v. 2, n. 3, p. 541-546, 2007.
- WU, M. P., ZHANG, Y. S., XU, X., *et al.* Vinpocetine Attenuates Pathological Cardiac Remodeling by Inhibiting Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 31, n. 2, p. 157-166, 2017.
- XAVIER, R.J., PODOLSKY D.K. Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.448, n. 7152,p.427-434, 2007.
- XUE, L., FARRUGIA, G., MILLER, S. M., *et al.* Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1851-1855, 2000.
- YADAV, M., GOETZL, E.J. Vasoactive Intestinal Peptide–Mediated Th17 Differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1144, n. 1, p. 83-89, 2008.
- YIANGOU, Y., FACER, P., DYER, N. H. C., *et al.* Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. **The Lancet**, v. 357, n. 9265, p. 1338-1339, 2001.
- YU, H., PARDOLL, D., JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 11, p. 798, 2009.
- YUKAWA, T., OSHITANI, N., YAMAGAMI, H., *et al.* Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptor 1 expression in inflammatory bowel disease. **International journal of molecular medicine**, v. 20, n. 2, p. 161-167, 2007.
- ZABIHI, M., HAJHASHEMI, V., TALEBI, A., *et al.* Evaluation of central and peripheral effects of doxepin on acetic acid-induced colitis in rat and the involved mechanisms. **EXCLI journal**, v. 16, p. 414, 2017.
- ZAGORODNYUK, V.P. *et al.* Loss of visceral pain following colorectal distension in an endothelin-3 deficient mouse model of Hirschsprung's disease. **The Journal of physiology**, v. 589, n. 7, p. 1691-1706, 2011.

ZHANG, W., HUANG, Y., LI, Y., *et al.* Efficacy and Safety of Vinpocetine as Part of Treatment for Acute Cerebral Infarction: A Randomized, Open-Label, Controlled, Multicenter CAVIN (Chinese Assessment for Vinpocetine in Neurology) Trial. **Clinical drug investigation**, v. 36, n. 9, p. 697-704, 2016.

ZHAO, P., SUN, H. X., CHU, M., *et al.* Inhibitory Effects of Botulinum Toxin Type A on Pyloric Cholinergic Muscle Contractility of Rat. *The Chinese journal of physiology*, v. 59, n. 4, p. 218-224, 2016.

ZHAO, P., DONG, L., LUO, J. Y., *et al.* Possible Role of Mast Cells and Neuropeptides in the Recovery Process of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in Rats. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 28, n. 1, p. 28-33, 2013.

ZHAO, Y. Y., YU, J. Z., LI, Q. Y. *et al.* TSPO-specific ligand vinpocetine exerts a neuroprotective effect by suppressing microglial inflammation. **Neuron glia biology**, v. 7, n. 2-4, p. 187-197, 2011.

ZHU, H., LI, Y.R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 5, p. 474-480, 2012.

ZHUANG, J., PENG, W., LI, H., *et al.* Inhibitory effects of vinpocetine on the progression of atherosclerosis are mediated by Akt/NF- κ B dependent mechanisms in apoE^{-/-}mice. *PLoS One*, v. 8, n. 12, p. e82509, 2013.

ARTIGO CIENTÍFICO

VINPOCETINE HAS LOW PROTECTOR EFFECT ON THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN ACETIC ACID-INDUCED ACUTE COLITIS MICE

Renata Streck Fernandes*, Victor Fattori**, Waldiceu Aparecido Verri Júnior**, Eduardo José de Almeida Araújo*.

*Department of Histology. Universidade Estadual de Londrina. Paraná, Brazil.

**Department General Pathology. Universidade Estadual de Londrina. Parana, Brazil.

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

Background: Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic and relapsing inflammation that affects the gastrointestinal tract (GIT). IBD usually causes damage to enteric nervous system (ENS) and, no gold standard treatment is available. Due its anti-inflammatory property, we aimed to evaluate the effect of treatment with vinpocetine on the ENS structure in inflamed colon.

Methods: Distal colitis was induced by rectal administration of 7.5% acetic acid in Swiss mice. Mice were treated with vinpocetine (30 mg/kg/v.o.) 2 hours before and 4, 10 and 16 hours after of colitis induction. Mice were euthanized at 18h post-acetic acid administration. Protein gene product 9.5 (PGP9.5), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), choline acetyltransferase (ChAT), vasoactive intestinal peptide (VIP) and substance P (SP) were detected by immunofluorescence in whole mounts of myenteric plexus and sections of distal colon.

Results: ENS was present in the inflamed colon and the number of myenteric neurons unchanged. On the other hand, general myenteric neurons were hypertrophied and nitrenergic myenteric neurons were atrophied. Besides, the number of VIP⁺ and SP⁺ fibres was apparently increased. No changing was observed for cholinergic neurons. The treatment with vinpocetine improved partially the morphometric alterations observed in cell bodies, but had no effect on the VIP⁺ and SP⁺ fibres.

Conclusions: Vinpocetine low protective effect for the ENS in acetic acid-induced colitis mice.

Key words: ulcerative colitis, anti-inflammatory drugs, neuroplasticity, neurotransmitters.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic and relapsing inflammation that affects the gastrointestinal tract (GIT). Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are the two main forms of IBD^{1,2}. Both are considered a public health problem due to the increasing incidence in a productive age group (20 to 30 years), especially in developing countries, with significant personal and social impacts. Although the pathogenesis of these diseases is not well understood, evidence suggests that the interaction of environmental, genetic, microbiota and immunological components are involved in the initiation and progression of IBD³⁻⁵.

The main clinical manifestations are abdominal pain, diarrhoea, bloody stools and weight reduction⁶. Abdominal pain and diarrhoea suggest functional alterations resulting from the rupture of neural control of the intestine, performed by intrinsic neurons of the GIT (enteric nervous system - ENS) and extrinsic reflexes (sympathetic and parasympathetic pathways).^{7,8} Regarding the ENS, its two ganglionated plexi (submucosal and myenteric) usually undergo structural alterations in IBD⁹⁻¹².

Due to the functional implications caused by the structural changes of the ENS, many studies have sought to trace a profile of modifications in the production of neurotransmitters and their receptors in experimental models of IBD. In this sense, studies have demonstrated impairment of myenteric neurons that produce acetylcholine, nitric oxide, vasoactive intestinal peptide (VIP) and substance P (SP)^{9,11,13-15}. As these neurotransmitters may be present in afferent neurons, interneurons and motor neurons¹⁶, it is suggested that the intense inflammation observed in IBD causes changes in myenteric neuronal circuits that may be related to the motility disorders observed in this disease^{17,18}. It is worth noting that besides these neurotransmitters modulate the functioning of neurons and smooth muscle cells, VIP and SP also modulate the activity of cells of the immune system present in the intestinal wall¹⁹⁻²¹.

Fortunately, neuronal circuits altered by GIT diseases tend to adapt in order to recover function. This neuronal adaptation may be of great importance for the relief of IBD symptoms, if it is successful. Therefore, the study of enteric neuroplasticity in IBD is fundamental for the development of therapeutic interventions that have intrinsic innervation as the target, since the current treatments are aimed at restoring the mucosa, not being completely effective in reducing the symptoms, besides they have long-term side effects²².

Due to structural changes in the ENS come from intense inflammation of the intestinal wall, the use of NFκB inhibitors may be considered a possible treatment alternative to be investigated. NFκB inhibitors have been shown to have important anti-inflammatory effects by reducing proinflammatory cytokines and inhibiting the generation of reactive oxygen and nitrogen species.²³⁻²⁵

Vinpocetine (phosphodiesterase type 1 inhibitor) is a safe nootropic produced from an alkaloid extracted from the *Vinca minor* plant²⁶. Since its discovery in 1978, this drug has been demonstrating beneficial effects in brain-vascular disorders and, more recently, its anti-inflammatory role has been highlighted due vinpocetine is able to inhibit NF-κB-dependent inflammation response²⁷. Therefore, we hypothesized that vinpocetine could act as an anti-inflammatory in an acetic acid-induced experimental colitis model and contribute to restore ENS changes caused by IBD.

In the present study we showed what experimental colitis induced by acetic acid resulted histologic damages in the colon and on the ENS. Furthermore, we analyzed the effect of oral treatment with vinpocetine, an interesting anti-inflammatory against colitis induced by acetic acid.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Swiss mice (28.7±5.2g) from the Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil, were used in this study. Mice housed in standard clear plastic cages with free access to food and water and a light/dark cycle of 12-12h at 21°C.

Groups Experimentals

Forty-five mice were randomly assigned into three experimental groups (n=15/group): (1) Control: healthy animals; (2) Colitis: colitis mice with no treatment; and

(3) Colitis + Vinpocetine: colitis mice treated with vinpocetine. Mice received orally administration of vinpocetine (vinpocetine powder at >98% purity (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) (30 mg/kg, 150 μ L) or vehicle (80% sterile saline + 20% tween 20) 2 hours before and 4, 10 and 16 hours after of colitis induction. The dose of 30 mg/Kg vimpocetin was determined according to previous studies which demonstrated antiinflammatory effect on different models of inflammation^{28,29,30}.

Colitis Induction

Colon inflammation was induced as previously described with modifications³¹. Mice were fasted for 12 h and anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/kg, i.m.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.m.). Initially, all mice received 100 μ L of saline through the rectum using a 3 cm-polyethylene cannula. Colitis was induced by rectal administration of 200 μ L of acetic acid 7.5% (pH 2.5). Control group received same volume rectal administration of saline instead.

Euthanasia And Tissue Collection

After 18 hours of induction of colitis, all mice were euthanized using an euthanasia chamber with halothane vapour saturation (Tanohalo[®], Cristália Produtos. Químicos LTDA, Itapira – SP/Brazil). Colon extraction was performed and its total length were measured.

Evaluation of Microscopic Lesion

For microscopic analysis, one centimeter-fragments of the distal colon were fixed in paraformaldehyde 4% for 3 hours, processed for paraffin embedding and hematoxylin and eosin staining. Microscopic lesions of distal colon sections were examined at 100 and 200 \times magnification considering the following alterations in the colonic tissue: loss of mucosal architecture, cellular infiltrate, edema of the submucosa and abscess formation in the crypts.

Immunofluorescence

A 1 cm distal segment of each colon was used to froze in O.C.T. compound (Tissue-Tek[®], Sakura Finetek – USA). Colonic cross-sections were made using a cryostat (Leica 1850), which were submitted to standard immunofluorescence technique

in order to label neuronal structures using primary antibodies for protein gene product 9.5 (PGP9.5), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), choline acetyltransferase (ChAT); vasoactive intestinal peptide (VIP) and substance P (SP), as shown on the Table 1.

The remaining colons were washed with 0.1 M Tampão Fosfato-salino (PBS) (pH 7.4) and fixed using Paraformaldehyde 4% fixative solution for 3 hours at room temperature. The colons were stored in 0.1 M PBS, pH 7.4, containing 0.08% sodium azide at 4°C for microdissection using a stereomicroscope. Whole mounts containing the external muscular layer and myenteric plexus were processed according to standard immunofluorescence technique using the primary antibodies for PGP9.5 and nNOS.

Qualitative Analysis

This analysis was made using the colonic cross-section. It was observed the presence of neuronal structures from the ENS considering the general population (PGP9.5) and the nitrergic, VIPergic and SP-containing neuronal subpopulations. Cell bodies and extensions in all layers were observed and compared between the three experimental groups.

Quantitative Analysis

The total number of cell bodies of myenteric neurons immunolabelled for PGP 9.5 and nNOS was counted in 32 images / mouse / group obtained from a fluorescence microscope (Axioscop Plus light microscope, Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 20x objective. Each image had 0.0014 cm² and the number of neurons was projected to 1 cm² to calculate the population density of myenteric neurons. Besides, immunoreactivity of 100 myenteric cell bodies from each mouse were measured for their area (µm²) of labelling for PGP9.5 and nNOS using Image Pro-Plus 4.5v software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Statistical Analysis

All data were expressed as the mean±SEM. Data were analysed to determine the distribution using the Shapiro-Wilk test. Significant statistical differences were identified using the two-way ANOVA test, followed by Bonferroni post hoc test. For this purpose, the GraphPad Prism6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used. The significance level was set to 5%.

ETHICAL CONSIDERATIONS

Animal care and handling procedures were approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (process number 15933.2016.37). All efforts were made to minimize animals' suffering and to reduce the number of animals used.

RESULTS

Acetic acid administration to mice induced an inflammatory response characterized by inflammatory infiltrate in all intestinal layers, mainly in the mucosa and submucosa, loss of the structure of the mucosa and edema in the submucosa layer. Treatment with vinpocetine preserved the mucosal architecture, reduced infiltration of immune cells, and partially decreased colitis-induced edema (Fig. 1 A-C). The qualitative analysis in sections showed degeneration of the mucosa and edema of the submucosa in all colitis mice (Fig. 2 A-C). In the external muscle of the colitis mice, it was possible to see the myenteric plexus with neurons positive for PGP9.5, nNOS (Fig. 2 D-F) and ChAT (Fig. 2 G-I) apparently without morphologic changes. nNOS⁺ fibres were innervating the external muscle, mucosa and muscularis mucosae, but no morphologic changes were observed because the inflammation (Fig. 3 A-B). Cholinergic neurons were seen in the myenteric and submucosal plexi without changing provoked by the inflammation (Fig. 3 C-D). The treatment with vinpocetine improved partially the edema of the submucosa (Fig. 1C) and did not interfere in the presence of nNOS⁺ and ChAT⁺ structures in the myenteric and submucosal plexi (Fig. 2 and Fig. 3). Regarding the labelling for VIP and SP, it was observed an increase of the both fibres mainly in the muscle layer and also in the mucosa (except for SP) of the colon from colitis mice, which was not altered by the treatment with vinpocetine (Fig. 4).

The quantitative analysis in whole-mounts showed no changing in the number of general (PGP9.5⁺) and nitrergic (nNOS⁺) myenteric neurons because the colitis or the treatment with vinpocetine ($p > 0.05$; Table 2; Fig. 5). Regarding the size of myenteric neurons, the colitis provoked an increase of 38.7% in cell bodies of general neurons and reduced the cell bodies of nitrergic neurons about 20%. The treatment with vinpocetine improved partially these morphometric changes, but not reaching the control level ($p < 0.05$; Table 3). Besides, the total length of colon was not altered by the colitis (5.9 ± 0.3 cm) or the treatment with vinpocetine (6.5 ± 0.3 cm) in relation to control (6.9 ± 0.8 cm).

DISCUSSION

In this report, we evaluated structural alterations of ENS in acetic acid-induced colitis mice and the effect of the treatment with vinpocetine. Vinpocetine is a drug well established for the treatment of cerebro-vascular disease and cognitive impairment³², since vinpocetine demonstrates to improve brain blood flow causing enhancing oxygen and glucose supply for neurons³²⁻³⁴. Besides, vinpocetine demonstrated property to inhibit NF- κ B-dependent inflammatory response by directly targeting I κ B kinase complex²⁷, thus it has been considered an anti-inflammatory drug. For this reason, as the colitis can be developed via several inflammatory mechanisms including the NF- κ B-dependent inflammatory response³⁵, we hypothesized if vinpocetine could control the inflammation process caused by the acetic acid administration and protect the damage caused to the ENS in colitis mice.

According to results using the general neuronal marker PGP9.5, the structure of the ENS was preserved in colitis mice. Myenteric ganglia were visualized in cross-sections and neuronal extensions were present in the external muscle layer. Rare submucosal ganglia and several mucosal nerve fibres were also visualized. nNOS⁺ fibres were observed innervating several structures, but they were not increased because the inflammation. DSS-induced colitis in mice provoked increase of labelling of nNOS and production of nitric oxide after 6 days post induction, which was correlated to lesions normally observed in the disease³⁶. Interestingly, it was demonstrated that the DSS-induced inflammation causes an upregulation of neuropeptide Y (NPY) and then an increasing of nNOS⁺ fibres. Despite the intense inflammation provoked by the administration of acetic acid, we did not observe increase or reduction of nNOS⁺ fibres probably because the time course of the experiment (18h). It means that alterations of the ENS because inflammation probably happens after 18h. This suggestion can be supported by Sung (2006)³⁷ which showed that acetic acid-induced colitis in rats did not alter the circular muscle contraction even 48h post induction. We used 18h as time course considering our previous studies which showed intense inflammation after the colitis induction with acetic acid at this time point³⁸.

We observed in colonic cross-sections that the mucosa and submucosa were damage in colitis mice as extensively described on the literature^{39,40,41}. Despite the submucosal plexus and myenteric were visible, the innervation of the mucosa, submucosa and external muscle was changed. There was an increase of SP- and VIP-

containing fibres, which probably have different functional implications. Increasing of SP⁺ fibres happened mainly in the external muscle and poorly in the mucosa as also observed in previous studies^{42,43}. SP released by enteric neurons can alter the function of the muscularis mucosae, external muscle, smooth muscle in the blood vessels, epithelial ion transport and immune cells via the neuronkinin-1 receptor^{19,44}. In colitis, SP is usually increased and it was associated with weight loss, diarrhoea, rectal bleeding, colon shortening, increasing of MPO, TNF- α and Interferon gamma (IFN- γ) in DSS-induced colitis^{39,44,45}. Besides the effector response for the releasing of SP, were demonstrated the potential association of SP with pain receptors (TRPV1) and fibres in the colon^{46,47}. Since capsaicin (an agonist for the TRPV1 receptor) provokes greater releasing of SP in inflamed colon compared with non-inflamed⁴⁸, the increasing of SP⁺ fibres could be correlated with the intense abdominal pain complained by IBD patients. Recently, it was demonstrated co-localization of TRPM8 and SP in inflamed colon⁴⁹, which have been considered one pathway to trigger abdominal pain in IBS patients. The treatment with vinpocetine did not change the increasing of SP⁺ fibres in colitis mice.

Regarding the increasing of VIP⁺ fibres, it is known that this peptide has a regulator role for the intestinal immune pathways^{15,43,50} and also causes relaxation of the smooth muscle cells⁵¹. Many studies have demonstrated the involvement of VIP in experimental colitis^{43,52,53} and in IBD patients^{21,46,50}. The absence of VIP secretion causes attenuation of inflammatory responses from mice exposed to DSS⁵³. However, rats exposed to DSS with signs of colitis demonstrated no changing of VIP⁺ fibres⁴³. Rather than VIP secretion, studies have highlighted the importance of its receptor for the pathogenesis of experimental colitis. There are two receptors for VIP: VPAC1 and VPAC2. Knockout mice for VPAC1 does not develop acute colitis when exposed to DSS; on the other hand, knockout mice for VPAC2 and wild-type mice develop acute colitis⁵². Further, an experimental study using VPAC1 receptor-specific antagonist in DSS-exposed mice demonstrated resistance to induce colitis⁵³. In humans, it was showed that VPAC1 is increased in ulcerative colitis patients mainly in innate immune cells positive for TNF- α located in the lamina propria and submucosa²¹. All these results support the importance of VPAC1 receptor for the pathogenesis of experimental colitis. The treatment with vinpocetine did not improve the increasing of VIP⁺ fibres in colitis mice.

Regarding the counting of myenteric neurons, we observed no changing because the inflammation and we attributed this result also to time course of this

experiment (18h). Probably, loss of myenteric neurons requires more time facing inflammation. Unaltered number of myenteric neurons could also support the Sung's results (2006)³⁷ that showed no changes in the colonic circular muscle contraction in rats with acetic acid-induced colitis 48h post induction. In order to highlight the relevance of the exposition time of myenteric neurons to intestinal wall inflammation, it was revealed that *Winnie* (*Win/Win*) mice and knockout mice for TLR4, which spontaneously develop colitis, showed loss of myenteric neurons after 12-16 weeks old¹¹ or 9-10 weeks old⁵⁴ respectively. Considering chemical agent-induced colitis, rats exposed to DSS for 7 days also had reduction of myenteric neurons, specially in the distal colon⁵⁵. Other study showed that rats exposed to dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) also showed loss of myenteric neurons⁵⁶. Despite the unchanged number of myenteric neurons, we observed that general myenteric neurons were hypertrophic and nitrergic neurons were atrophic because the colitis and the treatment with vinpocetine improved partially this effect. As the number of nNOS⁺ fibres apparently did not change because the inflammation, we suggest that alterations in the cell body not always implicate in modification on the neuronal extensions. Morphometric alterations can be considered indicative of neuroplasticity and this cellular behaviour is very important to survival of neurons^{57,58}. Alteration of the neuronal cell body area is a very common finding in several studies evaluating the ENS, but this parameter has been neglected in most of investigations involving experimental colitis. For this reason, there is no previous information about neuronal cell body area in inflamed colon of colitis mice.

Considering the treatment with vinpocetine, the alterations that we observed in the ENS because the inflammation induced by acetic acid did not improve or improved partially. The complexity of colitis could explain this result. Although the aetiology of colitis has not been clearly demonstrated, there are indication that different inflammation mechanisms are involved. It has been described upregulation of cyclooxygenase (COX)-2 or inducible nitric oxide synthase (iNOS), and commitment of transcription factors, e.g. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), signal transducer and activator of transcription (STAT) family, and activator protein 1 (AP-1)³⁵. Among these, vinpocetine is able to inhibit only NF- κ B-dependent inflammatory response. Thus, the other inflammation pathways probably keep working even under vinpocetine effect. The importance to control different transcript factors in the colitis was demonstrated by the treatment with rosmarinic acid, which exhibited an

ameliorating of the disease due its capacity to inhibit NF- κ B and signal transducers and activators of transcription (STAT3) activation³⁴.

In conclusion, acetic acid administration was able to induce inflammation with histopathological changes, provoked increasing of VIP⁺ and SP⁺ fibres, caused hypertrophy of general myenteric neurons and atrophy of nitrergic myenteric neurons. The treatment with vinpocetine did not improve the alteration of VIP⁺ and SP⁺ fibres, but ameliorated partially the morphometric alterations observed in the myenteric neuronal cell bodies.

ACKNOWLEDGMENT

This paper is part of the master's thesis of the first author. The authors thank to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) for the grant and to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for the master scholarships of Renata Streck Fernandes.

REFERENCES

1. Hirata Y, Ihara S, Koike K. Targeting the complex interactions between microbiota, host epithelial and immune cells in inflammatory bowel disease. *Pharmacological Research*. 2016;113:574-584.
2. Sun L, Nava G, Stappenbeck T. Host genetic susceptibility, dysbiosis, and viral triggers in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2011;27(4):321-327.
3. de Souza H, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015;13(1):13-27.
4. Molodecky N, Soon I, Rabi D et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.
5. Huttenhower C, Kostic A, Xavier R. Inflammatory Bowel Disease as a Model for Translating the Microbiome. *Immunity*. 2014;40(6):843-854.

6. Gasche C, Berstad A, Befrits R et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(12):1545-1553.
7. Lomax A, Pradhananga S, Bertrand P. Plasticity of neuroeffector transmission during bowel inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2017;312(3):G165-G170.
8. Brierley S, Linden D. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014;11(611-627).
9. Winston J, Li Q, Sarna S. Paradoxical regulation of ChAT and nNOS expression in animal models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2013;305(4):G295-G302.
10. Rahman A, Robinson A, Jovanovska V et al. Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. *Cell and Tissue Research*. 2015;362(3):497-512.
11. Rahman A, Robinson A, Brookes S et al. Rectal prolapse in Winnie mice with spontaneous chronic colitis: changes in intrinsic and extrinsic innervation of the rectum. *Cell and Tissue Research*. 2016;366(2):285-299.
12. Ghasemi-Pirbaluti M, Motaghi E, Bozorgi H. The effect of menthol on acute experimental colitis in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2017;805:101-107.
13. Ghalwash A, Soliman N, Hamouda H et al. Effects of N-acetylcysteine on acetic-acid-induced ulcerative colitis in experimental rat model. *Tanta Medical Journal*. 2017;45(1):36-44.

14. Steinhoff M, von Mentzer B, Geppetti P et al. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiological Reviews*. 2014;94(1):265-301.
15. Abad C, Cheung-Lau G, Coûté-Monvoisin A et al. Vasoactive Intestinal Peptide-Deficient Mice Exhibit Reduced Pathology in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(3):203-212.
16. Furness J. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012;9(5):286-294.
17. Lomax A, Fernandez E, Sharkey K. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterology and Motility*. 2005;17(1):4-15.
18. Brierley S, Linden D. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014.
19. Poole D, Lieu T, Pelayo J et al. Inflammation-induced abnormalities in the subcellular localization and trafficking of the neurokinin 1 receptor in the enteric nervous system. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015;309(4):G248-G259.
20. Lu P, Luo H, Quan X et al. The role of substance P in the maintenance of colonic hypermotility induced by repeated stress in rats. *Neuropeptides*. 2016;56:75-82.
21. Yukawa T, Oshitani N, Yamagami H et al. Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptor 1 expression in inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Medicine*. 2007;20:161-167.
22. Kruger G, Mosher J, Bixby S et al. Neural Crest Stem Cells Persist in the Adult Gut but Undergo Changes in Self-Renewal, Neuronal Subtype Potential, and Factor Responsiveness. *Neuron*. 2002;35(4): 657-669.

23. Tewari P, Mandal P, Roy R et al. A novel function of TLR4 in mediating the immunomodulatory effect of Benzanthrone, an environmental pollutant. *Toxicology Letters*. 2017;276:69-84.
24. Raja S, Rajendiran V, Kasinathan N et al. Differential cytotoxic activity of Quercetin on colonic cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;106:92-106.
25. Ojeda M, Carreras O, Sobrino P et al. Biological implications of selenium in adolescent rats exposed to binge drinking: Oxidative, immunologic and apoptotic balance. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017;329, 165-172.
26. Loerincz C, Szasz K, Kisfaludy L. (1977). ChemInform Abstract: The Synthesis of Ethyl Apovincamate. *Chemischer Informationsdienst*. 1976;26(10a):1907.
27. Jeon K, Xu X, Aizawa T et al. Vinpocetine inhibits NF- κ B-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(21):9795-9800.
28. Ruiz-Miyazawa K, Zarpelon A, Pinho-Ribeiro F et al. Vinpocetine Reduces Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Mice by Inhibiting Oxidative Stress, Cytokine Production and NF- κ B Activation in the Paw and Spinal Cord. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118942.
29. Ruiz-Miyazawa K, Pinho-Ribeiro F, Zarpelon A et al. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF- κ B. *Chemico-Biological Interactions*. 2015;237:9-17.
30. Fattori V, Borghi S, Guazelli C et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- κ B activation in mice. *Pharmacological Research*. 2017;120:10-22.

31. Guazelli CF, Fattori V, Colombo BB *et al.* Quercetin-Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms. *Journal of Natural Products*. 2013;76:200-208
32. Solovyeva E, Karneev A, Chekanov A *et al.* Complex application 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine-succinate and vinpocetine in cerebrovascular disorder. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. S.S. Korsakova*. 2017;117(5):103.
33. Swart P, Currin C, Russell V *et al.* Early ethanol exposure and vinpocetine treatment alter learning- and memory-related proteins in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience Research*. 2016;95(5):1204-1215.
34. Shang Y, Wang L, Li Y *et al.* Vinpocetine Improves Scopolamine Induced Learning and Memory Dysfunction in C57 BL/6J Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2016;39(9):1412-1418.
35. Jin B, Chung K, Cheon S *et al.* Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation. *Scientific Reports*. 2017;7: 46252.
36. Chandrasekharan B, Bala V., Vasantha L *et al.* Targeted deletion of neuropeptide Y (NPY) modulates experimental colitis. *PLoS One*. 2008; 3(10): e3304.
37. Sung T, La J, Kim T *et al.* Alteration of nitrenergic neuromuscular transmission as a result of acute experimental colitis in rat. *Journal of Veterinary Science*. 2006;7(2):143-150.
38. Belém M, Andrade G, Carlos T *et al.* Light-emitting diodes at 940nm attenuate colitis-induced inflammatory process in mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016; 162: 367-373.

39. Utsumi D, Matsumoto K, Amagase K *et al.* 5-HT₃ receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *British Journal of Pharmacology*. 2016;173(11):1835-1849.
40. Hartmann R, Morgan Martins M, Tieppo J *et al.* Effect of *Boswellia serrata* on Antioxidant Status in an Experimental Model of Colitis Rats Induced by Acetic Acid. *Digestive Diseases and Sciences*. 2012;57(8): 2038-2044.
41. Randhawa P, Singh K, Singh N *et al.* A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2014;18(4): 279.
42. Lee J, Yamamoto T, Kuramoto H *et al.* TRPV1 expressing extrinsic primary sensory neurons play a protective role in mouse oxazolone-induced colitis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2012;166(1): 72-76.
43. Zhao P, Dong L, Luo J *et al.* Possible Role of Mast Cells and Neuropeptides in the Recovery Process of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in Rats. *Chinese Medical Science Journal*. 2013;28(1):28-33.
44. Pellegrini C, Fornai M, Colucci R *et al.* Alteration of colonic excitatory tachykininergic motility and enteric inflammation following dopaminergic nigrostriatal neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13: 146.
45. Kun J, Szitter I, Kemény Á *et al.* Upregulation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel in the Inflamed Human and Mouse Colon and Its Protective Roles. *PLoS ONE*. 2014; 9(9):e108164.
46. de Fontgalland D, Brookes S, Gibbins I *et al.* The neurochemical changes in the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels in Ulcerative colitis and Crohn's disease. *Neurogastroenterology & Motility*. 2014;26(5):731-744.

47. Lapointe TK, Basso L, Iftinca M et al. TRPV1 sensitization mediates postinflammatory visceral pain following acute colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015; 309(2):G87-G99.
48. Engel M, Khalil M, Mueller-Tribbensee S et al. The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons. *Journal of Gastroenterology*. 2011;47(3):256-265.
49. Hosoya T, Mutsumoto K, Tashima K et al. TRPM8 has a key role in experimental colitis-induced visceral hyperalgesia in mice. *Neurogastroenterology & Motility*. 2014; 26(8):1112-1121.
50. Del Valle-Pinero, A. Altered vasoactive intestinal peptides expression in irritable bowel syndrome patients and rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *World Journal of Gastroenterology* 2015; 21(1):155.
51. Harmar A, Fahrenkrug J, Gozes I et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166(1):4-17.
52. Yadav M, Huang MC, Goetzl EJ. VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis. *Cell immunology*. 2011; 267(2):124-132.
53. Vu JP, Million M, Larauche M et al. Inhibition of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) induces resistance to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014; 52(1): 37-47.
54. Caputi V, Marsilio I, Cerantola S et al. Toll-Like Receptor 4 Modulates Small Intestine Neuromuscular Function through Nitroergic and Purinergic Pathways. *Frontiers in Pharmacology*. 2017; 8:350.

55. Kono T, Chisato N, Ebisawa Y et. Impaired nitric oxide production of the myenteric plexus in colitis detected by a new bioimaging system. *Journal of Surgical Research*. 2004;117(2):329-338.
56. Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *American Journal of Pathology*. 1999; 155(4):1051-1057.
57. Ferezin R, Vicentino-Vieira S, Góis M et al. Different inoculum loads of *Toxoplasma gondii* induce reduction of myenteric neurons of the rat colon. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2017; 26(1),47-53
58. Araújo, E. *Toxoplasma gondii* causes death and plastic alteration in the jejunal myenteric plexus. *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 21(16):4829.

Table 1 - Antibodies used for immunofluorescence.

Tissue Antigen	Producing Species	Dilution	Manufacturer	Code
PGP9.5	Rabbit	1:1000	Abcam	AB27053
PGP9.5	Mouse	1:750	Abcam	AB8189
nNOS	Rabbit	1:1000	Santa Cruz	SC8309
ChAT	Goat	1:100	Millipore	AB144P
VIP	Goat	1:500	Santa Cruz	SC21041
SP	Rabbit	1:1000	Millipore	AB1566
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	Donkey	1:500	Invitrogen	A21208
Alexa Fluor 488 anti-mouse	Donkey	1:500	Invitrogen	A21202
Alexa Fluor 568 anti-goat	Donkey	1:500	Invitrogen	A11057
Alexa Fluor 568 anti-rabbit	Donkey	1:500	Invitrogen	A10042

PGP9.5: protein gene product 9.5; nNOS: neuronal nitric oxide synthase; ChAT: choline acetyltransferase; VIP: vasoactive intestinal peptide; SP: substance P.

Table 2 – Number/cm² and area of the cell body of myenteric neurons in acetic acid-induced colitis mice treated with vinpocetine.

		Control	Colitis	Colitis + Vinpocetine
Number of neurons/cm ²	PGP 9.5	30,133.9 ^a ± 1,314.7	22,567.0 ^a ± 2,470.3	32,187.5 ^a ± 1,819.6
	nNOS	10,013.4 ^a ± 1,341.1	10,321.4 ^a ± 566.1	8,325.9 ^a ± 615.1
Area (µm ²) of cell body of myenteric neurons	PGP 9.5	139.80 ^a ± 4.56	193.91 ^b ± 3.86	169.99 ^c ± 4.20
	nNOS	210.99 ^a ± 3.54	177.82 ^b ± 2.37	178.34 ^c ± 2.86

Data presented as mean ± standard error. Means followed by different letters mean statistical difference ($p < 0.05$). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.. PGP9.5: protein gene product 9.5; nNOS: neuronal nitric oxide synthase.

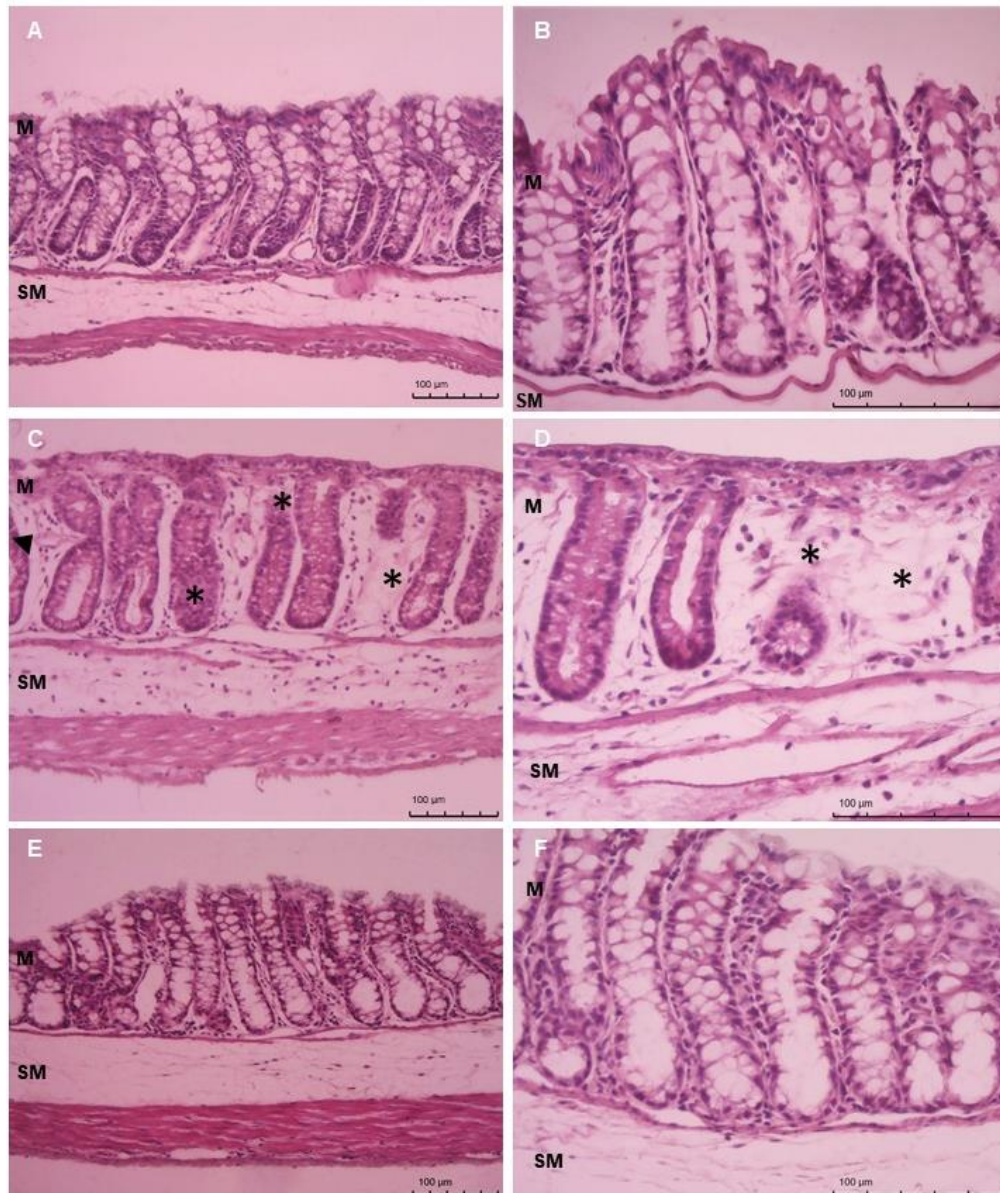


Figure 1 – Photomicrograph of colonic wall highlighting changes on the intestinal wall layers in acetic acid-induced mice treated with vinpocetine. A and B control grupo. C and D: colitis group. E and F: colitis group treated with vinpocetine. Observe inflammatory infiltrate in all intestinal layers, mainly in the mucosa and submucosa, loss of the structure of the mucosa (asterisk) and edema in the submucosa layer in colitis mice (C; D) in relation to control (A; B). Treatment with vinpocetine (E; F) preserved the mucosal architecture, reduced infiltration of immune cells, and partially decreased colitis-induced edema. H.E. Magnification 100x (A, C, E) and 200x (B, D, F). M: mucosa; SM: submucosa.

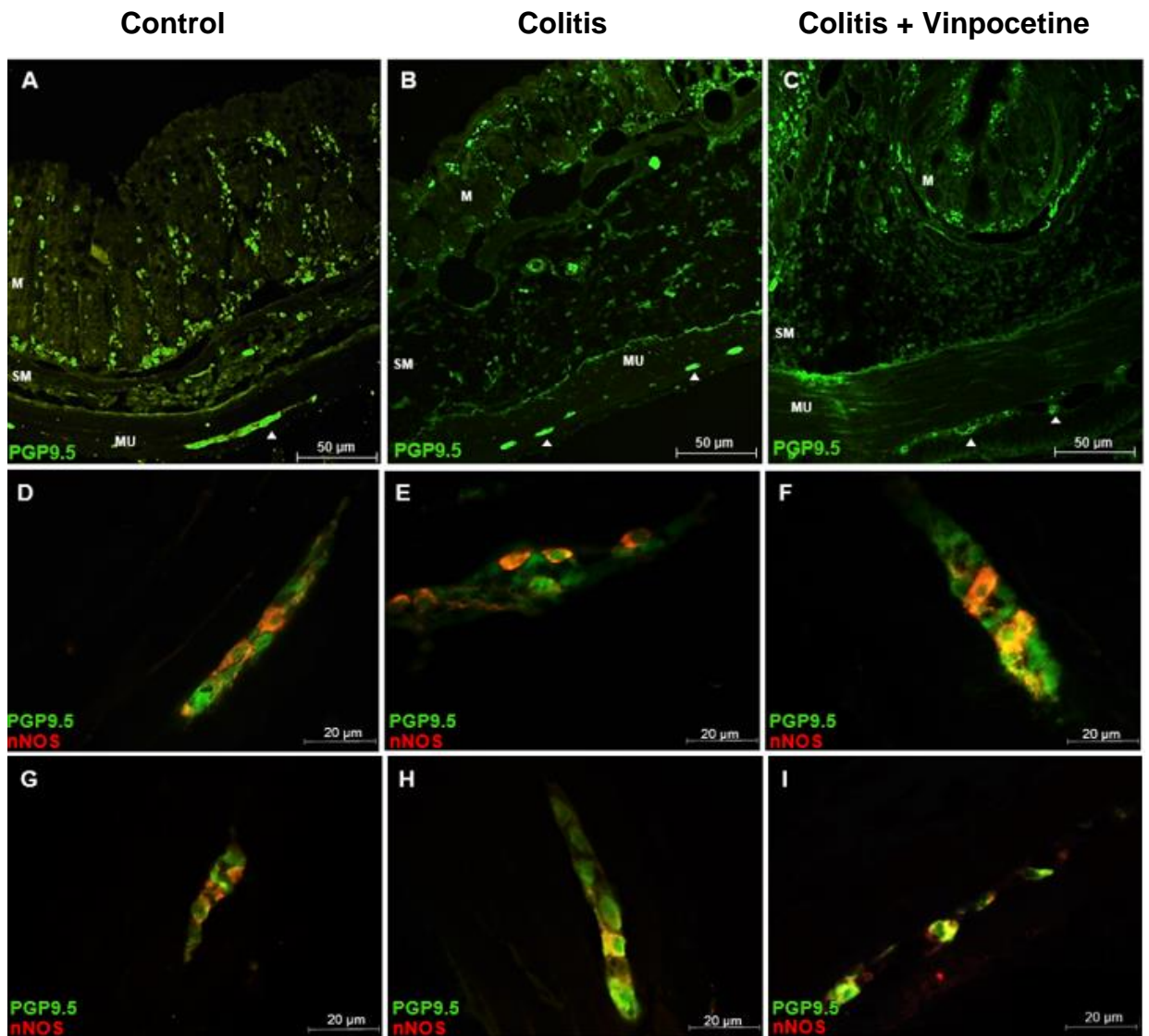


Figure 2 – Photomicrograph of colonic wall highlighting the enteric nervous system in acetic acid-induced mice treated with vinpocetine. A-C: cross-sections of colonic wall showing neuronal cell bodies and fibres labelled with PGP9.5. D-F: myenteric plexus containing nitrenergic neurons was present in all experimental groups. G-I: myenteric plexus containing cholinergic neurons was present in all experimental groups. Magnification 100x (A - C) and 400x (D - I). M: mucosa; SM: submucosa; MU: muscular.

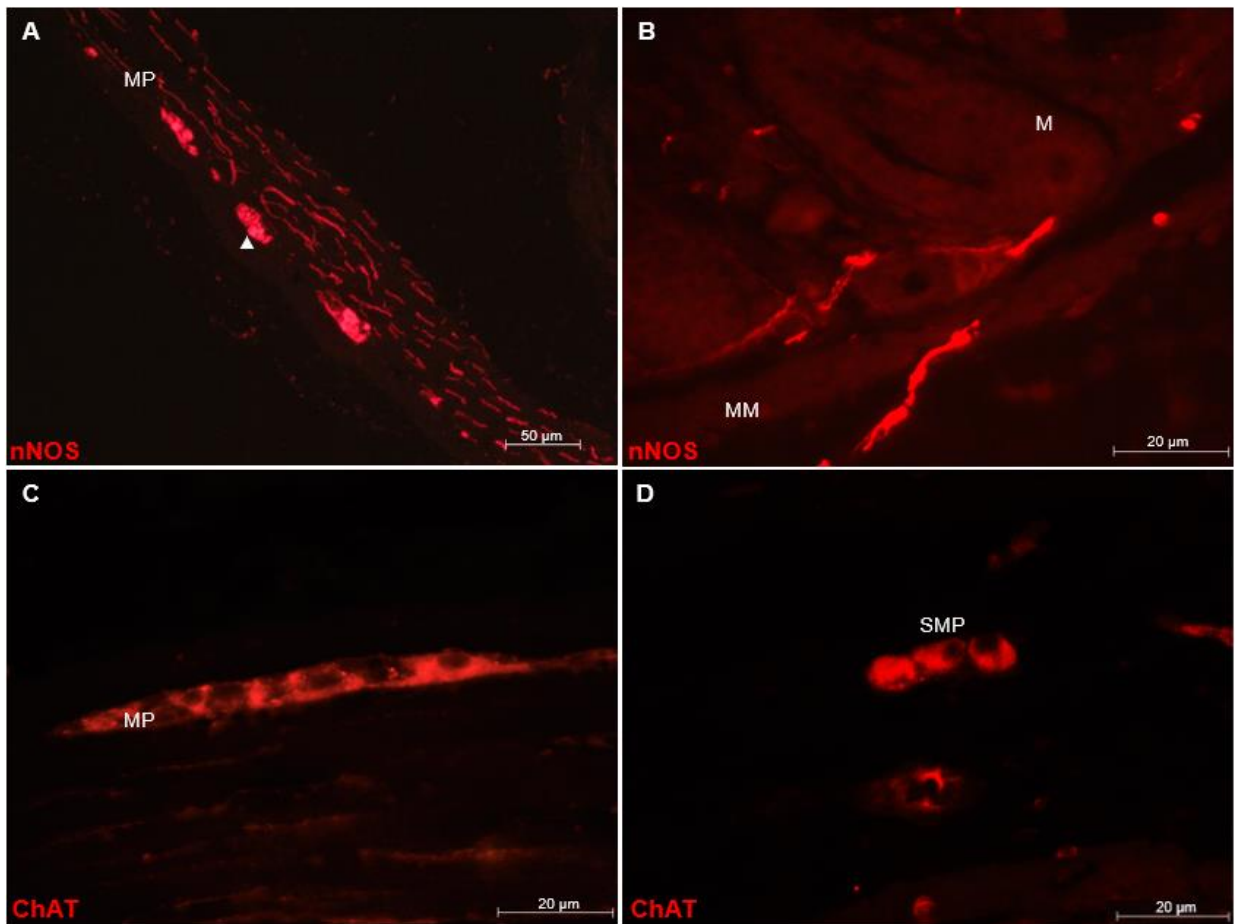


Figure 3 – Photomicrograph of colonic wall highlighting the enteric nervous system in acetic acid-induced mice. A,B: nitroergic innervation in the colonic wall showing myenteric plexus (MP), nerve fibres in the muscularis mucosae (MM) and mucosa (M). C,D: cholinergic innervation in the colonic wall showing myenteric (MP) and submucosal (SMP) plexi. Magnification 100x (A) and 400x (B - D).

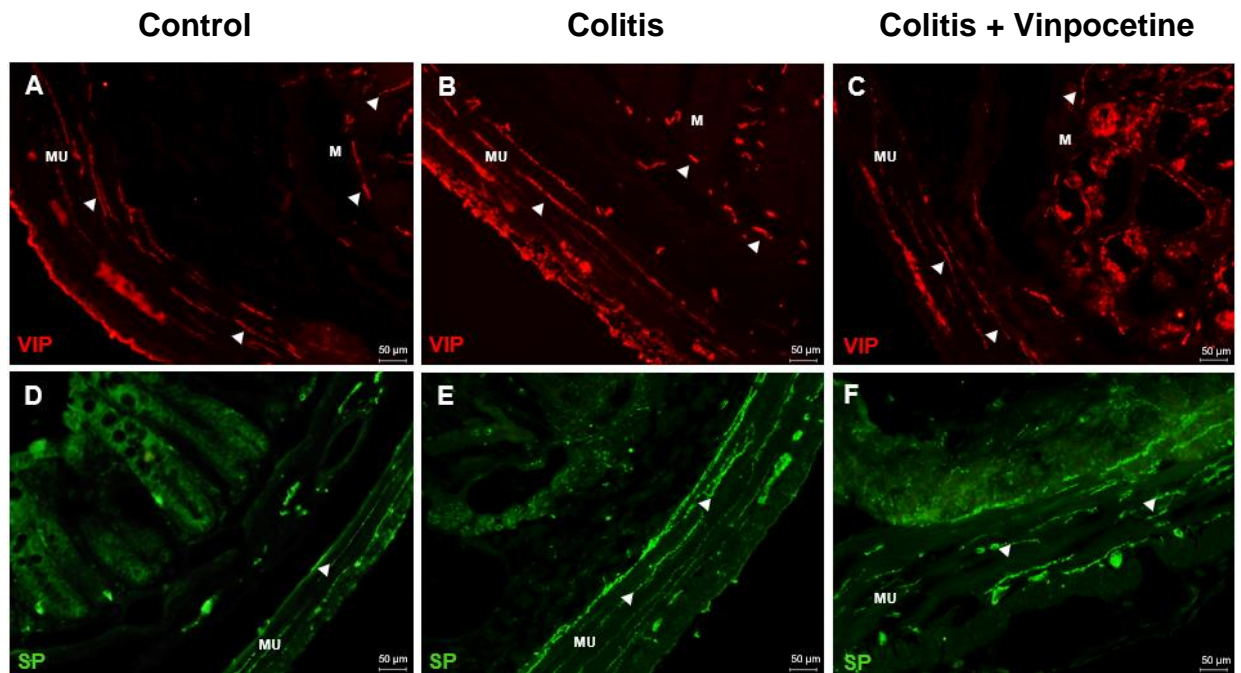


Figure 4 – Photomicrograph of colonic wall highlighting structures of the enteric nervous system in acetic acid-induced mice. A-C: VIPergic innervation was increased in the colitis mice. D-F': SP-containing fibres was also increased in the colitis mice. The treatment with vinpocetine did not protect the ENS. Magnification 200x. M: mucosa; SM: submucosa; MU: muscular.

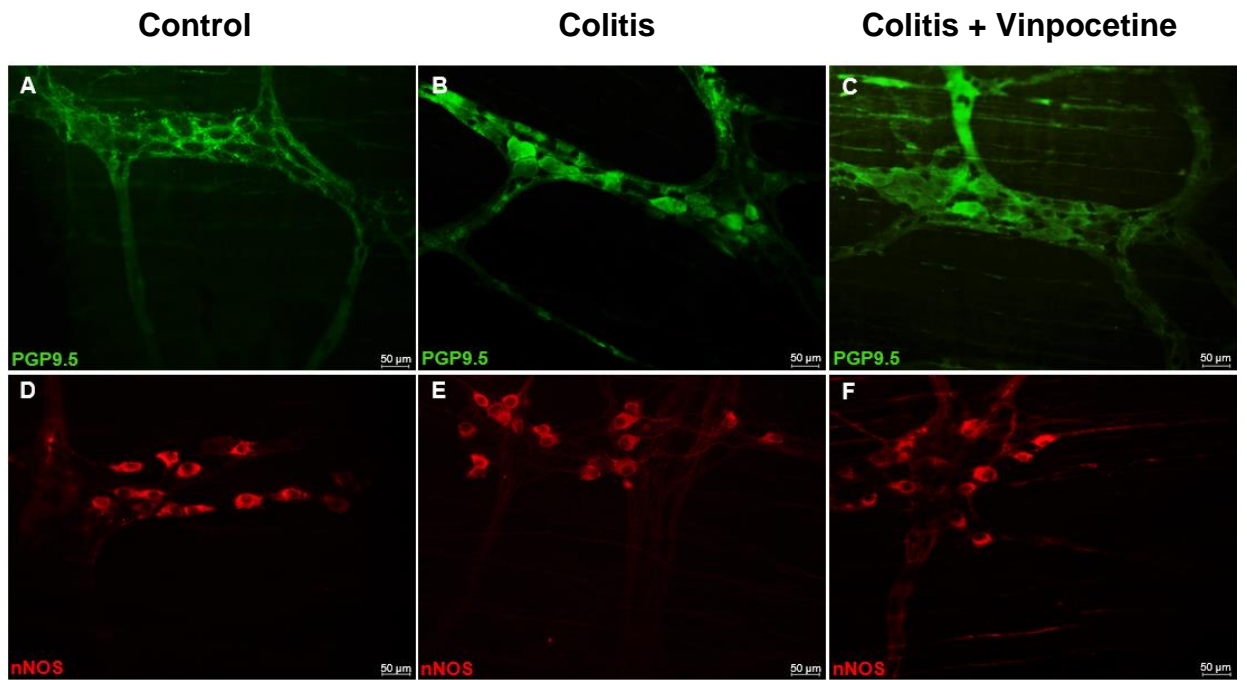


Figure 5 – Photomicrograph of myenteric plexus in acetic acid-induced mice treated with vinpocetine. A-C: myenteric plexus labelled with pan-neuronal marker: PGP9.5. D-F: myenteric plexus labelled for showing nitregeric neurons. Colitis did not change the number of neurons. Magnification 200x.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a administração de ácido acético é capaz de induzir inflamação com mudanças histopatológicas, provocadas pelo aumento de fibras nervosas VIPérgicas e produtoras de substância P. Esse aumento causa hipertrofia na população total de neurônios e atrofia na subpopulação nitrérgica do plexo mioentérico. O tratamento com vimpocetina não foi capaz de proteger das alterações nas fibras neuronais VIP⁺ e SP⁺ fibras, mas protegeu parcialmente das alterações morfométricas observadas no corpo celular dos neurônios mioentéricos.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL) protocolo 157/2016, processo nº 15933.2016.37.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 157/2016

Londrina, 01 de Agosto de 2016.

Prezado Pesquisador,

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito da vinpocetina sobre o plexo mioentérico do cólon de camundongos com colite induzida por ácido acético", protocolo CEUA nº 15933.2016.37, sob a responsabilidade de **Eduardo Jose de Almeida Araújo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL), em reunião realizada em **26/07/2016**.

O objetivo do projeto é investigar o efeito da administração oral de vinpocetina sobre a morfologia do plexo mioentérico do cólon de camundongos com colite induzida por ácido acético. Os camundongos serão distribuídos aleatoriamente em três grupos: •Grupo controle (Controle) – administração via retal de 100µL de solução salina estéril para lavagem do cólon, 1 hora antes a administração de solução salina (200 µL) pela via retal. •Grupo Colite sem tratamento (Colite) – administração via retal de 100µL de solução salina estéril para lavagem do cólon, 1 hora antes a administração de 200 µL de solução de ácido acético 7,5% (v/v) pela via retal e, em seguida, tratados via oral, por gavagem, com solução salina 0,9% (100 µL), sem o fármaco. •Grupo Colite com tratamento (Colite_Vinpo) –receberão pré tratamento com 30 mg/Kg de vinpocetina (100 µL), via oral, por gavagem,, diluída em solução salina 0,9%, duas horas antes da indução da colite (200 µL de solução de ácido acético 7,5% (v/v) pela via retal). Os animais serão submetidos à administração via retal de 100µL de solução salina estéril para lavagem do cólon, 1 hora antes da indução da colite. Após a indução, os animais serão tratados nos tempos de 4, 10 e 16 horas com Vinpocetina 30 mg/kg (100 µL). Método de indução de morte anestesia e posterior punção cardíaca, utilizando cloridrato de ketamina (75mg/kg) e cloridrato de xilasina (10mg/kg), intraperitoneal. GI 2.

Vigência do Projeto	01/08/2016 a 28/02/2017
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	60
Peso/Idade	20-25 g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Cólon

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

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

Profa. Dra. Glaura Spantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UUEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Eduardo Jose de Almeida Araújo
Coordenador do Projeto
Departamento de Histologia / Centro de Ciências Biológicas
Com cópia para Coord. do Biotério Central/UUEL; Chefe do Departamento de Histologia e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

ANEXO B

Normas da revista *Inflammatory Bowel Diseases*

 Author Resources

Instructions for Authors

Author Guidelines (this page)

SCOPE

The focus of the journal *Inflammatory Bowel Diseases*® is to bring the most current information in the clinical and basic sciences to all physicians caring for patients with inflammatory bowel diseases, and to investigators performing research in inflammatory bowel diseases and related fields. The journal publishes peer-reviewed manuscripts and review articles in basic and clinical sciences, updates on clinical trials, reviews of the current literature, editorials, and other features.

ETHICAL/LEGAL CONSIDERATIONS

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of the publisher. Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the journal, its editors, or the publisher. All manuscripts must be submitted through the journal's online submission system at <http://www.editorialmanager.com/ibd/>.

Inflammatory Bowel Diseases utilizes the plagiarism software, CrossCheck. Manuscripts submitted to this journal may be screened for plagiarism against previously published works. Authors who have been found to be guilty of plagiarism after the appropriate institutional investigation will be banned from submitting to the journal for a defined period of time.

Patient Anonymity and Informed Consent - It is the author's responsibility to ensure that a patient's anonymity be carefully protected and to verify that any experimental investigation with human subjects reported in the manuscript was performed with informed consent and following all the guidelines for experimental investigation with human subjects required by the institution(s) with which all the authors are affiliated. Authors should mask patients' eyes and remove patients' names from figures unless

they obtain written consent from the patients and submit written consent with the manuscript.

Human Studies - Human experimentation must conform to ethical standards, and be approved by the appropriate Institutional Review Board (IRB). A statement concerning IRB approval and consent procedures must appear at the beginning of the Methods section. Any systematic data gathering effort in patients or volunteers must be approved by an IRB or adhere to appropriate local/national regulations. The Editors of *Inflammatory Bowel Diseases* are concerned about appropriate IRB review and informed consent. Authors may be questioned about the details of consent forms or the consent process. On occasion, the Editor-in-Chief may request a copy of the approved IRB application from the author. Lack of appropriate consent or documentation may be grounds for rejection. Local IRB approval does not guarantee acceptability; the final decision will be made by the Editor-in-Chief.

Animal Studies - Experimental work on animals must conform to the guidelines laid out in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, which is available from the National Academy of Science; a text-only version is available at <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>. Adherence to all relevant regulations and/or approval of the appropriate institutional Animal Care Committee or governmental licensure of the investigator and/or laboratory must be obtained. A statement concerning such approval must be included at the beginning of the Methods section. The Editors of *Inflammatory Bowel Diseases* are concerned about appropriate animal care. On occasion, the Editor-in-Chief may request a copy of the approved Animal Care Committee application from the author. Local committee approval does not guarantee acceptability; the final decision will be made by the Editor-in-Chief.

Registration of Clinical Trials - All clinical trials that involve investigational drugs supported by a pharmaceutical firm or investigational devices supported by a device manufacturer must be registered at the time that a manuscript is submitted to *Inflammatory Bowel Diseases* for publication. The registry and registration number must be stated in the first paragraph of the Methods section of the manuscript.

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements - A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM)

articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement & Disclosure form provides the mechanism.

Copyright - All authors must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html).

A copy of the form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an Email with instructions on completing the form upon submission.

Conflicts of Interest - Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading "Conflicts of Interest and Source of Funding".

For example: Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker's bureau for Organization X — the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html).

A copy of the form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an Email with instructions on completing the form upon submission.

Permissions - Authors must submit written permission from the copyright owner (usually the publisher) to use direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted form elsewhere, along with complete details about the source.

Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, and not the responsibility of the publisher.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review. See specific guidelines for Letters to the Editor below. For questions on preparing manuscripts for submission, please contact Meghann Knowles at meghann@jeditorial.com.

Title Page Include on the title page (a) complete manuscript title; (b) authors' full names, highest academic degrees, and affiliations; (c) name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address; and (d) sources of support that require acknowledgment.

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

Structured Abstract and Key Words Limit the abstract to 250 words. It must be factual and comprehensive. Do not cite references in the abstract. Limit the use of abbreviations and acronyms, and avoid general statements (e.g., "the significance of the results is discussed"). It should be sectioned into Background, Methods, Results, and Conclusions. List three to five key words.

Text For full-length research articles, organize the manuscript in the following sequence: Abstract and Key Words, Introduction, Materials and Methods, Ethical Considerations, Results, Discussion, Acknowledgment, References, Tables, and Figure Legends. Original Research Articles: Authors are encouraged to submit articles in basic or clinical science. Review Articles of exceptional merit will also be accepted. Contributors should communicate with the Editors before submitting a review. Abbreviations must be defined at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, manufacturer and address (city and state/country) should be supplied. Acknowledge all forms of support, including pharmaceutical industry support, in an Acknowledgment paragraph.

Abbreviations For a list of standard abbreviations, consult the Council of Biology Editors Style Guide (available from the Council of Science Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814) or other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure.

References The authors are responsible for the accuracy of the references. Key the references (double-spaced) at the end of the manuscript. Cite the references in text in the order of appearance, including those references cited in tables and figure legends at the chronological citation of the tables and figures in text. Cite unpublished data, such as papers submitted but not yet accepted for publication, personal communications, in parentheses in the text. If there are more than three authors, only name the first three authors and then use *et al.* For abbreviations of journal names, refer to List of Journals Indexed in Index Medicus. This can be accessed at <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

Sample references are given below:

- | | | |
|--|-----------------|------------|
| Journal | Article | |
| 1. Gudlaugsdottir S, van Dekken H, Stijnen T, <i>et al.</i> Prolonged use of proton pump inhibitors, CagA status, and the outcome of Helicobacter pylori gastritis. <i>J Clin Gastroenterol.</i> 2002;34:536-540. | | |
| Book | Chapter | |
| 2. Tobin RW, Kimmey MB. Painful diseases of the gastrointestinal tract. In: Loeser JD, ed. <i>Bonica's Management of Pain.</i> 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:1269-1292. | | |
| Entire | Book | |
| 3. Rohen JW, Yokochi C, Lütjen-Drecoll E. <i>Color Atlas of Anatomy: A Photographic Study of the Human Body.</i> 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. | | |
| Software | | |
| 4. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1994. | | |
| Online | Journals | |
| 5. Friedman SA. Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. <i>ObstetGynecol</i> [serial online]. January 1988;71:22-37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990. | | |
| Database | | |
| 6. CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2014. Updated March 29, 2014. | | |
| World | Wide | Web |
| 7. Gostin LO. Drug use and HIV/AIDS [JAMA HIV/AIDS Web site]. June 1, 2015. Available at: http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics . Accessed July 26, 2015. | | |

Figures Art should be created/scanned and saved and submitted as either a TIFF (tagged image file format), or an EPS (encapsulated postscript) file. Line art must have a resolution of at least 1200 dpi (dots per inch), and electronic photographs, radiographs, CT scans, and other scanned images must have a resolution of at least 300 dpi. If fonts are used in the artwork, they must be converted to paths or outlines or they must be embedded in the files. Color images must be created/scanned and saved and submitted as CMYK files. Please note that artwork generated from office suite programs such as Corel Draw and MS Word and artwork downloaded from the Internet (JPEG or GIF files) cannot be used. Cite figures consecutively in the manuscript, and number them in the order in which they are discussed.

Figure Legends Legends must be submitted for all figures. They should be brief and specific, and they should appear after the tables. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

Color Figures At no cost to the author, the journal accepts for publication color figures that will enhance the article. Figures are also published online in color at no cost.

Steps for Submitting Artwork

1. Please reference "5 Steps to Creating Digital Artwork (pdf)" available at <http://edmgr.ovid.com/lww-final/accounts/5StepsforArt.pdf>, specifically steps 2 and 3, when creating figures for submission.
2. Create, Scan and Save according to the "5 Steps to Creating Digital Artwork (pdf)".
3. Compare your final figure to the Target Digital-Imaging Results listed below.
4. Upload each figure to the journal's online submission system in conjunction with your manuscript text and tables.

Digital Artwork Guideline Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital art to *Inflammatory Bowel Diseases*. Artwork saved as TIFF and EPS files. Do not save TIFFs as compressed files. PowerPoint files are also acceptable.

- Artwork created as the actual size (or slightly larger) it will appear in the journal. (To get an idea of the size images should be when they print, study a copy of the

journal to which you wish to submit. Measure the artwork typically shown and scale your image to match.)

- Crop out any white or black space surrounding the image.
- Text and fonts in any figure are one of the acceptable fonts: Helvetica, Times Roman, Symbol, Mathematical PI, and European PI.
- Color images are created/scanned and saved and submitted as CMYK only. Do not submit any figures in RGB mode because RGB is the color mode used for screens/monitors and CMYK is the color mode used for print.
- Line art saved at a resolution of at least 1200 dpi.
- Images saved at a resolution of at least 300 dpi.
- Each figure saved as a separate file and saved separately from the accompanying text file.
- For multi-panel or composite figures only: Any figure with multiple parts should be sent as one file with each part labeled the way it is to appear in print.

Remember:

- Artwork generated from office suite programs such as CoreIDRAW, MS Word, Excel, and artwork downloaded from the Internet (JPEG or GIF files) cannot be used because the quality is poor when printed.
- Cite figures consecutively in your manuscript.
- Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
- Upload figures consecutively to the journal's online submission system and number figures consecutively in the Description box during upload.

Tables Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (e.g., Word). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Do not submit tables as image files or images placed in Word documents, tables must be provided as editable text (Word files are preferred). Submit all tables as separate files. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Key each on a separate sheet, and include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not imbed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text.

Supplemental Digital Content (SDC) Authors may submit supplementary materials via the journal's online submission system that enhance their article's text to be considered for online posting. SDC may include standard media such as text documents, graphs,

audio, video, etc. On the Attach Files page of the submission process, please select Supplemental Audio, Video, or Data for your uploaded file as the Submission Item. If an article with SDC is accepted, our production staff will create a URL with the SDC file. The URL will be placed in the call-out within the article. SDC files are not copy-edited by LWW staff, they will be presented digitally as submitted. Please supply the SDC files as you would like them to appear in final publication (include legends in the same file as the images; make text double spaced or single spaced per your preference). For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

SDC Call-outs Supplemental Digital Content must be cited consecutively in the text of the submitted manuscript. Citations should include the type of material submitted (Audio, Figure, Table, etc.), be clearly labeled as "Supplemental Digital Content," include the sequential list number, and provide a description of the supplemental content. All descriptive text should be included in the call-out as it will not appear elsewhere in the article.

Example: We performed many tests on the degrees of flexibility in the elbow (see Video, Supplemental Digital Content 1, which demonstrates elbow flexibility) and found our results inconclusive.

List of Supplemental Digital Content A listing of Supplemental Digital Content must be submitted at the end of the manuscript file. Include the SDC number and file type of the Supplemental Digital Content. This text will be removed by our production staff and not be published.

Example:

Supplemental Digital Content 1.wmv

SDC Files Requirements All acceptable file types are permissible up to 10 MBs. For audio or video files greater than 10 MBs, authors should first query the journal office for approval. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

Style Follow American Medical Association Manual of Style (10th edition). Stedman's Medical Dictionary (27th edition) and Merriam Webster's Collegiate Dictionary (10th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Capitalize the trade names of drugs and place them in parentheses after the generic names. To comply with

trademark law, include the name and location (city and state in USA; city and country outside USA) of the manufacturer of any drugs, supplies, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express units of measure and degrees Celsius to express temperatures, and use SI units rather than conventional units.

Basic and Clinical IBD Review Articles Guidelines Basic and clinical IBD Review articles should present recent advances in a relatively narrow topic that have been made in cutting edge research.

The goal of the basic and clinical IBD review articles should be to present a complete summary of important research areas that are now improving our understanding of Crohn's disease and ulcerative colitis.

The body of basic and clinical IBD Review articles should be no longer than 20 double spaced pages (not including references, figures, and tables). There should be no more than 6 tables and figures (combined). Supplemental figures and tables will be allowed online. If page limits need to be increased, the authors may request permission from the Editors to increase the length of the Review article. The number of references should be limited to 100. The Review article should be focused on a single specific topic. All review articles will be peer-reviewed.

Future Directions and Methods for IBD Research Guidelines Original research articles and review articles on future directions and methods for IBD research should discuss important basic and clinical areas in which investigators should focus their efforts to provide a deeper understanding of IBD research areas in which rapid advances and novel concepts can be made. In addition, the Future Directions and Methods for IBD original research articles and review articles should include a discussion of areas in which improved methodologic tools have been identified and exactly how those methods should be performed. Basic science directions and methods should be presented that will expand our knowledge of areas that will allow novel insights to be made regarding the genetic, immunologic, microbial and environmental interactions that are the basis of the pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Clinical directions and methods should be presented that will allow investigators to make advances using cohort studies, multicenter registries, risk stratifications, and treatment outcomes. The goal of the Future Directions and Methods for clinical IBD original research articles and review articles should be to better understand the challenging biological variables in IBD patients and to provide optimal evidence of novel therapeutics that will more effectively treat, cure, and prevent Crohn's disease and ulcerative colitis.

Original research articles, for the Future Directions and Methods for IBD research section, should be written as described in the IBD Journal Instructions for original research articles. Review articles, for the Future Directions and Methods for IBD research section, should be no longer than 35 double spaced pages (including references and figure legends). There should be no more than 6 tables and figures (combined). Supplemental figures and tables will be allowed online. If page limits need to be increased, the authors may request permission from the Editors to increase the length of their future directions and methods for IBD research review article. The number of references should be limited to 100. The future directions and methods for IBD research review article should be focused on a single specific topic.

Letters to the Editor Guidelines Letters in response to articles published in the journal are welcome and should be submitted via IBD's online submission system. All Letters should start with the phrase "To the Editors," and be written as a letter. Letters must be submitted the end of the following calendar month (e.g. by the end of July, for letters referring to articles in the June print issue) and be a maximum of 400 words, with no more than one figure or table and no more than 5 references. All LTEs will be published online-only.

Research letters and case-based discussions will no longer be accepted for submission effective November 1, 2012.

REVISIONS

When submitting a revision, please submit both a clean copy and marked copy of the manuscript. The marked copy should highlight all of the changes made by authors after the original review. Authors can use the track changes feature of the Microsoft Word program to create a marked copy. Authors also should submit all tables and figures in separate files for production purposes.

AFTER ACCEPTANCE

Open access LWW's hybrid open access option is offered to authors whose articles have been accepted for publication. With this choice, articles are made freely available online immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally,

immediately upon publication. The article processing charge for *Inflammatory Bowel Diseases* is \$3,000. The article processing charge for authors funded by the Research Councils UK (RCUK) is \$3,800. The publication fee is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by credit card by the author, funding agency or institution. Payment must be received in full for the article to be published open access.

- **Authors retain copyright** Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant LWW a license to publish the article and identify itself as the original publisher.
- **Creative Commons license** Articles opting for open access will be freely available to read, download and share from the time of publication. Articles are published under the terms of the Creative Commons License Attribution-NonCommercial No Derivative 3.0 which allows readers to disseminate and reuse the article, as well as share and reuse of the scientific material. It does not permit commercial exploitation or the creation of derivative works without specific permission. To view a copy of this license visit: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0>.
- **Compliance with NIH, RCUK, Wellcome Trust and other research funding agency accessibility requirements** A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW identifies to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and transmits the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism. LWW ensures that authors can fully comply with the public access requirements of major funding bodies worldwide. Additionally, all authors who choose the open access option will have their final published article deposited into PubMed Central. RCUK and Wellcome funded authors can choose to publish their paper as open access with the payment of an article process charge (gold route), or opt for their accepted manuscript to be deposited (green route) into PMC with an embargo. With both the gold and green open access options, the author will continue to sign the Copyright Transfer

Agreement (CTA) as it provides the mechanism for LWW to ensure that the author is fully compliant with the requirements. After signature of the CTA, the author will then sign a License to Publish where they will then own the copyright. Those authors who wish to publish their article via the gold route will be able to publish under the terms of the Attribution 3.0 (CCBY) License. To view of a copy of this license visit: <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>. Those authors who wish to publish their article via the green route will be able to publish under the rights of the Attribution Non-commercial 3.0 (CCBY NC) license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>). It is the responsibility of the author to inform the Editorial Office and/or LWW that they have RCUK funding. LWW will not be held responsible for retroactive deposits to PMC if the author has not completed the proper forms.

FAQ for open access <http://links.lww.com/LWW-ES/A48>

Page Proofs and Corrections - Corresponding authors will receive an e-mail containing a link to the electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. The pages proofs are provided as portable document format (PDF) files which require Adobe Reader to be viewed and edited. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading the files and for returning the corrected pages electronically to the publisher. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style should be allowed to stand if they do not alter the authors' meaning. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections returned within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the communication accompanying the page proofs.

Reprints - The corresponding author will receive the reprint order form via e-mail while the article is in production. Reprint requests can be submitted any time before or after publication of the article. For orders submitted before the article is published, the reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. For any questions regarding reprints or publication fees, contact the Reprint Department by mail at Lippincott Williams & Wilkins, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21201; by phone at 1-800-341-2258; by fax at 410-528-4434; or by e-mail at: reprints@wolterskluwer.com.

Permissions - For permission and/or rights to use content for which the copyright holder is LWW or the society, please go to the journal's website and after clicking on the

relevant article, click on the "Request Permissions" link under the "Article Tools" box that appears on the right side of the page. Alternatively, send an e-mail to customercare@copyright.com.

For Translation Rights & Licensing queries, contact Silvia Serra, Translations Rights, Licensing & Permissions Manager, Wolters Kluwer Health (Medical Research) Ltd, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK. Phone: +44 (0) 207 981 0600. E-mail: silvia.serra@wolterskluwer.com

For Special Projects and Reprints (U.S./Canada), contact Alan Moore, Director of Sales, Lippincott Williams & Wilkins, Two Commerce Square, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103. Phone: 215-521-8638. E-mail: alan.moore@wolterskluwer.com

For Special Projects and Reprints (non-U.S./Canada), contact Silvia Serra, Translations Rights, Licensing & Permissions Manager, Wolters Kluwer Health (Medical Research) Ltd, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK. Phone: +44 (0) 207 981 0600. E-mail: silvia.serra@wolterskluwer.com