

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "ESTUDO DO ANTAGONISTA BRILLIANT BLUE G SOBRE O RECEPTOR P2X7 NOS NEURÔNIOS ENTÉRICOS E CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS DO COLO DISTAL DE RATOS SUBMETIDOS À COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL", protocolado sob o CEUA nº 1793240815, sob a responsabilidade de **Patrícia Castelucci e equipe; Mariá Munhoz Evangelinellis** - 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 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 01/02/2016.

We certify that the proposal "Study of the Brilliant Blue G antagonist of the P2X7 receptor in the enteric neurons and enteric glial cells of the rat distal colon submitted to ulcerative colitis", utilizing 200 Isogenic rats (200 males), protocol number CEUA 1793240815, under the responsibility of **Patrícia Castelucci and team; Mariá Munhoz Evangelinellis** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 02/01/2016.

Vigência da Proposta: de 09/2015 a 02/2018

Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Procedência: Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Espécie: Ratos isogênicos

sexo: Machos

idade: 2 meses

N: 200

Linhagem: Wistar

Peso: 250

Resumo: As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas do trato gastrointestinal e incluem a colite ulcerativa e a Doença de Crohn. A colite ulcerativa caracteriza-se como uma inflamação limitada ao colo, normalmente iniciando no reto e espalhando de maneira contínua. A frequência da colite ulcerativa é maior nos países desenvolvidos e áreas urbanas e infecções gastrointestinais prévias podem dobrar o risco de desenvolvimento da doença. A inflamação intestinal, seja ela causada por infecções ou por resposta imune anormal podem levar a alterações que resultam em mudanças estruturais, intrínsecas e sinápticas que alteram a função neuronal. Estudos em modelos animais têm demonstrado o efeito da inflamação intestinal sobre o sistema nervoso entérico, após a indução de colite com substâncias ácidas, como o 2,4,6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Tem sido descrito a presença de receptores purinérgicos P2X1-P2X7 no sistema nervoso entérico. O receptor P2X7 é o maior entre os membros da família P2X e participa na regulação de diversos processos, como a permeabilidade celular, apoptose e liberação de citocinas. Um estudo recente demonstrou que a colite ulcerativa reduz o número de neurônios imunoativos a P2X7 no plexo mioentérico. A redução na densidade neuronal também resultou em perda de motilidade intestinal. Este projeto visa avaliar o efeito do Brilliant Blue G, antagonista do receptor P2X7, no sistema nervoso entérico do intestino grosso de animais submetidos à colite ulcerativa. Serão analisados o colo distal de ratos Wistar submetidos a indução da colite ulcerativa pela administração TNBS no intestino grosso. O tratamento com BBG será feito 1 hora após a indução da colite e por 5 dias consecutivos, os colos distais serão coletados 24 horas e 7 dias após a indução da colite. Os grupos estudados serão grupo controle (CT, não manipulado), grupo SHAM, (indução será feita com salina), grupos COL 24h, BBG 24h, COL 7 dias e BBG 7 dias. Será avaliado o código químico, a densidade neuronal e área dos neurônios entéricos imunoativos a óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), colina acetil Transferase (ChAT), Calbindina e Calretinina, juntamente com o receptor P2X7, assim como nas células gliais entéricas, reativas ao S100 β e ao GFAP (proteína fibrilar ácida). O material será analisado através das técnicas de imunohistoquímica por dupla marcação quanto a imunoreatividade à P2X7, ChAT, NOS, Calb, Carl, S100 β e ao GFAP e anti HuC/D; análise histológica, utilizando as técnicas de Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de Masson e Picrosirius para avaliar a integridade da parede intestinal; classificação da colite; western blot e PCR em tempo real para avaliação da expressão de P2X7; microscopia eletrônica de transmissão; histoquímica da Mieloperoxidase (MPO) para quantificação de neutrófilos e motilidade intestinal.

São Paulo, 01 de fevereiro de 2016



Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo do receptor P2X7 e do sistema nervoso entérico do intestino grosso de ratos submetidos a colite ulcerativa experimental*", registrado sob o protocolo nº **68/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, 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 e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **11/10/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Patrícia Castelucci**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Mariah Munhoz Evangelinellis (Pós-graduando), Cristina Eusebio Mendes (Pós-graduando), Roberta Figueiroa de Souza (Iniciação científica)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Study of the P2X7 receptors and enteric nervous system of the rats distal colon after ulcerative colitis*", protocol nº **68/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/11/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

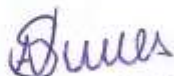
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Patrícia Castelucci**

- Team members: *Mariah Munhoz Evangelinellis (Graduate Student), Cristina Eusebio Mendes (Graduate Student), Roberta Figueiroa de Souza (Undergraduate Student).*

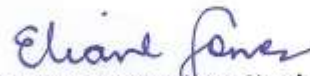
At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Wistar</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>200 g</i>	308

São Paulo, 14 de outubro de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP