MÁRCIA SANAÉ MIZUNO

**ANÁLISES MORFOQUANTITATIVA E DO CÓDIGO QUÍMICO
DO RECEPTOR PURINÉRGICO P2X₂ NO PLEXO
MIOENTÉRICO DO ÍLEO DE CAMUNDONGOS OBESOS
FÊMEAS E MACHOS (*ob/ob*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Castelucci

São Paulo

2010

RESUMO

MIZUNO, S. M. **Análises morfoquantitativa e do código químico do receptor purinérgico P2X₂ no plexo mioentérico de camundongos obesos (*ob/ob*) fêmeas e machos.** 150 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As atividades intestinais são coordenadas pelo sistema nervoso entérico e, disfunções na motilidade intestinal são observadas em indivíduos obesos. O ATP é um co-transmissor e seus receptores estão distribuídos nos neurônios entéricos constituindo a família P2X e P2Y. O presente estudo tem como objetivo analisar a expressão do receptor P2X₂ e o código químico nos neurônios mioentéricos na obesidade. Foram utilizados fêmeas de camundongos obesos machos (OBM) e fêmeas (OBF) (C57BL/6J *ob/ob*), e controles (CF; CM) (+/+), que foram submetidos à técnica imuno-histoquímica de duplas marcações em neurônios imunomarcados ao receptor P2X₂ com NOS (inibitórios), ChAT (excitatórios) ou Calr (excitatórios e sensoriais). *Resultados dos grupos CF e OBF:* Foi verificado a imunomarcação ao receptor P2X₂, NOS, ChAT e Calr no citoplasma e nas membranas celular e nuclear dos neurônios mioentéricos de ambos os grupos. As duplas marcações dos neurônios imunorreativos (-ir) ao receptor P2X₂ com NOS, ChAT ou Calr em CF foram 24±4%, 24±2% e 24±4%, e em OBF foram 19±4%, 25±4% e 22±1%, respectivamente. As duplas marcações dos neurônios NOS-ir, ChAT-ir ou Calr-ir com os neurônios receptor P2X₂-ir foram 100% nos dois grupos. A densidade dos neurônios P2X₂-ir aumentou em 62%, enquanto que a dos neurônios NOS-ir e ChAT-ir reduziram em 49% e 57%. A morfometria demonstrou aumento na área dos neurônios NOS-ir (CF 234±63, OBF 312±67); ChAT-ir (CF 210±24, OBF 253±14) e Calr-ir (CF 203±41, OBF 315±47), no entanto, neurônios P2X₂-ir não apresentaram alterações (CF 325±23, OBF 336±67). A histoquímica demonstrou não haver diferença estatística entre os grupos quanto à densidade e a morfometria dos neurônios NADH-diaforase positivos. *Resultados dos grupos CM e OBM:* A expressão do receptor P2X₂ foi identificada somente em CM e a imunomarcação a NOS, ChAT e Calr nos dois grupos. Em CM as duplas marcações dos neurônios P2X₂-ir com NOS-ir, ChAT-ir ou Calr-ir foram 23±3%, 34±5% e 32±6%, respectivamente, e nos neurônios NOS-ir, ChAT-ir e Calr-ir com o receptor P2X₂ foram 100%. A densidade dos neurônios NOS-ir e Calr-ir reduziram em 31% e 16%, enquanto que a densidade da população ChAT-ir aumentou 31%. A morfometria demonstrou que neurônios NOS-ir (CM 390±49, OBM 350±22); ChAT-ir (289±18, OBM 312±44), Calr-ir (CM 375±49, OBM 360±38) e P2X₂-ir (CM 437±190) não apresentaram diferenças entre os grupos. A expressão protéica pela técnica do Western Blotting mostrou que houve uma redução de 36,5% no grupo OBM. Concluímos que neste modelo experimental tanto a obesidade (C57BL/6J *ob/ob*) como os gêneros podem contribuir com alterações: na expressão do receptor P2X₂, na densidade e na morfologia dos neurônios NOS-ir, ChAT-ir e Calr-ir, promovendo mudanças nas atividades intestinais.

Palavras-chave: Plexo mioentérico. Código químico. Obesidade. Receptor P2X₂. Morfologia. Camundongo *ob/ob*.

ABSTRACT

MIZUNO, S. M. **Morfoquantitative and chemical coding analyses of the purinergic P2X₂ receptor in myenteric plexus of female and male obese mice (*ob/ob*)**. 150 p. Ph. D. Thesis (Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The intestinal activities are coordinated by enteric nervous system, and dysfunctions in intestinal motility were observed in obese individuals. The enteric neurons have been demonstrated to express different purinergic receptors. This study aims to analyze the expression of P2X₂ receptor and the chemical code in the myenteric neurons in obesity. Sample from ileum of obese male (OBM) and females (OBF) (C57BL/6J *ob/ob*) and controls mice (CF, CM) (+/+) were used. Immunohistochemistry for double labelling in neurons P2X₂ receptor immunostained with NOS (inhibitory), ChAT (excitatory) or Calr (excitatory and sensory) was performed. *Results of CF and OBF groups:* immunostaining was verified for P2X₂ receptor, NOS, ChAT and Calr in the cytoplasm and in cell and nuclear membranes of myenteric neurons of both groups. The double-labelling for P2X₂ receptor/NOS, ChAT or Calr in CF were 24 ±4%, 24 ±2% and 24 ±4%, respectively, and in OBF were 19 ±4%, 25 ±4% and 22±1%. Inversely, NOS, ChAT or Calr/P2X₂ receptor immunoreactive neurons were 100% in both groups. The density of P2X₂ neurons showed an increase of 62%, whereas NOS and ChAT neurons decreased by 49% and 57%. In morphometric analysis showed an increase in NOS (CF 234 ± 63, 312 ± 67 OBF), ChAT (CF 210 ± 24, 253 ± 14 OBF) and Calr (CF 203 ± 41, 315 ± 47 OBF) neuronal area, however, P2X₂ neurons no changed in this feature (CF 325 ± 23, 336 ± 67 OBF). The histochemistry for NADH-diaphorase showed no statistical difference to density and morphometry of neurons between the groups. *Results of CM and OBM groups:* The P2X₂ receptor expression was identified only in CM. Immunostaining for NOS, ChAT and Calr were observed in both groups. The double-labelling observed in CM for P2X₂ receptor and NOS, ChAT or Calr were 23±3%, 34 ±5% and 32 ±6%, and inversely, NOS, ChAT or Calr/P2X₂ receptor immunoreactive neurons were 100%. The NOS and Calr neuronal density were reduced about 31% and 16%, while population ChAT neuronal density increased about 31%. The morphometry showed that NOS (CM 390 ± 49, 350 ± 22 OBM), ChAT (289 ± 18, 312 ± 44 OBM), Calr (CM 375 ± 49, 360 ± 38 OBM) and P2X₂ (CM 437 ± 190) neurons no differ between groups. The P2X₂ receptor protein expression by Western blotting showed that there was a reduction in 36.5% in OBM. We concluded that in this experimental model, both obesity (C57BL/6J *ob/ob*) and genders may contribute to changes in P2X₂ receptor expression, density and morphology of neurons NOS, ChAT and Calr, promoting alterations in intestinal activities.

Key words: Myenteric plexus. Chemical coding. Obesity. P2X₂ receptor. Morphology. Mice *ob/ob*.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Organização do Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso entérico (SNE) é uma divisão do sistema nervoso, o qual se apresenta constituído por células nervosas organizadas formando uma rede neural localizado na parede dos órgãos do trato gastrointestinal, e estes circuitos possuem grande importância para o perfeito funcionamento do sistema digestório (FURNESS, 2006a; 2000; FURNESS e COSTA, 1987).

Langley (1903)¹ apud Furness (2006a) definiu o termo autônomo e os três subsistemas: o simpático, o parassimpático e o sistema entérico, classificando-os através das bases anatômica e funcional. O conceito inicial de Sistema Nervoso Entérico derivou dos estudos deste mesmo autor em 1921², que chamou a atenção para um grande número de neurônios que apresentaram características diferenciais de outras divisões do sistema nervoso. Segundo o autor, estes neurônios apresentam um grau de independência do sistema nervoso central, devido à realização de trajetos reflexos completos dentro do sistema nervoso entérico e, por apresentarem poucos axônios eferentes chegando ao intestino em comparação ao grande número de neurônios entéricos.

Durante muito tempo o sistema nervoso entérico foi considerado como a porção pós-ganglionar da divisão parassimpática do sistema nervoso autônomo (SNA), atualmente, é reconhecido como uma divisão própria do sistema nervoso autônomo, juntamente com os sistemas nervosos simpático e parassimpático. Isto se tornou possível somente na década de 80, com a publicação do trabalho de Furness e Costa, os quais estabeleceram que o SNE apresenta as seguintes características: 1. grau de independência do Sistema Nervoso Central; 2. presença de trajetos reflexos completos no SNE, devido à presença de neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores que formam trajetos reflexos que são intrínsecos no intestino; 3. a natureza ampla do SNE que contém cerca de 10^7 a 10^8 células nervosas e; 4. a diversidade dos tipos neuronais neste sistema.

Gershon et al. (1993) traduziram o SNE da seguinte maneira: “O sistema nervoso entérico é a maior e mais complicada divisão do sistema nervoso periférico, contém mais neurônios do que a medula espinal e, em contraste com outras regiões do sistema nervoso periférico, o SNE é capaz de mediar atividade reflexa na ausência de aferências neurais centrais. A maior parte dos neurônios do SNE não está diretamente inervada por uma aferência pré-ganglionar do cérebro ou da medula espinal e a sua independência funcional

¹ LANGLEY, J.N. The autonomic nervous system. **Brain**, v. 26, p. 1–26, 1903.

² LANGLEY, J. N. **The Autonomic Nervous System**. Heffer: Cambridge, 1921.

está espelhada na química e na estrutura. A diversidade fenotípica excede aquela do restante do sistema nervoso periférico e cada uma das classes de neurotransmissores encontradas no cérebro, se não, todos os próprios transmissores, estão representados no SNE. Os muitos neurônios deste sistema estão agrupados em complexos micro-circuitos que estão apenas começando a ser compreendidos. Estes micro-circuitos incluem neurônios aferentes primários, interneurônios, neurônios motores excitatórios e inibitórios. Ainda, o suporte interno para os neurônios do SNE não é fornecido pelo colágeno e células de Schwann como nas regiões extra-entéricas do sistema nervoso periférico; em vez disso, os neurônios entéricos são sustentados por células que se assemelham aos astrócitos do sistema nervoso central e que foram denominadas de glia entérica”.

A existência dos reflexos polarizados que funcionam no intestino, por influência extrínseca, trouxe as características incomuns do SNE e classifica-os como a terceira divisão do SNA. O SNE consiste de feixes nervosos interconectados e gânglios que estão localizados dentro da parede de órgãos tubulares do trato gastrointestinal, pâncreas e sistema biliar e, é composto por dois grandes plexos nervosos interconectados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (FURNESS e COSTA, 1987).

O plexo mioentérico (ou de Auerbach) localiza-se entre a túnica muscular longitudinal externa e a túnica muscular circular interna, estendendo-se ao longo do trato digestório, desde o esôfago até o reto. Neste plexo, três componentes de fibras são descritos: o plexo primário, o plexo secundário e o plexo terciário (LI, 1940³ apud FURNESS, 2006a; STOHR, 1930⁴ apud FURNESS, 2006a; SCHABADASH, 1930⁵ apud FURNESS, 2006a; AUERBACH, 1864⁶ apud FURNESS, 2006a) (Figura 1).

O plexo submucoso é proeminente nos intestinos delgado e grosso e, divide-se em plexo submucoso interno (plexo de Meissner) abaixo da mucosa, o plexo submucoso externo (plexo de Schabadash ou de Henle) e junto à camada circular do músculo, o plexo intermediário posicionado entre os plexos submucoso e externo (Figura 1). Suas malhas são menores do que o plexo mioentérico, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor. Este plexo está situado em torno da circunferência e ao longo do intestino, sendo que,

³ LI, P. -L. The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. **J. Anat.**, v. 74, p. 348-359, 1940.

⁴ STOHR, P. Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanales. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v. 12, p. 66-154, 1930.

⁵ SCHABADASH, A. Die Nerven des Magens der Katze. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v. 10, p. 254-319, 1930.

⁶ AUERBACH, L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. **Arch. Pathol. Anat. Physiol.** v. 30, p. 457-460, 1864.

um plexo fica próximo do músculo circular e o outro próximo da mucosa (GONIAEW, 1875⁷ apud FURNESS, 2006a; HENLE, 1871⁸ apud FURNESS, 2006a).

Figura 1 – Representação esquemática da estratigrafia da parede do trato gastrointestinal.
Fonte: Furness, 2006a.

Cada plexo contém vários tipos neuronais, incluindo os neurônios motores, interneurônios, e neurônios aferentes primários intrínsecos que reflexamente controlam as funções gastrintestinais (FURNESS 2006a; SAYEGH e RITTER, 2003; BROOKES, 2001 FURNESS, 2000). A rede neural do plexo mioentérico está predominantemente envolvida com a regulação reflexa das atividades contráteis da musculatura externa, enquanto que os neurônios motores do plexo submucoso estão relacionados com o controle das atividades secretomotora e vasomotora da túnica mucosa (FURNESS et al., 2003; LOMAX e FURNESS, 2000).

⁷ GONIAEW, K. Die nerven des nahrungsschlauches. *Arch. Mikrosk. Anat.*, v. 11, p. 479-496, 1875.

⁸ HENLE, J. *Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen.*, Band III, Abt 2 Nervenlebre. Vieweg und Sohn, Braunschweig, 1871.

1.2 Código Químico

O arranjo dos plexos entéricos tem sido estudado principalmente em espécies como camundongos (QU et al., 2008; SPANGÉUS e El-SALHY, 2001; SANG e YOUNG, 1996), ratos (SAYEGH e RITTER, 2003;) porcos (BALEMBA et al., 1998), cobaias (FURNESS, 2006b; LOMAX e FURNESS, 2000) e em humanos (MURPHY et al., 2007; BREHMER et al., 2004). Essencialmente, os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório tubular, porém diferenças quanto à densidade e ao tamanho dos neurônios, bem como a forma dos gânglios, podem ser encontrados no mesmo segmento do trato digestório dos animais de mesma espécie e com diferentes idades (PHILLIPS e POWLEY, 2007; McKEOWN et al., 2001; MATINI et al., 1997; SANTER, 1994; SANTER e BAKER, 1988) ou submetidos a condições experimentais como a desnutrição (GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010; GOMES et al., 2006; CASTELUCCI et al., 2002a) ou em protocolo de inflamação intestinal (VENTURA-MARTINEZ et al., 2008; BOYER et al., 2005; LePARD, 2005; DE GIORGIO et al., 2004).

Métodos imuno-histoquímicos, eletrofisiológicos, morfológicos (microscopias de luz e eletrônica), farmacológicos e técnicas de traçadores retrógrados foram combinados e utilizados para a identificação e classificação dos neurônios (BREHMER et al., 2004; FURNESS et al., 2004; CASTELUCCI et al., 2002b; POOLE et al., 2002; FURNESS, 2000; LOMAX et al., 2000; SONG et al., 1998; WANG et al., 1995; BROOKES et al., 1995). A utilização destes métodos é de grande importância para o entendimento dos circuitos neurais e neurofisiológicos do SNE e em consequência destes estudos, houve a descoberta de que cada neurônio entérico contém vários marcadores químicos, o qual indica as suas funções. Estes estudos utilizaram combinações metodológicas que permitiram a descoberta, até o momento, ao redor de 14 tipos funcionais de neurônios entéricos somente no intestino de cobaias (BROOKES, 2001; FURNESS, 2000; 2006a).

Baseado na combinação destes métodos, Furness (2000), descreveu no intestino delgado de cobaias os tipos de neurônios segundo as funções, morfologias do corpo celular, código químico e projeções, que estão representadas na Figura 2: 1. Interneurônio ascendente; 2. Neurônio aferente primário intrínseco mioentérico; 3. neurônio intestino-fugal; 4. Neurônio motor excitatório do músculo longitudinal; 5. Neurônio motor inibitório do músculo longitudinal; 6. Neurônio motor excitatório do músculo circular; 7. Neurônio motor inibitório do músculo circular; 8. Interneurônio descendente (reflexos locais); 9. Interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10. Interneurônio descendente (complexo mioelétrico

migratório); 11. Neurônio aferente primário intrínseco submucoso; 12. Neurônio vasodilatador/secretomotor não-colinérgico; 13. Neurônio vasodilatador/secretomotor colinérgico; 14. Neurônio secretomotor (não-vasodilatador) colinérgico.

Figura 2 – Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do sistema nervoso entérico (ML – Músculo longitudinal, PM – Plexo mioentérico, CM – Músculo, PS – Plexo submucoso, MM – Muscular da mucosa, Muc – Mucosa).

Fonte: Furness, 2006a.

A avaliação da morfologia do corpo celular e do código químico são dois métodos utilizados para caracterizar os neurônios entéricos. O primeiro método depende da comparação das formas dos corpos celulares dos neurônios entéricos com as documentadas em 1899 pelo histologista russo Dogiel⁹ apud Furness (2006a). Este pesquisador denominou os neurônios em Dogiel tipo I e Dogiel tipo II, sendo que o primeiro possui corpos celulares pequenos (entre 13 e 35µm de comprimento e 9-22µm de largura) com múltiplos e curtos dendritos e com um axônio, e o segundo possui corpos celulares grandes (apresentam diâmetro máximo entre 22 e 47µm e diâmetro mínimo de 13 a 22µm) com um ou dois longos processos. No estudo do código químico, este depende da detecção da imunorreatividade aos anticorpos produzidos contra o marcador neuronal, assim como os neurotransmissores,

⁹ DOGIEL, A. S. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch. Anat. Physiol. Leipzig. Anat. Abt. Jg.*, v. 1899, p. 130-158, 1899.

receptores, proteínas citoesqueléticas, ou enzimas nos neurônios entéricos, por exemplo, óxido nítrico sintase (NOS), P2X, calbindina (Calb) e neurofilamento-N (FURNESS, 2006a; SAYEGH e RITTER, 2003; CASTELUCCI et al., 2002a; COSTA et al., 1996; YOUNG et al., 1993).

A imuno-histoquímica tem sido o método mais utilizado para a detecção do fenótipo dos neurônios entéricos, e que também permite a verificação do código químico como um meio de discriminar diferentes classes de neurônios de acordo com a imunorreatividade ao neuropeptídeo. Dentre os códigos químicos mais estudados na investigação dos neurônios entéricos temos: a acetilcolina (ACh), calbindina (Calb), calretinina (Calr), colecistoquinina (CCK), colina acetiltransferase (ChAT), encefalinas (ENK), 5-hidroxi-triptamina (5-HT), neurofilamento-N (NF-N), óxido nítrico sintase (NOS), neuropeptídeo Y (NPY), somatostatina (SOM), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e a família dos receptores purinérgicos (P2X) (LePARD, 2005; ANLAUF et al., 2003; CHIOCCHETTI et al., 2003; POOLE et al., 2002; BROOKES, 2001; QUINSON et al., 2001; SPANGÉUS e EL-SALHY, 2001; CLERK et al., 1998; COSTA et al., 1996). O significado funcional de uma célula pode ser fornecido pela presença de uma proteína particular ou de um neuropeptídeo, como por exemplo, a imunorreatividade à calbindina, o qual é uma proteína ligante ao íon cálcio citosólico, que baseado em suas propriedades morfológicas e eletrofisiológicas é considerada um neurônio aferente primário intrínseco (IPAN) (SAYEGH e RITTER, 2003).

Além disso, no íleo de cobaias, os neurônios aferentes primários intrínsecos contêm a colina acetiltransferase (ChAT, enzima sintetizadora da acetilcolina) são, portanto colinérgicas. No entanto, mais de 80% dos neurônios contêm substância P. Existem também marcadores que distinguem os neurônios sensoriais de interneurônios e neurônios motores. Grande parte dos neurônios intrínsecos aferentes primários (IPANs) contêm calbindina (proteína ligante ao cálcio) e muitos destes neurônios são reativos ao marcador nuclear NeuN (BERTRAND, 2003).

A eletrofisiologia tem sido outro método utilizado para a classificação funcional dos neurônios em dois grupos distintos: neurônios AH (neurônios sensoriais intrínsecos) e neurônios S (interneurônios e neurônios motores). Os neurônios AH são caracterizados pela longa hiperpolarização seguida pelo potencial de ação, e os neurônios S são células que apresentam impulsos sinápticos rápidos (LOMAX et al., 2000; BROOKES et al., 1995;).

Em termos funcionais gerais, Furness (2006a, 2000) propõe uma classificação das células nervosas entéricas, encontradas no intestino delgado de cobaias, com observação no

código químico da célula. Os cinco tipos funcionais considerados neurônios motores intrínsecos são: neurônios excitatórios e inibitórios para a musculatura lisa do intestino, neurônios vasomotores/vasodilatadores, neurônios secretomotores e neurônios cujo território de inervação são as células entero-endócrinas. Dentre os interneurônios, existe apenas um tipo com trajeto ascendente e três tipos com trajetos descendentes. Os interneurônios ascendentes são colinérgicos e formam uma rede ao longo do intestino, e estão relacionados com os reflexos propulsivos no intestino. Os interneurônios descendentes que apresentam ChAT/NOS/VIP±BN±GABA±NPY como seus códigos químicos, são aqueles envolvidos com a motilidade reflexa local. Os interneurônios ChAT/SOM estão envolvidos na condução de complexos mioelétricos migratórios no intestino delgado e os interneurônios ChAT/5-HT estão relacionados com reflexos secretomotores. Dentre os neurônios sensoriais ou os IPANs estão incluídos os neurônios quimiossensores e os mecanorreceptores da mucosa, e neurônios responsivos a distensão da parede intestinal.

Estudos sobre a identificação do código químico em neurônios entéricos e as projeções dentro da parede intestinal têm sido estudados em humanos (MURPHY et al., 2007; BREHMER et al., 2004) e em animais de portes variados como cavalos (FREYTAG et al., 2008), porcos (CZAJA et al., 2005; BROWN e TIMMERMANS, 2004), coelhos (DENES e GABRIEL, 2004), ratos (XIANG e BURNSTOCK, 2004; PARK et al., 1999) e amplamente em espécies como as cobaias (CASTELUCCI et al., 2002b; POOLE et al., 2002; HU et al., 2001). Porém são poucos os estudos nesta linha de pesquisa em camundongos, os trabalhos detalhados sobre o código químico e algumas de suas colocalizações foram verificados por Qu et al. (2008), Sang e Young (1998), Sang et al. (1997) e Sang e Young (1996).

Recentemente o camundongo tornou-se uma espécie atrativa na pesquisa da neurociência entérica devido à disponibilidade de animais mutantes que esta espécie oferece e a facilidade com que a manipulação genética pode ser realizada através da utilização de tecnologia em genes recombinantes (REN et al., 2003; WARD et al., 1994; HUANG et al., 1993). Pode-se adicionar que, o camundongo apresenta vantagens quanto aos estudos sobre o desenvolvimento do SNE devido a sua curta e uniforme gestação, oferecendo aos pesquisadores grandes êxitos (RUAN et al., 2004; MCKEOWN et al., 2001; GERSHON et al., 1993).

Entre os estudos do código químico, existem relatos da distribuição e padrões de dupla marcação da calbindina (Calb), calretinina (Calr), ácido gama-aminobutírico (GABA), 5-hidroxitriptamina (5-HT), óxido nítrico sintase (NOS), neuropeptídeo Y (NPY), substância P

(SP) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) em neurônios entéricos de camundongos (QU et al, 2008; SANG et al., 1997; SANG e YOUNG, 1996).

1.3 Receptores Purinérgicos no Sistema Nervoso Entérico

Durante um longo tempo após a descoberta do SNE, as estruturas internas dos gânglios entéricos do trato gastrointestinal e os circuitos que eles formam permaneceram desconhecidos. Entretanto, com o advento de novas tecnologias, a organização dos circuitos entéricos tem sido substancialmente demonstrada e, recentemente muitos avanços importantes no entendimento das funções individuais dos neurônios nos circuitos entéricos têm sido realizados (FURNESS et al., 2004).

A utilização do adenosina 5'-trifosfato (ATP) como um neurotransmissor pelos neurônios entéricos foi uma das grandes descobertas. Durante muito tempo, o ATP foi considerado um importante elemento envolvido no metabolismo celular e na produção de energia. Porém, estudos realizados pelo pesquisador Geoffrey Burnstock permitiram a revelação do ATP como um co-transmissor de curta-duração de funções altamente específicas no sistema nervoso (ABBRACCHIO e BURNSTOCK, 1998).

Drury e Szent-Gyorgyi (1929)¹⁰ apud Abbracchio e Burnstock (1998) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem que a componente adenina possui uma potente ação extracelular em coração de mamíferos. No final da década de 50, Holton¹¹ apud Abbracchio e Burnstock (1998) demonstrou a liberação de ATP durante a estimulação anti-drômica de nervos sensoriais suprimindo uma artéria da orelha do coelho. Porém somente no ano de 1970, Burnstock e seus colaboradores propuseram que o ATP ou um nucleotídeo relacionado poderiam ser um neurotransmissor liberado pelos neurônios não adrenérgicos e não colinérgicos inibitórios no intestino. Então foi sugerindo a existência de receptores purinérgicos específicos presentes na membrana celular pós-juncional.

Em 1978, Burnstock propôs, através de experimentos farmacológicos, a divisão dos receptores de membrana específicos em dois tipos purinérgicos denominados de P1 e P2, os quais são ativados pela adenosina e ATP, respectivamente. Os receptores P2 são identificados baseados nas suas propriedades farmacológicas, mecanismo de transdução do sinal e sequência de aminoácidos deduzidos. Desta forma, os receptores P2 foram subdivididos em

¹⁰ DRURY, A. N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 68, p. 213-237, 1929.

¹¹ HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. **J. Physiol. (London)**, v. 145, p. 494-504, 1959.

P2X e P2Y, o primeiro são receptores ligantes aos canais iônicos, e o segundo são membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G. Na família dos receptores P2X existem 07 tipos distintos de cDNAs (P2X_{1,2,3,4,5,6,7}), e na família dos receptores P2Y existem seis subunidades diferentes (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) (ABBRACHIO et al., 2009; DUNN et al., 2001; ABBRACCHIO e BURNSTOCK, 1998).

Apesar da variedade de trabalhos farmacológicos, eletrofisiológicos e de biologia molecular do ATP como um neurotransmissor, estudos morfológicos no campo dos neurônios entéricos visando a imunorreatividade da família P2X ainda são raros. Têm-se sugerido que os neurônios entéricos, predominantemente, expressam receptores P2X₂ (LePARD et al., 1997; ZHOU e GALLIGAN, 1996), enquanto que uma minoria da população entérica apresenta imunorreatividade ao P2X₁, como verificado em neurônios submucosos do íleo de cobaias (VULCHANOVA et al., 1996). Quanto aos estudos sobre os receptores P2X₄ e P2X₆ em neurônios entéricos, são poucos até o momento. Barajás-López et al. (1996), observou que os neurônios mioentéricos expressam um receptor P2X mostrando alguma semelhança farmacológica às subunidades P2X₄ e P2X₆. Entretanto, foi notado também que as propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas dos receptores P2X são virtualmente idênticas entre os neurônios mioentéricos e submucosos, sugerindo que os receptores P2X similares estão presentes em ambos os plexos.

A aplicação do ATP exógeno também resulta na resposta de despolarização rápida em 80-90% dos neurônios S mioentéricos excitatórios no intestino delgado de cobaia e afeta o potencial de membrana em 80-90% dos neurônios mioentéricos, da maioria dos neurônios AH e S (BARAJAS-LOPEZ et al., 1996; KATAYAMA e MORITA, 1989), em gânglios submucosos (BARAJAS-LOPEZ et al., 1994). Historicamente, S significa sináptico, os neurônios S exibem potencial de ação rápido que é seguido por um potencial pós-hiperpolarizante (AHP) de curta duração, 20-100ms. AH significa pós-hiperpolarizante, são neurônios que não apresentam potenciais pós-sinápticos rápidos e possuem maior duração do os neurônios S por apresentar uma inflexão na fase de queda, seguido por duas fases distintas de hiperpolarização, uma AHP precoce e outra tardia (FURNESS, 2006a). O efeito da rápida despolarização do ATP parece ser através da abertura de canais de Ca²⁺ não específicos, em neurônios mioentéricos (ZHOU e GALLIGAN, 1996) e neurônios submucosos (BARAJAS-LOPEZ et al., 1994), que poderia ser consistente com a presença dos receptores P2X. Experimentos demonstram que receptores purinérgicos têm um papel fisiológico na transmissão neuronal no sistema nervoso entérico (BIAN et al., 2000). Nestes

estudos foram usadas drogas agonistas e antagonistas que foram aplicadas em partes selecionadas dos circuitos entéricos nervosos e indicaram que os receptores purinérgicos estavam envolvidos nas sinapses neuro-neuronal de trajetos ascendentes e descendentes. Bian et al. (2000) concluíram que os receptores P2X estavam envolvidos na transmissão entre interneurônios descendentes e neurônios motores. Os autores Spencer e Walsh (2000) concluíram que as purinas estão envolvidas na transmissão de neurônios motores ascendentes (excitatórios).

Os autores Castelucci et al. (2002b) verificaram que somente 25% dos neurônios do plexo mioentérico do íleo de cobaias foram fortemente imunorreativos a subunidade P2X₂, e que esta forte imunorreatividade ocorreu em neurônios específicos, como em neurônios motores inibitórios e IPANs no gânglio mioentérico imunorreativos ao óxido nítrico sintase e a calbindina. Este fato indica que outras subunidades P2X ocorrem nos neurônios mioentéricos. Outra subunidade localizada é o tipo P2X₃, que foi reportado em estudo de neurônios mioentéricos do cólon de humanos (YIANGOU et al., 2001), e esta subunidade ocorre em associação com o P2X₂ nos gânglios da raiz dorsal, trigeminal, inferior do nervo vago e no SNE (XIANG e BURNSTOCK, 2004; POOLE et al., 2002; COLLO et al., 1996; CHEN et al., 1995; LEWIS et al., 1995).

A imunorreatividade ao receptor purinérgico P2X₂ também foi observada por Castelucci et al. (2003), em terminações nervosas laminares intra-ganglionares (IGLEs) associados aos gânglios mioentéricos por todo o trato gastrointestinal de camundongos. As IGLEs são terminações mecano-sensoriais especializadas de neurônios aferentes do nervo vago que consiste em um grande número de lamelas semelhantes a pequenas placas, medindo cerca de 2 a 5 µm. As IGLEs têm origem de um simples axônio, interconectado com outro e formam uma cobertura descontínua de partes do gânglio entérico (ZAGORODNYUK e BROOKES, 2000; BERTHOUD e NEUHUBER, 2000; POWLEY et al., 1994).

O ATP liberado localmente nos receptores P2X₂ de fibras sensoriais nos órgãos viscerais podem estimular a via da dor, e estes uma vez ativados podem estimular receptores P2X₂ nos neurônios localizados na coluna dorsal da medula espinal enviando informações nociceptivas e desta forma participando da dor neuropática como observado em camundongo com lesão constritiva crônica (BURNSTOCK, 2008).

Ren et al 2003 corroboram que o controle da frequência e amplitude das contrações peristálticas no segmento ileal é promovido através do receptor P2X₂ o qual contribui para os potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos. Além disso, os receptores P2X₂ podem mediar

à mudança no fenótipo da microglia inativada elaborando processos para forma amebóide ativada nos locais de injúria (BURNSTOCK, 2008).

Os receptores P2X₃ têm atraído atenção especial, pois segundo Nassauw et al. (2002), estes receptores estão, predominantemente, em neurônios sensoriais nociceptivos pequenos no gânglio da raiz dorsal, trigêmeo e nodoso (gânglio inferior do nervo vago). No SNE, foram detectados neurônios imunorreativos aos receptores P2X₃ em alguns neurônios mioentéricos no cólon de humanos (YIANGOU et al., 2001) e em neurônios de ambos os plexos no trato gastrointestinal de cobaias e de ratos (XIANG e BURNSTOCK, 2005; 2004; POOLE et al., 2002). Contudo, é sugerido que os neurônios sensoriais intrínsecos em ambos os plexos expressam a imunorreatividade para o receptor P2X₃, implicando em um possível papel, destes neurônios, nos trajetos reflexos (BURNSTOCK, 2001).

A distensão dos segmentos intestinais pode evocar sensações dolorosas e não dolorosas, regulando os reflexos. Como os neurônios sensoriais intrínsecos e extrínsecos se projetam para a mucosa, tem sido proposto que o ATP liberado pelas células epiteliais da mucosa durante a distensão moderada do intestino age em receptores P2X₃ presente em processos sensoriais sub-epiteliais de neurônios entéricos intrínsecos para promover os movimentos peristálticos, enquanto a distensão severa atua em receptores P2X₃ de processos sensoriais sub-epiteliais de neurônios extrínsecos originados do gânglio da raiz dorsal para transmitir aos centros da dor no cérebro (BURNSTOCK, 2001).

Quanto à imunorreatividade ao receptor P2X₅, foi observado em fibras nervosas que envolvem os corpos celulares dos neurônios ganglionares, e possivelmente em processos gliais dos plexos entéricos. No plexo submucoso a imunorreatividade ao receptor foi expresso em todo o citoplasma e na superfície das membranas das células nervosas (RUAN e BURNSTOCK, 2005). No sistema nervoso entérico de rato de sido evidenciado o receptor P2X₃ (XIANG e BURNSTOCK, 2004) e receptor P2X₆ (YU et al., 2010) e, em cobaias, a presença dos receptores P2X₂ e P2X₃ (XIANG e BURNSTOCK, 2004) e colocalização destes receptores com P2Y₂ (XIANG e BURNSTOCK, 2005).

A imunorreatividade ao receptor P2X₇ (anteriormente denominada de P2Z) foi detectada em neurônios dos plexos mioentérico e submucoso do intestino delgado de cobaias (HU et al., 2001). Os receptores P2X₇ são conhecidos como ativadores da apoptose em vários tipos celulares e podem sofrer modificações durante o envelhecimento e a gravidez (SLATER et al., 2000a, b). Este receptor também está envolvido nas interações neuro-imunes onde atua

influenciando na produção de citocinas e na ação proliferativa (BURNSTOCK, 2008; SOLLE et al., 2001).

De um modo geral, os terminais periféricos localizados, como por exemplo, no intestino, são ativados pelo ATP liberado a partir de células locais por deformação mecânica, hipóxia ou através de vários agentes locais mediando respostas reflexas e nocicepção (BURNSTOCK, 2009). E até o momento tem se compreendido que as purinas no sistema nervoso é liberado pela exocitose de vesículas sinápticas e agem como neurotransmissores na comunicação intercelular de neurônios e células da glia, assim afetando a liberação de neurotransmissores e a onda de propagação de cálcio glial. O ATP pode agir como fator trófico tanto na diferenciação/crescimento como na regeneração/proliferação e sobrevivência, bem como agente tóxico que media a degeneração e morte de diferentes tipos celulares em condições fisiológicas e de desenvolvimento normal (FRANKE e ILLES, 2006).

Embora haja evidências sugerindo que as purinas possam influenciar na motilidade do trato gastrointestinal (BIAN et al., 2003; REN et al., 2003), uma clara caracterização dos diferentes subtipos de receptores P2 envolvidos não tem sido estabelecido. Este fato é certamente verdadeiro no trato gastrointestinal de camundongos, onde existe muito pouca literatura concernente á atividade dos componentes purinas e a ativação dos seus receptores. No entanto, a presença dos receptores P2X₂, P2X₃ e P2X₅ (RUAN e BURNSTOCK, 2005; RUAN et al., 2004; BIAN et al., 2003; REN et al., 2003; GIARONI et al., 2002), tem sido observado em estudos morfológicos dos neurônios entéricos de camundongos.

Trabalhos do presente laboratório tem demonstrado alterações no código químico de neurônios entéricos de ratos submetidos à desnutrição e renutrição protéica imunorreativos ao receptor P2X₂ no íleo (MISAWA et al., 2010) e receptores P2X₂ e ₇ no colo distal (GIROTTI, 2008). Além disso, estudos envolvendo modelo de ratos submetidos à isquemia/reperfusão intestinal tem demonstrado modificações no receptor P2X₂ (PAULINO et al., 2008¹²) e no receptor P2X₇ (PALOMBIT et al., 2010).

1.4 Obesidade e o Sistema Nervoso Entérico

Clinicamente, a obesidade é uma condição crônica que é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal em magnitude suficiente para afetar a qualidade de vida e

¹² PAULINO, A. S.; GIROTTI, P. A.; TAVARES DE LIMA, W.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P. Efeito da isquemia/reperfusão intestinal (I/R-i) sobre a expressão do receptor P2X₂ nos neurônios mioentéricos do íleo de ratos. Trabalho apresentado em forma de painel na **Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE**, 2008.

aumento no risco de morte. Em particular, a obesidade está associada á diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, apnéia durante o sono, certas formas de câncer, alterações ortopédicas e posturais, esteatose hepática, alterações gastrintestinais e neuropatia periférica (SCOARIS et al., 2010; MOAYYEDI, 2008; DREL et al., 2006; KOPELMAN, 2000). Atualmente a obesidade não é considerada uma simples desordem, mas uma doença multifatorial, complexa e de natureza quase sempre poligênica (HALPERN e MANCINI, 2009), o qual é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) como uma condição epidêmica que afeta a população de todo o mundo. Cerca de 01 bilhão de adultos no mundo estejam com o índice de massa corporal (IMC) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ e no mínimo 300 milhões de pessoas estejam clinicamente obesas, ou seja, com o IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$.

Uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde (2009) indica que a obesidade aumentou nos brasileiros. Atualmente, 13% dos adultos são obesos, sendo o índice maior entre as mulheres (13,6%) do que entre os homens (12,4%). Em 2006, quando foi apresentada a primeira edição do estudo Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico (VIGITEL), 11,4% dos brasileiros eram obesos. Em 2007, esse índice subiu para 12,9%. Nas pesquisas através da VIGITEL 2006 e 2007 mostravam que a obesidade em mulheres vinha em uma tendência de estabilização e, agora, há um aumento expressivo neste fator.

Segundo Halpern e Mancini (2009) a obesidade é causada por um gene que anula uma proteína que regula o equilíbrio energético, podemos chamá-la de doença genética, em que o ambiente tem um papel apenas permissivo na graduação da gravidade do fenótipo. Segundo estimativas do Bouchard (1990), os casos de causa genética da obesidade equivalem a cerca de 5% dos obesos e a uma porcentagem maior nos obesos mórbidos. As formas mais comuns de obesidade podem ser divididas em predisposição genética forte (com um número grande de alelos de suscetibilidade em vários *loci*) e leve. Os pacientes com suscetibilidade forte provavelmente apresentarão sobrepeso e, em um ambiente “obesogênico”, tornar-se-ão obesos. Algumas pessoas são geneticamente resistentes ao desenvolvimento de obesidade, permanecendo no peso normal em condições francamente obesogênicas. A tendência é que no futuro os testes genéticos possam rastrear a população para predizer o nível de risco das formas poligênicas mais comuns da obesidade.

Com o aumento da obesidade aparece também de forma significativa quase que uma variante ou um dos muitos componentes dessa doença, a síndrome metabólica. Várias

definições têm sido propostas para a síndrome metabólica. Na definição da OMS, a síndrome metabólica se caracteriza por alteração dos níveis de glicemia com ou sem diabetes, associada a dois ou mais dos seguintes componentes: aumento de pressão arterial, obesidade central ou obesidade, microalbuminúria ou alteração renal mais avançada e dislipidemia, caracterizada por aumento de triglicerídeos com ou sem aumento de colesterol (HALPERN e MANCINI, 2009; ALBERTI et al., 2005).

Esta desordem heterogênea crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal, pode também resultar de pessoas com gasto energético inadequado ou com ingesta calórica excessiva. Destacando, o sistema gastrointestinal como importante componente no controle da ingestão do alimento, digestão e absorção de nutrientes, o sucesso das realizações destas funções fisiológicas depende da coordenação da motilidade e da presença da integridade das estruturas que o compõem. A motilidade gastrointestinal não somente regula a razão no qual os nutrientes estão sendo processados, como também, participa no controle do apetite e da saciedade. Muitos dos processos fisiológicos e patológicos do trato gastrointestinal estão envolvidos com a integridade do Sistema Nervoso Entérico, e isto é essencial para uma vida normal. Condições patológicas envolvendo anormalidades neuronais entéricas incluindo a acalasia, a pseudo-obstrução intestinal crônica que promove dismotilidades, condições como estenose pilórica hipertrófica infantil e a doença de Hirschsprung, que são potencialmente fatais, indicam que há uma alta morbidade ou mortalidades associadas com anormalidades congênitas ou adquiridas do sistema nervoso entérico (DE GIORGIO et al., 2004).

Estudos relacionados com os sintomas gastrointestinais em indivíduos com sobrepeso e obesos têm sido muito limitados, o que é surpreendente dado que o trato GI é responsável pela quebra mecânica e química do alimento e absorção pelo corpo. À respeito da prevalência global da obesidade, Eslick (2010) em seu estudo de revisão, na tentativa de determinar, a prevalência dos múltiplos sintomas do trato GI entre indivíduos com peso normal, com sobrepeso, obeso e extremamente obeso verificou que os trabalhos avaliados sugerem que em pacientes com sobrepeso e obesos, um grande número de sintomas GI estão significativamente associado com aumento do IMC. Dentre os sintomas verificados que foram significativamente positivos quando comparado ao indivíduo normal foram: flatos, constipação, diarreia, distensão, dor abdominal, doença do refluxo gastroesofágico, síndrome do intestino irritável, vômito, azia, inchaço, diarreia, aumento no volume das fezes e perda de água nas fezes (ESLICK, 2010; FOXX-ORENSTEIN, 2010).

A motilidade intestinal exibe duas fases motoras distintas: as contrações segmentares e o complexo mioelétrico migratório, este consiste em três fases - fase I (repouso) representa 20% a 30% do período, fase II (rápida) caracterizada por contrações rítmicas e intensas com duração de 50% a 60% do ciclo e a fase III, é uma fase de curta duração de período intenso com contrações rítmicas que propagam pelo intestino da porção oral á porção distal. A duração do complexo mioelétrico migratório ocorre de 90 a 120 minutos. Em pacientes obesos é sugerido distúrbios na motilidade no período de jejum, incluindo diminuição da fase I e aumento da fase II e ocorrência menos freqüente e distal da atividade da fase III, em associação com a diminuição na concentração da motilina do plasma (PIERAMICO et al., 1992). Tem se especulado alterações na motilidade do cólon em obesos, o que poderia afetar a porção oral do trato gastrointestinal no controle da saciedade e na absorção de nutrientes dentro do intestino delgado.

Estudos relacionados á obesidade são bastante amplos, como por exemplo, trabalhos relatando o transporte de nutrientes através da parede intestinal e a ação dos hormônios e peptídeos intestinais sobre os órgãos do trato gastrointestinal em indivíduos obesos (DRUCE et al., 2005; KIELY et al., 2005a; SCHARF e AHIMA, 2004; FERRARIS e VINNAKOTA, 1995), porém, pesquisas sobre os efeitos da obesidade no Sistema Nervoso Entérico são bastante raros.

Os autores Spångéus e El-Salhy (2001) investigaram o trato gastrointestinal de camundongos diabéticos obesos e verificaram que nestes animais houve diminuição no volume das fibras nervosas assim como no número de corpos celulares por área ganglionar de neurônios mioentéricos do duodeno contendo peptídeo-intestinal-vasoativo (VIP) e NOS. No entanto, no colo, o volume das fibras nervosas contendo neuropeptídeo Y e do transportador vesicular de acetilcolina (VACHAT) apresentaram uma diminuição significativa e que estes achados podem ter alguma relevância nas disfunções gastrointestinais em indivíduos obesos diabéticos.

Corroborando parcialmente com o trabalho antes descrito, Surendran e Kondapaka (2005) publicaram um artigo observando a alteração da expressão da NOS neuronal no plexo mioentérico do duodeno de camundongos obesos diabéticos machos e fêmeas. Neste estudo os autores observaram que a expressão da NOS neuronal apresenta-se diminuído nos neurônios mioentéricos de camundongos obesos machos e que isto não foi observado em animais fêmeas. Ainda, estes autores sugerem que a expressão da NOS neuronal provavelmente possa contribuir com a apoptose visto que é necessário para a sobrevivência neuronal entérica.

As espécies mais utilizadas como objeto de estudos neste tipo de pesquisa são os camundongos da linhagem C57BL/6J e humanos, principalmente em estudos apontando modificações na atividade de neurônios entéricos que possam estar atuando na motilidade do trato gastrointestinal (KIELY et al., 2005a,b; SMOUT, 2004; XING e CHEN, 2004; SPÅNGÉUS e EI-SALHY, 2001; WISÉN e HELLSTRÖM, 1995; WISÉN e JOHANSSON, 1992). Estes autores propõem que estas alterações no sistema nervoso entérico podem ser consideradas fatores contribuintes para o desenvolvimento e manutenção da obesidade.

A crescente preocupação dos pesquisadores em relação às alterações na atividade do trato gastrointestinal tem aumentado a ponte entre a ciência básica e o tratamento clínico de pacientes com desordens intestinais. Este fato é confirmado, através do crescente número de publicações nesta área. Portanto, a importância deste trabalho está em demonstrar, de maneira original, o efeito da obesidade sobre os neurônios do plexo mioentérico imunorreativos ao receptor P2X₂ e seu código químico com os neurônios imunorreativos á óxido nítrico sintase (NOS), colina acetiltransferase (ChAT) e calretinina (Calr).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com as proposições estabelecidas, a metodologia empregada e os resultados obtidos, conclui-se que:

1. Nos animais obesos o aumento no peso corporal foi acompanhado pelo aumento na área intestinal;
2. A expressão do receptor P2X₂ nos neurônios mioentéricos foi presente nos grupos CF, OBF e CM, e ausente no grupo OBM;
3. O receptor P2X₂ foi encontrado em neurônios inibitórios (NOS-ir), excitatórios (ChAT-ir) e sensoriais aferente primários (Calr-ir) nos grupos CF, OBF e CM;
4. No OBF houve diminuições na densidade neuronal e na estimativa dos neurônios NOS-ir e ChAT-ir, sugere-se perda neuronal;
5. No OBM houve diminuição na densidade dos neurônios NOS-ir e Calr-ir, e aumento dos ChAT-ir, na estimativa não houve alteração dos neurônios NOS-ir e Calr-ir, mas com aumento na estimativa dos neurônios ChAT-ir, sugere-se alteração do código químico;
6. Houve aumento na área do perfil de neurônios ChAT-ir e Calr-ir no OBF e não houve alteração nos parâmetros morfométricos no OBM;
7. A técnica de imuno-histoquímica foi importante para identificar as diferentes classes neuronais e observar que foram afetadas diferentemente nos grupos CF, OBF, CM e OBM;
8. A classificação dos neurônios Calr-ir em Dogiel Tipo I e II permitiu separar os neurônios em excitatórios e sensoriais e, evidenciar que foram afetados de maneira diferenciada na obesidade;
9. Os neurônios NADH-diaforase positivos mostraram uma indicação na diminuição da sua densidade no íleo de OBF; a área do perfil dos neurônios NADH não sofreu modificações com a obesidade;
10. Parâmetros como a morfometria, densidade e estimativa dos neurônios NADH positivos; a morfometria e o número de neurônios por gânglio (P2X₂, NOS e Calr) mostraram diferenças estatísticas em relação ao gênero, tanto entre controles como entre obesos;
11. Os grupos OBF e OBM apresentaram valores similares em relação á densidade e a estimativa de neurônios NOS-ir e Calr-ir;

- 12.** Neste modelo experimental tanto a obesidade (C57BL/6J *ob/ob*) como os gêneros podem contribuir com a modificação na expressão do receptor P2X₂, na densidade e morfologia dos neurônios NOS, ChAT e Calr, os quais podem conduzir a alterações na atividade funcional normal do trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Pathophysiological roles. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 78, p. 113-145, 1998. [doi:10.1254/jjp.78.113](https://doi.org/10.1254/jjp.78.113) PMID:9829617
- ABBRACHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosc.**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009. [doi:10.1016/j.tins.2008.10.001](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001) PMID:19008000
- ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059-62, 2005. [doi:10.1016/S0140-6736\(05\)67402-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67402-8) PMID: 16182882
- ANLAUF, M.; SCHFER, M. K.; EIDEN, L.; WEIHE, E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. **J. Comp. Neurol.**, v. 459, n. 1, p. 90-111, 2003. [doi:10.1002/cne.10599](https://doi.org/10.1002/cne.10599) PMID:12629668
- AUBÉ, A. C.; CABARROCAS, J.; BAUER, J.; PHILIPPE, D.; AUBERT, P.; DOULAY, F.; LIBLAU, R.; GALMICHE, J. P.; NEUNLIST, M. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. **Gut**, v. 55, n. 5, p. 630-7, 2006. [doi:10.1136/gut.2005.067595](https://doi.org/10.1136/gut.2005.067595) PMID: 16236773
- BALEMBA, O. B.; GRØNDAHL, M. L.; MBASSA, G. K.; SEMUGURUKA, W. D.; HAYSMITH, A.; SKADHAUGE, E.; DANTZER, V. The organization of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry. **J. Anat.**, v. 192, n. 2, p. 257-267, 1998. [doi:10.1046/j.1469-7580.1998.19220257.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19220257.x) PMID:9643426
- BARAJAS-LÓPEZ, C. Interactions between inhibitory and excitatory modulatory signals in single submucosal neurons. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 5 (Pt. 1), p. C1359-65, 1994. PMID: 7526697
- BARAJAS-LÓPEZ, C.; HUIZINGA, J. D.; COLLINS, S. M.; GERNZANICH, V.; ESPINOSA-LUNA, R.; PERES, A. L. P2X-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, p. 1541-1548, 1996. PMID: 8982499
- BASILISCO, G.; CAMBONI, G.; BOZZANI, A.; VITA, P.; DOLDI, S.; BIANCHI, P. A. Orocecal transit delay in obese patients. **Dig. Dis. Sci.**, v. 34, n. 4, p. 509-12, 1989. [doi:10.1007/BF01536325](https://doi.org/10.1007/BF01536325) PMID: 2702881
- BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; MAURER, C. A.; FISOGNI, S.; DI FABIO, F.; CADEI, M.; MORELLI, A.; PANAGIOTIS, T.; CATHOMAS, G.; SALERNI, B. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. **Gut**, v. 55, p. 41-46, 2008. [doi: 10.1136/gut.2005.073197](https://doi.org/10.1136/gut.2005.073197).
- BEREZIN, L.; SNYDER, S. H.; BREDT, D. S.; DANIEL, E. E. Ultrastructural localization of

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

nitric oxide synthase in canine small intestine and colon. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. C981-C989, 1994. PMID: 7513956.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Funcional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Auton. Neurosci.**, v. 85, p. 1-17, 2000. [doi:10.1016/S1566-0702\(00\)00215-0](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00215-0) PMID: 11189015

BERTRAND, P. P. ATP and sensory transduction in the enteric nervous system. **Neuroscientist.**, v. 9, n. 4, p. 243-260, 2003. [doi:10.1177/1073858403253768](https://doi.org/10.1177/1073858403253768)

BESSESEN, D. H. Update on obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, n. 6, p. 2027-34, 2008. [doi:10.1210/jc.2008-0520](https://doi.org/10.1210/jc.2008-0520) PMID: 18539769

BIAN, X.; BERTRAND, P. P.; BORNSTEIN, J. C. Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v. 528, n. 3, p. 551-60, 2000. [doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00551.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00551.x) PMID:11060131

BIAN, X.; REN, J.; DEVRIES, M.; SCHNEGELSBERG, B.; COCKAYNE, D. A.; FORD, A. P. D. W.; GALLIGAN, J. J. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X₃ subunit. **J. Physiol.**, v. 551, n. 1, p. 309-322, 2003. [doi:10.1113/jphysiol.2003.044172](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.044172) PMID:12813150

BOR-SENG-SHU, E.; CHADI, G.; BOR-JIUN-SHU, F.; FERRAZ-DE-CARVALHO C. A.; DE-SOUZA, R. R. Myenteric neurons of the mouse small intestine. Morphometry and acetylcholinesterase activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 101-108, 1994. PMID:8173525

BOUCHARD, C.; TREMBLAY, A.; DESPRÉS, J. P.; NADEAU, A.; LUPIEN, P. J.; THÉRIAULT, G.; DUSSAULT, J.; MOORJANI, S.; PINAULT, S.; FOURNIER, G. The response to long-term overfeeding in identical twins. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n. 21, p. 1477-82, 1990. PMID:2336074

BOYER, L.; GHOREISHI, M.; TEMPLEMAN, V.; VALLANCE, B. A.; BUCHAN, A. M.; JEVON, G.; JACOBSON, K. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. **Auton. Neurosci.**, v. 117, n. 1, p. 41-53, 2005. [doi:10.1016/j.autneu.2004.10.006](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.10.006) PMID:15620569

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976. [doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3) PMID: 942051

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Reportagem especial: 13% dos brasileiros adultos são obesos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/reportagensEspeciais>. Acesso em: 30mar.2010.

BREHMER, A.; SCHRODL, F.; NEUHUBER W. Correlated morphological and chemical phenotyping in myenteric type V neurons of porcine ileum. **J. Comp. Neurol.**, v. 453, n. 1, p. 1-9, 2002. [doi:10.1002/cne.10358](https://doi.org/10.1002/cne.10358) PMID:12357427

- BREHMER, A.; BLASER, B.; SEITZ, G.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. **Histochem. Cell Biol.** v. 121, p. 13–20, 2004. [doi:10.1007/s00418-003-0603-7](https://doi.org/10.1007/s00418-003-0603-7) PMID:14663589
- BROOKES, S. J. H.; SONG, Z. -M.; RAMSAY, G. A.; COSTA, M. Long aboral projections of Dogiel type II, AH neurons within the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 5, p. 4013-4022, 1995. PMID:7751962
- BROOKES, S. J. H. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **The Anat. Rec.**, v. 262, p. 58-70, 2001. [doi:10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<58::AID-AR1011>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<58::AID-AR1011>3.0.CO;2-V) PMID: 11146429
- BROWN, D. R.; TIMMERMANS, J. P. Lessons from the porcine enteric nervous system. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 16, n. 1, p. 50-54, 2004. [doi:10.1111/j.1743-3150.2004.00475.x](https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00475.x) PMID:15066005
- BURNSTOCK, G.; CAMPBELL, G.; SATCHELL, D.; SMYTHE, A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. **Brith. J. Pharmacol.**, v. 40, p. 668-688, 1970. PMID:4322041
- BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: STRAUB, R. W.; BOLIS, L. (Eds.). **Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach**. New York: Raven Press, 1978, p.107-118.
- BURNSTOCK, G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 182-188, 2001. [doi:10.1016/S0165-6147\(00\)01643-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01643-6) PMID:11282418
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 659-797, 2007. [doi:10.1152/physrev.00043.2006](https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006) PMID:17429044
- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 7, p. 575-590, 2008. [doi:10.1038/nrd2605](https://doi.org/10.1038/nrd2605) PMID:18591979
- BURNSTOCK, G. Purines and sensory nerves. *Handb. Exp. Pharmacol.* v. 194, p. 333-92, 2009. [doi:10.1007/978-3-540-79090-7_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_10) PMID:19655112
- CAI, Y.; CRONIN, C. N.; ENGEL, A. G.; OHNO, K.; HERSH, L. B.; RODGERS, D. W. Choline acetyltransferase structure reveals distribution of mutations that cause motor disorders. **EMBO J.**, v. 23, p. 2047-2058, 2004. [doi:10.1038/sj.emboj.7600221](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600221) PMID:15131697
- CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; DE ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Res.**, v. 310, p. 1-7, 2002a. [doi:10.1007/s00441-002-0615-y](https://doi.org/10.1007/s00441-002-0615-y) PMID:12242478

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

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; FURNESS, J. B. P2X₂ purine receptor immunoreactivity of intraganglionic laminar endings in the mouse gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.**, v. 312, p. 167-174, 2003. PMID:12690440

CAVALIERE, F.; AMADIO, S.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; VOLONTÉ, C. Synaptic P2X₇ and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 24, p. 392-8, 2004. [doi:10.1097/00004647-200404000-00004](https://doi.org/10.1097/00004647-200404000-00004) PMID: 15087708

CAVRIANI, G.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TREZENA, A. G.; DA SILVA, Z. L.; DOMINGOS, H. V.; DE ARRUDA, M. J.; JANCAR, S.; TAVARES DE LIMA, W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 494, n. 2-3, p. 241-249, 2004. [doi:10.1016/j.ejphar.2004.04.048](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.048)

CHEN, C. -C.; AKOPIAN, A. N.; SIVILOTTI, L.; COLQUHOUN, D.; BURNSTOCK, G.; WOOD, J. N. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature**, v. 377, p. 428-431, 1995. [doi:10.1038/377428a0](https://doi.org/10.1038/377428a0) PMID:7566119

CHIOCCHETTI, R.; POOLE, D. P.; KIMURA, H.; AIMI, Y.; ROBBINS, H. L.; CASTELUCCI P.; FURNESS J. B. Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. **Cell Tissue Res.**, v. 311, p. 11-22, 2003. [doi:10.1007/s00441-002-0652-6](https://doi.org/10.1007/s00441-002-0652-6) PMID:12483280

CHIOCCHETTI, R.; GRANDIS, A.; BOMBARDI, C.; LUCCHI, M. L.; DAL LARGO, D. T.; BORTOLAMI, R.; FURNESS, J. B. Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum: a morphometric and neurochemical investigation. **Cell. Tissue Res.**, v. 323, p. 183-196, 2006. [doi:10.1007/s00441-005-0075-2](https://doi.org/10.1007/s00441-005-0075-2) PMID:16228232

CHU, Y.; MOUAT, M.F.; STABILLE, S.R.; COFFIELD, J. A.; ORLANDO, R.; GRIDER, A. Expression of P2X₆, a purinergic receptor subunit, is affected by dietary zinc deficiency in rat hippocampus. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 91, p. 77-87, 2003. [doi:10.1385/BTER:91:1:77](https://doi.org/10.1385/BTER:91:1:77) PMID: 12713031

CLÉMENT, K. Genetics of human obesity. **C.R. Biol.**, v. 329, p. 608-622, 2006. [doi:10.1016/j.crv.2005.10.009](https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.10.009) PMID:16860279

CLERC, N.; FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. A. Morphological and immunohistochemical identification of neurons and their targets in the guinea-pig duodenum. **Neuroscience**, v. 86, n. 2, p. 679-694, 1998. [doi:10.1016/S0306-4522\(98\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00025-6) PMID: 9881879

COCKAYNE, D. A.; DUNN, P. M.; ZHONG, Y.; RONG, W.; HAMILTON, S. G.; KNIGHT, G. E.; RUAN, H. Z.; MA, B.; YIP, P.; NUNN, P.; McMAHON, S. B., BURNSTOCK, G.; FORD, A. P. P2X₂ knockout mice and P2X₂/P2X₃ double knockout mice

reveal a role for the P2X₂ receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. **J. Physiol.**, v. 567, n. 2, p. 621-39, 2005. [doi:10.1113/jphysiol.2005.088435](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088435) PMID: 15961431

COLLO, G.; NORTH, R. A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; SURPRENANT, A.; BUELL, G. Cloning of P2X₅ and P2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 2495-2507, 1996. PMID:8786426

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

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, n. 4, p. iv15–iv19, 2000. [doi:10.1136/gut.47.suppl_4.iv15](https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15)

COWEN, T.; JOHNSON, R. J. R.; SOUBEYRE, V.; SANTER, R. M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. **Gut**, v. 47, p. 653-660, 2000. [doi:10.1136/gut.47.5.653](https://doi.org/10.1136/gut.47.5.653) PMID:11034581

CZAJA, K.; KALECZYE, J.; SIENKIEWICZ, W.; LAKOMY, M. The influence of experimental ileitis on the neuropeptide coding of enteric neurons in the pig. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 155-63, 2005. PMID:15989136

DE GIORGIO, R.; ARAKAWA, J.; WETMORE, C. J.; STERNINI, C. Neurotrophin-3 and neurotrophin receptor immunoreactivity in peptidergic enteric neurones. **Peptides**, v. 21, p. 1421–6, 2000. [doi:10.1016/S0196-9781\(00\)00286-2](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00286-2)

DE GIORGIO, R.; GUERRINI, S.; BÁRBARA, G.; STANGHELLINI, V.; PONTI, F.; CORINALDESI, R.; MOSES, P. L.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1872-1883, 2004. [doi:10.1053/j.gastro.2004.02.024](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.024) PMID: 15188182

DENES, V.; GABRIEL R. Calbindin-immunopositive cells are cholinergic interneurons in the myenteric plexus of rabbit ileum. **Cell Tissue Res.**, v. 318, n. 2, p. 465-472, 2004. [doi:10.1007/s00441-004-0931-5](https://doi.org/10.1007/s00441-004-0931-5) PMID:15378349

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J. M.; VENKATACHALAM, M. A. Calcium in cell injury and death. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p. 405–434, 2006. [doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100218](https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100218)

DREL, V. R.; MASHTALIR, N.; ILNYTSKA, O.; SHIN, J.; LI F.; LYZOGUBOV, V. V.; OBROSOVA, I. G. The leptin-deficient (*ob/ob*) mouse: A new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 55, p. 3335-3343, 2006. [doi:10.2337/db06-0885](https://doi.org/10.2337/db06-0885) PMID:17130477

DRUCE, M. R.; SMALL, C. J.; BLOOM, S. R. Gut peptides regulating satiety. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2660-2665, 2005. [doi:10.1210/en.2004-0089](https://doi.org/10.1210/en.2004-0089) PMID:15044353

DUNN, P. M.; ZHONG, Y.; BURNSTOCK, G. P2X receptors in peripheral neurons. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p. 107-134, 2001. [doi:10.1016/S0301-0082\(01\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00005-3) PMID:11403876

ESLICK, G. D. Prevalence and epidemiology of gastrointestinal symptoms among normal weight, overweight, obese and extremely obese individuals. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v. 39, p. 9-22, 2010. [doi:10.1016/j.gtc.2009.12.007](https://doi.org/10.1016/j.gtc.2009.12.007) PMID:20202575

FERRARIS, R.P.; VINNAKOTA, R.R. Intestinal nutrient transport in genetically obese mice. **Am. J. Clin. Nutr.** v.62, p.540-546, 1995. PMID:7661115

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000. [doi:10.1590/S0104-42302000000300012](https://doi.org/10.1590/S0104-42302000000300012)

FOX, J. G; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M. T.; NEWCOMER, C. E.; QUIMBY, F. W.; SMITH, A. L. **The Mouse in Biomedical Research**: Normative Biology, Husbandry and Models. 2. ed., v. 2. Amsterdam: Elsevier, 2007.

FOXX-ORENSTEIN, A. E. Gastrointestinal symptoms and diseases related to obesity: an overview. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v. 39, p. 23-37, 2010. [doi:10.1016/j.gtc.2009.12.006](https://doi.org/10.1016/j.gtc.2009.12.006) PMID:20202576

FRANK, H.; KRÜGEL, U.; ILLES, P. P2 receptors and neuronal injury. **Pflugers Arch.**, v. 452, p. 622-644, 2006. [doi:10.1007/s00424-006-0071-8](https://doi.org/10.1007/s00424-006-0071-8) PMID:16645849

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. **Pharmacol. Ther.** v.109(3), p.297-324, 2006. [doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.002](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.002) PMID: 16102837

FREYTAG, C.; SEEGER, J.; SIEGEMUND, T.; GROSCHE, J.; GROSCHE, A.; FREEMAN, D. E.; SCHUSSER, G. F.; HÄRTIG, W. Immunohistochemical characterization and quantitative analysis of neurons in the myenteric plexus of the equine intestine. **Brain Res.**, v. 1244, p. 53-64, 2008. [doi:10.1016/j.brainres.2008.09.070](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.070) PMID: 18930715

FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The Enteric Nervous System**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987.

FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; YOUNG, H. M.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. **Cell Tissue Res.**, v. 277, p. 139-149, 1994. [doi:10.1007/BF00303090](https://doi.org/10.1007/BF00303090) PMID:7519970

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

FURNESS, J. B.; ALEX, J.; CLARK, M. J.; LAL, V. V. Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. **Anat. Rec.**, v. 272A, p. 475-483, 2003. [doi:10.1002/ar.a.10064](https://doi.org/10.1002/ar.a.10064) PMID:12740940

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

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

FURNESS, J. B. The organization of the autonomic nervous system: Peripheral connections. **Auton. Neurosci.**, v. 130, n. 1-2, p. 1-5, 2006b. [doi:10.1016/j.autneu.2006.05.003](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.05.003)

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 23, p. 218-219, 1969. [doi:10.1007/BF01899135](https://doi.org/10.1007/BF01899135)

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **J. Anat.**, v. 109, p. 81-95, 1971. [doi:10.1016/0306-4522\(87\)90369-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90369-1) PMID:5556678

GABELLA, G. The number of the neurons in the small intestine of mice, guinea-pig and sheep. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987. [doi:10.1016/0306-4522\(87\)90369-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90369-1) PMID: 2444903

GALLAGHER, T. K.; GEOGHEGAN, J. G.; BAIRD, A. W.; WINTER, D. C. Implications of altered gastrointestinal motility in obesity. **Obes. Surg.**, v. 17, p. 1399-1407, 2007. [doi:10.1007/s11695-007-9221-0](https://doi.org/10.1007/s11695-007-9221-0) PMID:18098402

GERSHON, M. D.; CHALAZONITIS, A.; ROTHAMAN, T. P. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. **J. Neurobiol.**, v.24, n. 2, p. 199-214, 1993. [doi:10.1002/neu.480240207](https://doi.org/10.1002/neu.480240207) PMID:8445388

GIARONI, C.; KNIGHT, G. E.; RUAN, H. -Z.; GLASS, R.; BARDINI, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G.; BURNSTOCK, G. P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 1313-1323, 2002. [doi:10.1016/S0028-3908\(02\)00294-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00294-0) PMID: 12527481

GIROTTTI, P. A. **Análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos e submucosos imunorreativos aos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇, ao óxido nítrico sintase, a calretinina, a calbindina e a colina acetil transferase (ChAT) do colo distal de ratos submetidos à desnutrição protéica e à renutrição protéica**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfocelulares) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; DE VASCONCELLOS FONTES, R. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study. **Auton. Neurosci.**, v. 126-127, p. 277-84, 2006. [doi:10.1016/j.autneu.2006.03.003](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.03.003) PMID: 16713368

GREGGIO, F. M.; DE VASCONCELOS FONTES, R. B.; MAIFRINO, L. B. M.; CASTELUCCI, P.; SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. Effects of perinatal protein deprivation and recovery on esophageal myenteric plexus. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 5, p. 563-570, 2010. [doi:10.3748/wjg.v16.i5.563](https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i5.563) PMID:20128023

- GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1349-1358, 2009. [doi:10.1053/j.gastro.2008.12.058](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.058) PMID: 19250649
- HALPERN, A.; MANCINI, M. C. **Obesidade e Síndrome Metabólica para o Clínico**. São Paulo: Roca, 2009.
- HANANI, M.; MAUDLEJ, N.; HÄRTIG, W. Morphology and intercellular communication in glial cells of intramural ganglia from the guinea-pig urinary bladder. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 76, n. 1, p. 62-7, 1999. [doi:10.1016/S0165-1838\(99\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(99)00004-1) PMID: 10323307
- HANANI, M.; FELLIG, Y.; UDASSIN, R.; FREUND, H. Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. **Auton. Neurosci.**, v. 113, p. 71-78, 2004. [doi:10.1016/j.autneu.2004.05.007](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.05.007) PMID:15296797
- HIROTA, C. L.; MCKAY, D. M. Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 149, p. 463-479, 2006. [doi:10.1038/sj.bjp.0706889](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706889) PMID:16981004
- HU, H. Z.; GAO, N.; LIN, Z.; GAO, C.; LIU, S.; REN, J.; XIA, Y.; WOOD, J. D. P2X₇ receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v. 440, p. 299-310, 2001. [doi:10.1002/cne.1387](https://doi.org/10.1002/cne.1387) PMID:11745625
- HUANG, P. L.; DAWSON, T. M.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H.; FISHMAN, M. C. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. **Cell**, v. 75, p. 1273-1286, 1993. [doi:10.1016/0092-8674\(93\)90615-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90615-W) PMID: 7505721
- JOHNSON, P. J.; BORNSTEIN, J. C.; YUAN, S. Y.; FURNESS, J. B. Analysis of contributions of acetylcholine and tachykinins to neuro-neuronal transmission in motility reflexes in the guinea-pig ileum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, n. 4, p. 973-83, 1996 PMID: 8799571
- JOHANSSON, C.; GÖTHE, S.; FORREST, D.; VENNSTRÖM, B.; THORÉN, P. Cardiovascular phenotype and temperature control in mice lacking thyroid hormone receptor-beta or both alpha1 and beta. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 6 (Pt 2), p. H2006-12, 1999.
- KARAGIANNIDES, I.; POTHOUAKIS, C. Obesity, innate immunity and gut inflammation. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 23, p. 661-666, 2007. [doi:10.1097/MOG.0b013e3282c8c8d3](https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282c8c8d3) PMID:17906444
- KATAYAMA, Y.; MORITA, K. Adenosine 5'-triphosphate modulates membrane potassium conductance in guinea-pig myenteric neurones. **J. Physiol.**, v. 408, p. 373-90, 1989. PMID:2476557
- KIELY, J. M.; NOH, J. H.; GRAEWIN, S. J.; PITT, H. A.; SWARTZ-BASILE, D. A. Altered intestinal motility in leptin-deficient obese mice. **J. Surg. Res.**, v.124, n. 1, p. 98-103, 2005a. [doi:10.1016/j.jss.2004.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.10.005) PMID:15734486

KIELY, J.M.; GRAEWIN, S.J. PITT, H.A. SWARTZ-BASILE, D. Leptin increases small intestinal response to cholecystokinin in leptin-deficient obese mice. **J. Surg. Res.**, v.124, p. 146-150, 2005b. [doi:10.1016/j.jss.2004.10.006](https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.10.006) PMID:15734493

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-643, 2000. PMID:10766250

KRISHNAN, R. V.; PAL, G. P.; BORADKAR, R. V. Size plasticity of intact motoneurons as reaction to partial denervation of muscle. **In. J. Neurosci.**, v. 17, p. 43-49, 1982. PMID: 7166474

KUNZE, W. A.; FURNESS, J. B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annu Rev Physiol.**, v. 61, p. 117-42, 1999. [doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.117](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.117) PMID:10099684

KUNZE, W. A. A.; CLERC, N.; FURNESS, J. B.; GOLLA, M. The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 526, p. 375-385, 2000. [doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00375.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00375.x) PMID:10896726

LAWRENCE, V. J.; KOPELMAN, P. G. Medical consequences of obesity. **Clin. Dermatol.**, v. 22, p. 296-302, 2004. [doi:10.1016/j.clindermatol.2004.01.012](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.01.012) PMID:15475229

LEPARD, K. J.; MESSORI, E.; GALLIGAN, J. J. Purinergic fast excitatory postsynaptic potentials in myenteric neurons of guinea pig: distribution and pharmacology. **Gastroenterology**, v. 113, n. 5, p. 1522-34, 1997. [doi:10.1053/gast.1997.v113.pm9352854](https://doi.org/10.1053/gast.1997.v113.pm9352854) PMID: 9352854

LEPARD, K. J. Choline acetyltransferase and inducible nitric oxide synthase are increased in myenteric plexus of diabetic guinea-pig. **Auton. Neurosci.**, v. 118, p. 12-24, 2005. [doi:10.1016/j.autneu.2004.12.002](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.12.002) PMID:15795174

LEWIS, C.; NEIDHART, S.; HOLY, C.; NORTH, R. A.; BUELL, G.; SURPRENANT, A. Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. **Nature**, v. 377, p. 432-435, 1995. [doi:10.1038/377432a0](https://doi.org/10.1038/377432a0) PMID:7566120

LINDSTRÖM, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 666-685, 2007. [doi:10.1100/tsw.2007.117](https://doi.org/10.1100/tsw.2007.117) PMID:17619751

LOMAX, A. E.; FURNESS, J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. **Cell Tissue Res.**, v. 302, p. 59-72, 2000. [doi:10.1007/s004410000260](https://doi.org/10.1007/s004410000260) PMID:11079716

MAIFRINO, L. B.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R. NADPH-diaphorase positive cardiac neurons in the atria of mice: A morphoquantitative study. **BMC Neurosci.**, v. 7, p. 10, 2006. [doi:10.1186/1471-2202-7-10](https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-10) PMID: 16451738

MAO, Y.; WANG, B.; KUNZE, W. Characterization of myenteric sensory neurons in the mouse small intestine. **J. Neurophysiol.**, v. 96, p. 998-1010, 2006.

[doi:10.1152/jn.00204.2006](https://doi.org/10.1152/jn.00204.2006) PMID: 16899648

MARESE, A. C. M.; FREITAS, P.; NATALI, M. R. M. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Auton. Neurosci.**, v. 137, p. 10-18, 2007. [doi:10.1016/j.autneu.2007.05.003](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2007.05.003) PMID:17574931

MATINI, P.; MAYER, B.; PELLEGRINI, M. S. F. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. **Cell Tissue Res.**, v. 288, p. 11-23, 1997. [doi:10.1007/s004410050788](https://doi.org/10.1007/s004410050788) PMID:9042768

McKEOWN, S. J.; CHOW, C. W.; YOUNG, H. M. Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. **Cell Tissue Res.**, v. 303, p. 301-305, 2001. [doi:10.1007/s004410000303](https://doi.org/10.1007/s004410000303) PMID:11291776

MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; MIZUNO, M. S.; LIBERTI, E. A.; FURNESS, J. B. CASTELUCCI, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on the P2X₂-receptor- ileum enteric neurons **World J. Gastroenterology**, 2010, No prelo, ISSN 1007-9327, [DOI: 10.3748](https://doi.org/10.3748)

MIZUNO, M. S.; POMPEU, E.; CASTELUCCI, P.; LIBERTI E. A. Age-related changes in urinary bladder intramural neurons. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 25, n. 3, p. 141-8, 2007. [doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.02.004) PMID:17449214

MOAYYEDI, P. The epidemiology of obesity and gastrointestinal and other diseases: an overview. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, n. 9, p. 2293-9, 2008. [doi:10.1007/s10620-008-0410-z](https://doi.org/10.1007/s10620-008-0410-z) PMID: 18636328

MOTA, G. R. da; ZANESCO, A. Leptin, ghrelin, and physical exercise. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 1, p. 25-33, 2007. PMID:17435852

MURPHY, E. M. A.; DEFONTGALLAND D.; COSTA, M.; BROOKES, S. J. H.; WATTCHOW, D. A. Classification of subclasses of human colonic myenteric neurons by immunoreactivity to Hu, choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 19, p. 126-134, 2007. [doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00843.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2006.00843.x)

NAKAJIMA, K.; TOOYAMA, I.; YASUHARA, O.; AIMI, Y.; KIMURA, H. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 18, v. 1-2, p.31-40, 2000. [doi:10.1016/S0891-0618\(99\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(99)00058-7)

NASSAUW, L. V.; BROWUNS, I.; ADRIAENSEN, D.; BURNSTOCK, G.; TIMMERMANS J. P. Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X₃ receptors in the guinea-pig ileum. **Histochem. Cell Biol.**, v. 118, p. 193-203, 2002. PMID:12271355

OGIOLDA, L.; WANKE, R.; ROTTMANN, O.; HERMANNNS, W.; WOLF, E. Intestinal dimensions of mice divergently selected for body weight. **Anat. Rec.**, v. 250, p. 292-299, 1998. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199803\)250:3<292::AID-AR4>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199803)250:3<292::AID-AR4>3.0.CO;2-2) PMID: 9517846

PALOMBIT, K. **Estudo do receptor P2X₇ nas classes neuronais do íleo de ratos submetidos à isquemia intestinal com reperfusão.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfocelulares) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PATRICK, R. C.; PRIOR, I. A.; SMITH, J. C.; SMITH, A. H. Relationship between blood pressure and modernity among Ponapeans. **Int. J. Epidemiol.**, v. 12, n. 1, p. 36-44, 1983. [doi:10.1093/ije/12.1.36](https://doi.org/10.1093/ije/12.1.36) PMID:6601631

PARK, S.; HARROLD, J. A.; WIDDOWSON, P. S.; WILLIAMS, G. Increased binding at 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. **Brain Res.**, v. 847, p. 90-97, 1999. [doi:10.1016/S0006-8993\(99\)02055-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02055-7) PMID:10564740

PHILLIPS, R. J.; KIEFFER, E. J.; POWLEY, T. L. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Auton. Neurosci.**, v. 106, n. 2, p. 69-83, 2003. [doi:10.1016/S1566-0702\(03\)00072-9](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(03)00072-9) PMID: 12878075

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. **Auton. Neurosci.**, v. 136, p. 1-19, 2007. [doi:10.1016/j.autneu.2007.04.005](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2007.04.005) PMID:17537681

PIERAMICO, O.; MALFERTHEINER, P.; NELSON, D. K.; GLASBRENNER, B.; DITSCHUNIT, H. Interdigestive gastroduodenal motility and cycling of putative hormones in severe obesity. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 27, p. 538-544, 1992. [doi:10.3109/00365529209000117](https://doi.org/10.3109/00365529209000117) PMID:1641580

POLI, E.; LAZZARETTI, M.; GRANDI, D.; POZZOLI, C.; CORUZZI, G. Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis. **Neurochem. Res.**, v. 26, n. 8-9, p. 1085-93, 2001. [doi:10.1023/A:1012313424144](https://doi.org/10.1023/A:1012313424144) PMID:11699935

POMEROY, S. L.; ZURAKOWSKI, D.; KHOYAYO, S.; ENDARA, M.; DIKES, P. Postnatal addition of satellite cells to parasympathetic neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 375, p. 518-525. 1996. [doi:10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961118\)375:3<518::AID-CNE12>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961118)375:3<518::AID-CNE12>3.0.CO;2-H) PMID: 8915846

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

POWLEY, T. L.; HOLST, M. C.; BOYD, D. B.; KELLY, J. B. Three-dimensional reconstructions of autonomic projections to the gastrointestinal tract. **Microsc. Res. Tech.**, v. 29, n. 4, p. 297-309, 1994. [doi:10.1002/jemt.1070290407](https://doi.org/10.1002/jemt.1070290407) PMID: 7531035

QU, Z. D.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BAGYÁNSZKI, M.; EPSTEIN, M. L.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 334, n. 2, p. 147-61, 2008. [doi:10.1007/s00441-008-0684-7](https://doi.org/10.1007/s00441-008-0684-7) PMID:18855018

QUINSON, N.; ROBBINS, H. L.; CLARK, M. J.; FURNESS, J. B. Calbindin immunoreactivity of enteric neurons in the guinea-pig ileum. **Cell Tissue Res.**, v. 305, p. 3-9, 2001. [doi:10.1007/s004410100395](https://doi.org/10.1007/s004410100395) PMID: 11512670

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998. PMID:9755289

REN, J.; BIAN, X.; DEVRIES, M.; SCHNEGELSBERG, B.; COCKAYNE, D. A.; FORD, A. P; GALLIGAN, J. J. P2X₂ subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 552, p. 809-821, 2003. [doi:10.1113/jphysiol.2003.047944](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047944) PMID:12937291

RIVERA, L. R.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BRON, R.; FURNESS, J. B. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. **Acta Neuropathol.**, v. 118, p. 261–270, 2009. [doi:10.1007/s00401-009-0549-5](https://doi.org/10.1007/s00401-009-0549-5)

RUAN, H. Z.; MOULES, E.; BURNSTOCK, G. Changes in P2X₃ purinoceptors in sensory ganglia of the mouse during embryonic and postnatal development. **Histochem. Cell Biol.**, v. 122, p. 539-551, 2004. [doi:10.1007/s00418-004-0714-9](https://doi.org/10.1007/s00418-004-0714-9) PMID:15549366

RUAN, H. Z.; BURNSTOCK, G. The distribution of P2X₅ purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. **Cell Tissue Res.**, v. 319, p. 191-200, 2005. [doi:10.1007/s00441-004-1002-7](https://doi.org/10.1007/s00441-004-1002-7) PMID:15551155

RÜHL, A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 17, n. 6, p. 777-790, 2005. [doi:10.1111/j.1365-2982.2005.00687.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00687.x) PMID:16336493

SAFFREY, M. J.; WARDHAUGH, T.; WALKER, T.; DAISLEY, J.; SILVA, A. T. Trophic actions of neurotrophin-3 on postnatal rat myenteric neurones in vitro. **Neurosci. Lett.**, v. 278, p. 133–6, 2000. [doi:10.1016/S0304-3940\(99\)00927-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00927-1)

SANG, Q.; YOUNG, H. M. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. **Cell Tissue Res.**, v. 284, p. 39-53, 1996. [doi:10.1007/s004410050565](https://doi.org/10.1007/s004410050565) PMID:8601295

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

SANG, Q.; YOUNG, H. M. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. **Anat. Rec.**, v. 251, n. 2, p. 185-99, 1998. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199806\)251:2<185::AID-AR6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199806)251:2<185::AID-AR6>3.0.CO;2-Y) PMID: 9624448

SANTER, R. M.; BACKER, D. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 25, p. 59-67, 1988. [doi:10.1016/0165-1838\(88\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0165-1838(88)90008-2) PMID: 3225382

SANTER, R. M. Survival of the population of NADH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 49, p. 115-121, 1994. [doi:10.1016/0165-1838\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0165-1838(94)90131-7)

SARAIVA, R. M.; MINHAS, K. M.; ZHENG, M.; PITZ, E.; TREUER, A.; GONZALEZ, D.; SCHULERI, K. H.; VANDEGAER, K. M.; BAROUCH, L. A.; HARE, J. M. Reduced neuronal nitric oxide synthase expression contributes to cardiac oxidative stress and nitroso-redox imbalance in *ob/ob* mice. **Nitric oxide**, v. 16, p. 331-338, 2007. [doi:10.1016/j.niox.2006.12.001](https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.12.001) PMID:17307368

SAYEGH, A. I.; RITTER, R. C. Morphology and distribution of nitric oxide synthase-, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. **Anat. Rec.**, v. 271A, p. 209-216, 2003. [doi:10.1002/ar.a.10024](https://doi.org/10.1002/ar.a.10024) PMID:12552637

SCHARF, M. T.; AHIMA, R. S. Gut peptides and other regulators in obesity. **Semin. Liver Dis.**, v. 24, n. 4, p. 335-347, 2004. [doi:10.1055/s-2004-860863](https://doi.org/10.1055/s-2004-860863) PMID:15605302

SCHÄFER, K. H.; HÄNSGEN, A.; MESTRES, P. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. **Anat. Rec.**, v. 256, p. 20-28, 1999. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0185\(19990901\)256:1<20::AID-AR4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(19990901)256:1<20::AID-AR4>3.0.CO;2-8) PMID: 10456982

SCOARIS, C. R.; RIZO, G. V.; ROLDI, L. P. R.; DE MORAES, S. M. F.; DE PROENÇA, A. R. G.; PERALTA, R. M.; NATALI, M. R. M. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, v. 26, p. 312-320, 2010. [doi:10.1016/j.nut.2009.04.012](https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.012) PMID:19665869

SEIDEL, B.; BIGL, M.; FRANKE, H.; KITTER, H.; KIESS, W.; ILLES, P.; KRÜGEL, U. Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. **Brain Res.** v. 1089, p. 143-152, 2006. [doi:10.1016/j.brainres.2006.03.038](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.038) PMID:16643864

SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPHY, C. R. Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X₁₋₇) in uterine epithelial cells during early pregnancy. **Histochem J.**, v. 32, n. 6, p. 365-72, 2000a. [doi:10.1023/A:1004017714702](https://doi.org/10.1023/A:1004017714702) PMID:10943851

SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPHY, C. R. The purinergic calcium channels P2X_{1,2,5,7} are down-regulated while P2X_{3,4,6} are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. **Histochem. J.**, v. 32, n. 9, p. 571-80, 2000b. [doi:10.1023/A:1004110529753](https://doi.org/10.1023/A:1004110529753) PMID:11127979

SMOUT, A. J. P. M. Small intestinal motility. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 20, p. 77-81, 2004. [doi:10.1097/00001574-200403000-00005](https://doi.org/10.1097/00001574-200403000-00005) PMID:15703625

SOLLE, M.; LABASI, J.; PERREGAUX, D. G.; STAM, E.; PETRUSHOVA, N.; KOLLER, B. H.; GRIFFITHS, R. J.; GABEL, C. A. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 1, p. 125-32, 2001. [doi:10.1074/jbc.M006781200](https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200) PMID:11016935

SOLTANPOUR, N.; BAKER, D. M.; SANTER, R. M. Neurons and microvessels of the nodose (vagal sensory) ganglion in young and aged rats: morphometric and enzyme histochemical studies. **Tissue Cell Res.**, v. 28, n. 5, p. 593-602, 1996. [doi:10.1016/S0040-8166\(96\)80062-0](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(96)80062-0) PMID: 8858885

SONG, Z. M.; COSTA, M.; BROOKES, S. J. H. Projections of submucous neurons to the myenteric plexus in the guinea pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v. 399, p. 255-268, 1998. [doi:10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980921\)399:2<255::AID-CNE8>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980921)399:2<255::AID-CNE8>3.0.CO;2-#) PMID: 9721907

SPÂNGÉUS, A.; SUHR, O.; EL-SALHY, M. Diabetic state affects the innervation of gut in an animal model of human type 1 diabetes. **Histol. Histopathol.**, v. 15, n. 3, p. 739-44, 2000. PMID: 10963118

SPÂNGÉUS, A.; EL-SALHY, M. Myenteric plexus of obese diabetic mice (an animal model of human type 2 diabetes). **Histol. Histopathol.**, v. 16, p. 159-165, 2001. PMID:11193191

SPENCER, N. J.; WALSH, M. Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v. 522, n. 2, p. 321-31, 2000. [doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00321.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00321.x) PMID:10639107

SRIRAM, K.; BENKOVIC, S. A.; MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Obesity exacerbates chemically induced neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 115, n. 4, p. 1335-1346, 2002. [doi:10.1016/S0306-4522\(02\)00306-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00306-8) PMID: 12453501

SURENDRAN, S.; KONDAPAKA, S. B. Altered expression of neuronal nitric oxide synthase in the duodenum longitudinal muscle-myenteric plexus of obesity induced diabetes mouse: implications on enteric neurodegeneration. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, n. 2, p. 919-22, 2005. [doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.039](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.039) PMID:16256069

TAN, L. L.; BORNSTEIN, J. C.; ANDERSON, C. R. The neurochemistry and innervations patterns of extrinsic sensory and sympathetic nerves in the myenteric plexus of the C57BL6 mouse jejunum. **Neuroscience**, v. 166, p. 564-579, 2010. [doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.034](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.034) PMID:20034545

TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Molecules in focus: Lipofuscin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 1400-1404, 2004. [doi:10.1016/j.biocel.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.009)

TOOYAMA, I.; KIMURA, H. A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 17, n. 4, p. 217-226, 2000. [doi:10.1016/S0891-0618\(99\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(99)00043-5)

VANDERWINDEN, J. M.; TIMMERMANS, J. P.; SCHIFFMANN, S. N. Glial cells, but not interstitial cells, express P2X₇, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. **Cell Tissue Res.**, v. 312, p. 149-154, 2003. PMID:12684872

VAN GELDRE, L. A.; FRAEYMAN, N. H.; PEETERS, T. L.; TIMMERMANS, J. P.; LEFEBVRE, R. A. Further characterisation of particulate neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. **Auton. Neurosci.**, v. 110, n. 1, p. 8-18, 2004. [doi:10.1016/j.autneu.2003.05.001](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2003.05.001) PMID: 14766320

VASINA, V.; BARBARA, G.; TALAMONTI, L.; STANGHELLINI, V.; CORINALDESI, R.; TONINI, M.; DE PONTI, F.; DE GIORGIO, R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. **Auton. Neurosci.**, v. 126-127, p. 264-272, 2006.

[doi:10.1016/j.autneu.2006.02.025](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.02.025) PMID:16624634

VENTURA-MARTINEZ, R.; SANTIAGO-MEJIA, J.; GOMES, C.; RODRIGUES, R.; FORTOUL, T.I. Acute morphological changes in guinea-pig ileum myenteric neurons after ischemia in situ with superfusion in vitro. **Pathol. Res. Pract.**, v. 204, p. 121-127, 2008. PMID:18096325

VINCENT, R. P.; ASHRAFIAN, H.; LE ROUX, C. W. Mechanisms of disease: the role of gastrointestinal hormones in appetite and obesity. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 5, n. 5, p. 268-277, 2008. [doi:10.1038/ncpgasthep1118](https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1118)

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The enteric glia and neurotrophic factors. **Z. Gastroenterol.**, v. 44, n. 9, p. 985-90, 2006. [doi:10.1055/s-2006-926968](https://doi.org/10.1055/s-2006-926968) PMID: 16981072

VULCHANOVA, L.; ARVIDSSON, U.; RIEDL, M.; WANG, J.; BUELL, G.; SURPRENANT, A.; NORTH, R. A.; ELDE, R. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 8063-8067, 1996. [doi:10.1073/pnas.93.15.8063](https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8063) PMID:8755603

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

WARBURTON, A. L.; SANTER, R. M. The hypogastric and thirteenth thoracic ganglia of the rat: effects of age on the neurons and their extracellular environment. **J. Anat.**, v. 190, p. 115–124, 1997. [doi:10.1046/j.1469-7580.1997.19010115.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19010115.x) PMID:9034887

WARD, S. M.; BURNS, A. J.; TORIHASHI, S.; SANDERS, K. M. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. **J. Physiol.**, v. 480, p. 91-97, 1994. PMID:7853230

WEIDMANN, S.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Quantitative estimation of putative primary afferent neurons in the myenteric plexus of human small intestine. **Histochem. Cell Biol.**, v. 128, p. 399–407, 2007. [doi:10.1007/s00418-007-0335-1](https://doi.org/10.1007/s00418-007-0335-1) PMID:17882448

WISÉN, O.; JOHANSSON, C. Gastrointestinal function in obesity: motility, secretion, and absorption following a liquid test meal. **Metabolism**, v.41, n. 4, p. 390-395, 1992. [doi:10.1016/0026-0495\(92\)90073-J](https://doi.org/10.1016/0026-0495(92)90073-J)

WISÉN, O.; HELLSTRÖM, P. M. Gastrointestinal motility in obesity. **J. Intern. Med.**, v. 237, p. 411-418, 1995. [doi:10.1016/0026-0495\(92\)90073-J](https://doi.org/10.1016/0026-0495(92)90073-J) PMID: 1372949

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Available from: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>. Accessed in Mar 30, 2010.

WYNN, G.; RONG, W.; XIANG, Z.; BURNSTOCK, G. Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. **Gastroenterology**, v. 125, p. 1398–1409, 2003. [doi:10.1111/j.1365-2796.1995.tb01195.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1995.tb01195.x) PMID: 14598256

WYNN, G.; BEI, M.; RUAN, H. Z.; BURNSTOCK, G. Purinergic component of mechanosensory transduction is increased in a rat model of colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 287, p. G647–G657, 2004. [doi:10.1152/ajpgi.00020.2004](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00020.2004) PMID:15331354

XIANG, Z.; BURNSTOCK, G. P2X₂ and P2X₃ purinoceptors in the rat enteric nervous system. **Histochem. Cell Biol.**, v. 121, p. 169-179, 2004. [doi:10.1007/s00418-004-0620-1](https://doi.org/10.1007/s00418-004-0620-1) PMID:14767775

XIANG, Z.; BURNSTOCK, G. Distribution of P2Y₂ receptors in the guinea pig enteric nervous system and its coexistence with P2X₂ and P2X₃ receptors, neuropeptide Y, nitric oxide synthase and calretinin. **Histochem. Cell Biol.**, v. 124, p. 379-390, 2005. [doi:10.1007/s00418-005-0043-7](https://doi.org/10.1007/s00418-005-0043-7) PMID:16136347

XING, J.; CHEN, J. D. Z. Alterations of gastrointestinal motility in obesity. **Obes. Res.**, v. 12, n. 11, p. 1723-1732, 2004. [doi:10.1038/oby.2004.213](https://doi.org/10.1038/oby.2004.213) PMID:15601965

YIANGOU, Y.; FACER, P.; BAECKER, P. A.; FORD, A. P.; KNOWLES, C. H.; CHAN, C. L. H.; WILLIAMS, N. S.; ANAND, P. ATP-gated ion channel P2X₃ is increased in human inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 13, p. 365-369, 2001. [doi:10.1046/j.1365-2982.2001.00276.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2001.00276.x) PMID:11576396

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SEWELL, P.; BURCHER, E. F.; KANDIAH, C. J. Total number of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 272, p. 197-200, 1993. [doi:10.1007/BF00323587](https://doi.org/10.1007/BF00323587) PMID: 8481953

YU, Q.; ZHAO, Z.; SUN, J.; GUO, W.; FU, J.; BURNSTOCK, G.; HE, C.; XIANG, Z. Expression of P2X₆ receptors in the enteric nervous system of the rat gastrointestinal tract. **Histochem. Cell Biol.**, v. 133, p. 177-188, 2010. [doi:10.1007/s00418-009-0659-0](https://doi.org/10.1007/s00418-009-0659-0) PMID:19946698

ZAGORODNYUK, V. P.; BROOKES, S. J. H. Transduction sites of vagal mechanoreceptors in the guinea pig esophagus. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 6249-6255, 2000. PMID:10934275

ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994. [doi:10.1038/372425a0](https://doi.org/10.1038/372425a0) PMID:7984236

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2. Ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1984.

ZHOU, X.; GALLIGAN, J. J. P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. **J. Physiol. (Lond)**, v. 496, p. 719-729, 1996. PMID:8930839