

**PRISCILA AZEVEDO GIROTTI**

**ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS  
E SUBMUCOSOS IMUNORREATIVOS AOS RECEPTORES  
P2X<sub>2</sub> E P2X<sub>7</sub>, AO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS), À CALRETININA,  
À CALBINDINA E À COLINA ACETIL TRANSFERASE (ChAT)  
DO COLO DISTAL DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO  
E À RENUTRIÇÃO PROTÉICA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Morfofuncionais do Departamento de Anatomia  
do Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.**

**Área de Concentração: Anatomia**

**Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Castelucci**

**São Paulo**

**2007**

## RESUMO

**GIROTTTI P. A. Análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos e submucosos imunorreativos aos receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>, 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.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Foi descrita a presença do receptor P2X nos neurônios entéricos e os efeitos da desnutrição e da renutrição pré e pós-natal. Este trabalho, analisou a distribuição dos receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>, o óxido nítrico sintase (NOS-ir), calretinina (Calr-ir), calbindina e a colina acetil transferase (ChAT) com seu código químico e morfometria. Foram utilizados, tecidos do colo distal de animais nutridos (N42), desnutridos (D42) e renutridos (RN42). Os resultados dos plexos mioentérico e submucoso, demonstraram que 100% dos neurônios NOS-ir, Calr-ir, Calb-ir, ChAT-ir, expressam estes receptores nos três grupos analisados. A densidade neuronal no plexo mioentérico, demonstrou um aumento de 20% a 97% dos neurônios receptores P2X<sub>2-7</sub>-ir, Calr-ir, ChAT-ir e NOS-ir e no plexo submucoso, foi de 29% a 75%, ambos D42 e recuperação no RN42. O perfil neuronal de neurônios P2X<sub>7</sub>-ir, Calb-ir, Calr-ir e ChAT-ir do plexo mioentérico demonstrou diminuição de 28% a 40% e no plexo submucoso os neurônios P2X<sub>2-7</sub>-ir, Calb-ir e ChAT-ir de 19% a 47% no D42. Concluiu-se que, a desnutrição afetou os neurônios entéricos havendo recuperação na renutrição, podendo influenciar nas funções gastrintestinais.

Palavras-chave: desnutrição, renutrição, receptor P2X<sub>2</sub>, receptor P2X<sub>7</sub>, plexo mioentérico, plexo submucoso.

## ABSTRACT

GIROTTTI P. A. **Morphoquantitative analyses of myenteric and submucous neurons immunoreactive to P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors, nitric oxide sintase (NOS), calretinin, calbindin and choline acetyltransferase (ChAT) of the rats distal colon submitted to undernutrition and refeeding proteic.** Master Thesis (Ciências Morfuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

It is showed the expression of the P2X receptor in the enteric neurons and the effects to undernutrition pre and postnatal and refeeding post natal. The aim of the work was to analyze the distribution of the P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors with nitric oxide synthase (NOS), and calretinin (Calr-ir), and calbindin (Calb-ir) and choline acetyltransferase (ChAT) and chemical coding and morphometry. Colon distal was used from nourished (N42), undernourished (D42) and refeeding animals (RD42). The results and myenteric and submucous plexus have shown 100% of neurons with P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors, NOS-ir, Calr-ir, Calb-ir, ChAT-ir, express these receptors in the three analyzed groups. The myenteric neurons density have shown increase of the 20% to 97% of the P2X<sub>2-7</sub>-ir, Calr-ir, ChAT-ir and NOS-ir neurons of the D42 group, and the submucous neurons have been increase of the 29% to 75% in the D42 group. In the myenteric neurons profile P2X<sub>7</sub>-ir, Calb-ir, Calr-ir and ChAT-ir neurons have shown decrease of the 28% to 40% and in the submucous plexus P2X<sub>2-7</sub>-ir, Calb-ir and ChAT-ir of the 19% to 47% neurons in the D42 group. The conclusion demonstrated that, the undernutrition affects the enteric neurons and there was recuperation in the refeeding, this can influence the gastrointestinal functions.

Keywords: undernourished, refeeding, P2X<sub>2</sub> receptor, P2X<sub>7</sub> receptor, myenteric plexus, submucous plexus.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Organização do sistema nervoso entérico e seu código químico

Langley (1900, 1921) definiu o termo autônomo e três subsistemas: o simpático, o parassimpático e o sistema entérico, classificando-os com base anatômica e funcional. Os neurônios entéricos são histologicamente diferentes do gânglio autônomo simpático e parassimpático. As fibras dos nervos do sistema nervoso central (SNC) conectam-se ao gânglio entérico, de maneira diferente que os nervos similares se conectam ao outro gânglio periférico (FURNESS e COSTA, 1987; FURNESS, 2006).

A existência dos reflexos polarizados que funcionam no intestino, por influência extrínseca, trouxe as características incomuns do Sistema Nervoso Entérico (SNE) e classifica-os como terceira divisão do sistema nervoso autônomo (SNA). Ao reconhecer o circuito neural do SNE foi descrito os movimentos gastrintestinais, a estrutura fisiológica e a presença de células ganglionares microscópicas, na faringe e na parede gástrica (FURNESS e COSTA, 1987).

O SNE está contido nas paredes do trato do tubo digestório, pâncreas e sistema biliar, e consistem de dois plexos ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (FURNESS e COSTA, 1987; FURNESS et al., 1995b, 1999a).

O plexo mioentérico de (Auerbach) localiza-se entre a camada longitudinal externa e à camada do músculo circular, presente por todo trato digestório do esôfago ao reto (AUERBACH, 1864; STOHR, 1930; SCHABADASH, 1930a, 1930b; LI, 1940).

No plexo do músculo circular, existem pequenas fibras nervosas funcionando paralelamente e ao longo das fibras musculares encontradas na espessura do músculo. Estes ramos nervosos conectam-se com componentes preliminares e secundários do plexo mioentérico e do plexo muscular profundo no intestino delgado (FURNESS e COSTA, 1987; FURNESS, 2006).

O plexo submucoso é proeminente no intestino delgado e grosso e divide-se em plexo submucoso interno (plexo de Meissner) abaixo da mucosa, plexo submucoso externo (plexo de Schabadash ou de Henle) e junto à camada circular do músculo e o plexo intermediário posicionado entre os plexos submucoso e externo. Suas malhas são menores que o plexo mioentérico, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor. Este plexo localiza-

se ao longo do intestino, sendo que um plexo fica perto do músculo e o outro perto da mucosa (HENLE, 1871; GONIAEW, 1875).

No SNE, encontram-se 14 a 17 tipos de neurônios, dependendo da região e do trato gastrointestinal onde se situam (Figura 1). Estes neurônios podem controlar a motilidade, o transporte de fluídos da mucosa e o fluxo sanguíneo local (FURNESS, 2000; FURNESS et al., 2000; FURNESS, 2003).

Por diferentes métodos imunohistoquímicos e farmacológicos, foram identificados diferentes tipos de neurônios incluindo o neurônio motor, neurônios para arteríolas intrínsecas, para células epiteliais, vários interneurônios e, possivelmente, neurônios aferentes primários intrínsecos (FURNESS et al., 1998).

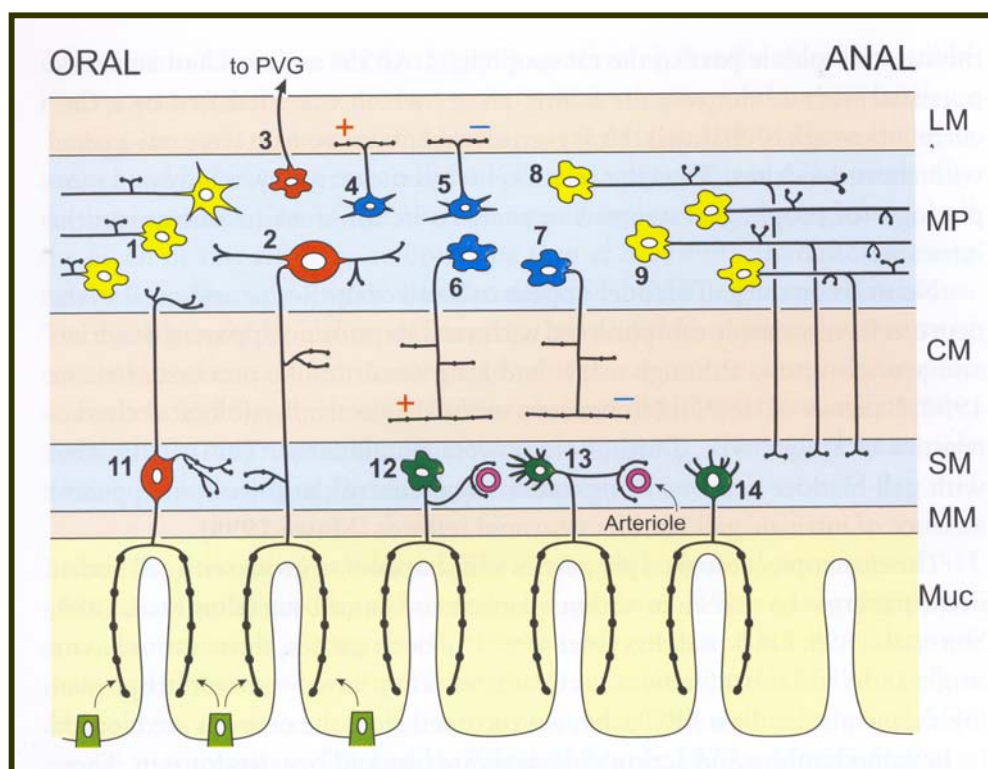


Figura 1. Demonstra os tipos de neurônios entéricos no intestino delgado da cobaia. 1. interneurônio ascendente; 2. neurônio intrínseco aferente primário; 3. neurônio intestínofugal; 4. neurônio motor da musculatura longitudinal excitatória; 5. neurônio motor da musculatura longitudinal inibitória; 6. neurônio motor da musculatura circular excitatória; 7. neurônio motor da musculatura circular inibitória; 8. interneurônio descendente (reflexo local); 9. interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10. interneurônio descendente

(complexo mioelétrico migratório); 11. neurônio intrínseco aferente primário submucoso; 12. neurônio vasodilatador/secretomotor não/colinérgico; 13. neurônio vasodilatador/secretomotor; 14. neurônio colinérgico secretomotor (não-vasodilatador) (FURNESS, 2006).

Todas as regiões do intestino recebem uma inervação excitatória. Pelo uso efetivo e específico do receptor antagonista muscarínico, muitas investigações mostraram que a transmissão excitatória tem um componente muscarínico sendo predominante da liberação das taquiquininas. Os neurônios motores são imunorreativos para ambas as enzimas que sintetizam a colina acetil transferase (ChAT) e taquiquininas (LIPPI et al., 1998). As substâncias muscarínicas antagonistas acabam inibindo a motilidade gastrintestinal (BORODY et al., 1985; GALLIGAN et al., 1986).

O neurônio motor inibitório contém a enzima óxido nítrico sintase (NOS) e libera óxido nítrico com efeito relaxante. Embora existam evidências que o óxido nítrico seja um transmissor desses neurônios (SANDERS e WARD, 1922; STARK e SZURSZEWSKI, 1992), isto é igualmente claro que ele não é o único transmissor (MAKHLOUF e GRIDER, 1993; FURNESS et al., 1995b).

Nos interneurônios, existem os neurônios ascendentes, cujos axônios correm para o sentido oral e, outro grupo de três tipos de neurônios descendentes direcionados ao sentido anal que são bem identificados no intestino delgado da cobaia. Os neurônios ascendentes são colinérgicos e, como os neurônios descendentes eles se estendem ao longo do intestino (KUNZE e FURNESS, 1999). Os três tipos de interneurônios descendentes têm os seguintes códigos químicos: ChAT/NOS/VIP, que estão envolvidos na motilidade reflexa local e os neurônios (ChAT/SOM) estão envolvidos na condução dos complexos mioelétricos no intestino delgado e não são encontrados no colo. O ChAT-5-Hidroxitriptamina (ChAT/S/HT) estão envolvidos nos reflexos secretomotores e não diretamente na motilidade reflexa (POMPOLO et al., 1998; FURNESS, 2000).

O neurônio aferente primário intrínseco (IPANs) tem sido registrado por reflexos isolados no intestino, e, após a secção do nervo extrínseco, ocorre sua degeneração (LANGLEY e MAGNUS, 1905; CREMA et al. 1970; FURNESS et al., 1995a). Evidências de sua identidade somente foram obtidas no intestino delgado da cobaia, com morfologia do neurônio Dogiel tipo II

e através de propriedades eletrofisiológicas o distinguiram dos interneurônios e dos neurônios motores (KIRCHGESSNER et al., 1992; KUNZE et al., 1995, 1998, 1999; BERTRAND et al., 1997). A identificação dos IPANs no tecido entérico, pela imunohistoquímica é feita com a calbindina na cobaia (FURNESS et al., 1998; QUINSON et al., 2001).

Os IPANS são afetados pelo estiramento, promovendo a motilidade e os reflexos entéricos pela distensão (BAYLLIS e STARLING, 1899). Estes IPANS respondem ao estiramento, tonicamente à tensão gerada pela contração do músculo, ou à distorção direta de seus processos (KUNZE et al., 1998, 1999).

Nos quimiosensores da mucosa seus reflexos são iniciados através da aplicação química em partes isoladas ao lúmen e à mucosa do íleo, onde ocorrem propagações do potencial de ação nos corpos celulares do neurônio Dogiel tipo II e no plexo mioentérico. Os IPANS mantêm atividade por um longo período, e se a mucosa for removida, sua atividade desaparece (KUNZE et al., 1995; BERTRAND et al., 1997).

Nos mecanorreceptores da mucosa, os reflexos entéricos são mediados por estímulos mecânicos aplicados à mucosa (HUKUHARA et al., 1958; SMITH e FURNESS, 1988; VANNER et al., 1993; SIDHU e COOKE, 1995). Os reflexos são iniciados pela distorção da mucosa e são conduzidos ao longo do intestino através do plexo mioentérico (SMITH e FURNESS, 1995).

O neurônio secretomotor do plexo submucoso e o neurônio vasomotor controlam diretamente o circuito reflexo local. Os dois tipos de neurônios secretomotores intestinais são os neurônios colinérgicos e os não-colinérgicos (FURNESS et al., 2000).

Os neurônios não-colinérgicos parecem mediar a maioria das respostas reflexas locais, utilizando o VIP ou um peptídeo relacionado, como seu transmissor primário (JODAL e LUNDGREN, 1989; COOKE e REDDIX, 1994).

O neurônio motor das células endócrinas reside na mucosa do trato gastrointestinal. Evidências funcionais da inervação do neurônio motor para células endócrinas entéricas participam do controle da secreção gástrica (FURNES, 2000).

O neurônio neuro-imune do intestino afeta os neurônios dentro da parede do intestino, excitando-os diretamente, sendo sensíveis aos estímulos fisiológicos e patológicos (COLLO et al., 1996; FURNESS et al., 1999a).

Os autores Sayegh e Ritter (2003) avaliaram a morfologia no plexo mioentérico e submucoso do intestino delgado de ratos. Os neurônios foram imunorreativos ao NOS(-ir), receptor neurokinina-1 (NK-1R), calretinina(-ir), calbindina(-ir) e o neurofilamento-M (NF-M). Os neurônios NOS-ir apresentaram a morfologia Dogiel tipo I e foram abundantes no plexo mioentérico, quando comparado ao plexo submucoso. Os neurônios calbindina-ir exibiram quatro morfologias distintas: neurônios pequenos e grandes, Dogiel tipo II, neurônios Dogiel tipo I e neurônios alongados. Estes neurônios estavam menos significativamente presentes no plexo mioentérico, quando comparados ao plexo submucoso. Os neurônios calretinina-ir apresentaram a morfologia Dogiel tipo II.

## **1.2 Receptores purinérgicos no sistema nervoso entérico**

A 5'-adenosina trifosfato (ATP) foi mencionada, como um provável neurotransmissor (Holton, 1959). Demonstrou que o ATP pode ser liberado dos nervos sensoriais que supria a artéria do ouvido de coelho durante uma estimulação antidrômica. Burnstock et al. (1963) propuseram a existência de nervos autonômicos que não eram adrenérgicos nem colinérgicos e que supriam o trato gastrointestinal. Nos anos subseqüentes, foram feitos esforços para identificar o transmissor não-adrenérgico e não-colinérgico dos nervos que supriam o intestino e a bexiga urinária, e o ATP foi a substância que mais satisfizesse este critério (BURNSTOCK et al., 1963).

Estudos farmacológicos definiram uma primeira divisão dos receptores purinérgicos em P1 e P2 (Burnstock, 1978) e logo após, a subdivisão dos subtipos P2 em P2X e P2Y (BURNSTOCK E KENNEDDY, 1985). Atualmente tem sido clonados, caracterizados farmacologicamente e aceitos como válidos membros da família de receptores P2X: P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> e P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>1-7</sub>) e P2Y: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub> (ABBACHIO E BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P2X estão acoplados a canais iônicos que mediam rapidamente (dentro de 10 ms) e seletivamente a permeabilidade para cátions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>) (NORTH E SUPRENTANT, 2000). Os receptores P2X são encontrados em células musculares lisas, neurônios, células gliais e apresentam um papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida nos sistemas nervoso central e periférico (RALEVIC E BURNSTOCK, 1998).



Nos neurônios mioentéricos da cobaia o ATP despolariza, 70-90%, com despolarização rápida, implicando que a maioria dos neurônios tem o tipo de receptor P2X (BARAJAS-LÓPEZ et al., 1996; ZHOU e GALLIGAN, 1996). No SNE, o ATP despolariza 80-90% dos neurônios mioentéricos, da maioria dos neurônios S e AH (pela classificação eletrofisiológica, os neurônios S apresentam potencial de ação breve que são seguidos por curta duração do potencial após-hiperpolarização. Os neurônios AH apresentam um potencial de ação longo) (KATAYAMA e MORITA, 1989; BARAJAS-LÓPEZ et al., 1996). Também, o ATP despolariza neurônios dos gânglios submucosos (BARAJAS-LÓPEZ et al., 1994; GLUSHAKOV et al., 1998). O efeito da rápida despolarização do ATP parece ser através da abertura de canais de Ca<sup>+</sup> não específicos, em neurônios mioentéricos (ZHOU e GALLIGAN, 1996) e neurônios submucosos (BARAJAS-LÓPEZ et al., 1994), que poderia ser consistente com os receptores P2X. Experimentos demonstram que receptores purinérgicos têm um papel fisiológico na transmissão neuronal no sistema nervoso entérico (BIAN et al., 2000; SPENCER et al., 2000). Nestes estudos foram usadas drogas agonistas e antagonistas que foram aplicadas ao íleo indicando que os receptores purinérgicos estavam envolvidos nas sinapses excitatórias de trajetos ascendentes e descendentes do íleo. Os dados farmacológicos não identificaram qual dos sete subtipos dos receptores P2X era ativado.

Para demonstrar a presença do receptor P2X nos neurônios entéricos, os autores Castelucci et al. (2002a) descreveram, de maneira original, a expressão e o código químico do receptor P2X<sub>2</sub> nos neurônios entéricos. No plexo submucoso, 55% dos neurônios exibem a subunidade, nos neurônios secretomotores, submucosos e nos neurônios primários intrínsecos aferentes (IPANS) e à expressão nos neurônios mioentéricos imuno-reativos receptor P2X<sub>2</sub> é expressa nos neurônios primários intrínsecos aferentes (IPANS), neurônios inibitórios e interneurônios.

Com métodos de imunohistoquímica e de hibridização *in situ*, os autores Xiang e Burnstock (2004), descreveram a distribuição do receptor P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>3</sub> nos neurônios calbindina-ir e calretinina-ir no plexo mioentérico e submucoso do íleo e colo distal de ratos.

Ao analisar outra subunidade dos receptores P2X, os autores Poole et al. (2003) observaram o receptor P2X<sub>3</sub> nos neurônios motores inibitórios, nos neurônios secretomotores não-colinérgicos, porém, somente na subunidade. A subunidade P2X<sub>3</sub>, foi relatada nos neurônios

mioentéricos no colo de humanos (YANGOU et al., 2001) e ocorre na associação com subunidades do receptor P2X<sub>2</sub> na raíz dorsal, trigeminal e no gânglio nodoso (CHEN et al., 1995; LEWIS et al., 1995; COLLO et al., 1996).

Também, foi reportada a imunorreatividade do receptor P2X<sub>2</sub> nas terminações nervosas intra-glanglionares laminares (IGLES) no trato gastrintestinal de camundongos (CASTELUCCI et al., 2003).

O receptor P2X<sub>7</sub> é um membro original da família P2X e participa na regulação da permeabilidade celular, liberação das citocininas ou na apoptose. É expresso em células lineares hematopoiéticas, monócitos, macrófagos e na microglia. Estes dados concordam com o suposto papel deste receptor no reparo do cérebro após a inflamação, infarto, apoptose, hipóxia ou o insulto imune (FERRARI et al., 1997a; 1997b; FERRARI et al., 1999).

Tem sido demonstrada a presença do receptor P2X<sub>7</sub> em fibroblastos humanos (SOLINI et al., 1999a; SOLINI et al., 2000), epitélio e bexiga urinária humana (O'REILLY et al., 2001a; 2007b), na uretra de humanos e ratos (SLATER et al., 2000; TASSELL et al., 2000), nos órgãos genitais masculinos de humanos, de ratos (LEE et al., 2000), nas células do ducto e acinares da glândula parótida (LI et al., 2003).

A alta regulação do receptor P2X<sub>7</sub> tem sido observada em vários modelos patológicos, incluindo a privação de energia (CAVALIERE et al., 2002; CAVALIERE et al., 2004) na isquemia *in vivo* (FRANKE et al., 2004), epilepsia (VIANNA et al., 2002), lesão mecânica (FRANKE et al., 2001), modelos transgênicos da doença de Alzheimer (PARVATHENANI et al., 2003), retina pigmentosa (FRANKE et al., 2005), assim como em tecidos humanos obtidos de pacientes que sofrem de vitreoretinopatia proliferativa (BRINGMANN et al., 2001), esclerose múltipla (NARCISSE et al., 2005) e lesão dos nervos sensitivos (CHESSELL et al., 2005).

O receptor P2X<sub>7</sub> inicia apoptose em vários tipos celulares que podem ser modificados durante a gravidez e o envelhecimento (CHOW et al., 1997; SCHULZE-LOHOFF et al., 1998; COUTINHO-SILVA et al., 1999; SLATER et al., 2000a,b). Além disso, está envolvido nas interações neuro-imunes e influencia na produção das citocinas (FERRARI et al., 2000; SOLLE et al., 2001).

A ativação do receptor P2X<sub>7</sub>, conduz a mudanças rápidas nas concentrações intracelulares de cálcio, liberação das citocinas pró-inflamatórias e interleucinas. Dados recentes

sobre o receptor P2X<sub>7</sub>, sugerem também um papel específico em estados inflamatórios, neuropáticos da dor e na sinalização nociceptiva em estados crônicos da dor e seu potencial terapêutico (DONNELLY-ROBERTS e JARVIS, 2007).

No sistema nervoso entérico tem sido reportada a presença do receptor P2X<sub>7</sub> (HU et al., 2001) através de técnicas imunohistoquímicas e propriedades farmacológicas em neurônios que expressam funcionalmente este receptor P2X<sub>7</sub>, porém não foi feita análise quantitativa de qual classe neuronal se encontra o receptor purina P2X<sub>7</sub>.

### **1.3 A desnutrição e a renutrição: seus efeitos no sistema nervoso entérico**

A desnutrição calórico-protéica (CHANDRA, 1973; RANA et al., 1991) é um dos principais problemas que afetam crianças nos países em desenvolvimento. Devido à importância desses fatos, pesquisadores têm se preocupado em reproduzir em animais de laboratório, as diferentes formas de desnutrição, a fim de avaliar seus efeitos em vários níveis. Diversos estudos experimentais demonstraram que o processo de desnutrição pode ser obtido, através de métodos baseados na limitação de oferta de alimento (FIRMANSYAH et al., 1989a,b), na elaboração de uma dieta hipoprotéica (BECK et al., 1989), pela diminuição do número de filhotes da prole, criando-se um grupo controle com populações maiores (PATHAK et al., 1981) ou, ainda, utilizando-se de dois fatores: a limitação de oferta e a expansão da ninhada (WINICK e NOBLE, 1966). No sistema nervoso autônomo Schafer e Friede (1988) observaram a diminuição do número de lamelas das fibras nervosas mielínicas, em ratos submetidos à desnutrição pré-natal.

Os efeitos da desnutrição, nos sistemas nervoso central e periférico, têm sido extensivamente estudados (BEDI, 1994; RUSHMORE et al., 1998). No SNC, a severa desnutrição causa diminuição no tamanho da célula nervosa em algumas regiões (ex., giro denteado), enquanto que, em outras, como no córtex cerebral, parece protegido de perdas celulares (BEDI, 1991). No caso dos neurônios periféricos, a desnutrição causa uma diminuição significativa no conteúdo de proteínas no gânglio cervical superior, de ratos jovens (GAETANI et al., 1977) e, em um período de desnutrição materna, durante a gravidez, causa redução no tamanho dos neurônios e na noradrenalina no gânglio mesentérico superior (CONBOY et al., 1987). Estes efeitos foram observados cedo na prole e persistiram na vida adulta.

No sistema nervoso entérico, foi relatada uma diminuição de 27%, no número de neurônios entéricos, no jejuno de ratos submetidos a uma severa desnutrição pré-natal (SANTER e CONBOY, 1990). Similarmente, Sant'ana et al. (1997) descreveram uma diminuição de 13% da área neuronal, no plexo mioentérico do colo ascendente de ratos adultos submetidos à desnutrição protéica.

Os autores Brandão et al. (2003) por métodos histoquímicos para a marcação da NADH-diaforase, observaram, no íleo de animais desnutridos pré e pós-natal, que o gânglio mioentérico dos animais desnutridos se arranjavam de forma irregular e a maioria dos neurônios mostrava um citoplasma menos marcado. A média total das áreas dos neurônios do grupo nutrido variou de 101 a 450  $\mu\text{m}^2$  e do grupo desnutrido de 51 a 200  $\mu\text{m}^2$ .

Os efeitos da renutrição, em neurônios do SNC, foram investigados e os dados indicaram que, se os neurônios foram perdidos, eles não são substituídos quando os animais retornam a uma dieta normal (RANA et al., 1991; ANDRADE et al., 1995). O efeito da renutrição, nos neurônios entéricos, ainda não foi totalmente avaliado. Em um estudo prévio, mães foram desprovidas de alimentos e, então, a prole foi examinada, depois de fazerem uma dieta normal (SANTER e CONBOY, 1990). Os animais não foram examinados antes da restauração da dieta normal, embora o estudo sugira que o número de neurônios esteja reduzido pela desnutrição, eles não se recuperaram (SANTER e CONBOY, 1990).

Os autores Castelucci et al. (2002b) observaram uma redução de 50% do peso e de 40% no tamanho do intestino grosso de filhotes das mães que foram submetidas à desnutrição protéica pré e pós-natal. Também, houve diminuição de 15% do perfil neuronal, porém não houve redução no número total de neurônios. Depois de feita a renutrição, foram restaurados: o peso corporal, a área dos neurônios mioentéricos e intestino grosso.

Segundo Gomes et al. (2006) investigaram os efeitos da desnutrição e renutrição no intestino delgado de ratos, verificou-se diminuição no peso dos ratos desnutridos, sendo restaurado na renutrição. A área do intestino delgado do grupo desnutrido diminuiu cerca de 45% na área dos neurônios mioentéricos dos grupos nutridos e renutridos, porém não houve alteração na área dos neurônios mioentéricos.

A importância deste trabalho está em demonstrar, de maneira original, possíveis alterações da desnutrição e renutrição sobre a expressão dos receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub> e

P2X7, e caracterizar estes efeitos sobre o código químico dos neurônios nos plexos mioentéricos e submucosos, do colo distal, visando contribuir para desenvolvimento dos conhecimentos das influências sobre o organismo no processo de desnutrição e a renutrição.

## 2 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente trabalho, podemos concluir que:

1. A dieta hipoprotéica (5% de caseína) foi eficiente para obtenção dos animais D42, pois houve diminuição de peso destes animais quando comparados aos N42 e RN42. Além disso, a renutrição foi eficiente, pois houve recuperação dos pesos dos animais.
2. Houve alteração na expressão dos receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>, e da acetil colina transferase (ChAT) nos animais D42.
3. Os receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>, foram observados nos neurônios inibitórios, sensoriais e excitatórios nos três grupos N42, D42 e RN42.
4. A desnutrição ocasionou um aumento na densidade neuronal dos neurônios do plexo mioentérico e submucoso, dos neurônios imunorreativos aos receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>, ao NOS, à calretinina e ao ChAT no grupo D42 e uma recuperação no grupo RN42.
5. A desnutrição contribuiu para a alteração do perfil neuronal dos neurônios mioentéricos, imunorreativos ao receptor P2X<sub>7</sub>, aos neurônios intrínsecos aferentes primários e motores excitatórios. A desnutrição não afetou os perfis neuronais dos neurônios mioentéricos, do receptor P2X<sub>2</sub> e dos neurônios inibitórios.
6. A desnutrição não afetou os perfis neuronais no plexo submucoso dos neurônios intrínsecos aferentes primários. Causou aumento nos perfis neuronais no plexo submucoso dos neurônios intrínsecos aferentes primários e motores excitatórios no grupo D42 e uma recuperação no grupo RN42.
7. A desnutrição afetou de maneira diferenciada os plexos mioentérico e submucoso, em sua morfologia e os receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>7</sub>.

8. A técnica de imunohistoquímica foi eficiente, pois pode evidenciar especificamente a classe neuronal afetada pela desnutrição e renutrição.
9. A renutrição foi um fator eficiente e importante para a recuperação de diversos parâmetros morfológicos dos neurônios entéricos.

### 3. REFERÊNCIAS

ABBRACHIO, M.; BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: pathological roles. **Jpn J. Pharmacol.**, v.78, p.113-145, 1998.

ANDRADE, J.P.; MADEIRA, M.D.; PAULA-BARBOSA, M.M. Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. **J. Anat.**, v.187, p. 379-393, 1995.

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

BARAJAS-LÓPEZ, C.; ESPINOSA LUNA, R.; GERZANICH, V. ATP closes a potassium and opens a cationic conductance through different receptors in neurons of guinea pig submucous plexus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 268, p. 1396-1402, 1994.

BARAJAS-LÓPEZ, C.; HUIZINGA, J.D.; COLLINS, S.M.; GERZANICH, 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.

BARAJAS-LÓPEZ, C.; ESPINOSA LUNA, R.; ZHU Y. Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons. **J. Physiol.**, v.513, p.671-683, 1998.

BARAJAS-LÓPEZ, C.; ESPINOSA LUNA, R.; CHRISTOFI, F.L. Changes in intracellular Ca<sup>+</sup> by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. **Eur. J. Pharmacol.**, v.409, p.243-257, 2000.

BAYLISS, W.M.; STARLING, E.H. The movements and innervation of the small intestine. **J Physiol.** v.24, p.99-143, 1899.

BECK, B.; DOLLET, M.J.; MAX, P.J. Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: Effects on food intake and body weight in rats. **Physiol. Behav.**, v.5, p. 761-765, 1989.

BEDI, K.S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. **J. Comp. Neurol.**, v. 311, p. 425-433, 1991.

BEDI, K.S. Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 342, p. 596-602, 1994.



BERTRAND, P.P.; KUNZE, W.A.A.; BORNSTEIN, J.C.; FURNESS, J.B.; SMITH, M.L. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. G422-G435, 1997.

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

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, p. 551-560, 2000.

BOBANOVIC, L.; ROYLE, S.J.; MURREL-LAGNADO, R.D. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. **Journ. Neurosc.**, v.22, n.12, p.4814-4824, 2002.

BORODY, T.J.; QUILEY, E.M.M.; PHILLIPS, S.F.; WEINBECK, M.; TUCKER, R.L.; HADDAD, A.; ZINSMEISTER, A.R. Effects of morphine and atrophine on motility and transit in the human ileum. **Gastroenterology**, v.89, p.562-570, 1985.

BRANDÃO, M.C.S.; DE ANGELIS, R.C.; DE SOUZA, R.R.; LIBERTI E.A. Effects of pre-and postnatal protein deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weaning rats. **Nutr. Res.**, v.23, p.215-223, 2003.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; MOLL, V.; MILENKOVIC, I.; FAUDE, F.; ENZMANN, V.; WOLF, S.; REICHENBACH, A. Upregulation of P2X<sub>7</sub> receptor currents in Muller glial cells during proliferative vitreoretinopathy. **Invest. Ophthalmol.Vis. Sci.**, v.42, p.860-867, 2001.

BROOKES, S.J.H.; SEELE, P.A.; COSTA, M. Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Research**. V. 263, p. 471-481, 1991.

BURNSTOCK, G.; CAMPBELL, G.; BENNETT, M.; HOLMAN, M.E. Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. **Nature**, v.200, p.581-582, 1963.

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.

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: STRAUB, R.W.; BOLIS, L.(Ed.). **Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones**. A Multidiciplinary Aproach. New York.: Raven Press, 1978. p.107-118.

BURNSTOCK, G., KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **Gen. Pharmacol.**, v.16, p.433-440, 1985.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS H.L.; POOLE, D.P.; FURNESS, J.B. The distribution of purine P2X<sub>2</sub> receptors in the guinea pig enteric nervous system. **Histochem. Cell Biol.**, v.117, p.415-422, 2002a.

CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R.R.; DE ANGELIS, R.C.; FURNESS, J.B.; LIBERT, 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, 2002b.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H.L.; FURNESS, J.B. P2X<sub>2</sub> purine receptor immunoreactivity of intraganglionic laminar endings in the mouse gastrointestinal. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n.2, p.167-174, 2003.

CAVALIERE, F.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; VOLONTE, C. Extracellular ATP and nerve growth factor intensify hypoglycemia-induced cell death in primary neurons: role of P2 and NGFRp75 receptors. **J. Neurochem.**, v.83, p.1129-1138, 2002.

CAVALIERE, F.; AMADIO, S.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; VOLONTE, C. Synaptic P2X<sub>7</sub> and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **J. Cereb. Blood Flow. Metab.**, v. 24, p.392-398, 2004.

CHA C.J.M., GELARDI N.L., OH W. Growth and cellular composition in rats with intrauterine growth retardation: effects of postnatal nutrition. **J. Nutrition.**, v.117, p.1463-1468, 1987.

CHANDRA, R.K. Nutrition & immunity: lessons from the past and new insights into the future. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, p.397-402, 1973.

CHEN, C.C.; AKOPIAN, A.N.; COLQUHOUN, D.; BURNSTOCK, G.; WOOD, J.N. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature**, v. 377, p.428-431, 1995.

CHESSEL, I.P.; HATCHER, J.P.; MICHEL, A.D.; HUGHES, J.P.; GREEN, P.; EGERTON, J.; MURFIN, M.; RICHARDSON, J.; PECK, W.L.; GRAHAMES, C.B.; CASULA, M.A.; YANGO, U. Y.; BIRCH, R.; ANAD, P.; BUELL, G.N. Disruption of the P2X<sub>7</sub> purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. **Pain**, v. 114, p.386-396, 2005.

CHOW, S.C.; KASS, G.E.; ORRENIUS, S. Purines and their roles in apoptosis. **Neuropharmacology**. V. 36, p. 1149-1156, 1997.

CHRISTOFI, F.L.; GUAN, Z.; WOOD, J.D.; BAIADAN, L.V.; STOKES, B.T. Purinergic Ca<sup>2+</sup> signaling in myenteric neurons via P2 purinoceptors. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. G463-G473, 1997.

CHU, Y.; MOUAT, M.F.; COFFIELD, J.A.; ORLANDO, R.; GRIDER, A. Expression of P2X<sub>6</sub>, a purinergic receptor subunit, is affected by dietary zinc deficiency in rat hippocampus. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 91, p. 77-87, 2003.

CREMA, A.; FRIGO, G.M.; LECHINNI S. A pharmacological analysis of the peristaltic reflex in the isolated colo of the guinea-pig or cat. **Br. J. Pharmacol.**, v.39, p.334-345, 1970.

COLLO, G.; NORTH, R.A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; BUELL, G. Cloning of P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. **J. Neurosci.**, v.16, p.2495-2507, 1996.

COLLO, G.; NEIDHART, S.; KAWASHIMA, E.; KOSCO-VILBOISM.; NORTH, R.A.; BUELL, G. Tissue distribution of the P2X<sub>7</sub> receptor. **Neuropharmacology**, v.36, p.1277-1283, 1997.

COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P.M.; BISAGGIO, R.D.; PERFETTINI, J.L.; NETO, A.C.; KANELLOPOULOS, J.M.; MOTTA-LY, I.; DAUTRY-VARSAT, A.; OJCIUS, D.M. P2Z/P2X<sub>7</sub> receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. C1139-C1147, 1999.

COOKE, H.J.; REDDIX A. Neural regulation of intestinal electrolyte transport. In: JOHNSON, L.R. **Physiology of the gastrointestinal**. New York: Tract, Raven Press., 1994. p.2083-2132.

CONBOY, V.B.; SANTER, R.M.; SWIFT, G.L. Effects of prenatal undernutrition on prevertebral sympathetic neurons in the rat: a morphological and fluorescence histochemical study. **J. Anat.**, v. 154, p.47-53, 1987.

DI VIRGILIO, F.; SANZ, J.M.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S. The P2Z/P2X<sub>7</sub> receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. **Prog. Brain Res.**, v. 120, p.355-368, 1999.

DONNELLY-ROBERTS, D.; McGARAUGHTY, S.; SHIEH, C.C.; HONORE, P.; JARVIS, M.F. Painful Purinergic receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2007.

FERRARI, D.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; DAL SUSINO, M.; COLLO, G.; BUELL, G., DI VIRGILIO, F. ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. **Neuropharmacology**, v.36, p.1295-1301, 1997a.

FERRARI, D.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; DAL SUSINO, M.; MCLCHIORRI, L.; BARICORDI, OR.; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP triggers IL-1beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. **J. Immunol.**, v. 159, p.1451-1458, 1997b.

FERRARI, D.; LOS, M.; BAUER, MK.; VANDENABEELE, P.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. **FEBS Lett.**, v. 447, p.71-75, 1999.

FERRARI, D.; LA SALA, A.; CHIOZZI, P.; MORELLI, A.; FALZONI, S.; GIROLOMONI, G.; IDZKO, M.; DICHMANN, S.; NORGAEUER, J.; DI VIRGILIO, F. The P2 purinergic receptors

of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. **FASEB. J.**, v. 14, p. 2466-2476, 2000.

FIRMANSYAH, A.; SUNOTO, S.; SUHARYONO, S. Effect of malnutrition during different periods on the small intestine of the rat. **Japan J. Exp. Med.**, v.59, n.1, p.1-7, 1989a.

FIRMANSYAH, A.; SUWANDITO, L.; PENN, D.; LEBENTHAL, E. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 50, p.2761- 268, 1989b.

FRANKE, H.; GROSCHE, J.; SCHADLICH, H.; KRUGEL, U.; ALLGAIER, C.; ILLES, P. P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. **Neuroscience**, v.108, p.421-429, 2001.

FRANKE, H.; GUNTHER, A.; GROSCHE, J.; SCHMIDT, R.; ROSSNER, S.; REINHARDT, R.; FABER-ZUSCHARATTER, H.; SCHNEIDER, D.; ILLES, P. P2X<sub>7</sub> receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 63, p.686-699, 2004.

FRANKE, H.; BRINCKMANN, U.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; SPERLAGH, B.; REICHENBACH, A.; LIEBERT, U.G.; ILLES, P. P2X<sub>7</sub> receptor-mRNA and protein in the mouse retina: changes during retinal degeneration in BALB/C mice. **Neurochemistry**. v. 47, p.235-242, 2005.

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. **Pharmacology and Therapeutics**, v.109, p.297-324, 2006.

FRANKE, H.; KRÜGEL, U.; ILLES, P. P2 receptors and neuronal injury **Euro. Jour. Physiol.** 452:622-644, 2006.

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

FURNESS, J.B.; JOHNSON, P.J.; POMPOLO, S.; BORNSTEIN, J.C. Evidence that enteric reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. **Neurogastroenterol. Mot.**, v.7, p.89-96, 1995a.

FURNESS, J.B.; YOUNG, H.M.; POMPOLO, S.; BORNSTEIN, J.C.; KUNZE, W.A.A.; Mc CONALOUGH, K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, v.108, p.554-563, 1995b.

FURNESS, J.B.; KUNZE, W.A.; BERTRAND, P.P.; CLERC, N.; BORNSTEIN, J.C. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. **Prog. Neurobiol.**, v. 54, p.1-18, 1998.

FURNESS, J.B.; BORNSTEIN, J.C.; KUNZE, W.A.A.; CLERC, N. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: YAMADA, T.; ALPERS, D.H.; LAINE, L.; OWYANG,

C.; POWELL, D.W. (Ed). **Textbook of Gastroenterology**. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 1999a. v.1. p. 11-35.

FURNESS, J.B.; CLERC, M.; KUNZE, W.A.; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine and immune responses. **Am J Physiol.**, v. 277, p. G922-G928, 1999b.

FURNESS, J.B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J. Autonom. Nerv. Syst.**, v.81, p.87-96, 2000.

FURNESS, J.B.; KOOPMANS, H.S.; WOODMAN, H.L.; LIN, C. Identification of intestinofugal neurons projecting to the coeliac and superior mesenteric ganglia in the rat. **Auton. Neurosci.**, v. 83, p.81-85, 2000.

FURNESS, J.B. Intestinofugal neurons and sympathetic reflexes that bypass the central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, v. 455, p.281-284, 2003.

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

GAETANI, S.; MENGHER, E.; ROSSI, A.; SPADONI, M.A.; TOCHI, G. Long term protein deficiency in adult rats. Effects on different proteins of a sympathetic ganglion. **Neurochem Res.**, v.2, p.439-448, 1977.

GALLIGAN, J.J.; FURNESS, J.B.; COSTA, M. Effects of cholinergic blockade and sympathetic denervation on gastrointestinal myoelectric activity in guinea-pig. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 238, p.1114-1125, 1986.

GLUSHAKOV, A.V.; GLUSHAKOVA, H.Y.; SKOK, V.I. Two types of P2X-purinoceptors in neurons of the guinea pig ileum submucous plexus. **Neurophysiology**, v.30, p.301-304, 1998.

GOMES, O.A.; CASTELUCCI, P.; FONTES, R.B.V.; LIBERT, A.L. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. **Auton. Neurosci.**, p.277-284, 2006.

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

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

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

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.

HUKUHARA, T.; YAMAGAMIL, M.; NAKAGAMA, S. On the intestinal intrinsic reflexes. **Jpn. J. Physiol.**, v.8, p.9-20, 1958.

IYER, V.; BORNSTEIN, J.C.; COSTA, M.; FURNESS, J.B.; TAKAHASHI, Y, IWANAGA, T. Electrophysiology of guinea-pig myenteric neurons correlated with immunoreactivity for calcium binding proteins. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 22, p. 141-150, 1988.

JODAL, M.; LUNDGREN, O. Neurohormonal control of gastrointestinal blood flow. In: WOOD, J.D. (Ed.). **Handbook of Physiology: The gastrointestinal System.** 1989. Am. Physiol. Soc. v.16, p. 1667-1711.

KAMM, K; HOPPE, S.; BREVES.; SCHRODER, B.; SCHEMANN, M. Effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of the myenteric neurones in pig jejunum. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 16, p. 53-60, 2004.

KATAYAMA, Y.; MORITA, K. Adenosine 5'-triphosphate modulates membrane potassium conductance in guinea-pig myenteric neurons. **J. Physiol**, v. 408, p.373-390, 1989.

KING, R.S.; KEMPER, T.L.; DeBASSIO, W.A.;RAMZAN, M.; BLATT, G.J.; ROSENE, D.L.; GALLER, J.R. Birthdates and number of neurons in the serotonergic raphe nuclei in the rat with prenatal protein malnutrition. **Nutr. Neurosci.**,v. 5, p. 391-397, 2002.

KIRCHGESSNER, A.L.; TAMIR, H.; GERSHON, M.D. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucous plexus of the guinea-pig gut: activity-induced expression of Fos-immunoreactivity. **J. Neurosci.**, v. 12, p.235-248, 1992.

KHAKH, B.S.; BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C.; KING, B.F.; NORTH, R.A.; SEGULA, P.; VOIGT, M.; HUMPHREY, P.P.A. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. **Pharmacol. Rev.**, v.53, p. 107-118, 2001.

KUNZE, W.A.A.; BORNSTEIN, J.C.; FURNESS, J.B. Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ the intestine of a mammal. **Neuroscience**, v. 66, p. 1-4, 1995.

KUNZE, W.A.A.; FURNESS, J.B.; BERTRAND, P.P.; BORNSTEIN, J.C. Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. **J. Physiol.**, v. 506, p.827-842, 1998.

KUNZE, W.A.A.; FURNESS, J.B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 61, p.117-142, 1999.

KUNZE, W.A.A.; CLERC, N.; BERTRAND, P.P.; FURNESS, J.B. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. **J. Physiol.**, v. 517, p.547-561, 1999.

LANGLEY, J.N. The sympathetic and other related system of nerves. In: SCHAFFER, E. A. (Ed.). **Text book of physiology**. Edinburgh: Pentland, 1900. p. 616-696.

LANGLEY, J.N. **The autonomic nervous system**. Combridge: Heffer, 1921. Part 1.

LANGLEY, J.N., MAGNUS R. Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. **J. Physiol.**, v.33, p.34-51, 1905.

LEE, H.Y.; BARDINI, M.; BURNSTOCK, G. P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. **Cell. Tissue. Res.**, v. 300, p. 321-330, 2000.

LEWIS, C.; NEIDHART, S.; NORTH, R.A.; BUELL, G.; SURPRENANT, A. Coexpression of P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>3</sub> receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. **Nature**, v.377, p.432-435, 1995.

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.

LI, Q.; LUO, X.; ZENG, W.; MUALLEN, S. Cell-specific behaviour of P2X<sub>7</sub> receptors in mouse parotid acinar and duct cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.47554-61, 2003.

LI, Z.S.; FURNESS, J.B. Immunohistochemical localization of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig smallintestine. **Cell Tissue Research**. V. 299, p. 1-8, 1998.

LIPPI, A.; SANTICIOLI, P.; CRISCUOLI, M.; MAGGI, C.A. Despolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.375, p. 245-251, 1998.

MAKHLOUF, G.M.; GRIDER, J.R. Nonadrenergic noncholinergic transmitters of the gut. **News Physiol. Sci.**, v. 8, p. 196-199, 1993.

MANN, P.T.; FURNESS, J. B.; SOUTHWELL, B.R. Choline acetyltransferase immunoreactivity of putative intrinsic primary afferent neurons in the rat ileum. **Cell Tissue Research**. v. 297, p.241-248, 1999a.

MIZUNO, M.S.; GIROTTI P.A.; VELLOSO, L.A.; ELIAS, C.F.; LIBERTI, E.A.; CASTELUCCI, P. Alteração na coexpressão do receptor P2X<sub>2</sub> com o óxido nítrico sintase, colina

acetil transferase e calretinina nos neurônios do íleo de camundongos obesos machos (*OB/OB*). **FESBE**, 2007.

MISAWA, R.; GIROTTI, P.A.; MIZUNO, M.S.; LIBERTI, E.A.; CASTELUCCI, P. Quantitative morphological study of the P2X<sub>2</sub> receptor, nitric oxide synthase, calretinin, calbindin and choline acetyltransferase in neurons of the rat ileum following undernutrition and refeeding. *European Journal of nutrition*. 2007 (submetido).

NARCISSE, L.; SCEMES, E.; ZHAO, Y.; LEE, S.C.; BROSINAN, C.F. The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X<sub>7</sub> receptor expression and function in human astrocytes. **Glia**. v. 49, p. 245-258, 2005.

NATALI, M.R.M.; MOLINARI, S.L.; VALENTINI, L.C.; MIRANDA NETO, H.M. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. **Biocell**. v.29, p. 39-46, 2005.

NORTH, R.A.; SURPRENANT, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.40, p.563-580, 2000.

ONÍS, M.; MONTEIRO, C.; AKRÉ, J.; GLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. **Bull World Health Organ.**, v.71, n.6, p. 703-12, 1993.

O'REILLY, B.A.; KOSAKA, A.H.; CHANG, T.K. A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders. **J. Urol.**, v.165, p.1730-4, 2001a.

O'REILLY, B.A.; KOSAKA, A.H.; CHANG, T.K. A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. **BJU Int.**, v.87, p.617-22, 2001b.

PARVATHENANI, L.K.; TERTYSHNIKOVA, S.; GRECO, C.R.; ROBERTS, S.B.; ROBERTSON, B.; POSMANTUR, R. P2X<sub>7</sub> mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.13309-13317, 2003.

PATHAK, R.M.; MAHMOOD, A.; DUDEJA, P.K.; SUBRAHMANYAM, D. Intestinal brush border membrane structure and function: Effect of early postnatal undernutrition. **Pediatrics Res.**, v.15, p.112-114, 1981.

POMPOLO, S.; FURNESS, J.B. Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin reactive, Dogiel type II neurons, in the myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. **J. Neurocytol.**, v. 17, p. 771-782.



POOLE, D.P.; CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H.L.; CHIOCCHETTI, R.; FURNESS, J.B. The distribution of P2X<sub>3</sub> purine receptor subunits in the guinea-pig enteric nervous system. **Autonom. Neurosci.**, v.101, p.39-47, 2002.

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.3-9a, 2001.

QUINSON, N.; ROBBINS, H.L.; CLARK, M.J.; FURNESS, J.B. Locations and innervation of cell bodies of sympathetic neurons projecting to the gastrointestinal tract in the rat. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 64, n.3, p. 281-294b, 2001.

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

RANA, S.V.; CHOPRA, J.S.; MEHTA, S.; CHAND, U.K.; SHARMA, U. Electrophysiological and histopathological changes in peripheral nerves of postnatally undernourished and rehabilitated Young rhesus monkeys. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 29, p.385-390, 1991.

REDDIX, R.; KUWAHARA, A.; WALLACE, L.; COOKE, H.J. Vasoactive intestinal polypeptide: a transmitter in submucous neurons mediating secretion in guinea pig distal colon. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 269, p.1124-1129, 1994.

RITTER, R.C.; SAYEGH, A.I. 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. **Anatom. Rec.**, v. 271A, p.209-216, 2003.

ROBBINS, H.L.; CASTELUCCI, P.; FURNESS, J.B. The distribution of P2X<sub>7</sub> receptor subunits in the guinea-pig enteric nervous system. **Proc. Aust. Neurosci. Soc.**, v.14, 2003.

RUSHMORE, J.; LUEBKE, J.; GALLER, J.R. Electrophysiological properties of rat hippocampal principal cells are unaltered by prenatal protein malnutrition. **Hippocampus**, v. 8: 380-389, 1998.

SANDERS, K.M.; WARD, S.M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p.G379-G392, 1992.

SANT'ANA, M.; MIRANDA, N.M.H.; DE SOUZA, R.R.; MOLINARI, S.L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n.4, p.687-95, 1997.

SANTER, R.M.; CONBOY, V.B. Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. **J. Anat.**, v. 168, p.57-62, 1990.

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. **The anat. record.**, v. 271, p. 209-216, 2003.

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

SCHABADASH, A. Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs. **Z. Zellforsch.**, v.10, p.320-385, 1930b.

SCHAFER, K.; FRIEDE, R.L. The on set and rate of myelination in six peripheral and autonomic nerves of the rat. **J. Anat.**, v.159, p.181-195, 1988.

SCHULZE-LOHOFF, E.; HUGO, C.; ROST, S.; ARNOLD, S. GRUBER, A; BRUNE, B.; STERZEL, R.B. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X<sub>7</sub> receptors. *Am. J. Physiol.*, v. 275, p.F962-F971, 1998.

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.

SIDHU, M.; WARD, S.M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **Am. J. Physiol.**, v.269, p.G346-G351, 1995.

SIDHU, M.; COOKE, H.J. Role for 5H-T and Ach in submucosal reflexes mediating colonic secretion. **Am J. Physiol.**, v.269, p. G346-G351, 1995.

SLATER, N.M.; BARDEN, J.A.; MURPH, C.R. Distributional changes of purinergic receptor subtypes P2X<sub>1-7</sub> in uterine epithelial cells during early pregnancy. **Histochemi. J.**, v.32, p.365-72, 2000a.

SLATER, M.; BARDEN, J.A.; MURPH, C.R. The purinergic calcium channels P2X<sub>1,2,5,7</sub> are down-regulated while P2X<sub>3,4,6</sub> are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. **Histochem. J.**, v. 32, p. 571-580, 2000b.

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<sub>7</sub> receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 125-132, 2001.

SOLINI, A.; CHIOZZI, P.; MORELLI, A. et al. Human primary fibroblasts *in vitro* express a purinergic P2X<sub>7</sub> receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. **J. Cell Sci.**, v.122, p.297:305, 1999.

SOLINI, A.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S. Et al. High glucose modulates P2X<sub>7</sub> receptor-mediated function in human primary fibroblasts. **Diabetologia**, v.43, p.1248-56, 2000.

SONG, Z.M.; BROOKES, S.J.; COSTA, M. All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. **Neurosci. Lett.**, v. 180, p. 219-222, 1994.

STARK, M.E.; SZURSZEWSKI, J.H. Role of nitric in gastrointestinal and hepatic function and disease. **Gastroenterology**, v.103, p.1928-1949, 1992.

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

SMITH, T.K.; FURNESS, J.B. Reflex changes in circular muscle activity elicited by stroking the mucosa: an electrophysiological analysis in the isolated guinea-pig ileum. **J. Auton. Nerv.**, v.25, p.205-218, 1988.

SPENCER, N.J.; WALSH, M.; SMITH, T.K. Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v.522, p.321-331, 2000.

SUZUKI, T.; HIDE, I.; IDO, K. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X<sub>7</sub> receptor-activated microglia. **J. Neurosci.**, v.24, p.1-7, 2004.

TASSELL, W.; SLATER, M.; BARDEN, J.A.; MURPHY, C.R. Endometrial cell death during early pregnancy in the rat. **Histochem. J.**, v.32, P.373-9, 2000.

TORREJAIS, M.M.; NATALI, M.R.M.; CONEGERO, C.I.; MIRANDA NETO, M.H. Effects of proteic malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the rats. **Rev. Universidade de Maringá.**, v.17, p. 315-327, 1995.

VANNER, S.; JIANG, M.M.; SURPRENANT, A. Mucosal stimulation evokes vasodilation in submucosal arterioles by neuronal and non-neuronal mechanisms. **Am. J. Physiol.**, v.264, p.G202-G212, 1993.

VIANNA, E.P.; FERREIRA, A.T.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; SANABRIA, E.R.; FUNKE, M.; CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDEZ, M.J. Evidence that ATP participates in the pathophysiology of pilocarpine temporal lobe epilepsy: fluorimetric, immunohistochemical, and Western blot studies. **Epilepsia**, v.43, p.227-229, 2002 . Suppl. 5

VULCHANOVA L., ARVIDSSON U., RIEDHL M., WANG J., BUELL G., SUPRENANT A., NORTH R.A. Differential distribution of two ATP-gated ion channels P2x receptors determined by immunohistochemistry. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p.8063-8067, 1996.

YANGOU, Y.; FACER, P.; BAECKER, P.A., FORD, A.A.P.; KNOWLES, C.H.; CHAN, C.L.H.; WILLIAMS, N.S.; ANNAND, P. ATP- gated ion channel P2X<sub>3</sub> is increased in human inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterol. Motil.**, v.13, p.365-369, 2001.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **J. Nutr.**, v.89, p.300-306, 1966.

XIANG, Z.; BURNSTOCK, G. P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> purinoceptors in the rat enteric nervous system. **Histochem. Cell Biol.**, v.121, p.169-179, 2004.

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