

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

VANESSA RIBEIRO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NEUROPEPTÍDEOS DO
SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES PORTADORES E NÃO
PORTADORES DE CONSTIPAÇÃO INTESTINAL**

UBERLÂNDIA

2014

VANESSA RIBEIRO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NEUROPEPTÍDEOS DO
SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES PORTADORES E NÃO
PORTADORES DE CONSTIPAÇÃO INTESTINAL**

**Dissertação apresentada pela aluna
Vanessa Ribeiro de Souza como requisito
parcial para a obtenção do título de
Mestre pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de
Uberlândia**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira

Coorientadora: Profa. Dra. Michelle A. Ribeiro de Freitas

UBERLÂNDIA

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
Elaborada por Izaura Ferreira Neta - Bibliotecária CRB1-2771**

V718c Souza, Vanessa Ribeiro de.

Caracterização da expressão de neuropeptídeos do sistema nervoso entérico de pacientes portadores e não portadores de constipação intestinal / Vanessa Ribeiro de Souza - 2014.

55f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira. Coorientadora: Profa. Dra. Michelle A. Ribeiro de Freitas.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2014.

Não possui Biografia.

Inclui índice de tabelas e figuras.

1. Constipação intestinal. 2. Neuropeptídeos. 3. Sistema Nervoso Entérico. I. Título. II. Autor. III. Orientador. IV. Coorientador.

CDU: 616:611.013.32

*Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião e Lourdes
em retribuição ao amor e dedicação que me concedem a cada dia.*

Obrigada pelo apoio constante e pela sábia educação.

Orgulho-me muito de vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir meu crescimento humano e intelectual.

Ao meu noivo Cláudio, companheiro de todas as horas, que sempre esteve comigo nessa caminhada. Sua dedicação sem medir esforços, incentivo e carinho me encorajaram. Obrigada pelo apoio, pela valorização, pela confiança. Há muito de você nessa conquista! Obrigada!

Ao Dr. Alexandre, pela generosidade com que partilhou o conhecimento e a experiência. O meu muito obrigada pela paciência, confiança e apoio.

Um especial agradecimento à Universidade Federal de Uberlândia.

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NEUROPEPTÍDEOS DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES PORTADORES E NÃO PORTADORES DE CONSTIPAÇÃO INTESTINAL

RESUMO

A constipação intestinal é um problema grave de saúde pública que aflige milhares de pacientes em todo o mundo. Acredita-se que, com o estilo de vida moderno, seguido de constante estresse e inadequação dos hábitos alimentares, a incidência da constipação intestinal aumente consideravelmente nas próximas décadas. A constipação é causada por alterações no funcionamento do trato digestório que ainda não estão completamente elucidadas. Sabe-se que o sistema nervoso entérico é responsável pelas funções sensitivas e motoras do trato digestivo, o que confere a este funcionar sob perfeita sincronia e realizar a peristalse, promovendo o trânsito adequado do bolo alimentar e posteriormente do bolo fecal. A grande maioria das patologias que afligem o trato gastrointestinal são originadas de distúrbios em neurônios específicos do sistema nervoso entérico e, provavelmente, o mesmo ocorre com a constipação intestinal. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi, através da técnica de imunohistoquímica, caracterizar e comparar a expressão dos diversos neuropeptídios do sistema nervoso entérico em pacientes portadores de constipação intestinal e indivíduos não constipados. Os resultados demonstraram que, dentre os vários tipos de neurônios estudados, os pacientes constipados apresentam uma menor quantidade de neurônios que expressam calretinina e colina-acetiltransferase, neuropeptídios característicos de neurônios aferentes e de neurônios motores excitatórios. Acreditamos que esses resultados possam colaborar com futuras técnicas de tratamento e com a prevenção da constipação intestinal.

Palavras-chave: Constipação intestinal, sistema nervoso entérico, neuropeptídeos, marcadores neuronais.

CHARACTERIZATION OF THE EXPRESSION OF ENTERIC NERVOUS SYSTEM NEUROPEPTIDES IN PATIENTS WITH AND WITHOUT CONSTIPATION

ABSTRACT

Constipation is a serious public health problem that afflicts thousands of patients worldwide. It is believed that with the modern lifestyle, followed by constant stress and inadequate eating habits, the incidence of constipation will increase considerably in coming decades. Constipation is caused by abnormal functioning of the digestive tract which is not yet fully elucidated. It is known that the enteric nervous system is responsible for sensory and motor functions of the digestive tract, which makes it work in perfect sync and perform peristalsis, promoting proper transit of the bolus and subsequently fecal mass. The vast majority of pathologies afflicting the gastrointestinal tract are originated from disturb in specific neurons in the enteric nervous system and probably the same happens with constipation. Hence, the objective of this study was, by immunohistochemistry, to characterize and compare the expression of several neuropeptides of the enteric nervous system in patients with constipation and individuals not constipated. The results showed that among the various types of neurons studied, constipated patients have fewer neurons expressing calretinin and choline acetyltransferase, characteristic neuropeptides from afferent neurons and excitatory neurons engines. We believe that these results can help in future treatment techniques and prevention of constipation.

Keywords: Constipation, enteric nervous system, neuropeptides, neurochemical markers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema do sistema nervoso entérico observado em camadas e em secção transversal

FIGURA 2 – Perfil de marcação de neurônios no plexo submucoso de indivíduos não portadores de constipação intestinal e de pacientes constipados

FIGURA 3 – Expressão de calretinina em neurônios do plexo submucoso de indivíduo não constipado e de paciente constipado

FIGURA 4 – Expressão de neuropeptídeo Y em neurônios do plexo mioentérico de indivíduo não constipado e de paciente constipado

FIGURA 5 – Expressão de colina acetiltransferase em neurônios do plexo submucoso de indivíduo não constipado e de paciente constipado

FIGURA 6 – Expressão de substância P em neurônios do plexo submucoso de indivíduo não constipado e de paciente constipado

FIGURA 7 – Expressão de óxido nítrico sintetase em neurônios do plexo mioentérico de indivíduo não constipado e de paciente constipado

FIGURA 8 – Expressão de peptídeo intestinal vasoativo em neurônios do plexo mioentérico de indivíduo não constipado e de paciente constipado

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Critérios diagnósticos de Roma III para constipação funcional

TABELA 2 – Anticorpos primários utilizados para identificação dos neuropeptídeos

TABELA 3 – Anticorpos secundários contendo o marcador neuronal

TABELA 4 – Média do número de corpos neuronais nos plexos entéricos de indivíduos não constipados e pacientes constipados

TABELA 5 – Média de expressão de neuropeptídios nos plexos nervosos do cólon de indivíduos não constipados e pacientes portadores de constipação intestinal

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HT** – Serotonina
- a-FGF** – Fator de crescimento fibroblástico ácido
- ATP** – Adenosina trifosfato
- b-FGF** – Fator de crescimento fibroblástico básico
- CCK** – Colecistoquinina
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- ChAT** – Colina acetiltransferase
- CNTF** – Fator neurotrófico ciliar
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- GDNF** – Fator neurotrófico derivado de células gliais
- GFAP** – Proteína ácida fibrilar da glia
- GRP** – Peptídeo relacionado a gastrina
- IL-2** – Interleucina 2
- IL-4** – Interleucina 4
- IL-5** – Interleucina 5
- IL-6** – Interleucina 6
- IPANs** – Neurônios intrínsecos primários aferentes
- IR** – Imunorreativas
- mRNA** – RNA mensageiro
- NGF** – Fator de crescimento neuronal
- NK** – *Natural Killer*
- NO** – Óxido nítrico
- NOS** – Óxido Nítrico Sintetase
- NPY** – Neuropeptídeo Y
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- SNE** – Sistema Nervoso Entérico
- SNP** – Sistema Nervoso Periférico

SOM – Somatostatina

SP – Substância P

TK – Taquicininas

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

VIP – Peptídeo Intestinal Vasoativo

IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

A presente dissertação foi elaborada com o intuito de contribuir para a compreensão da relação entre a constipação intestinal e as alterações sofridas pelo sistema nervoso entérico, através da caracterização das alterações histopatológicas do trato gastrointestinal, principalmente as que dizem respeito às subclasses neuronais necessárias para conduzir à instalação da constipação intestinal. Este trabalho conta com a colaboração de um corpo científico que agrega diferentes competências nacionais e internacionais, sendo composto por pesquisadores de referência em diversas áreas, como imunopatologia e neurofisiologia do trato digestório. O projeto foi desenhado de forma a ser executado com a colaboração de instituições como a Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, o Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ e o Departamento de Anatomia e Biologia Celular da Universidade de Erlangen-Nuremberg – Alemanha, agregando conhecimentos e experiências prévias do coordenador do projeto às tecnologias atuais, o que permite atingir os objetivos propostos e trazer novas possibilidades à linha de pesquisa sobre a constipação intestinal no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. Acreditamos que este trabalho contribui para a elucidação dos mecanismos envolvidos na instalação da constipação intestinal e abre as portas para desdobramentos de investigação em patologias que afligem o trato gastrointestinal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
Constipação Intestinal	13
Constipação Primária	15
Constipação Secundária	16
Sistema Nervoso Entérico	18
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
Objetivo Geral	28
Objetivos Específicos	28
4 METODOLOGIA	29
Pacientes	29
Imunohistoquímica	30
Aquisição de Imagens dos Gânglios	31
Análise Estatística	31
5 RESULTADOS	32
Avaliação do Sistema Nervoso Entérico	32
Caracterização de neuropeptídeos do sistema nervoso entérico	34
Calretinina	34
Neuropeptídeo Y	35
Colina-acetiltransferase	36
Substância P	37
Óxido Nítrico Sintetase	38
Peptídeo Intestinal Vasoativo	39
6 DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Constipação Intestinal

Constipação intestinal crônica é um problema muito comum, com definições variáveis entre profissionais da saúde e pacientes. Para a maioria dos profissionais, constipação corresponde à frequência de evacuação inferior a três vezes por semana. Para os pacientes, constipação intestinal pode significar “sensação de evacuação incompleta, dificuldade para expelir as fezes (por duras ou secas), distensão abdominal ou mesmo gosto amargo na boca”. Alguns deles ainda acreditam em antigos conceitos que consideram a irregularidade intestinal perigosa para a saúde – um verdadeiro “suicídio por intoxicação” (Wald, 2006).

No século 19, cientistas formularam a teoria da “auto-intoxicação intestinal” que atribuía o “envenenamento” à retenção dos próprios resíduos. Entretanto, atualmente, há uma definição consensual que diz existir constipação intestinal quando ocorrem dois ou mais dos seguintes eventos, por no mínimo 12 semanas nos últimos 12 meses: menos de três evacuações por semana, dificuldade de evacuação, fezes ressecadas ou muito duras, sensação de evacuação incompleta, sensação de obstrução anorretal e/ou utilização de manobras manuais durante pelo menos 25% das evacuações (Bassotti *et al.*, 2004).

Adicionalmente, subtipos de constipação, devidos a diferentes mecanismos, são reconhecidos: inércia colônica (motilidade lenta), dificuldade evacuatória (alteração funcional de assoalho pélvico, reto ou ânus) e constipação funcional quando há trânsito normal. Em estudo realizado em 1000 pacientes com constipação crônica, o trânsito colônico normal foi a forma mais prevalente (59%), seguida por dificuldade evacuatória (25%), trânsito lento (13%) e combinação de distúrbio evacuatório com trânsito lento (3%) (Nyam *et al.*, 1997).

Dados recentes indicam que a prevalência estimada de constipação intestinal em adultos na América do Norte varia de 1,9% a 27,2%, com média de 14,8% (McCrea *et al.*, 2009; Andrews e Storr, 2011; Leung *et al.*, 2011; Tack *et al.*, 2011). O problema ocorre mais em mulheres, na proporção de 2,2:1, e em pessoas de mais de 65 anos. A constipação também é mais prevalente em indivíduos não caucasianos e ocorre mais em crianças do que em adultos (Higgins e Johanson, 2004). Em adultos, a constipação associa-se a outras co-morbidades (doenças neurológicas, psiquiátricas, proctológicas, endócrinas e metabólicas) e ao uso de muitos

medicamentos com propriedades anticolinérgicas (opióides, antidepressivos, diuréticos, anti-histamínicos, antiparkinsonianos, benzodiazepínicos, corticosteróides, fenotiazinas, propranolol, sais de ferro e laxativos) que em uso crônico que produzem o cólon catártico, isto é, aquele que funciona só à base de laxativos (Brandt *et al.*, 2005).

A prevalência da constipação intestinal é maior em mulheres do que nos homens. Entre os fatores que contribuem para maiores taxas de constipação no sexo feminino estão a maior propensão para lesão do assoalho pélvico e a maior propensão a relatar sintomas e participar de estudos de investigação (McCrea *et al.*, 2009). Alterações hormonais, diferenças comportamentais e histórias de abuso sexual, físico ou emocional, mais comuns no sexo feminino, também estão envolvidos em distúrbios funcionais do trato gastrointestinal (Collete *et al.*, 2010).

A idade avançada também é um fator de risco para a constipação intestinal já que as mudanças relacionadas com a idade afetam o trato gastrointestinal (Toner e Claros, 2012). As alterações gastrintestinais incluem alteração estrutural e funcional do intestino grosso, redução da sensibilidade perianal e/ou retal e lesões do nervo podendo. Somam-se a estas alterações a diminuição da mobilidade, depressão, condições médicas associadas ou utilização de fármacos, tornando os idosos um grupo susceptível (Kurniawan e Simadibrata, 2011). Neste grupo, a constipação intestinal traz maior declínio funcional e redução na qualidade de vida, havendo necessidade de maiores cuidados diários e de maior quantidade de medicamentos utilizados (Pimenta *et al.*, 2013).

A constipação intestinal tem um impacto negativo significativo sobre a qualidade de vida, independente de cultura ou nacionalidade (Leung e Rao, 2011). O prejuízo ocorre em componentes mentais e físicos, sendo este comprometimento da qualidade de vida comparável aos índices observados em condições que podem ser consideradas mais graves como osteoartrite, artrite reumatoide, alergias crônicas e diabetes (Belsey *et al.*, 2010).

A fisiopatologia da constipação é multifatorial e, embora confusa, pode ser classificada em forma primária ou secundária, de acordo com sua etiologia. As formas primárias de constipação apresentam trânsito normal ou lento e envolvem fatores intrínsecos, enquanto a forma secundária é relacionada a doenças orgânicas e sistêmicas, distúrbios neurológicos ou uso de medicamentos (Andrews e Storr, 2011).

Constipação Primária

A constipação de trânsito normal (constipação funcional) é a forma mais comum. Os critérios de Roma III para a constipação funcional são apresentados na Tabela 1. Os pacientes relatam sintomas consistentes com a constipação, entretanto, em testes, o trânsito e a frequência fecal estão dentro do intervalo normal. Os doentes podem apresentar dor, inchaço, desconforto abdominal, fezes endurecidas e aumento da angústia psicossocial e, comumente, são tratados com adição de fibra dietética ou laxantes osmóticos ou enterocinéticos (Andrews e Storr, 2011). A prática de exercícios físicos moderados, aumento na ingestão de líquidos e definição de um padrão intestinal regular também apresentam bons resultados (Toner e Claros, 2012).

TABELA 1: Critérios diagnósticos de Roma III para constipação funcional

Os critérios diagnósticos* devem incluir:

1. Dois ou mais dos seguintes sintomas:
 - a) Esforço evacuatório durante pelo menos 25% das defecações;
 - b) Fezes grumosas, irregulares ou duras em pelo menos 25% das defecações;
 - c) Sensação de evacuação incompleta em pelo menos 25% das defecações;
 - d) Sensação de obstrução/ bloqueio anorretal das fezes em pelo menos 25% das defecações;
 - e) Manobras manuais para facilitar pelo menos 25% das defecações (por exemplo, evacuação com ajuda digital, apoio de assoalho pélvico);
 - f) Menos de três evacuações por semana.
2. Fezes moles estão raramente presentes sem o uso de laxantes;
3. Critérios insuficientes para a Síndrome do Intestino Irritável.

*Critérios preenchidos nos últimos 3 meses com início dos sintomas pelo menos 6 meses antes do diagnóstico.

Adaptado de Andrews e Storr (Andrews e Storr, 2011).

A constipação de trânsito lento, também conhecida como inércia colônica, provoca evacuações infrequentes, podendo chegar a menos de uma evacuação por semana. Os pacientes não sentem vontade de defecar e queixam-se de inchaço e desconforto abdominal. Neste caso, o tempo de trânsito intestinal é maior e a frequência e amplitude das ondas peristálticas encontram-se significativamente prejudicadas, inclusive nos períodos onde normalmente são mais frequentes como pela manhã ou após refeições. Sugere-se que a constipação de trânsito lento seja uma

doença neuromuscular do intestino grosso já que há um decréscimo na quantidade de células intersticiais de Cajal, alterações no número de neurônios do plexo mioentérico e anormalidade de neurotransmissores entéricos, tais como substância P (SP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico sintetase (NOS), sendo que este conjunto de fatores produzem uma atividade motora reduzida e irregular. O tratamento geralmente envolve laxantes em regime agressivo (Andrews e Storr, 2011).

Outra forma primária de constipação surge de defeitos intrínsecos na função do intestino grosso ou mau funcionamento do processo de defecação devido a alterações anorretais anatômicas ou funcionais. Estas falhas incluem alteração na contração retal, falta de coordenação dos músculos envolvidos, flacidez dos músculos do assoalho pélvico, sensibilidade retal prejudicada, contração paradoxal do esfíncter anal externo e relaxamento anal inadequado, entre outros. Os pacientes apresentam esforço significativo durante a evacuação e, em alguns casos, a dificuldade também ocorre na eliminação de fezes líquidas. Anomalias estruturais, tais como prolapso da parede retal, retocele, intussuscepção intestinal e danos perineais também são consideradas (Andrews e Storr, 2011; de Hert *et al.*, 2011a; Tack *et al.*, 2011).

Constipação Secundária

A constipação secundária geralmente está relacionada ao uso de medicamentos. Várias classes de antidepressivos podem causar constipação intestinal por reduzir a contratilidade do músculo liso. Suplementação oral de ferro, fármacos contendo alumínio, analgésicos, medicamentos anti-parkinsonianos, antiepilépticos, antiespasmódicos e alcaloides de vinca também podem estar associados à constipação (Andrews e Storr, 2011; de Hert *et al.*, 2011b).

O diabetes mellitus pode causar uma série de problemas gastrointestinais e a constipação intestinal é um deles. A etiologia exata da constipação em pacientes portadores de diabetes (tipo 1 ou 2) é mal definida, sendo provavelmente multifatorial; no entanto, um mecanismo importante parece ser a perda funcional das células intersticiais de Cajal. Outro fator importante é a miopatia do músculo liso, causada pelo diabetes, tendo efeito prejudicial na motilidade gastrointestinal (Arebi *et al.*, 2011; Ragg *et al.*, 2011). Tanto a hiperglicemia quanto a hipoglicemia prejudicam o funcionamento neuronal entérico, causando constipação, portanto o controle glicêmico deve ser

prioridade de tratamento nestes pacientes (Andrews e Storr, 2011; Mohaghegh Shalmani *et al.*, 2011).

Lesões medulares, esclerose múltipla e doença de Parkinson estão frequentemente associadas à constipação. A origem da constipação nesses pacientes está relacionada à disfunção de nervos autonômicos pélvicos e fatores sistêmicos generalizados, entre eles, dieta alterada, mobilidade prejudicada, medicamentos e distúrbios psicológicos (Licup e Baumrucker, 2011; Pang e Croaker, 2011).

As complicações decorrentes da constipação intestinal crônica incluem: incontinência fecal, hemorroidas, fissuras anais, prolapso de órgãos pélvicos, impactação fecal, fecaloma, perfuração intestinal, peritonite estercoreal (Coyne *et al.*, 2011; Meek *et al.*, 2011; Toner e Claros, 2012).

O diagnóstico é feito através dos critérios de Roma III, história e avaliação física. A colonoscopia pode ser realizada com o intuito de excluir obstrução mecânica. A manometria anorretal identifica pacientes constipados devido a alterações de assoalho pélvico (Portier *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011).

O tratamento consiste, inicialmente, em modificações no estilo de vida incluindo dieta rica em fibras, ingestão de água e exercício físico. Não há dados que sustentem que o aumento na ingestão de água e a realização de atividade física melhorem a constipação intestinal crônica, entretanto, são benéficos para o tratamento (Portalatin e Winstead, 2012). Há uma correlação entre o aumento na ingestão de fibras e o tempo de trânsito colônico, de forma que a fibra dietética apresenta eficácia no alívio da constipação. A ingestão recomendada é de 20 a 35 gramas diariamente (Portalatin e Winstead, 2012). Os pacientes devem ser incentivados a aumentar a ingestão de água quando há o aumento na ingestão de fibras (Pennant *et al.*, 2011; Rowan-Legg, 2011). A adição de laxantes osmóticos ou estimulantes é uma opção no tratamento da constipação. Os laxantes atuam aumentando o teor de água nas fezes. Existem várias classes medicamentosas e a escolha é feita com base nas características de trânsito colônico de cada indivíduo. Poucas evidências disponíveis apoiam seu uso crônico (Bongers e Benninga, 2011; Hull *et al.*, 2011; Tashiro *et al.*, 2011). Probióticos e outros agentes também são utilizados, respeitando o caso clínico de cada paciente. Além disso, o estabelecimento de um hábito intestinal diário pode ser útil, reservando mais tempo para a evacuação, utilizando

posicionamentos do corpo ao evacuar e não ignorando a vontade de defecar (Kim *et al.*, 2011; Portalatin e Winstead, 2012).

Em casos graves procedimentos cirúrgicos são adotados, porém devem ser recomendados com cautela, pois possuem resultados funcionais pobres a longo prazo (Liu, 2011).

Aceita-se atualmente que é impossível que a constipação crônica se instale sem que ocorra a alteração de componentes do sistema nervoso entérico (SNE), como os neurônios, células de Cajal e células enterogliais (Lacerda-Filho *et al.*, 2008). Em patologias que afligem o trato gastrointestinal, a destruição de componentes do SNE é comumente observada. Embora o mecanismo de lesão neuronal continue obscuro, a frequente observação de ganglionite e periganglionite aponta para a participação de células do sistema imune nesse processo patológico. Infiltrados inflamatórios são encontrados na muscular da mucosa, submucosa e camadas musculares (Adad *et al.*, 2001; da Silveira *et al.*, 2007a; da Silveira *et al.*, 2007c). Em trabalhos anteriores de nosso grupo, observamos uma forte associação entre processo de destruição do SNE e instalação de patologias do trato gastrointestinal (da Silveira *et al.*, 2005a).

Sistema Nervoso Entérico

O trato gastrointestinal possui dois componentes nervosos responsáveis por sua inervação. Um componente extrínseco, de neurônios originados do sistema nervoso central (SNC) e um componente intrínseco representado pelo SNE. A inervação extrínseca do trato gastrointestinal é constituída de neurônios simpáticos e parassimpáticos.

No sistema nervoso simpático, a noradrenalina é o neurotransmissor mais comum em neurônios pós-ganglionares que inervam o intestino. Os corpos destes neurônios se encontram em gânglios nervosos pré-vertebrais e paravertebrais, enquanto seus axônios se conectam ao trato gastrointestinal através dos nervos mesentéricos. Quando estimulados, estes neurônios agem inibindo a peristalse, regulando o fluxo sanguíneo dos vasos intestinais e controlando a secreção de eletrólitos (Costa *et al.*, 2000; Lundgren, 2000; McMillin *et al.*, 1999; Powley, 2000a).

O sistema nervoso parassimpático atua no trato gastrointestinal através dos nervos vagos e dos nervos pélvicos. O nervo vago possui corpos neuronais localizados no SNC enquanto os seus axônios inervam grande parte do intestino. Os nervos pélvicos, por sua vez, possuem corpos neuronais na medula espinal ao nível do sacro e os axônios no trato gastrointestinal. Os

estímulos vagais utilizam acetilcolina como neurotransmissor, sendo esta responsável por estimular a peristalse e aumentar o aporte sanguíneo intestinal (Powley, 2000b).

Uma considerável quantidade de tecido nervoso, que consiste no SNE, está inserida na parede do trato gastrointestinal. O SNE apresenta neurônios e células de suporte (células da glia) que são agrupados em pequenos grupos denominados de gânglios entéricos, sendo estes interconectados por fibras nervosas. Os gânglios entéricos, apesar de pequenos, são tão numerosos que o sistema como um todo possui milhões de neurônios. Essas células se conectam através de fibras nervosas com outros neurônios, que por sua vez, inervam as camadas musculares do trato gastrointestinal, do epitélio secretor, dos vasos sanguíneos, do sistema biliar e do pâncreas.

As primeiras descrições dos plexos entéricos e de seus gânglios nervosos foram realizadas por Meissner (Meissner, 1857), Billroth (Billroth, 1858) e Auerbach (Auerbach, 1862a; Auerbach, 1862b; Auerbach, 1864). Remark (Remak, 1840; Remak, 1852) tinha previamente notado a presença de gânglios microscópicos nas paredes da faringe e estômago, mas suas descrições não sugerem que este autor reconheceu os mesmos como constituintes de plexos nervosos.

Após a sua descoberta, os plexos e gânglios entéricos atraíram considerável atenção da comunidade científica e numerosos trabalhos sobre sua organização foram realizados. Estes estudos forneceram informações detalhadas sobre o tamanho, estruturas e conexões entre os gânglios entéricos. Merecem destaque as brilhantes descrições de Meissner e Auerbach que, utilizando técnicas hoje consideradas rudimentares, elucidaram a organização geral dos plexos entéricos; trabalhos que mais de cem anos após sua realização, continuam servindo como base para estudos sobre o trato gastrointestinal.

A maior parte dos neurônios entéricos é encontrada em dois plexos; o plexo mioentérico (plexo de Auerbach) e o plexo submucoso (plexo de Meissner). O plexo mioentérico constitui uma rede de pequenos gânglios neuronais interconectados por feixes nervosos situados entre as camadas musculares (interna e externa) do trato gastrointestinal. Este plexo forma uma rede contínua em torno da circunferência e por toda extensão do sistema digestivo (Figura 1). Os gânglios encontrados neste plexo variam no tamanho e forma. Essas diferenças estão relacionadas à porção do intestino analisada e à espécie do animal em questão (Gabella, 1981; Irwin, 1931). Corpos neuronais isolados são ocasionalmente encontrados fora do plexo mioentérico, sendo

geralmente identificados na camada muscular adjacente ao plexo. Funcionalmente, a maior parte dos neurônios encontrados neste plexo são neurônios eferentes (Gabella e Trigg, 1984). A inervação das camadas musculares se dá através de projeções de feixes nervosos provenientes do plexo mioentérico. Estes feixes estão dispostos paralelamente às fibras musculares (Richardson, 1958).

O plexo submucoso, descrito por Meissner (Meissner, 1857) e Billroth (Billroth, 1858) é formado de gânglios interconectados por feixes nervosos, assim como o plexo mioentérico. Embora a presença de gânglios nervosos neste plexo seja mais evidente no intestino delgado e no cólon, os mesmos podem ser observados no esôfago e estômago. Os feixes nervosos que interconectam os gânglios do plexo submucoso são delgados em relação aos encontrados no plexo mioentérico (Goniaew, 1875; Henle, 1871; Timmermans *et al.*, 2001). Da mesma forma que o plexo mioentérico, o plexo submucoso forma uma rede contínua em torno da circunferência e por todo trato gastrointestinal (Figura 1). Em grandes mamíferos, como suínos e o ser humano, o plexo submucoso é formado de distintos, porém interconectados, plexos que se situam em diferentes níveis. Duas ou três camadas de gânglios podem ser observadas (Gunn, 1968; Hoyle e Burnstock, 1989; Schabadasch, 1930). A organização entre os gânglios no plexo submucoso e os tipos funcionais de neurônios, no que diz respeito a forma e natureza química encontrados nestes gânglios, diferem entre as espécies (Scheuermann *et al.*, 1987; Timmermans *et al.*, 1990). Entre os neurônios encontrados no plexo submucoso externo, alguns provem inervação à camada muscular interna, e algumas vezes, para a muscular externa (Furness *et al.*, 1990; Porter *et al.*, 1999; Sanders e Smith, 1986). O plexo submucoso interno possui poucos neurônios que inervam as camadas musculares, mas possui muitos que inervam a mucosa (Porter *et al.*, 1999).

Embora os plexos nervosos sejam descritos como entidades separadas, eles são de fato unidos por numerosos feixes nervosos. Auerbach observou conexões entre a inervação extrínseca (nervo vago e mesentérico) e o plexo mioentérico e também observou conexões entre os plexos mioentérico e submucoso (Auerbach, 1864). Drasch (1881) confirmou a conexão entre os plexos mioentérico e submucoso, reconhecendo que as fibras do plexo submucoso realizavam a inervação a mucosa.

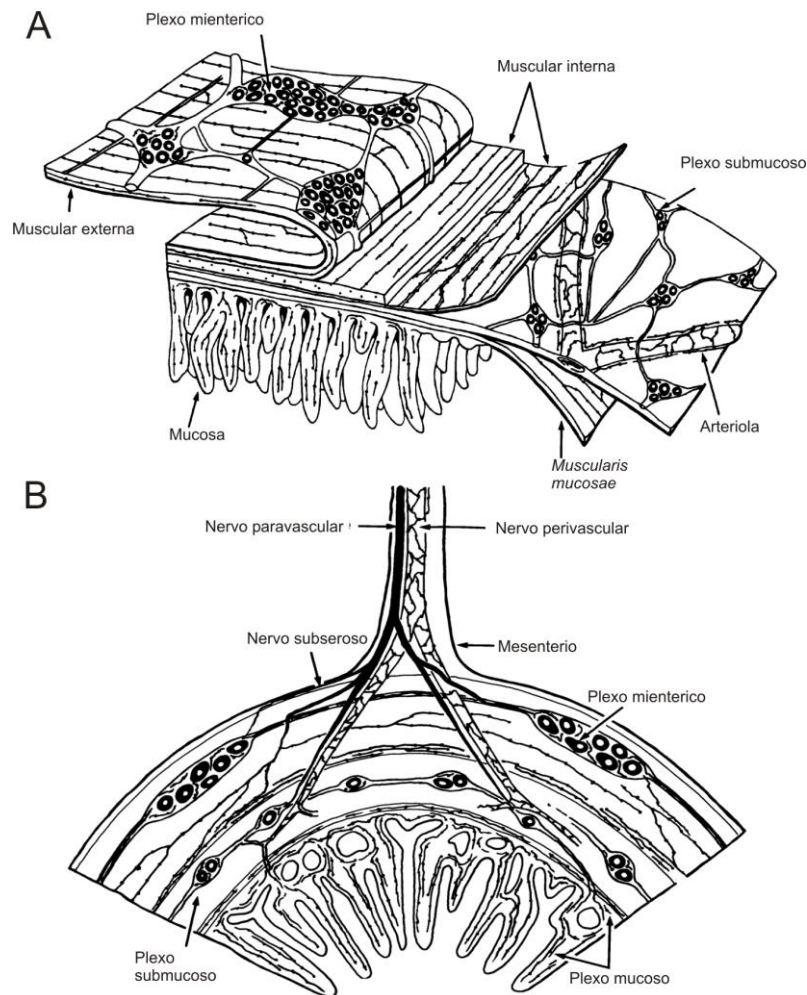


FIGURA 1: Esquema do SNE observado em camadas (A) e em seção transversal (B). Existem dois plexos nervosos formados por gânglios; o plexo mioentérico e o plexo submucoso, além das fibras nervosas que inervam as camadas musculares, a mucosa e as arteríolas intramurais. A inervação extrínseca tem acesso ao SNE através de nervos paravasculares e perivasculares (B). Adaptado de Furness e Costa (1980), com permissão dos autores.

Os neuropeptídeos encontrados no SNE possuem atividade considerável sobre o sistema imune. Os neurônios motores excitatórios utilizam como neuropeptídeos a SP e a acetilcolina que atuam promovendo contração da musculatura lisa circular e longitudinal do intestino. A SP é considerada uma proteína que, além de neuromediadora, possui ação pró-inflamatória sobre as células do sistema imunológico, estimulando a proliferação linfocitária, o tráfego de linfócitos através dos linfonodos e a produção de interleucina 2 (IL-2). Além disto, a SP age como um dos ativadores de células *Natural Killer* (NK) e possui ação quimiotática para mastócitos, macrófagos e neutrófilos. No cólon, os neurônios que expressam o VIP são responsáveis pelo relaxamento da

musculatura lisa observado durante a peristalse. O VIP inibe a resposta de células NK e de linfócitos T, bem como a produção de IL-2 e interleucina 4 (IL-4) por estas células. Por outro lado, VIP estimula a quimiotaxia de macrófagos e a produção de interleucina 5 (IL-5) por linfócitos (McKay e Fairweather, 1997).

O sistema imune, por sua vez, também influencia a atividade do SNE através da secreção de vários tipos de substâncias, como por exemplo, as neurotrofinas. As neurotrofinas são grupos heterogêneos de polipeptídeos que, através de seus receptores específicos, exercem papel essencial no desenvolvimento, diferenciação, sobrevivência, manutenção e regeneração do sistema nervoso (Barbacid, 1995; Griesbeck *et al.*, 1999; Lo, 1992; Roux e Barker, 2002). Em processos degenerativos, o padrão de expressão de neurotrofinas, geralmente verificado pela presença de seus RNA mensageiros (mRNAs), é totalmente distinto do encontrado no tecido nervoso intacto. Desta forma, na degeneração axonal após secção de nervos, a expressão dos fatores torna-se consideravelmente aumentada e esse aumento é pouco a pouco revertido durante a regeneração, retornando aos padrões presentes previamente à lesão (Funakoshi *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1992).

Por suas ações efetivas nas atividades neuronais, as neurotrofinas são indicadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas do SNC e do sistema nervoso periférico (SNP). Estratégias de administração desses fatores têm sido testadas experimentalmente e a compreensão detalhada de suas ações no desenvolvimento, manutenção e regeneração de neurônios é essencial para validar seu uso como agente terapêutico (Terenghi, 1999; Whitworth *et al.*, 1995).

O fator de crescimento neuronal (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser descrita (Levi-Montalcini e Angeletti, 1961), uma vez que seu papel no desenvolvimento, diferenciação e manutenção de neurônios sensitivos e simpáticos foi estabelecido (Halegoua *et al.*, 1991; Levi-Montalcini, 1987; Stephani *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1991). Uma série de células produz o NGF, entre as quais podemos destacar os neurônios, as células da glia, células musculares, fibroblastos e até mesmo algumas células do sistema imunológico, tais como os linfócitos B e linfócitos T (Edling *et al.*, 2004). Além do NGF, uma série de neurotrofinas passou a ser caracterizada devido a seus efeitos sobre o tecido nervoso. Dentre elas destacamos o Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF), os Fatores de Crescimento Fibroblástico ácido (a-FGF) e básico (b-FGF), e o Fator Neurotrófico Derivado de Células Gliais (GDNF), entre outros (Otten *et al.*, 1994; Scully e Otten, 1995a; Scully e Otten, 1995b).

O GDNF é um polipeptídeo originalmente conhecido por sua ação estimulante em neurônios do SNC, como neurônios dopaminérgicos mesencefálicos e neurônios motores (Lin *et al.*, 1993). O GDNF é também responsável pelo desenvolvimento e sobrevivência de neurônios entéricos (Saarma e Sariola, 1999). Foram demonstrados os efeitos tróficos substanciais do GDNF sobre populações de neurônios autonômicos, sobretudo sobre neurônios do SNE, sendo esses efeitos distintos daqueles produzidos por outras neurotrofinas e fatores neurotróficos (Ebendal *et al.*, 1995; Rauch *et al.*, 2006). Como ocorre com o NGF, neurônios, células da glia e células musculares são os principais produtores de GDNF (Peters *et al.*, 1998).

Outro componente que participa da fisiologia do trato gastrointestinal juntamente com os gânglios nervosos e o sistema imune são as células da glia entérica. As células da glia entérica, ou células enterogliais, são muito semelhantes aos astrócitos encontrados no SNC. Elas expressam a proteína estrutural S-100 (Ferri *et al.*, 1982) e apresentam também, em certas situações, a proteína ácida fibrilar da glia (GFAP) e MHC de classe II (Jessen e Mirsky, 1983). Células enterogliais possuem receptores para citocinas e também são capazes de produzir algumas delas, como por exemplo, a interleucina 6 (IL-6). Além disto, estas células possuem receptores para neurotransmissores e estudos já demonstraram que a produção de citocinas pelas células enterogliais pode ser modulada por neurotransmissores. Estes dados comprovam que as células enterogliais são capazes de estabelecer uma intercomunicação entre o sistema nervoso e o sistema imune intestinal, possuindo desta forma um importante papel na fisiologia intestinal (Ruhl *et al.*, 2004).

Bush *et al.* (1998) depletaram camundongos adultos de células GFAP-imunorreativas (IR) para avaliar a importância das mesmas na fisiologia intestinal. Foi observado que em apenas duas semanas todos os animais morreram devido a um quadro de jejunoileíte fulminante. Este quadro foi independente de processos infecciosos, sendo o mesmo caracterizado por degeneração de neurônios mioentéricos e hemorragia intestinal. Estes dados confirmam o papel da glia entérica como mantenedora da integridade intestinal.

Na doença inflamatória intestinal, a glia entérica aparentemente realiza um papel central no controle da inflamação (Geboes *et al.*, 1992). Von Boyen *et al.* (2004), demonstraram que, sob influência de citocinas pró-inflamatórias, células da glia entérica GFAP não IR podem se tornar GFAP-IR. O aumento da expressão de GFAP por células enterogliais tem sido também observado em tecidos coletados de pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Crohn.

Recentes estudos sobre doença de Crohn têm confirmado que a lesão de células do SNE é caracterizada por severa diminuição do número de células da glia, mesmo em tecidos sem evidência de processo inflamatório. Uma significativa redução de células da glia tanto do plexo mioentérico como do plexo submucoso é também uma das características histopatológicas da enterocolite necrosante (Cornet *et al.*, 2001).

O trato gastrointestinal depende da integridade dos componentes do SNE para realizar seus movimentos de forma coordenada. Na doença de Chagas, como resultado da destruição de componentes do SNE, verifica-se falta de coordenação motora, acalasia do esfíncter, retenção de alimentos no esôfago e de fezes no reto e cólon sigmóide, hipertrofia muscular e finalmente, dilatação, levando ao aparecimento do megaesôfago e/ou megacólon, que caracterizam a forma clínica digestiva da doença de Chagas (de Rezende, 1979).

Os neurônios entéricos são classificados de acordo com várias propriedades, como forma, características fisiológicas, especificidade imunohistoquímica, estruturas por eles inervadas, neurotransmissores utilizados e conexões estabelecidas. Com a evolução das técnicas imunohistoquímicas, a complexidade do SNE começou a ser revelada. O desenvolvimento da técnica de fluorescência por Falck (Falck, 1962) permitiu que autores como Norberg (Norberg, 1964) identificassem com exatidão os axônios terminais de neurônios simpáticos pós-ganglionares. Os neurônios colinérgicos entéricos foram identificados pela técnica de imunohistoquímica somente no início da década de 80 (Furness *et al.*, 1983). Desde as primeiras descrições de Hökfelt e sua equipe (Hökfelt *et al.*, 1975) sobre a presença de somatostatina (SOM) em neurônios entéricos, a localização de outros neuropeptídeos tornou-se alvo de inúmeros estudos (Costa e Furness, 1982; Furness *et al.*, 1980; Schultzberg *et al.*, 1980; Sundler *et al.*, 1980). A partir destes estudos foi revelada a presença de colecistoquinina (CCK), peptídeo relacionado a gastrina (GRP), neuropeptídeo Y (NPY), SP, VIP e serotonina (5-HT) em neurônios entéricos.

O desenvolvimento destes estudos levou à descoberta da coexistência de neuropeptídeos nos mesmos grupos neuronais tanto no SNC quanto no SNE (Hökfelt *et al.*, 1984; Hökfelt *et al.*, 1980), abrindo uma nova era de estudos da codificação neuroquímica de neurônios. Em 1980 (Schultzberg *et al.*, 1980) foi descoberta a coexistência de SOM e CCK nos mesmos grupos neuronais, conduzindo a investigações que identificassem a coexistência de outros neuropeptídeos. A variedade de neuropeptídeos nos neurônios entéricos simplesmente reflete a

complexidade funcional inerente ao funcionamento do trato gastrointestinal. Julgamos que a revelação do circuito neural e identificação neuroquímica dos neurônios entéricos é um ponto essencial para a compreensão do SNE.

Os neurônios entéricos podem ser classificados funcionalmente como neurônios motores, interneurônios e neurônios intrínsecos primários aferentes (IPANs). Esta classificação foi estabelecida através de estudos que correlacionaram propriedades neuroquímicas e funcionais de seus neurotransmissores e de seus receptores. O modelo experimental mais utilizado para essa caracterização é a cobaia, na qual uma extensa caracterização foi realizada no intestino delgado, cólon (Lomax e Furness, 2000) e estômago (Michel *et al.*, 2000). Entretanto, essa caracterização ainda não foi realizada de forma conclusiva no SNE do ser humano.

Os neurônios motores podem ser divididos em dois grupos, os excitatórios e os inibitórios. Ambos inervam as camadas musculares e a muscular da mucosa em todo trato gastrointestinal. Os principais neuromoduladores encontrados nos neurônios excitatórios são a acetilcolina e as taquicininas (TK). Os neurônios inibitórios possuem vários neuromoduladores, como óxido nítrico (NO), adenosina trifosfato (ATP) e VIP. (Furness *et al.*, 1995).

Os interneurônios são identificados em todas as camadas do trato gastrointestinal, e possivelmente variam entre as regiões mais que os outros tipos de neurônios. Por exemplo, o íleo e cólon contêm os mesmos, ou muito similares, neurônios motores e neurônios aferentes, mas seus interneurônios são completamente diferentes (Portbury *et al.*, 1995).

Os neurônios sensoriais do intestino são denominados IPANs. Esse nome surgiu devido ao fato destes neurônios exercerem, em algumas situações, papéis funcionais de interneurônios (p. ex. quando recebem sinapses excitatórias provenientes de outros neurônios) e mesmo de neurônios eferentes (p. ex. quando liberam neurotransmissores no epitélio da mucosa causando vasodilatação) (Holzer *et al.*, 1991; Lewis, 1927).

Os IPANs traduzem e codificam informações sobre o ambiente químico e estado físico do tecido que eles inervam e convertem essa informação para um circuito neuronal integrado, através do qual o estado funcional do órgão possa ser modificado. Nos plexos mioentérico e submucoso, esses neurônios se conectam a outros IPANs, a interneurônios e a neurônios motores (Dogiel, 1899; Gershon e Kirchgessner, 1991).

Recentes evidências indicam que os IPANs são afetados por processos inflamatórios tanto no intestino delgado como no cólon. A exposição desta classe de neurônios a ambientes

acometidos por processos inflamatórios alteraria as propriedades dos mesmos, promovendo anormalidades quanto a sinalização sensorial e controle dos reflexos entéricos (Sharkey e Mawe, 2002). A hipótese que distúrbios nos IPANs estariam envolvidos no desenvolvimento de patologias intestinais foi confirmada através de experimentos utilizando animais que demonstraram alterações funcionais entéricas após processos inflamatórios no trato gastrointestinal ou exposição prolongada a prostaglandinas (Manning *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 1998).

Em modelos experimentais, a codificação neuroquímica dos neurônios entéricos tem sido alvo de inúmeros trabalhos científicos. A utilização de técnicas imunohistoquímicas tem demonstrado a existência e a coexistência de moléculas intra-neuronais (neurofilamentos, proteínas carreadoras de cálcio, enzimas e outras). Através da aplicação deste método, estão caracterizados 14 tipos diferentes de neurônios entéricos no intestino de cobaia (Costa *et al.*, 1996; Furness, 2000b). Além disso, já foram descritos alguns princípios da organização morfológica dos neurônios entéricos (Timmermans *et al.*, 1997) e revelado que a codificação neuroquímica destes neurônios é específica em cada espécie (Gershon *et al.*, 1994).

2 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com patologias intestinais há alguns anos e as observações sobre a relação entre o quadro clínico do paciente e as condições do SNE têm revelado dados que vão de encontro a alguns conceitos já estabelecidos. Estudos preliminares destes pacientes indicam que a constipação é um evento independente do desenvolvimento de outras patologias intestinais, estando associada a alterações de componentes do SNE.

Para elucidar quais componentes estariam envolvidos na instalação da constipação intestinal, amostras foram obtidas de vários pacientes organizados em dois grupos: indivíduos não constipados e pacientes portadores de constipação intestinal crônica. Acreditamos que estudar comparativamente os componentes do SNE e sistema imune destes grupos de pacientes possa elucidar muitas dúvidas referentes ao funcionamento do trato gastrointestinal de pacientes que apresentem alguma patologia neste sistema. Ressalta-se que a constipação intestinal é problema relevante em saúde pública, precisando ser observado com atenção por gastroenterologistas e gestores de saúde. Embora somente um terço dos indivíduos afetados procure atendimento médico, os custos de tratamento da constipação chegam a milhões de dólares por ano despendidos somente com vendas de laxativos sem prescrição médica (Coyne *et al.*, 2008; Crane e Talley, 2007; Talley, 2004). Os resultados deste trabalho indicam novos caminhos relevantes para a terapêutica e mesmo para a prevenção da constipação intestinal, evitando a instalação de outras patologias decorrentes da constipação e representando uma enorme economia para o sistema público de saúde.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar a expressão dos neuropeptídeos no SNE de pacientes portadores de constipação intestinal e de indivíduos não constipados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Avaliar a expressão das subclasses de neurônios presentes no SNE em amostras de cólon de pacientes portadores de constipação intestinal e indivíduos não constipados.

2 - Estabelecer associações entre as subclasses de neurônios que são preferencialmente destruídas na constipação intestinal e neurônios preservados em amostras de cólon de pacientes portadores de constipação intestinal e indivíduos não constipados.

3 – Associar quadro clínico de constipação intestinal e alterações neuroquímicas sofridas pelo SNE em amostras de cólon de pacientes portadores de constipação intestinal e indivíduos não constipados.

4 METODOLOGIA

Pacientes

Segmentos de cólon oriundos de vinte pacientes foram coletados para o desenvolvimento deste estudo e divididos em dois grupos: 10 amostras de indivíduos não constipados e 10 amostras de pacientes portadores de constipação intestinal crônica. As amostras foram coletadas por cirurgia no Hospital Escola da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, pelo Dr. Enio Oliveira. Foi obtido consentimento prévio de todos os indivíduos para a inclusão dos mesmos no trabalho de pesquisa. Os indivíduos não constipados foram submetidos a procedimento cirúrgico devido a neoplasias intestinais. Pacientes constipados foram submetidos a ressecção dos tecidos devido ao déficit de motilidade intestinal.

As amostras de tecidos foram transportadas em soro fisiológico (pH 7,3) sobre o gelo para o laboratório. Após sua chegada (1-6 horas após a ressecção), as amostras foram lavadas em solução Krebs à temperatura ambiente e transferidas para o meio de Dulbecco Eagle modificado (DME/F12-Ham, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, E.U.A.) contendo 50 µg/ml de gentamicina (Sigma), 2,5 µg/ml de anfotericina B (Sigma), 10% de soro fetal bovino (Sigma), 4 µg/ml de nicardipina e 2,1 µg/ml de NaHCO₃, selados em um compartimento com 95% de O₂ e 5% de CO₂ a 37 °C por 1-2 horas. Posteriormente, os tecidos foram incubados por mais 2-5 horas, no mesmo meio com 100 µM de colchicina adicionada para aumentar a imunoreatividade do corpo neuronal. Para a fixação, as amostras foram clipadas na base de uma placa de Petri forrada de Sylgard e transferidas para solução de formalina 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) à temperatura ambiente por 2-3 horas. Após várias lavagens em 0,05 M Tris salina tamponada (TBS, pH 7,4), a camada muscular e plexos nervosos das amostras foram preparadas para a técnica de *wholemout*, segundo Furness (Furness *et al.*, 2004). A presença da doença foi confirmada através de exames clínicos e laboratoriais (da Silveira *et al.*, 2005b). A qualidade destas amostras foi avaliada através de técnicas histológicas e de imunohistoquímica, o que demonstrou a preservação da imunoreatividade das mesmas.

A utilização de amostras de tecidos humanos para estes experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU nº 110/11).

Imunohistoquímica

As amostras de tecidos foram pré-incubadas por 2 horas em solução de TBS 0,05 M (pH 7,4) com 1% de albumina sérica bovina (BSA), 0,5% Triton X-100, 0,05% thimerosal e 5% de soro de cabra. Para reduzir a autofluorescência induzida por lipofuscina, as *wholemounds* foram incubadas em tampão de acetato de amônio (pH 5,0) contendo 1 mM CuSO₄ por 60 minutos seguido de um curto enxágue em H₂O destilada (Brehmer *et al.*, 2004). Após um enxágue em TBS por 10 minutos, foram incubadas em uma solução contendo BSA, Triton X-100, thimerosal e os anticorpos primários (Tabela 2) por 72 horas a 4°C. Após este período, as *wholemounds* foram lavadas em TBS e em seguida os anticorpos secundários (Tabela 3) foram adicionados às amostras em temperatura de 4°C por um período de 2 horas. Em seguida as amostras foram lavadas por um banho em TBS (5 minutos) e montadas em meio sintético.

TABELA 2: Anticorpos primários utilizados para identificação dos neuropeptídeos

<i>Anticorpo</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Companhia</i>	<i>Código</i>
Anti-HuC/HuD	Marcador neuronal	INVITROGEN	A-21272
Anti-Calretinin	Neurônios aferentes	DAKO	M7245
Anti-Substância P	Neurônios motores excitatórios	INVITROGEN	180091
Anti-cChAT	Neurônios motores excitatórios	Advanced Targeting Systems	AB-N34
Anti-Neuropeptídeo Y	Interneurônios	SIGMA	N9528
Anti-NOS	Neurônios motores inibitórios	SIGMA	N7280
Anti-VIP	Neurônios motores inibitórios	SIGMA	V3508

TABELA 3: Anticorpos secundários contendo o marcador neuronal

Anticorpo	Diluição	Código / Fonte
ALEXA Fluor 488, donkey anti-mouse	1:1000	A-21202; Mobitec, Germany
ALEXA Fluor 488, donkey anti-rabbit	1:1000	A-21206; Mobitec, Germany
ALEXA Fluor 555, donkey anti-goat	1:1000	A-21432; Mobitec, Germany
ALEXA Fluor 647, donkey anti-mouse	1:1000	A-31571; Mobitec, Germany
ALEXA Fluor 647, donkey anti-rabbit	1:1000	A-31573; Mobitec, Germany

Aquisição de imagem dos gânglios

Para a aquisição das imagens, os gânglios do SNE foram selecionados aleatoriamente. Utilizando microscopia confocal laser scanning (Bio-Rad MRC 1000 anexado a uma Nikon diaphot 300, equipado com um laser argon-criptônio, American Laser Corporation, Salt Lake City, UT), séries-Z dos gânglios foram criadas através da aplicação de três comprimentos de onda para a detecção de anticorpos secundários (488, 568, 647 nm de excitação; z-steps 0,6 μm). A lente objetiva de 20x (abertura numérica 0,75) foi utilizada para a localização dos gânglios, enquanto a lente objetiva de 40x foi utilizada para a aquisição de imagens para as séries-Z com o auxílio do programa Confocal Assistant 4.02 software. Imagens dos gânglios foram preparadas usando o Adobe Photoshop CS (8.0.1).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste ANOVA, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos de pacientes. O nível de significância definido foi de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Avaliação do sistema nervoso entérico

Para verificação da integridade do SNE foram realizadas marcações com o anticorpo anti-HuC/D, um marcador pan-neuronal, comumente utilizado para avaliar a quantidade de corpos neuronais presentes nas amostras estudadas. As análises de nossos resultados foram divididas em dois grupos: neurônios do plexo submucoso e neurônios do plexo mioentérico. Os dados provenientes do plexo submucoso demonstraram uma redução significativa de neurônios em pacientes portadores de constipação intestinal em relação a indivíduos não constipados (Figura 2), embora sinais evidentes de processo inflamatório (focos de células inflamatórias e miosite) não foram identificados. As análises quantitativas do número de neurônios do plexo mioentérico não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre pacientes constipados e indivíduos não constipados (Tabela 4).

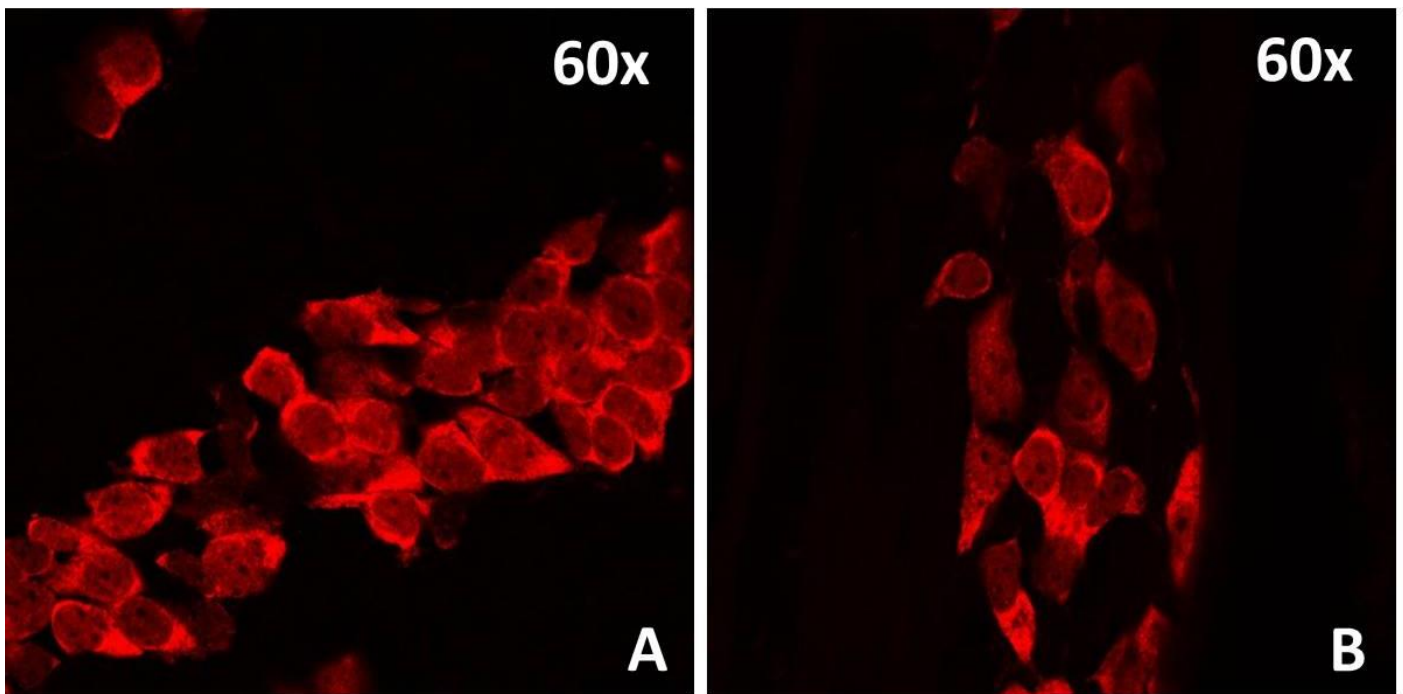


FIGURA 2: Perfil de marcação de neurônios no plexo submucoso de indivíduos não portadores de constipação intestinal (A) e de pacientes constipados (B) utilizando o marcador anti-HuC/D. Observe que pacientes constipados apresentam uma perceptível redução do número de corpos neuronais.

TABELA 4: Média do número de corpos neuronais nos plexos entéricos de indivíduos não constipados e pacientes constipados. *Diferença estatística entre este grupo e grupo controle. $P < 0,05$.

Média do número de corpos neuronais nos plexos nervosos entéricos de pacientes portadores e não portadores de constipação intestinal		
Pacientes / Região	Plexo submucoso	Plexo mientérico
Indivíduos não portadores de constipação intestinal	254 ± 19	325 ± 21
Indivíduos portadores de constipação intestinal	187 ± 16*	298 ± 28

Caracterização de neuropeptídios do SNE

Calretinina

A calretinina é um neuropeptídeo expresso exclusivamente por neurônios aferentes do SNE. A avaliação dos neurônios calretinina-IR, em relação ao número total de neurônios (HuC/D-IR) demonstrou que pacientes constipados apresentam uma menor proporção de neurônios calretinina-IR em comparação a indivíduos não constipados (Figura 3), sendo essa diferença estatisticamente relevante. Além disto, nossos resultados demonstraram que estes neurônios estão localizados preferencialmente no plexo submucoso. No plexo mioentérico, a avaliação de neurônios calretinina-IR não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre pacientes constipados e indivíduos não constipados (Tabela 5).

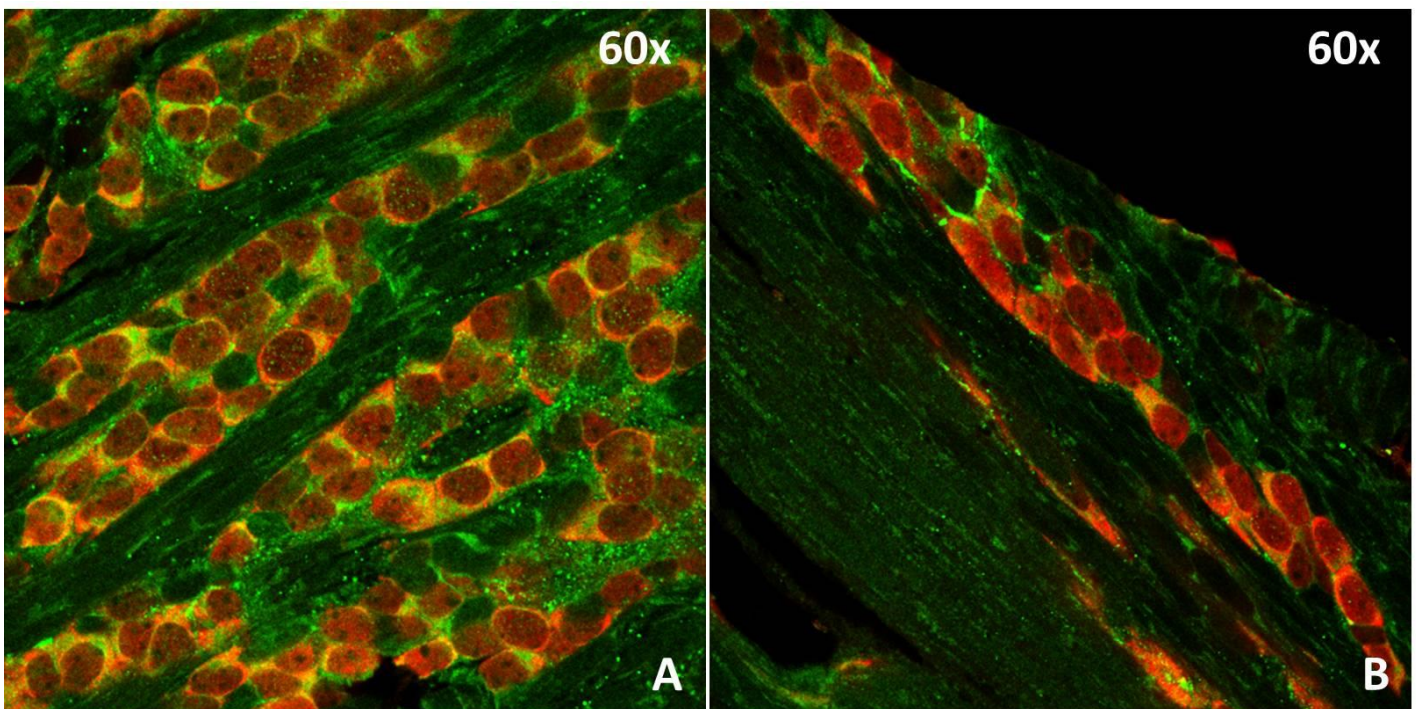


FIGURA 3: Expressão de calretinina em neurônios (vermelho) do plexo submucoso de indivíduo não constipado (A) e de paciente constipado (B). Observe uma clara diminuição na expressão de calretinina (verde) nos portadores de constipação intestinal.

Neuropeptídeo Y (NPY)

O NPY é expresso por uma gama de neurônios presentes em todo o SNC e SNP. No SNE humano, o NPY é expresso por neurônios que, funcionalmente, são classificados como interneurônios, responsáveis pela comunicação entre os componentes aferentes e eferentes do SNE. A avaliação dos neurônios NPY-IR em nosso estudo demonstrou uma distribuição equivalente deste neuropeptídeo em ambos os plexos nervosos, sendo que no grupo de pacientes constipados não houve alteração relevante no número de neurônios desta classe (Figura 4). A análise quantitativa confirmou que não há diferenças estatísticas entre a expressão dos mesmos ao compararmos pacientes portadores de constipação intestinal e indivíduos não constipados (Tabela 5).

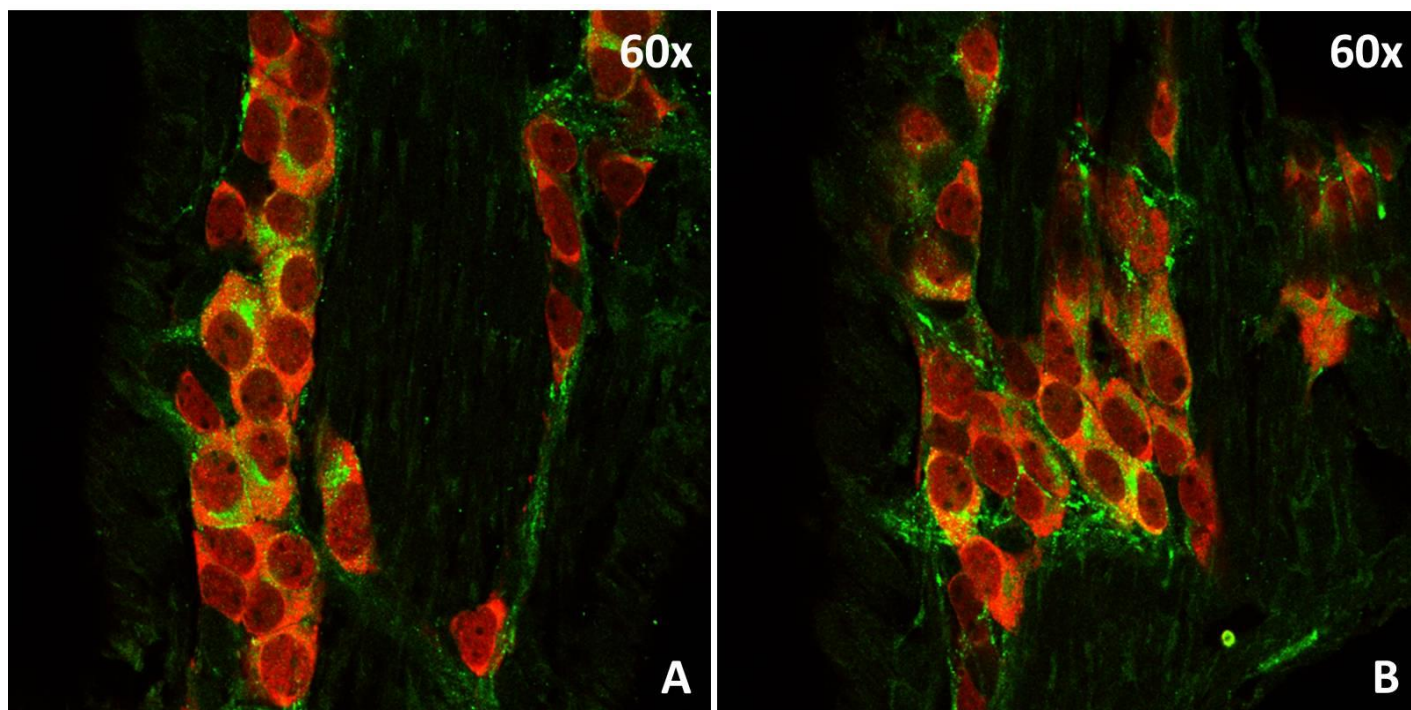


FIGURA 4: Expressão de neuropeptídeo Y (verde) em neurônios (vermelho) do plexo mioentérico de indivíduo não constipado (A) e de paciente constipado (B). Não é possível observar diferença de expressão deste neuropeptídeo entre os pacientes analisados.

Colina acetiltransferase (ChaT)

A ChaT é uma enzima responsável pela acetilação da molécula precursora da acetilcolina, estando presente em todos os neurônios que utilizam este neurotransmissor. É amplamente distribuída no SNC e SNP, no entanto no SNE está presente em neurônios que promovem a contração muscular, sendo denominados neurônios motores excitatórios. Em nosso estudo, a análise da expressão destes neurônios (ChaT-IR) demonstrou que estão presentes em ambos os plexos nervosos, estando concentrados principalmente no plexo mioentérico. A análise estatística demonstrou uma diferença estatisticamente considerável entre a quantidade de neurônios que expressam acetilcolina em pacientes portadores de constipação intestinal, que está diminuída, em relação a indivíduos não constipados em ambos os plexos nervosos (Tabela 5), a redução dessa classe neuronal é claramente visualizada na Figura 5.

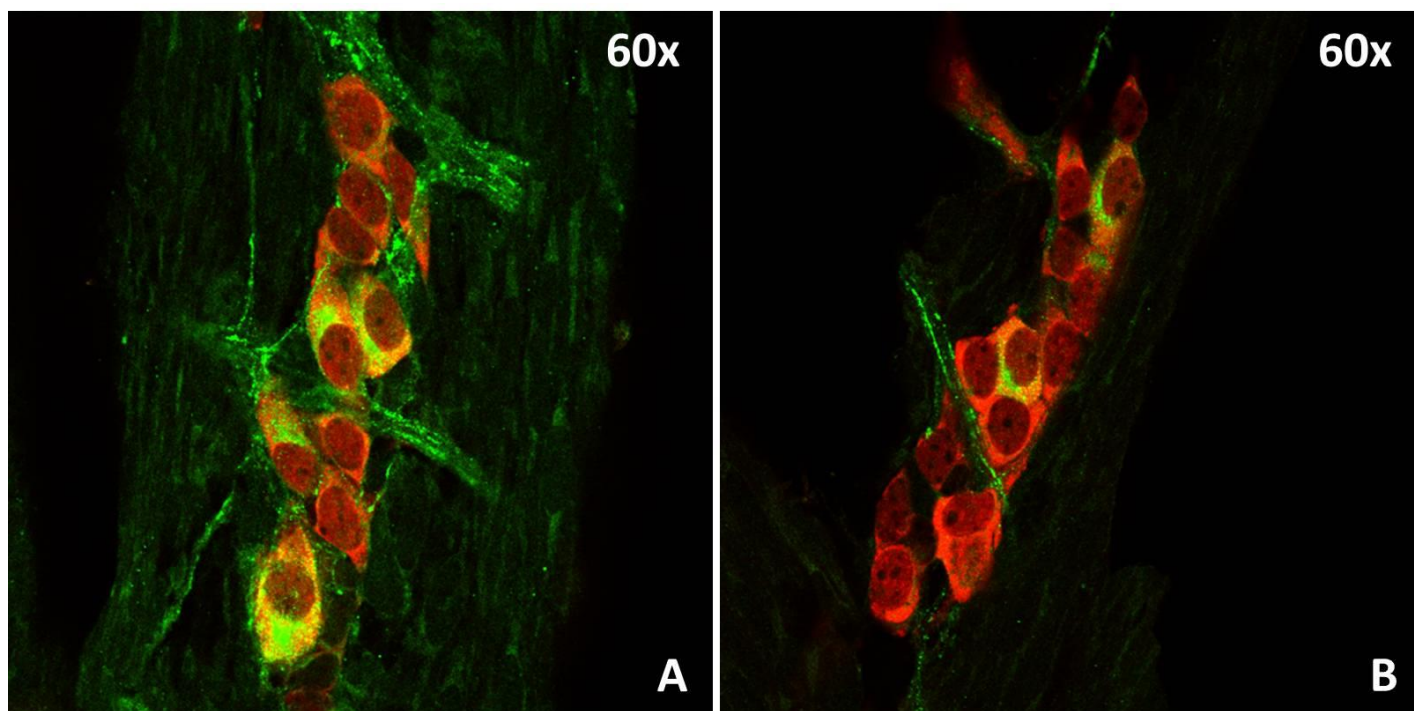


FIGURA 5: Expressão de ChaT (verde) em neurônios (vermelho) do plexo submucoso de indivíduo não constipado (A) e de paciente constipado (B). Observe uma clara diminuição na expressão de ChaT no portador de constipação intestinal.

Substância P (SP)

A SP é um neuropeptídeo amplamente distribuído pelo corpo humano. De uma forma geral, é um neurotransmissor nociceptivo responsável, entre outras coisas, pela modulação e sensação de dor e liberado em resposta a estímulos dolorosos mecânicos. No SNE, assim como a acetilcolina, é encontrada em neurônios responsáveis por promover a contração da musculatura lisa intestinal. Neurônios que expressam esse neuropeptídeo estão distribuídos em ambos os plexos nervosos, predominando no plexo mioentérico. A avaliação dos neurônios SP-IR mostrou equivalência entre a expressão destes neurônios em pacientes portadores constipação intestinal em relação a indivíduos não constipados (Figura 6). A análise estatística confirmou que não há diferenças estatísticas significantes entre a expressão de neurônios SP-IR nos grupos de pacientes analisados (Tabela 5).

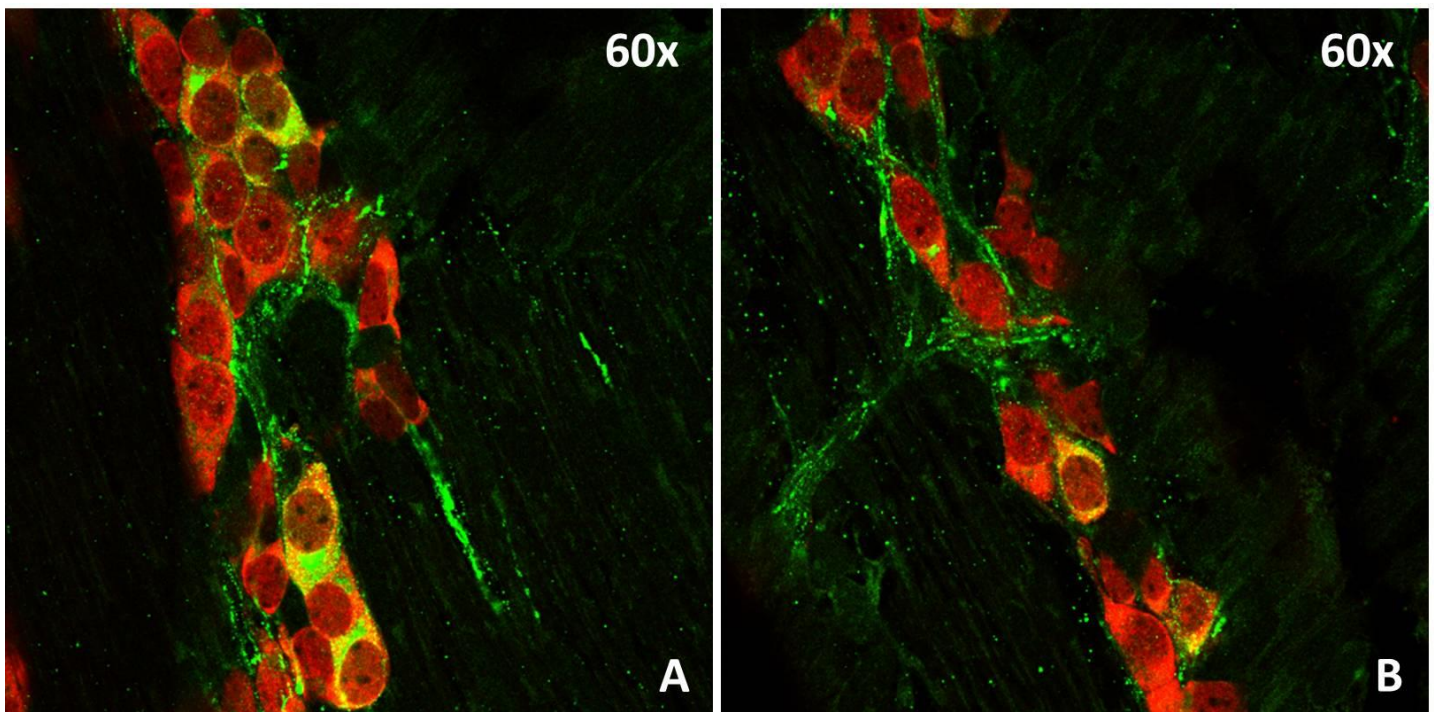


FIGURA 6: Expressão de substância P (verde) em neurônios (vermelho) do plexo submucoso de indivíduo não constipado (A) e de paciente constipado (B). Não é possível observar diferença de expressão deste neuropeptídeo entre os pacientes analisados.

Óxido Nítrico Sintetase (NOS)

NOS é uma enzima responsável pela síntese do óxido nítrico em todo o organismo. Como o óxido nítrico é um gás e se difunde rapidamente após ser produzido, a identificação de sua enzima precursora é a forma mais eficiente de localizar os neurônios que trabalham com essa substância. No SNE, neurônios que expressam a enzima NOS são responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa do intestino. Nossos resultados demonstraram que esses neurônios são encontrados em ambos os plexos nervosos do SNE (plexo mioentérico e plexo submucoso), com predominante presença no plexo mioentérico. A avaliação dos neurônios NOS-IR mostrou que não há diferenças na expressão destes neurônios em pacientes portadores constipação intestinal em relação a indivíduos não constipados (Figura 7), o que foi confirmado pela análise estatística (Tabela 5).

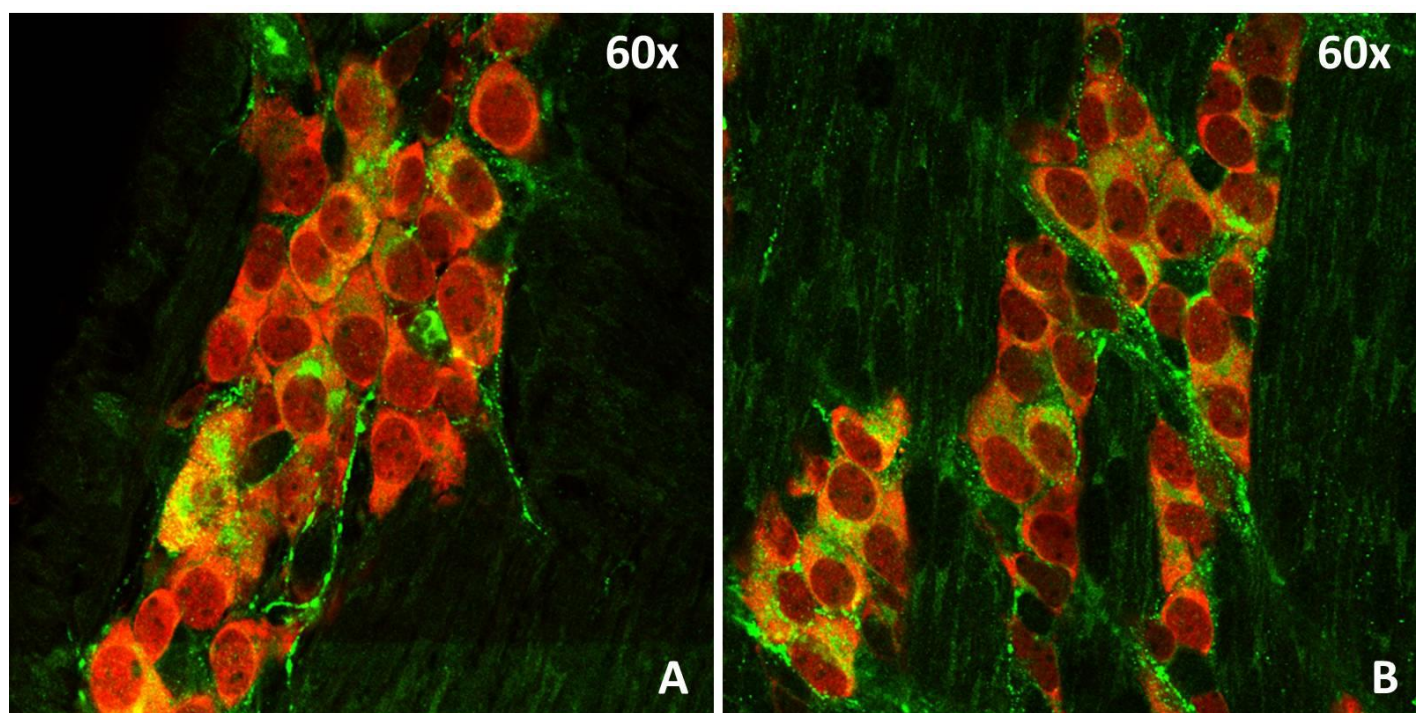


FIGURA 7: Expressão de NOS (verde) em neurônios (vermelho) do plexo mioentérico de indivíduo não constipado (A) e de paciente constipado (B). Não é possível observar diferença de expressão deste neuropeptídeo entre os pacientes analisados.

Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP)

O VIP é um neuropeptídeo que possui como mecanismos de ação a estimulação da secreção serosa pancreática e a inibição da motilidade gástrica induzindo a vasodilatação do sistema de arteríolas. No SNE o VIP funciona como neurotransmissor presente em neurônios que, assim como o NOS, são responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa do intestino. Nossos resultados demonstraram que esses neurônios são encontrados em ambos os plexos nervosos do SNE com predominante presença no plexo mioentérico. Nossos resultados demonstraram também que há uma preservação na expressão de VIP em pacientes portadores de constipação intestinal em relação a indivíduos não constipados (Figura 8), não havendo diferenças estatísticas entre esses dois grupos (Tabela 5).

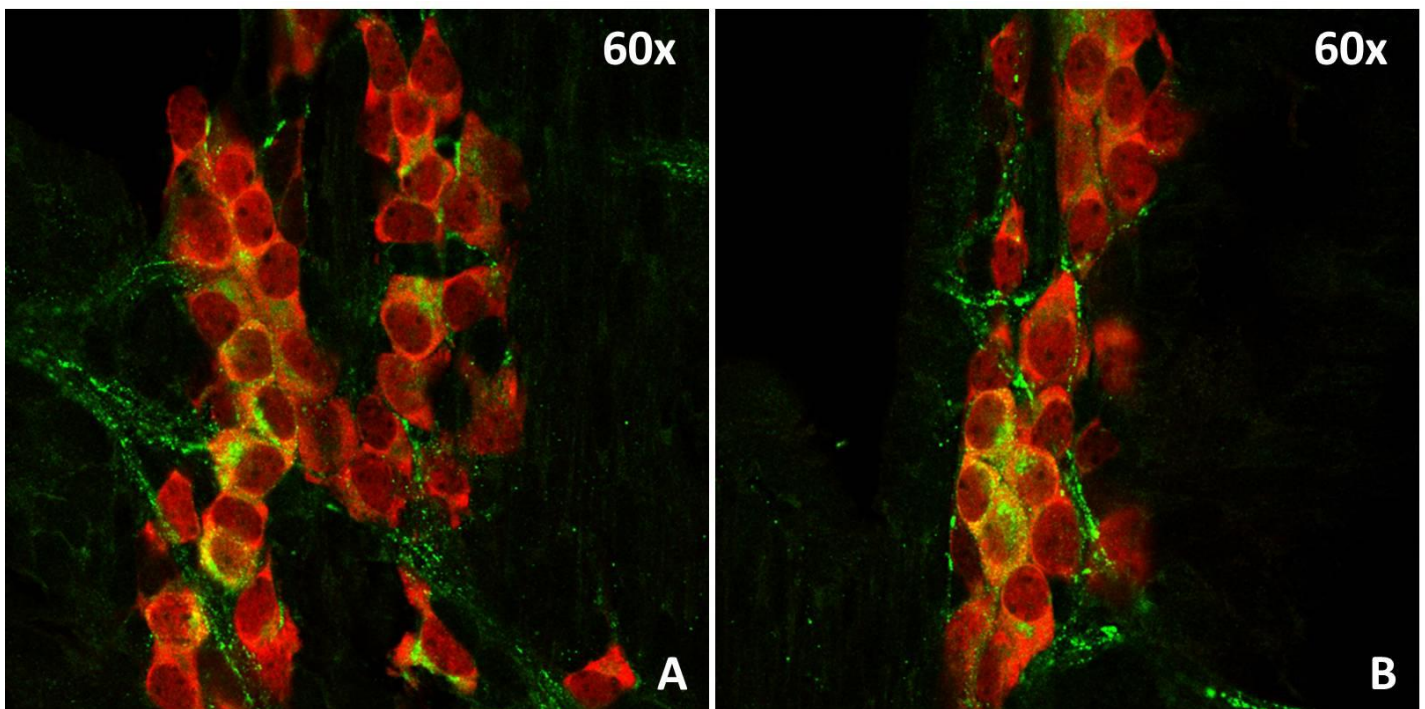


FIGURA 8: Expressão de VIP (verde) em neurônios (vermelho) do plexo mioentérico de indivíduo não constipado (A) e de paciente constipado (B). Não é possível observar diferença de expressão deste neuropeptídeo entre os pacientes analisados.

TABELA 5: Média de expressão de neuropeptídios nos plexos nervosos do cólon de indivíduos constipados e pacientes portadores de constipação intestinal.

Neuropeptídeos	Plexo submucoso		Plexo mientérico	
	Indivíduos não portadores de constipação intestinal	Pacientes portadores de constipação intestinal	Indivíduos não portadores de constipação intestinal	Pacientes portadores de constipação intestinal
Calretinin	121 ± 9	74* ± 8	89 ± 7	77 ± 6
Neuropeptídeo Y	54 ± 5	49 ± 5	60 ± 4	59 ± 5
Colina-Acetiltransferase (cChAT)	101 ± 8	63* ± 5	154 ± 11	122* ± 9
Substância P (SP)	45 ± 4	44 ± 4	91 ± 7	85 ± 6
Óxido Nítrico Sintetase (NOS)	67 ± 5	71 ± 7	112 ± 7	105 ± 10
Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP)	95 ± 8	103 ± 9	145 ± 11	133 ± 15

DISCUSSÃO

A constipação intestinal é um problema crônico que acomete milhares de pacientes no mundo. Em nosso país, constantemente são realizados estudos sobre a prevalência de constipação em escolas ou em unidades públicas de assistência, onde amostras consideradas representativas da comunidade são analisadas; esses resultados demonstram que a prevalência de constipação em nosso país é elevada (Collete *et al.*, 2010). A ocorrência da constipação intestinal está diretamente ligada a alterações funcionais do cólon, as quais são regidas pelo SNE (Neis *et al.*, 2013; Steiner *et al.*, 2013).

O cólon tem participação decisiva na manutenção do hábito intestinal normal. Sua motilidade é complexa e varia consideravelmente de acordo com seu conteúdo. Embora ainda haja algumas controvérsias, em consequência das dificuldades de estudo da motilidade, existem várias evidências de que, no cólon ascendente, ocorram movimentos antiperistálticos, que seguram o conteúdo que passa a válvula ileocecal para o cólon direito. Marcadores radiológicos ingeridos, aí permanecem por mais tempo do que seria esperado (Costilla e Foxx-Orenstein, 2014). O cólon sigmoide também é local que retarda o trânsito do conteúdo colônico. No cólon transversal e descendente ocorrem contrações segmentares que, lentamente, movimentam o conteúdo colônico em direção ao reto e em direção proximal. Ocasionalmente, ocorre movimento mais vigoroso (chamado movimento de massa), que move o conteúdo do cólon por distâncias maiores, de até um terço do comprimento deste órgão. O movimento de massa é frequentemente associado com a alimentação (Andrews e Storr, 2011). O cólon tem três funções importantes: reabsorção de água, manutenção de populações de bactérias intraluminais e controle da eliminação de fezes (El-Salhy *et al.*, 2014).

A perda da capacidade de reabsorver água ou a chegada de grande quantidade hiperosmótica, o desequilíbrio na composição e na quantidade das bactérias intestinais e distúrbios musculares ou nervosos, no controle da eliminação de fezes, provocam alterações do hábito intestinal. O SNE é o grande responsável pela coordenação dos movimentos intestinais. A coordenação de seus componentes promove a peristalse intestinal dentro das necessidades do organismo. Quando ocorre um excesso de estimulação, o paciente desenvolve diarreia crônica e se há uma falta da estimulação adequada, a constipação intestinal se instala (Coss-Adame, 2013). Tendo em vista este quadro, a caracterização do SNE de pacientes portadores de constipação

intestinal em comparação a indivíduos não constipados se torna importante, pois permite a identificação das alterações presentes em pacientes constipados, podendo assim sugerir uma intervenção mais pontual no tratamento destes pacientes (Christensen e Krogh, 2012; Seltzer, 2012).

Nossos resultados demonstraram que pacientes constipados apresentam uma redução no número de neurônios no plexo submucoso em relação a indivíduos não constipados. O plexo submucoso é a parte do SNE responsável pelas aferências deste sistema. Toda informação que chega ao trato gastrointestinal é processada por neurônios desta região, onde se localizada a grande maioria dos neurônios sensitivos (Furness, 2000a). Em seguida esses neurônios transmitem informações ao plexo mioentérico para que esse exerça a função mais adequada de acordo com cada situação (Furness, 2006). Podemos sugerir que, caso haja uma disfunção dos neurônios do plexo submucoso, o plexo mioentérico seria insuficientemente estimulado, levando a estímulos precários que acarretariam a estase do bolo fecal no trato gastrointestinal.

A permanência do bolo fecal no intestino grosso por um tempo prolongado leva a uma absorção excessiva de água, endurecendo as fezes e dificultando sua eliminação. Além disto, uma retenção prolongada da massa fecal no intestino pode aumentar a incidência de doenças inflamatórias, infecciosas e mesmo de patologias do cólon (Costilla e Foxx-Orenstein, 2014).

A diminuição do número de neurônios que expressam calretinina no plexo submucoso vem confirmar que existe uma diminuição da expressão de componentes aferentes no trato gastrointestinal de pacientes portadores de constipação intestinal. Esse é o primeiro estudo que demonstra a diminuição dos neurônios calretinina-IR no cólon de pacientes constipados, o que explicaria em parte a fisiopatologia desta doença. Observamos também uma diminuição de neurônios que expressam acetilcolina. Estes neurônios estão concentrados no plexo mioentérico e são responsáveis por estímulos que resultam na contração do músculo liso das camadas circular e longitudinal do trato digestório. Uma vez observado um déficit no componente aferente, responsável por emitir sinais ao componente motor, sugere-se que a falta de excitação pode levar a uma conseqüente diminuição da expressão de neuropeptídeos que são comumente presentes diante de uma estimulação adequada.

Já os outros neuropeptídeos analisados não apresentaram diferenças estatísticas entre pacientes constipados e indivíduos não constipados. Acreditamos que esses componentes não estejam envolvidos na instalação da constipação intestinal, mesmo porque por serem estruturas

relacionadas à capacidade motora do trato gastrointestinal, não sejam afetados pela destruição de estruturas aferentes do SNE. Comparativamente, outras patologias que atinjam o SNE, como o megacólon chagásico, apresentam grande capacidade de destruição do componente motor e relativa preservação das estruturas aferentes. Assim, acreditamos que o megacólon chagásico e a constipação intestinal tenham etiologia completamente diferente, sendo que na constipação predomina-se a destruição de componentes aferentes do plexo submucoso e no megacólon chagásico predomina-se a destruição de estruturas motoras presentes no plexo mioentérico (da Silveira *et al.*, 2007b; da Silveira *et al.*, 2007d).

Outra questão interessante é a origem do processo que iniciou a destruição dos neurônios aferentes em pacientes constipados. A presença do processo inflamatório parece ser fator essencial para a desnervação e consequente implantação do processo de constipação intestinal. Independente se a origem do processo for exógena, como alimentar ou pela estase do bolo fecal, ou endógena, como autoimune, a constipação parece estar intimamente ligada a um desajuste do sistema imunológico. No entanto, resta ainda identificar se há predominância de estímulos endógenos ou exógenos na instalação da constipação e quais componentes imunes estariam ligados com a destruição seletiva de neurônios aferentes do SNE destes pacientes.

A íntima relação entre o SNE e o sistema imunológico do trato gastrointestinal é notável na manutenção da homeostase do organismo. O equilíbrio entre esses dois sistemas garante que o trato digestório seja capaz, nas mais diversas condições, de exercer suas funções com eficiência (Furness *et al.*, 2000). Sugerimos que as patologias deste sistema são desencadeadas por fatores que prejudicam esse equilíbrio, levando a uma exacerbação ou supressão de alguns componentes, o que seria perfeitamente capaz de levar ao desenvolvimento de diversas patologias. Esses resultados podem contribuir na compreensão dos processos envolvidos na instalação da constipação intestinal, além de auxiliar o entendimento do funcionamento do SNE. O estudo comparativo das doenças do trato digestório pode acelerar ainda mais a coleta de dados que levem ao completo entendimento do SNE humano, tanto do ponto de vista patológico como em condições normais de funcionamento.

REFERÊNCIAS

ADAD, S. J.; CANCADO, C. G.; ETCHEBEHERE, R. M.; TEIXEIRA, V. P.; GOMES, U. A.; CHAPADEIRO, E.; LOPES, E. R. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Archives**, n. 438, p. 254-258, 2001.

ANDREWS, C.; STORR, M. The pathophysiology of chronic constipation. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 25, supl. B, p. 16b- 21b, 2011.

ARANTES, R. M.; MARCHE, H. H.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 4, p. 1361-1368, 2004.

AREBI, N.; KALLI, T.; HOWSON, W.; CLARK, S.; NORTON, C. Systematic review of abdominal surgery for chronic idiopathic constipation. **Colorectal disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland**, v. 13, p. 1335-1343, 2011.

AUERBACH, L. Ueber einen plexus gangliosus myogastricus. **Jahres-Bericht der Schlesischen Gesellschaft für Vaterländische Kultur**, 39, p. 103-104, 1862a.

AUERBACH, L. Ueber einen plexus myentericus, einen bisher unbekanntem ganglio-nervösen apparat im darmkanal der Wirbelthiere, **Verlag von E. Morgenstern**, Breslau, 1862b.

AUERBACH, L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. **Archiv für pathologische anatomie und physiologie und für klinische medizine**, 30, p. 457-460, 1864.

BARBACID; M. Structural and functional properties of the Trk family of neurotrophin receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 766, p. 442-458, 1995.

BASSOTTI, G.; CHISTOLINI, F.; SIETCHIPING-NZEPA, F.; DE ROBERTO, G.; MORELLI, A.; CHIARIONI, G. Biofeedback for pelvic floor dysfunction in constipation. **BMJ Case Reports**, v. 328, p. 393-396, 2004.

BELSEY, J.; GREENFIELD, S.; CANDY, D.; GERAIN, M. Systematic review: impact of constipation on quality of life in adults and children. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, p. 938-949, 2010.

BILLROTH, T. Einige beobachtungen über das Ausgedehnte Aorkommen von Nervenastomosen im Tractus Intestinalis. **Archives of Anatomy Physiology Leipzig**, p. 148-158, 1858.

BONGERS, M. E.; BENNINGA, M. A. Long-term follow-up and course of life in children with constipation. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 53 suppl. 2, p. 55-56, 2011.

BRANDT, L. J.; PRATHER, C. M.; QUIGLEY, E. M.; SCHILLER, L. R.; SCHOENFELD, P.; TALLEY, N. J. Systematic review on the management of chronic constipation in North America. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 100 suppl. 1, p. 5 - 21, 2005.

BREHMER, A.; BLASER, B.; SEITZ, G.; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. **Histochemistry and Cell Biology**, v.121, p. 13-20, 2004.

BUSH, T. G.; SAVIDGE, T. C.; FREEMAN, T. C.; COX, H. J.; CAMPBELL, E. A.; MUCKE, L.; JOHNSON, M. H.; SOFRONIEW, M. V. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell**, v. 93, 189-201, 1998.

CHRISTENSEN, P.; KROGH, K. Chronic constipation in adults. **Ugeskrift for Laeger**, v. 174, p. 2379-2382, 2012.

COLLETE, V.; ARAÚJO, C.; MADRUGA, S. Prevalência e fatores associados à constipação intestinal: um estudo de base populacional em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2007. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 7, 2010.

CORNET, A.; SAVIDGE, T. C.; CABARROCAS, J.; DENG, W. L.; COLOMBEL, J. F.; LASSMANN, H.; DESREUMAUX, P.; LIBLAU, R. S. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13306-13311, 2001.

COSS-ADAME, E. Constipation and functional anorectal disorders. **Revista de Gastroenterología de México**, v. 78, suppl. 1, p. 37-39, 2013.

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the Enteric Nervous System. **Gut**, v. 47 suppl. 4, p. 15-19; 2000.

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, p. 949-967, 1996.

COSTA, M.; FURNESS, J. B. Neuronal peptides in the intestine. **British Medical Bulletin**, v. 38, p. 247-252, 1982.

COSTILLA, V. C.; FOXX-ORENSTEIN, A. E. Constipation: understanding mechanisms and management. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 30, p. 107-115, 2014.

COYNE, K. S.; CASH, B.; KOPP, Z.; GELHORN, H.; MILSOM, I.; BERRIMAN, S.; VATS, V.; KHULLAR, V. The prevalence of chronic constipation and faecal incontinence among men and women with symptoms of overactive bladder. **BJU International**, v. 107, n. 2, p. 254-261, 2011.

COYNE, K. S.; SEXTON, C. C.; IRWIN, D. E.; KOPP, Z. S.; KELLEHER, C. J.; MILSOM, I. The impact of overactive bladder, incontinence and other lower urinary tract symptoms on quality of life, work productivity, sexuality and emotional well-being in men and women: results from the EPIC study. **BJU International**, v. 101, n. 11, p. 1388-1395, 2008.

CRANE, S. J.; TALLEY, N. J. Chronic gastrointestinal symptoms in the elderly. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 23, n. 4, p. 721-734, 2007.

DA SILVEIRA, A. B.; ARANTES, R. M.; VAGO, A. R.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R.; D'AVILA REIS, D. Comparative study of the presence of trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. 5, p. 627-634, 2005a.

DA SILVEIRA, A. B.; ARANTES, R. M.; VAGO, A. R.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R.; D'AVILA REIS, D. Comparative study of the presence of trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. 5, p. 627-634, 2005b.

DA SILVEIRA, A. B.; D'AVILA REIS, D.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI A. O.; POOLE, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 10, p. 2877-2883, 2007a.

DA SILVEIRA, A. B.; D'AVILA REIS, D.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI A. O.; POOLE, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 10, p. 2877-2883, 2007b.

DA SILVEIRA, A. B.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.; D'AVILA REIS, D. Megacolon in chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human Pathology**, v. 38, n. 8, p. 1256-1264, 2007c.

DA SILVEIRA, A. B.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.; D'AVILA REIS, D. Megacolon in chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human Pathology**, v. 38, n. 8, p. 1256-1264, 2007d.

DE HERT, M.; DOCKX, L.; BERNAGIE, C.; PEUSKENS, B.; SWEERS, K.; LEUCHT, S.; TACK, J.; VAN DE STRAETE, S.; WAMPERS, M.; PEUSKENS, J. Prevalence and severity of antipsychotic related constipation in patients with schizophrenia: a retrospective descriptive study. **BMC Gastroenterology**, v. 11, n. 17., p. 1-4, 2011a.

DE HERT, M.; HUDYANA, H.; DOCKX, L.; BERNAGIE, C.; SWEERS, K.; TACK, J.; LEUCHT, S.; PEUSKENS, J. Second-generation antipsychotics and constipation: A review of the literature. **European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 26, n. 1, p. 34-44, 2011b.

DE REZENDE, J. M. [Chagas disease of the digestive tract (author's transl)]. **Revista Médica de Chile**, v. 107, p. 71-72, 1979.

DOGIEL, A. S. Über den bau der ganglien in den geflechten des darmes und der gallenblase des menschen und der säugetiere. **Archives of Anatomy Physiology Leipzig**, v. 4, p. 130-158, 1899.

DRASCH, O. Beitrage zur Kenntnis des feineren Baues des Dunndarmes, insbesondere über die nerven desselben. **Sitz Ber Akad Wiss**, 82, p. 168-198, 1881.

EBENDAL, T.; TOMAC, A.; HOFFER, B. J.; OLSON, L. Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates fiber formation and survival in cultured neurons from peripheral autonomic ganglia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 40, n. 2, p. 276-284, 1995.

EDLING, A. E.; NANAVATI, T.; JOHNSON, J. M.; TUOHY, V. K. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 5, p. 709-717, 2004.

EL-SALHY, M.; SVENSEN, R.; HATLEBAKK, J. G.; GILJA, O. H.; HAUSKEN, T. (2014). Chronic constipation and treatment options (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 1, p. 3-8, 2014.

FALCK, B. Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 197, suppl. 1-26, 1962.

FERRI, G. L.; PROBERT, L.; COCCHIA, D.; MICHETTI, F.; MARANGOS, P. J.; POLAK, J. M. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. **Nature**, v. 297, p. 409-410, 1982.

FUNAKOSHI, H.; FRISEN, J.; BARBANY, G.; TIMMUSK, T.; ZACHRISSON, O.; VERGE, V. M.; PERSSON, H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 2, p. 455-465, 1993.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81(1-3), p. 87-96, 2000a.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81(1-3), p. 87-96, 2000b.

FURNESS, J. B. Novel gut afferents: intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic e Clinical**, v. 125(1-2), p. 81-85, 2006.

FURNESS, J. B.; CLERC, N.; KUNZE, W. A. Memory in the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 suppl. 4, p. 60-62, 2000.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, p. 1-20, 1980.

FURNESS, J. B.; COSTA, M.; ECKENSTEIN, F. Neurons localized with antibodies against choline acetyltransferase in the enteric nervous system. **Neuroscience Letters**, v. 40, p. 105-109, 1983.

FURNESS, J. B.; COSTA, M.; FRANCO, R.; LLEWELLYN SMITH, I. J. Neuronal peptides in the intestine: distribution and possible functions. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 22, p. 601-617, 1980.

FURNESS, J. B.; JONES, C.; NURGALI; CLERC, N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 143-164, 2004.

FURNESS, J. B.; KURAMOTO, H.; MESSENGER, J. P. Morphological and chemical identification of neurons that project from the colon to the inferior mesenteric ganglia in the guinea-pig. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 31, p. 203-210, 1990.

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

GABELLA, G. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: The enteric glial cells. **Neuroscience**, v. 6, p. 425-436, 1981.

GABELLA, G.; TRIGG, P. Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. **Journal of Neurocytology**, v. 13, p. 49-71, 1984.

GEBOES, K.; RUTGEERTS, P.; ECTORS, N.; MEBIS, J.; PENNINGCKX, F.; VANTRAPPEN, G.; DESMET, V. J. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 103, n. 439-447, 1992.

GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER, A. L. Identification, characterization and projections of intrinsic primary afferent neurones of the submucosal plexus: activity-induced expression of c-fos immunoreactivity. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 33, p. 185-187, 1991.

GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER, A. L.; WADE, P. R. Intrinsic reflex pathways of the bowel wall. In: TACHÉ, Y.; WINGATE, D. L., BURKS, T. F. EDS. Innervation of the gut: pathophysiological implications, **CRC Press**, Boca Raton, p. 275-288, 1994.

GONIAEW, K. Die nerven des nahrungsschlauches. **Archiv für Mikroskopische Anatomie.**, v. 11, p. 479-496, 1875.

GRIESBECK, O.; CANOSSA, M.; CAMPANA, G.; GARTNER, A.; HOENER, M. C.; NAWA, H.; KOLBECK, R.; THOENEN, H. Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. **Microscopy Research Technique**, v. 45, p. 262-275, 1999.

GUNN, M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. **Journal of Anatomy**, v. 102, p. 223-239, 1968.

HALEGOUA, S.; ARMSTRONG, R. C.; KREMER, N. E. Dissecting the mode of action of a neuronal growth factor. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 165, p. 119-170, 1991.

HENLE, J. Handbuch der systematischen anatomie des menschen. **Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn**, v. 2, Braunschweig, 1871.

HIGGINS, P. D.; JOHANSON, J. F. Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 4, p. 750-759, 2004.

HÖKFELT, T.; ELDE, R.; JOHANSSON, O.; LUFT, R.; ARIMURA, A. Immunohistochemical evidence for the presence of somatostatin, a powerful inhibitory peptide, in some primary sensory neurons. **Neuroscience Letters**, v. 1, p. 231-235, 1975.

HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; GOLDSTEIN, M. Chemical anatomy of the brain. **Science**, v. 225(4668), p. 1326-1334, 1984.

HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; LJUNGDAHL, A.; LUNDBERG, J. M.; SCHULTZBERG, M. Peptidergic neurones. **Nature**, v. 284(5756), p. 515-521, 1980.

HOLZER, P.; LIVINGSTON, E. H.; GUTH, P. H. Sensory neurons signal for an increase in rat gastric mucosal blood flow in the face of pending acid injury. **Gastroenterology**, v. 101, p. 416-423, 1991.

HOYLE, C. H. V.; BURNSTOCK, G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. **Journal of Anatomy**, v. 166, p. 7-22, 1989.

HULL, M. A.; MCINTIRE, D. D.; ATNIP, S. D.; DREADIN, J.; NIHIRA, M. A.; DREWES, P. G.; SCHAFFER, J. I.; WAI, C. Y. Randomized trial comparing 2 fiber regimens for the reduction of symptoms of constipation. **Female Pelvic Medicine e Reconstructive Surgery**, v. 17, n. 3, p. 128-133, 2011.

IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. **American Journal of Anatomy**, v. 49, p. 141-166, 1931.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. **Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 2206-2218, 1983.

KIM, J. H.; LEE, J. H.; JUNG, A. Y.; LEE, J. W. The prevalence and therapeutic effect of constipation in pediatric overactive bladder. **International Neurourology Journal**, v. 15, p. 206-210, 2011.

KRAMMER, H. J.; KUHNEL, W.. Immunohistochemistry for intermediate filaments in the enteric nervous system of porcine small intestine. **Annals of Anatomy**, v. 174, p. 275-278, 1993.

KULKARNI-NARLA, A.; BEITZ, A. J.; BROWN, D. R. Catecholaminergic, cholinergic and peptidergic innervation of gut-associated lymphoid tissue in porcine jejunum and ileum. **Cell and Tissue Research**, v. 298(2), p. 275-286, 1999.

KURNIAWAN, I.; SIMADIBRATA, M. Management of chronic constipation in the elderly. **Acta Medica Indonesiana**, v. 43, n. 3, p. 195-205, 2011.

LACERDA-FILHO, A.; LIMA, M. J.; MAGALHÃES, M. F.; PAIVA R. A.; CUNHA-MELO, J. R. Chronic constipation - the role of clinical assessment and colorectal physiologic tests to obtain an etiologic diagnosis. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 45, n. 1, p. 50-57, 2008.

LEUNG, F. W.; RAO, S. S. Approach to fecal incontinence and constipation in older hospitalized patients. **Hospital Practice**, v. 39, n. 1, p. 97-104, 2011.

LEUNG, L.; RIUTTA, T.; KOTECHA, J.; ROSSER, W. Chronic Constipation: An Evidence-Based Review. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 24, n. 4, p. 436-451, 2011.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science**, v. 237, n. 4819, p. 1154-1162, 1987.

LEVI-MONTALCINI, R.; ANGELETTI, P. U. Growth control of the sympathetic system by a specific protein factor. **The Quarterly Review of Biology**, v. 36, p. 99-108, 1961

LEWIS, T.. The blood vessels of the human skin and their responses. **The Journal of the American Medical Association**, v. 90, n. 4, 1927.

LICUP, N.; BAUMRUCKER, S. J. Methylnaltrexone: treatment for opioid-induced constipation. **The American Journal of Hospice and Palliative Care**, v. 28, n. 1, p. 59-61, 2011.

LIN, L. F. H.; DOHERTY, D. H.; LILE, J. D.; BEKTESH, S.; COLLINS, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**, v. 260, p. 1130-1132, 1993.

LIU L. Chronic constipation: current treatment options. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.25, p. 22b-28b, 2011

LO, D. C. NGF takes shape. **Current Biology**, v.2, n.2, p. 67-69, 1992.

LOMAX, A. E. G.; FURNESS, J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. **Cell and Tissue Research**, v. 302, p. 59-73, 2000.

LUNDGREN, O. Sympathetic input into the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 suppl. 4, p. 33-35, 2000.

MANNING, B. P.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Effects of PGE₂ in guinea pig colonic myenteric ganglia. **American Journal of Physiology**, v. 283, n. G1388-G1397, 2002.

MCCREA, G. L.; MIASKOWSKI, C.; STOTTS, N. A.; MACERA, L.; PAUL, S. M.; VARMA, M. G. Gender differences in self-reported constipation characteristics, symptoms, and bowel and dietary habits among patients attending a specialty clinic for constipation. **Gender Medicine**, v. 6, n. 1, p. 259-271, 2009.

MCKAY, D. M.; FAIRWEATHER, I. A role for the enteric nervous system in the response to helminth infections. **Parasitology today**, v. 13, n.2, p. 63-69, 1997.

MCMILLIN, D. L.; RICHARDS, D. G.; MEIN, E. A.; NELSON, C. D. The abdominal brain and enteric nervous system. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.5, n.6, p. 575-586, 1999.

MEEK, P. D.; EVANG, S. D.; TADROUS, M.; ROUX-LIRANGE, D.; TRILLER, D. M.; GUMUSTOP, B. Overactive bladder drugs and constipation: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 1, p. 7-18, 2011.

MEISSNER, G. Über die nerven der darmwand. **Zeitschrift für rationelle medizin**, v. 8, 364-366, 1857.

MEYER, M.; MATSUOKA, I.; WETMORE, C.; OLSON, L.; THOENEN, H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. **The Journal of Cell Biology**, v. 119, n.1, p. 45-54, 1992.

MEYRAT, B. J.; LESBROS, Y.; LAURINI, R. N. Assessment of the colon innervation with serial biopsies above the aganglionic zone before the pull-through procedure in Hirschsprung's disease. **Pediatric Surgery International**, v. 17, p. 129-135, 2001.

MICHEL, K.; REICHE, D.; SCHEMANN, M. Projections and neurochemical coding of motor neurones to the circular and longitudinal muscle of the guinea pig gastric corpus. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 440, p. 393-408, 2000.

MOHAGHEGH SHALMANI, H.; SOORI, H.; KHOSHKROOD MANSOORI, B.; VAHEDI, M.; MOGHIMI-DEHKORDI, B.; POURHOSEINGHOLI, M. A.; NOROUZINIA, M.; ZALI, M. R. Direct and indirect medical costs of functional constipation: a population-based study. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 26, n.4, p. 515-522, 2011.

NEIS, B.; NGUYEN, D.; ARORA, A.; KANE, S. The role of diagnostic colonoscopy in constipation: a quality improvement project. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 108, n. 1930, 2013.

NEMETH, L.; PURI, P. The innervation of human bowel mucosa and its alterations in Hirschsprung's disease using a whole-mount preparation technique. **Pediatric Surgery International**, v. 16, n.4, p. 277-281, 2000.

NORBERG, K. A. Adrenergic innervation of the intestinal wall studied by fluorescence microscopy. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 3, p. 379-382, 1964.

NYAM, D. C.; PEMBERTON, J. H.; ILSTRUP, D. M.; RATH, D. M. Long-term results of surgery for chronic constipation. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 40, n.3, p. 273-279, 1997.

OTTEN, U.; SCULLY, J. L.; EHRHARD, P. B.; GADIANT, R. A. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. **Progress in Brain Research**, v. 103, p. 293-305, 1994.

PALMER, J. M.; WONG RILEY, M.; SHARKEY, K. A. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. **American Journal of Physiology**, V. 275, P. 922-935, 1988.

PANG, K. H.; CROAKER, G. D. Constipation in children with autism and autistic spectrum disorder. **Pediatric Surgery International**, v. 27, n. 4, p. 353-358, 2011.

PENNANT, M.; ORLANDO, R.; BARTON, P.; BAYLISS, S.; ROUTH, K.; MEADS, C. Prucalopride for the treatment of women with chronic constipation in whom standard laxative regimens have failed to provide adequate relief. **Health Technology Assessment**, v. 15 suppl. 1, p. 43-50, 2011.

PETERS, R. J.; OSINSKI, M. A.; HONGO, J. A.; BENNETT, G. L.; OKRAGLY, A. J.; HAAK-FRENDSCHO, M.; EPSTEIN, M. L. GDNF is abundant in the adult rat gut. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v.70, p. 115-122, 1998.

PIMENTA, D.; YILMAZ, D.; GROSSMAN, R.; SOIN, B. An unusual cause of constipation in a 72-year-old man with a rising creatinine. **BMJ Case Reports**, 2013.

PORTALATIN, M.; WINSEAD, N. Medical management of constipation. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 25, p. 12-19, 2012.

PORTBURY, A. L.; POMPOLO, S.; FURNESS, J. B.; STEBBING, M. J.; KUNZE, W. A. A.; BORNSTEIN, J. C.; HUGHES, S. Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections. **Journal of Anatomy**, v. 187, p. 303-321, 1995.

PORTER, A. J.; WATTCHOW, D. A.; BROOKES, S. J.; COSTA, M. Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 1180-1187, 1999.

PORTIER, G.; KIRZIN, S.; CABARROT, P.; QUERALTO, M.; LAZORTHES, F. The effect of abdominal ventral rectopexy on faecal incontinence and constipation in patients with internal intra-anal rectal intussusception. **Colorectal disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland**, v. 13, n.8, p. 914-917, 2011.

- POWLEY, T. L. Vagal input to the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 suppl. 4, p. 30-32, 2000a.
- POWLEY, T. L. Vagal input to the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, p. 30-32, 2000b.
- RAGG, J.; MCDONALD, R.; HOMPES, R.; JONES, O. M.; CUNNINGHAM, C.; LINDSEY, I. Isolated colonic inertia is not usually the cause of chronic constipation. **Colorectal disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland**, v. 13, n.11, p. 1299-1302, 2011.
- RAUCH, U.; HANSGEN, A.; HAGL, C.; HOLLAND-CUNZ, S.; SCHAFER, K. H. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 21, n. 6, p. 554-559, 2006.
- REMAK, R. Neue beitrage zur kenntnis vom organischen nervensystem. **Medizinische Zeitung**, v.9, p. 7-8, 1840.
- REMAK, R. Über mikroskopische ganglien an den asten des N. Vagus in der wand des magens bei wirbeltieren. **Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte**, p. 181-183, 1852.
- RICHARDSON, K. C. Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. **American Journal of Anatomy**, v. 103, p. 99-135, 1958.
- ROUX, P. P.; BARKER, P. A. Neurotrophin signaling through the P75 neurotrophin receptor. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 3, p. 203-233, 2002.
- ROWAN-LEGG, A. Managing functional constipation in children. **Paediatrics and Child Health**, v. 16, n.10, p. 661-670, 2011.
- RUHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. Enteric glia. **Neurogastroenterology and motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 suppl. 1, p. 44-49, 2004.
- SAARMA, M.; SARIOLA, H. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). **Microscopy Research and Technique**, v. 45, p. 292-302, 1999.
- SANDERS, K. M.; SMITH, T. K. Motor neurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of the canine proximal colon. **The Journal of Physiology, London**, v. 380, p. 293-310, 1986.
- SCHABADASCH, A. Die nerven des magens der katze. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische anatomie**, v. 10, n. 2, p. 254-319, 1930.

SCHEUERMANN, D. W.; STACH, W.; TIMMERMANS, J. P. Topography, architecture and structure of the plexus submucosus internus Meissner of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. **Acta Anatomica**, v. 129, p. 96-104, 1987.

SCHULTZBERG, M.; HÖKFELT, T.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD J, F.; BROWN, M.; ELDE, R.; GOLDSTEIN, M.; SAID, S. Distribution of peptide and catecholamine neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, VIP, enkephalins, somatostatin, gastrin, neurotensin and dopamine b-hydroxylase. **Neuroscience**, v. 5, p. 689-744, 1980.

SCULLY, J. L.; OTTEN, U. Glucocorticoids, neurotrophins and neurodegeneration. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 5, p. 391-401, 1995a.

SCULLY, J. L.; OTTEN, U. NGF: not just for neurons. **Cell Biology International**, v. 19, n.5, p. 459-469, 1995b.

SELTZER, R. Evaluation and diagnosis of constipation. **Gastroenterology Nursing: The Official Journal of the Society of Gastroenterology Nurses and Associates**, v. 35, n. 5, p. 343-34, 2012.

SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. **Current opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 669-677, 2002.

STEINER, S. A.; TORRES, M. R.; PENNA, F. J.; GAZZINELLI, B. F.; CORRADI, C. G.; COSTA, A. S.; RIBEIRO, I. G.; DE ANDRADE, E. G.; DO CARMO M. B., M. Chronic functional constipation in children: adherence and factors associated to drug treatment. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 2013

STEPHANI, U.; SUTTER, A.; ZIMMERMANN, A. Nerve growth factor (NGF) in serum: evaluation of serum NGF levels with a sensitive bioassay employing embryonic sensory neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 17, p. 25-35, 1987.

SUNDLER, F.; HAKANSON, R.; LEANDER, S. Peptidergic nervous systems in the gut. **Clinics in Gastroenterology**, v. 9, p. 517-543, 1980.

TACK, J.; MÜLLER-LISSNER, S.; STANGHELLINI, V.; BOECKXZTAENS, G.; KAMM, M.; SIMREN, M.; GALMICHE, J.; FRIED M. Diagnosis and treatment of chronic constipation – a European perspective. **Neurogastroenterology e Motility Society**, v. 23, p. 697-710, 2011.

TALLEY, N. J. Definitions, epidemiology, and impact of chronic constipation. **Reviews in Gastroenterological Disorders**, v. 4, suppl. 2, p. 3-10, 2004.

TASHIRO, N.; BUDHATHOKI, S.; OHNAKA, K.; TOYOMURA, K.; KONO, S.; UEKI, T.; TANAKA, M.; KAKEJI, Y.; MAEHARA, Y.; OKAMURA, T.; IKEJIRI, K.; FUTAMI, K.; MAEKAWA, T.; YASUNAMI, Y.; TAKENAKA, K.; ICHIMIYA, H.; TERASAKA, R. Constipation and colorectal cancer risk: the fukuoka colorectal cancer study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 12, n. 8, p. 2025-2030, 2011.

TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of Anatomy**, v. 194, p. 1-14, 1999.

THOMAS, S. M.; HAYES, M.; D'ARCANGELO, G.; ARMSTRONG, R. C.; MEYER, B. E.; ZILBERSTEIN, A.; BRUGGE, J. S.; HALEGOUA, S. Induction of neurite outgrowth by v-src mimics critical aspects of nerve growth factor-induced differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 9, p. 4739-4750, 1991.

TIMMERMANS, J. P.; HENS, J.; ADRIAENSEN, D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. **Anatomical Record**, v. 262, p. 71-78, 2001.

TIMMERMANS, J. P.; ADRIAENSEN, D.; CORNELISSEN, W.; SCHEUERMANN, D. W. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118a, p. 331-340, 1997.

TIMMERMANS, J. P.; SCHEUERMANN, D. W.; STACH, W.; ADRIAENSEN, D.; DE GROODT LASSEEL, M. H. A. Distinct distribution of CGRF-, enkephalin-, galanin-, neuromedin U-, neuropeptide Y-, somatostatin-, substance P-, VIP- and serotonin-containing neurons in the two submucosal ganglionic neural networks of the porcine small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 260, p. 367-379, 1990.

TONER, F.; CLAROS, E. Preventing, assessing, and managing constipation in older adults. **Nursing**, v. 42, n. 12, p. 32-39, 2012.

VON BOYEN, G. B. T.; STEINKAMP, M.; REINSHAGEN, M.; SCHAFFER, K. H.; ADLER, G.; KIRSCH, J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 222-228, 2004.

WALD, A. Constipation in the primary care setting: current concepts and misconceptions. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 9, p. 736-739, 2006.

WHITWORTH, I. H.; DORE, C. J.; GREEN, C. J.; TERENGHI, G. Increased axonal regeneration over long nerve gaps using autologous nerve-muscle sandwich grafts. **Microsurgery**, v. 16, n.12, p. 772-778, 1995.

XU, H. M.; HAN, J. G.; NA, Y.; ZHAO, B.; MA, H. C.; WANG, Z. J. Colonic transit time in patient with slow-transit constipation: comparison of radiopaque markers and barium suspension method. **European Journal of Radiology**, v. 79, n. 2, p. 211-213, 2011.