

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

PAULO HENRIQUE DE SOUSA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS DOGIEL TIPO II:
CARACTERIZAÇÃO NEUROQUÍMICA DOS NEURÔNIOS AFERENTES PRIMÁRIOS
INTRÍNSECOS (IPANs) NO SNE DO CÓLON HUMANO**

UBERLÂNDIA

2020

PAULO HENRIQUE DE SOUSA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS DOGIEL TIPO II:
CARACTERIZAÇÃO NEUROQUÍMICA DOS NEURÔNIOS AFERENTES PRIMÁRIOS
INTRÍNSECOS (IPANs) NO SNE DO CÓLON HUMANO**

Dissertação apresentada pelo aluno Paulo Henrique de Sousa Fernandes ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientando: Paulo Henrique de Sousa Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira

UBERLÂNDIA

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F363 2020	<p data-bbox="414 1211 1117 1411">Fernandes, Paulo Henrique de Sousa, 1968- Avaliação de marcadores de neurônios entéricos Dogiel tipo II: caracterização neuroquímica dos neurônios aférentes primários intrínsecos (IPANs) no SNE do cólon humano [recurso eletrônico] / Paulo Henrique de Sousa Fernandes. - 2020.</p> <p data-bbox="414 1444 1101 1668">Orientador: Alexandre Barcelos Morais da Silveira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.591 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p data-bbox="414 1702 1069 1825">1. Ciências médicas. I. Silveira, Alexandre Barcelos Morais da, 1978-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p data-bbox="1212 1892 1315 1928">CDU: 61</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcsafamed.ufu.br - copme@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 019/PSCSA				
Data:	20.08.2020	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:00h
Matrícula do Discente:	11812CSD034				
Nome do Discente:	Paulo Henrique de Sousa Fernandes				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS (NEURÔNIOS DOGIEL TIPO II): CARACTERIZAÇÃO NEUROQUÍMICA DOS NEURÔNIOS AFERENTES PRIMÁRIOS INTRÍNSECOS (IPANS) NO SNE DO CÓLON HUMANO				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Relação entre Sistema Nervoso Entérico e sistema imune em patologias do trato digestivo				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Raquel Borges Moroni (UFU), Silvio Santana Dolabella (UFS) e Alexandre Barcelos Morais da Silveira (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira, apresentou a Comissão Examinadora e ao candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Silvio Santana Dolabella, Usuário Externo**, em 20/08/2020, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barcelos Moraes da Silveira, Presidente**, em 20/08/2020, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Borges Moroni, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/08/2020, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2202759** e o código CRC **9C5A1D2F**.

Sumário

<i>RESUMO</i>	6
<i>ABSTRACT</i>	7
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	8
<i>LISTA DE TABELAS</i>	9
<i>LISTA DE GRÁFICOS</i>	10
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	11
<i>INTRODUÇÃO</i>	12
<i>JUSTIFICATIVA</i>	24
<i>OBJETIVO GERAL</i>	25
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	25
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	26
Pacientes e amostras de tecidos.....	26
Investigação imuno-histoquímica.....	26
Aquisição e processamento de imagens.....	27
Análise estatística.....	27
<i>RESULTADOS</i>	28
Relação entre neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e calbindina-IR no cólon humano.....	28
Relação entre calretinina e neuromoduladores em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano.....	32
Relação entre a expressão de calretinina e NOS em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano.....	32
Relação entre a expressão de calretinina e cChAT em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano.....	35
Relação entre a expressão de calretinina e VIP em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano.....	38
<i>DISCUSSÃO</i>	41
<i>CONCLUSÃO</i>	45
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	46

RESUMO

O sistema nervoso entérico (SNE) é constituído por uma rede de milhões de neurônios interconectados que são responsáveis pela inervação autônoma de todo trato gastrointestinal. O advento de novas técnicas laboratoriais, como a imuno-histoquímica com microscopia confocal possibilitou a identificação e a caracterização de vários componentes do SNE que antes eram desconhecidos. Dentre esses componentes os IPANs (*intrinsic primary afferent neurons*) ou neurônios aferentes primários intrínsecos são a representação dos neurônios sensitivos de todo o trato gastrointestinal. Os IPANs são transdutores de estímulos fisiológicos, incluindo movimento das vilosidades, distorção da mucosa, contração do músculo intestinal e alterações na química do conteúdo do lúmen intestinal. No intestino os IPANs apresentam morfologia Dogiel tipo II, ou seja, são grandes neurônios redondos ou ovais com múltiplos dendritos, alguns dos quais terminam perto da superfície luminal do intestino e outros que formam sinapses com interneurônios entéricos, neurônios motores e mesmo entre IPANs. O objetivo deste trabalho foi identificar a melhor combinação de neuromarcadores capaz de caracterizar os IPANs por imuno-histoquímica, e assim contribuir para diagnósticos mais precisos, rápidos e eficazes em diversas patologias. Para isso utilizamos os marcadores de canais de cálcio calretinina e calbindina em associação com óxido nítrico sintase (NOS), colina acetiltransferase (cChAT) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP). As diferenças estatísticas foram determinadas através do teste ANOVA one-way do programa estatístico Minitab v.13 e considerado $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que a melhor combinação para identificação dos IPANs observada neste estudo foi a calretinina e cChAT, alcançando positividade de marcação de 73% no plexo miontérico e 82% no plexo submucoso. Acredita-se que estudos futuros que visem avaliar a marcação neuroquímica dos IPANs poderão alcançar maiores níveis de positividade, ao acrescentar, por exemplo, um terceiro marcador. Esses estudos de identificação podem ser importantes para otimizar o diagnóstico precoce de diversas patologias que afligem o trato gastrointestinal.

Palavras-chave: neurônios Dogiel tipo II, calretinina, calbindina, colina acetiltransferase, óxido nítrico sintase, peptídeo intestinal vasoativo, sistema nervoso entérico, neuropeptídeos, marcadores neuronais.

ABSTRACT

The enteric nervous system (ENS) consists of a network of millions of interconnected neurons that are responsible for the autonomic innervation of the entire gastrointestinal tract. The advent of new laboratory techniques, such as immunohistochemistry with confocal microscopy, enabled the identification and characterization of several components of the ENS that were previously unknown. Among these components, there are IPANs (intrinsic primary afferent neurons), which are the representation of the sensitive neurons of the entire gastrointestinal tract. IPANs are transducers of physiological stimuli, including villous movement, mucosal distortion, intestinal muscle contraction and changes in the chemistry of the intestinal lumen content. In the intestine, IPANs have Dogiel type II morphology, that is, they are large round or oval neurons with multiple dendrites, some of which end near the luminal surface of the intestine and some of which form synapses with enteric interneurons, motor neurons and other IPANs. The objective of this work is to characterize the best combination of identification of neuromarkers capable of characterizing IPANs by immunohistochemistry, and thus contribute to more accurate, rapid and effective diagnoses in several pathologies. For that, we used the calcium channel markers calretinin and calbindin in association with nitric oxide synthase (NOS), choline acetyltransferase (cChAT) and vasoactive intestinal peptide (VIP). Statistical differences were determined using the one-way ANOVA test of the Minitab v.13 statistical program and considered $p < 0.05$. The results showed that the best combination for identifying IPANs was calretinin with cChAT, reaching positivity of 73% in the myenteric plexus and 82% in the submucosal plexus. We believe that future studies that aim to evaluate the neurochemical marking of IPANs may reach higher levels of positivity, by adding, for example, a third marker. These identification studies are important to optimize the early diagnosis of several pathologies that afflict the gastrointestinal tract.

Keywords: Dogiel neurons type II, calretinin, calbindine, choline acetyltransferase, nitric oxide synthase, intestinal vasoactive peptide, enteric nervous system, neuropeptides, neuronal markers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema do sistema nervoso entérico observado em camadas e em secção transversal.....	15
FIGURA 2 - Diagrama ilustrando a inervação da mucosa intestinal.....	16
FIGURA 3 - Diagrama ilustrando exemplos de neurônio Dogiel tipo I.....	18
FIGURA 4 - Diagrama ilustrando exemplos de neurônio Dogiel tipo II.....	19
FIGURA 5 - Diagrama ilustrando exemplos de neurônio Dogiel tipo III.....	20
FIGURA 6 - Diferenças morfológicas entre neurônios Dogiel tipo I e tipo II no cólon humano.....	29
FIGURA 7 - Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-calbindina no cólon humano.....	31
FIGURA 8 - Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-NOS no cólon humano.....	34
FIGURA 9 - Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-cChAT no cólon humano.....	37
FIGURA 10 - Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-VIP no cólon humano.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Relação de anticorpos primários utilizados para o estudo de imunofluorescência.....	27
TABELA 2 - Relação de anticorpos secundários utilizados para o estudo de imunofluorescência.....	27
TABELA 3 - Número absoluto de neurônios Dogiel tipo II nos plexos submucoso e plexo Mioentérico do cólon humano.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e calbindina-IR no plexo mioentérico do cólon humano.....	30
GRÁFICO 2 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e calbindina-IR no plexo submucoso do cólon humano.....	30
GRÁFICO 3 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e NOS-IR no plexo mioentérico do cólon humano	33
GRÁFICO 4 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e NOS-IR no plexo submucoso do cólon humano.....	33
GRÁFICO 5 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e cChAT-IR no plexo mioentérico do cólon humano.....	35
GRÁFICO 6 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e cChAT-IR no plexo submucoso do cólon humano.....	36
GRÁFICO 7 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II imunorreativos a calretinina e a VIP no plexo mioentérico do cólon humano.....	38
GRÁFICO 8 -	Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II imunorreativos a calretinina e a VIP no plexo submucoso do cólon humano.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina

ATP: Adenosina trifosfato

cChAT: Colina acetiltransferase comum

CCK: Colecistoquinina

ChAT: Colina acetiltransferase

GRP: Peptídeo relacionado à gastrina

ICC: Células intersticiais de Cajal

IPANs: Neurônios intrínsecos primários aferentes

NOS: Óxido nítrico sintase

NPY: Neuropeptídeo Y

SNC: Sistema nervoso central

SNE: Sistema nervoso entérico

SOM: Somatostatina

SP: Substância P

TGI: Trato gastrintestinal

VIP: Peptídeo intestinal vasoativo

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal possui uma vasta quantidade de tecido neural que constitui o sistema nervoso entérico (SNE) e está embutida na parede do trato gastrointestinal representando sua inervação intrínseca. Dentro do SNE as células nervosas e as células de suporte (gliais) são reunidas em pequenos grupos, os gânglios entéricos, interconectados por feixes de fibras nervosas formando os plexos entéricos. Remak (1840, 1852) foi o primeiro a descrever a presença de gânglios microscópicos nas paredes da faringe e do estômago, mas suas descrições não sugerem que ele reconheceu um plexo ganglionar. Meissner (Meissner, 1857), Billroth (Billroth, 1858) e Auerbach (Auerbach, 1862a; Auerbach, 1862b; Auerbach, 1864) foram os primeiros a descrever claramente os plexos ganglionares dentro da parede do trato digestivo. Após esta descoberta vários outros autores descreveram informações detalhadas sobre os sistemas, arranjos e interconexões dos gânglios entéricos (Henle, 1871; Drash, 1881; Dogiel, 1895; Dogiel, 1899; Cajal 1911, Schabadasch, 1930; Stöhr, 1934; Irwin, 1931). As descrições que Meissner, Billroth e Auerbach forneceram dados sobre a organização geral dos plexos ganglionados, com base em técnicas bastante primitivas para revelar o tecido nervoso, e não foram substituídas por outros estudos nos 100 anos subsequentes. Uma tradução em inglês da descrição de Auerbach de 1864 foi publicada (Furness & Costa, 1987).

O sistema nervoso entérico não é dependente do sistema nervoso central (SNC), que representa sua inervação extrínseca, mas sim modulado por ele por meio do sistema nervoso simpático e parassimpático (Furness & Costa, 1980). Os corpos dos neurônios simpáticos se encontram em gânglios nervosos pré-vertebrais e paravertebrais, enquanto seus axônios se conectam ao trato gastrointestinal através dos nervos mesentéricos. A noradrenalina é o neurotransmissor mais comum no sistema simpático e quando seus neurônios são estimulados 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, 2000).

O sistema nervoso parassimpático é responsável por estimular a peristalse, aumentar o aporte sanguíneo, as secreções intestinais e diminuir a constrição de esfínteres através do nervo vago e dos nervos pélvicos. A acetilcolina é o seu principal neurotransmissor (Powley, 2000).

No intestino delgado e no cólon, a maioria das células nervosas é encontrada em dois conjuntos de gânglios, os gânglios do plexo mioentérico (também chamado de plexo de Auerbach)

e do plexo submucoso (frequentemente referido como plexo de Meissner). Os axônios dessas células nervosas inervam outros gânglios e os tecidos dos órgãos digestivos, como as camadas musculares e a mucosa.

O plexo mioentérico é formado por uma rede de filamentos nervosos e pequenos gânglios que se situam entre as camadas musculares longitudinais externas e circulares internas da camada muscular externa do intestino. A rede é contínua em torno da circunferência e ao longo do trato gastrointestinal (Figura 1). Os gânglios mioentéricos variam em tamanho, forma e orientação entre as espécies anuais e de uma parte do intestino para outra, mas a forma da rede é geralmente característica e identificada em qualquer região principal de uma espécie particular (Gabella, 1981; Irwin, 1931; Maifrino *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2017). Embora o padrão seja facilmente reconhecido, é encontrada uma variação considerável no tamanho dos gânglios. No íleo de cobaias, os gânglios variam em tamanho de 5 a mais de 200 corpos celulares nervosos. Corpos de células nervosas individuais são ocasionalmente encontrados fora da rede principal do plexo, geralmente adjacentes a um cordão nervoso. Para a medição de características como forma e densidade espacial, deve-se levar em consideração o estado de contração da parede intestinal (Gabella & Trigg, 1984). Existem feixes nervosos, provenientes do plexo mioentérico, que estão dispostos paralelamente às fibras musculares (Richardson, 1958; Singh *et al.*, 2013; Tanano *et al.*, 2005). Estes feixes promovem também a inervação das camadas musculares interna e muscular externa (*muscularis propria*). A maior parte dos neurônios do plexo mioentérico é funcionalmente classificada como eferente ou motora (Gabella & Trigg, 1984; Tan *et al.*, 2010).

O plexo ganglionar submucoso encontrado no intestino delgado e grosso em humanos, foi descrito pela primeira vez em meados do século 19 por Meissner (Meissner, 1857) e Billroth (Billroth, 1858). Embora gânglios dispersos sejam encontrados na camada submucosa do esôfago e do estômago, eles não formam um plexo ganglionar comparável ao dos intestinos. O plexo submucoso é contínuo ao redor da circunferência e ao longo do comprimento dos intestinos delgado e grosso e em geral, os filamentos de interconexão do plexo submucoso são mais finos e os gânglios são menores do que os do plexo mioentérico (Henle, 1871; Goniaew, 1875; Timmermans *et al.*, 2001). Os arranjos dos gânglios no plexo submucoso e os tipos funcionais de neurônios nesses gânglios diferem entre as espécies (Scheuermann *et al.*, 1987; Schemann *et al.*, 2004; Timmermans *et al.*, 1990; Nakanishi *et al.*, 2020). Em animais de grande porte, sendo bons exemplos o porco e o ser humano, os gânglios submucosos formam plexos distintos, mas interconectados, em níveis

diferentes, conforme descrito claramente por Schabadasch (Schabadasch, 1930). Duas ou às vezes três camadas de gânglios foram distinguidas (Schabadasch, 1930; Gunn, 1968; Hoyle & Burnstock 1989; Timmermans *et al.*, 2001). Gânglios em diferentes profundidades contêm distintas populações de neurônios, sendo essas variações aparentes nas formas e na natureza química das células nervosas constituintes. O plexo ganglionado interno (mais próximo ao lúmen intestinal) foi identificado com aquele descrito por Henle (Henle, 1871) e Schabadasch (Schabadasch, 1930). Porque não está completamente claro quem deve ser creditado com a descoberta de componentes individuais do plexo submucoso, parece sensato referir-se aos agrupamentos mais óbvios como os plexos submucosos interno e externo (Timmermans *et al.* 2001), o interno aquele mais próximo do lúmen intestinal, e o plexo externo aquele que fornece inervação para a camada muscular circular e até mesmo para o músculo longitudinal (Sanders & Smith 1986; Furness *et al.*, 1990), Timmermans *et al.*, 1994, 1997; Porter *et al.*, 1999). O plexo submucoso externo também fornece inervação para a mucosa. O plexo submucoso interno tem poucos neurônios que inervam a musculatura intestinal, mas muitos que inervam a mucosa (Porter *et al.*, 1999; Timmermans *et al.* 2001). Os feixes de fibras que conectam os plexos mioentérico e submucoso são quase perpendiculares à camada muscular circular. Estes têm sido chamados de "feixes de fibras penetrantes" ou "fibras verticais" (Furness *et al.*, 1990a, Brehmer *et al.*, 1998). Em pequenos mamíferos os gânglios do plexo submucoso se assemelham mais aos do plexo submucoso interno de espécies maiores (Furness *et al.*, 1984; Furness, 2003).

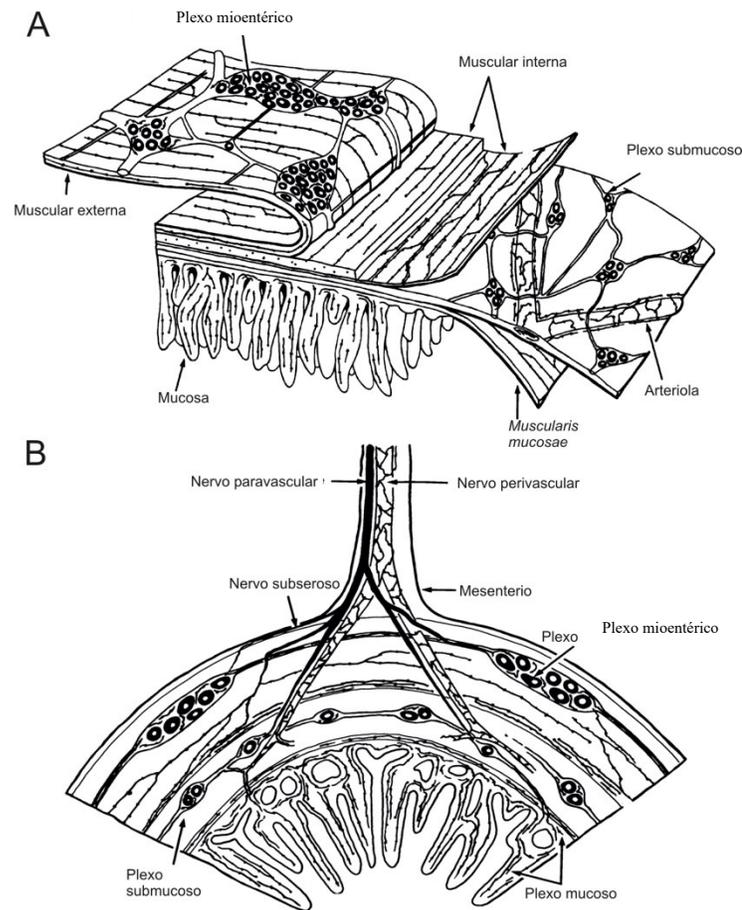


Figura 1: O sistema nervoso entérico (SNE) visto em camadas (A) e em seção transversal (B). Existem dois plexos nervosos formados por gânglios; o plexo mioentérico e o plexo submucoso, além das fibras nervosas que inervam as camadas musculares, a mucosa e as arteríolas intramurais. A inervação extrínseca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

Pequenos grupos de neurônios também podem ser observados na região da lâmina própria da mucosa do intestino delgado e intestino grosso, mas raramente no estômago (Balemba *et al.*, 1998; Drasch, 1881; Fang *et al.*, 1993; Isisawa, 1939). Stöhr (Stöhr, 1934) sugeriu que estes seriam gânglios ectópicos do plexo submucoso. Estes neurônios quase sempre se encontram próximos à *muscularis mucosae*, ou seja, próximos ao plexo submucoso interno. A estrutura da mucosa é a parte mais variável encontrada no trato gastrointestinal. De forma geral, a mucosa intestinal é constituída da *muscularis mucosae*, da lâmina própria, de glândulas tubulares simples (glândulas

de Lieberkuhn) e das vilosidades. Uma rede de fibras nervosas delgadas encontradas na região da lâmina própria e da mucosa inervam essa região, sendo as mesmas descritas pela primeira vez na metade do século 19 (Berkley & Baltimore, 1893; Billroth, 1858; Cajal, 1895; Cajal, 1911).

A inervação da mucosa pode ser dividida em distintos componentes: um plexo periglandular, um plexo viloso subepitelial e um plexo viloso central (Figura 2). Existe uma certa especificidade em relação a neuromarcadores nas fibras nervosas que contribui para a diferenciação destes componentes (Brookes *et al.*, 1991; Clerc *et al.*, 1998). As fibras nervosas que inervam a mucosa estão associadas ao tecido conectivo da lâmina própria, e não penetram no epitélio, o qual é formado apenas por uma única camada de células no estômago, no intestino delgado e no cólon. Algumas fibras nervosas, que se acredita serem aferentes, penetram nas camadas celulares do epitélio estratificado presente no esôfago (Rodrigo *et al.*, 1975).

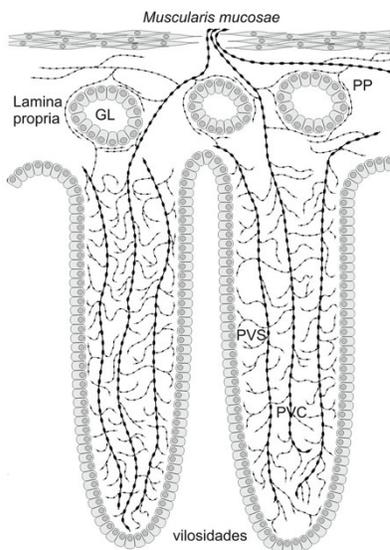


Figura 2: Diagrama ilustrando a inervação da mucosa intestinal. As fibras nervosas formam feixes que compõem uma contínua rede na lâmina própria e nas vilosidades. Essa rede de inervação da mucosa pode ser dividida em plexo periglandular (PP), plexo viloso subepitelial (PVS) e plexo viloso central (PVC). GL, glândula. Adaptado de Furness (Furness *et al.*, 2000) com permissão do autor.

Os neurônios entéricos podem ser classificados por suas formas, propriedades fisiológicas, características imuno-histoquímicas e outras características distintivas, incluindo as estruturas que inervam, os transmissores que utilizam e as conexões que recebem. Embora dados extensos sobre cada tipo de neurônio tenham sido obtidos apenas para a cobaia, o sistema nervoso entérico desempenha as mesmas funções em todas as espécies de mamíferos e, portanto, todas as espécies têm essencialmente os mesmos neurônios funcionalmente definidos (Furness, 2006). É geralmente verdade que os neurônios que desempenham as mesmas funções em espécies diferentes têm a mesma forma (Peters *et al.*, 1991), um princípio que parece se aplicar ao sistema nervoso entérico

(Brehmer *et al.*, 1999a, Furness *et al.*, 2004b). Motoneurônios nos cornos ventrais da medula espinhal, células de Purkinje cerebelares, células piramidais no córtex cerebral, células ganglionares da retina e células ganlionares da raiz dorsal são exemplos de neurônios que têm as mesmas formas e as mesmas funções em diferentes espécies (Furness, 2006). Justifica-se, portanto, o uso da morfologia como primeiro indicador da equivalência de neurônios em diferentes espécies.

A primeira e mais resistente classificação morfológica de neurônios entéricos foi realizada por Dogiel no final do século 19. Este autor descreveu neurônios nos plexos mioentérico e submucoso do intestino de seres humanos, cobaia, hamster, coelho, camundongo, cães e gatos (Dogiel, 1895; Dogiel, 1899). Não obstante, a maior parte de suas ilustrações são provenientes da análise de amostras de cobaia e seres humanos. As principais classes de neurônios descritos por este autor são denominadas como Dogiel tipo I, II e III.

Dogiel descreveu a forma do neurônio tipo I como aplainado, ligeiramente alongado e com aspecto angular quando visto em preparações de delaminação. Os corpos celulares possuem cerca de 13-35 μ m de largura por 9-22 μ m de comprimento. Estas células possuem cerca de 4 a 20 dendritos que, na maior parte dos casos, se estendem por pequenas distâncias (Figura 3) (Dogiel, 1899). Os axônios destes neurônios partem dos gânglios miontericos em direção à *muscularis propria*. Esta descrição é correta para alguns neurônios tipo I, mas nem todos se encaixam nesse perfil (Lawrentjew, 1929). Modernas técnicas imuno-histoquímicas têm revelado que neurônios tipo I não pertencem a uma única classe funcional, sendo alguns classificados como motoneurônios inibidores e excitatórios e alguns como interneurônios (Costa & Furness, 1982; Furness *et al.*, 1989).

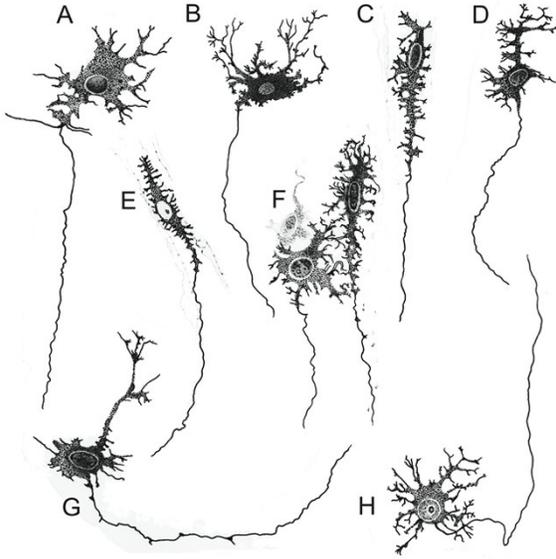


Figura 3: Exemplos de neurônios Dogiel tipo I. Os neurônios A, C, E, F, e H são provenientes do plexo mioentérico do intestino delgado de cobaia, os neurônios D e G são do plexo mioentérico do intestino delgado humano e neurônio B do intestino delgado de cão. Adaptado de Dogiel (Dogiel, 1899).

Os neurônios Dogiel tipo II são os mais proeminentes nos gânglios dos plexos mioentérico e submucoso do intestino delgado e cólon, embora sejam raros no estômago. Estes apresentam grande corpo celular e formato de redondo a oval. Neurônios Dogiel tipo II foram descritos como possuindo 3-10 dendritos e um axônio. Análises utilizando imagens de alta resolução demonstraram que a superfície destes são irregulares, medindo 13-22 μ m de largura por 22-47 μ m de comprimento (Figura 4). Uma característica dos neurônios Dogiel tipo II revelada pelo uso da microscopia eletrônica foi que eles contêm grande quantidade de mitocôndrias e lisossomos. Devido às suas características morfológicas e ultraestruturais, eles podem ser distinguidos de outros neurônios, mesmo sem o uso de métodos imuno-histoquímicos (Pompolo & Furness, 1988). Dogiel mencionou que alguns processos dendríticos se projetavam dos corpos neuronais da região submucosa para a região da mucosa. Neste trabalho foi utilizada a técnica de delaminação, sendo o tecido analisado em camadas individuais. Por esta razão este autor não teve oportunidade de observar projeções de neurônios mioentéricos em direção à mucosa. Neurônios Dogiel tipo II presentes no plexo mioentérico também apresentam projeções para a mucosa em todas as espécies onde essas projeções foram investigadas (Brehmer *et al.*, 1999b; Furness *et al.*, 2004b; Furness *et al.*, 1990b; Hens *et al.*, 2000).

Na verdade é provável que todos os neurônios Dogiel tipo II exibam projeções para a mucosa, embora isto tenha sido confirmado apenas no intestino de cobaia (Song *et al.*, 1994). Os processos neuronais direcionados para a mucosa fornecem inervação colateral para os neurônios

da submucosa, promovendo uma via de comunicação entre os plexos nervosos entéricos (Furness *et al.*, 1990b).

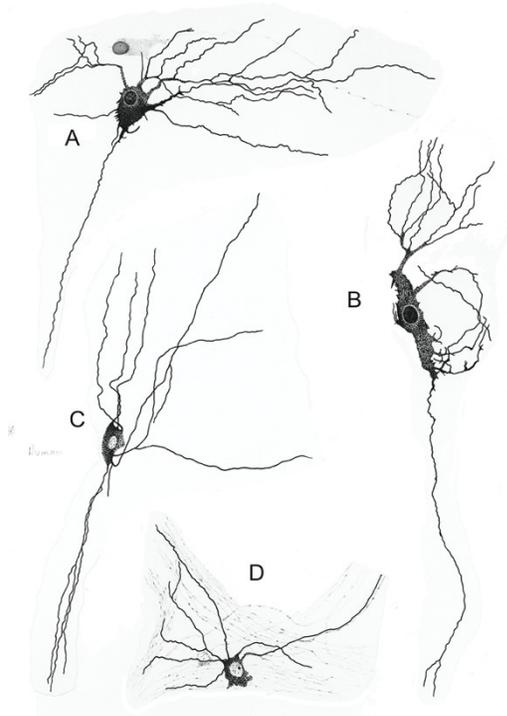


Figura 4: Exemplos de neurônios Dogiel tipo II. Os neurônios A e B são do plexo mioentérico do intestino delgado de cobaia, neurônio C do plexo mioentérico humano, e D do intestino grosso de cobaia. Adaptado de Dogiel (Dogiel, 1899).

Os neurônios tipo III foram descritos por Dogiel como possuindo de 2 a 10 processos dendríticos. Morfologicamente, estes dendritos são delgados e relativamente curtos comparados aos encontrados nos neurônios Dogiel tipo II. Os axônios dos neurônios Dogiel tipo III se assemelham aos dendritos e dificilmente suas terminações são identificadas (Figura 5). Mesmo com as ferramentas de pesquisa disponíveis, o reconhecimento destes neurônios é muito difícil. Uma das características mais marcantes deste tipo neuronal é a grande presença de filamentos intracelulares no corpo e nos prolongamentos dos mesmos (Lomax *et al.*, 1999; Portbury *et al.*, 1995)



Figura 5: Exemplos de neurônios Dogiel tipo III. Ambos neurônios são do plexo mioentérico do intestino delgado de cobaia. Adaptado de Dogiel (Dogiel, 1899).

Estudos imuno-histoquímicos extensivos demonstram que cada neurônio entérico contém várias substâncias cuja química e farmacologia são consistentes com a composição de neurotransmissores. Além disso, a análise farmacológica da transmissão revelou numerosos casos em que os neurônios entéricos liberam mais de um transmissor. Todo este conhecimento só foi possível com o desenvolvimento da técnica de fluorescência por Falck (Falck, 1962). A partir desta evolução foram observadas as características neuroquímicas de neurônios e identificados os neuropeptídeos que são substância que estariam presentes em grupos específicos de neurônios (Norberg, 1964). Principalmente após a década de 80 e a evolução da imuno-histoquímica, se identificou a coexistência de neuropeptídeos nos mesmos grupos neuronais, tanto no SNC como no SNE, abrindo uma nova era de estudos para codificação neuroquímica de neurônios (Hökfelt *et al.*, 1984; Hokfelt *et al.*, 1980; Schultzberg *et al.*, 1980). Entre os neuromoduladores identificados nos neurônios entéricos temos a acetilcolina, que passou a ser reconhecida através de uma enzima neuronal responsável por sua síntese, denominada colina acetiltransferase (ChAT) (Furness *et al.*, 1983), como também a somatostatina (Hökfelt *et al.*, 1975), a colecistoquinina (CCK), o peptídeo relacionado à gastrina (GRP), o neuropeptídeo Y (NPY), a substância P (SP), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e a serotonina (5-HT), dentre outros transmissores (Costa & Furness, 1982; Furness *et al.*, 1980; Schultzberg *et al.*, 1980; Sundler *et al.*, 1980).

Essencialmente, todos os tipos funcionais de neurônios entéricos foram caracterizados por suas formas, propriedades celulares neuroquímicas e fisiológicas na cobaia (Lomax & Furness, 2000; Timmermans *et al.*, 1997), em seus ortólogos em humanos e em várias outras espécies (Furness, 2006), porém no SNE humano essa caracterização ainda não foi realizada de forma conclusiva. Existem 15 tipos de neurônios no intestino delgado, um pouco mais no cólon e um

pouco menos no estômago e esôfago (Michel *et al.*, 2000). Os neurônios podem ser agrupados em quatro classes funcionais, neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs), interneurônios, neurônios motores e neurônios inestínofugais.

Neurônios motores excitatórios e inibitórios inervam o músculo liso longitudinal e circular e a *muscularis mucosae* ao longo do trato digestivo. Geralmente são neurônios uniaxoniais. Os principais transmissores dos neurônios excitatórios são a acetilcolina (ACh) e as taquicininas (TK). Os neurônios inibitórios têm vários transmissores, incluindo óxido nítrico (NO), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e adenosina trifosfato (ATP), que são liberados por cada neurônio. Os papéis relativos dos vários transmissores inibidores variam entre regiões e espécies (Bian *et al.*, 2000; Furness *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1999; Lepard & Galligan, 1999).

A *muscularis propria* é inervada principalmente por neurônios encontrados no plexo mioentérico, e secundariamente, por neurônios do plexo submucoso. Na maior parte das espécies, os neurônios motores são morfologicamente classificados como Dogiel tipo I (Costa *et al.*, 1996; Furness *et al.*, 1994; Nurgali *et al.*, 2004; Timmermans *et al.*, 1993).

Os interneurônios formam uma rede de neurônios semelhantes que funcionam tanto por via oral quanto anal conectando IPANs e neurônios motores (Portbury *et al.*, 1995; Young & Furness, 1995), no entanto, mais do que outras classes neuronais, eles podem variar entre as regiões, por exemplo interneurônios localizados no cólon são bastante diferentes daquele encontrados no íleo terminal, o que não ocorre com seus IPANs. No intestino delgado da cobaia, ocorrem três classes de interneurônios descendentes e uma classe de interneurônios ascendentes. Estudos detalhados de conexões sinápticas indicam que as cadeias formadas por dois dos tipos de interneurônios descendentes se interconectam (Mann *et al.*, 1997). Os interneurônios ascendentes parecem estar envolvidos em reflexos de motilidade local, assim como dois tipos de neurônios colinérgicos descendentes, aqueles que contêm NOS e aqueles que contêm 5-HT. Outro tipo de interneurônio descendente, o interneurônio ACh/SOM, pode estar ligado à passagem dos complexos mioelétricos migratórios ao longo do intestino. Estes são neurônios Dogiel tipo III com numerosos dendritos filamentosos ramificados e afilados (Portbury *et al.*, 1995).

As vias reflexas intrínsecas que estão envolvidas no controle das funções fisiológicas do intestino delgado e do cólon, ou seja, movimento intestinal, fluxo sanguíneo e secreção, são ativadas por meio de neurônios aferentes que respondem a vários estímulos, como distensão, química luminal, e estimulação mecânica da mucosa (Furness, 2006). Estes se conectam a outros

neurônios aferentes, a interneurônios e a motoneurônios em ambos plexos nervosos (Dogiel, 1899; Gershon & Kirchgessner, 1991). Desta forma esta classe neuronal pode desempenhar papel de interneurônio (quando recebe sinapses de outros neurônios) ou neurônio motor (quando causa, por exemplo, vasodilatação por meio de liberação de neurotransmissores no epitélio da mucosa) (Holzer *et al.*, 1991; Lewis, 1927). Cervero (Cervero, 1994) forneceu um valioso resumo das diferenças conceituais entre a inervação aferente de tecidos e órgãos e suas inervações sensoriais. Como ele aponta, a ativação de receptores viscerais (como quimiorreceptores arteriais, receptores de estiramento no pulmão e osmorreceptores no fígado) não evoca sensação e, portanto, o termo aferente é mais apropriado para designar os neurônios que carregam essa informação. Neste sentido os autores Kirchgessner e Gershon (Kirchgessner & Gershon, 1998) tiveram o cuidado de chamá-los de neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs), uma mudança na nomenclatura que foi seguida por outros autores, entre eles Furness (Furness *et al.*, 1998). Assim, quando os IPANs são referidos como sensoriais, deve-se lembrar que eles na verdade não transmitem nenhuma sensação a partir do intestino, mas sim recolhem informações sobre o estado físico do tecido que eles inervam e o ambiente químico, e transmitem essa informação para um circuito neuronal integrado, através do qual o estado funcional dos órgãos possa ser modificado. Morfologicamente, em sua maior parte, eles podem ser classificados como Dogiel tipo II (Furness, 2006).

Sharkey & Mawe (Sharkey & Mawe, 2002) identificaram que processos inflamatórios ou exposição prolongada às prostaglandinas (Manning *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 1998), poderiam alterar a funcionalidade dos IPANs.

Estudos utilizando amostras de tecido humano tentam há algum tempo decifrar as propriedades neuroquímicas dos neurônios entéricos, mas a maior parte destes estudos não apresentou resultados consistentes. Dentre os trabalhos que eficientemente estabeleceram correlações entre a neuroquímica, a morfologia e a fisiologia neuronal, destacamos os realizados por Axel Brehmer. Em 2004, Brehmer e sua equipe (Brehmer *et al.*, 2004a) realizaram a descrição morfológica de neurônios intestinais através do uso de marcadores para neurofilamentos neuronais (NF) e sua relação com os padrões de lipofuscina encontrados em neurônios de indivíduos de diferentes faixas etárias. Neste mesmo ano foi realizada a caracterização imuno-histoquímica de IPANs no intestino delgado (Brehmer *et al.*, 2004b). Em 2005, este autor descreveu a morfologia de neurônios do plexo mioentérico imunorreativos à encefalina (ENK) (Brehmer *et al.*, 2005a), VIP e NOS (Brehmer *et al.*, 2005b).

Estes trabalhos revelaram que a complexidade neuroquímica do SNE humano é maior do que se imaginava. Esta descoberta reporta a necessidade da realização de mais estudos que visem a caracterização destes neurônios, principalmente em indivíduos que não apresentem alterações patológicas no trato gastrintestinal, o que segundo Camilleri (Camilleri, 2001) alteraria o perfil neuroquímico destes neurônios. Assim sendo, este trabalho tem o objetivo de contribuir para o entendimento da caracterização neuroquímica e de neurônios Dogiel tipo II do SNE provenientes de amostras do cólon de pacientes não portadores de patologias intestinais. A partir de resultados obtidos por outros autores este estudo procura auxiliar na elucidação de questões relacionadas à codificação neuroquímica dos neurônios entéricos Dogiel tipo II.

JUSTIFICATIVA

O SNE possui três elementos neuronais responsáveis pela coordenação das funções do trato gastrointestinal. Estes são os neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs), as várias classes de interneurônios e neurônios motores. Estas e outras informações sobre os neurônios entéricos são baseadas, principalmente, em investigações em cobaia, até hoje o modelo animal mais estudado nessa área. Sabe-se que a divisão dos neurônios entéricos em três classes funcionais é válida para todas as espécies e que populações homólogas de neurônios possuem papéis correspondentes dentro de seus respectivos circuitos entéricos (Gershon *et al.*, 1994).

A forma mais eficiente para identificação de neurônios entéricos é através do seu código neuroquímico (Furness & Costa, 1980). Apesar desta classificação neuroquímica ter sido realizada de forma eficiente em modelos experimentais, os estudos em humanos apresentaram resultados consistentes somente a partir de 1990, quando começou-se a estabelecer uma inter-relação entre a morfologia, função e característica neuroquímica de neurônios entéricos humanos.

Camilleri e sua equipe (Camilleri *et al.*, 2001) demonstraram que neurônios entéricos provenientes de amostras humanas, cujo trato gastrointestinal encontrava-se sob condições patológicas, apresentavam alterações em sua codificação química. Desta forma, destaca-se a importância de caracterizar os neurônios quanto aos aspectos neuroquímicos e morfológicos em amostras de tecidos provenientes de indivíduos não portadores de patologias intestinais. Temos interesse particular nos neurônios Dogiel tipo II pela sua ampla distribuição no cólon e pela facilidade de caracterização morfológica. Walters e sua equipe (Walters *et al.*, 1993) trabalhando em amostras do trato gastrointestinal humano sugeriram que tanto o anticorpo anti-calretinina quanto o anti-calbindina poderiam ser empregados para o reconhecimento de subpopulações neuronais, identificando neurônios Dogiel tipo II no intestino. Brehmer e sua equipe (Brehmer *et al.*, 2004b) sugerem que o anticorpo anti-calretinina seria o mais adequado para identificação destes neurônios, enquanto Furness e sua equipe sugerem o anticorpo anti-calbindina (Furness *et al.*, 2004a).

Este trabalho tem como objetivo, através de marcadores imuno-histoquímicos, avaliar o melhor marcador para neurônios Dogiel tipo II e, em seguida utilizá-lo para identificar a co-expressão de neuromoduladores nesta classe de neurônios entéricos.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o melhor marcador de neurônios entéricos Dogiel tipo II e realizar uma caracterização neuroquímica desta classe de neurônios no SNE do cólon humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar através de imuno-histoquímica de dupla marcação calretinina/calbindina qual anticorpo é o melhor marcador de neurônios Dogiel tipo II do cólon humano;

Utilizar o anticorpo eleito como melhor marcador de neurônios Dogiel tipo II para identificar co-expressão dos neuromoduladores NOS, cChAT, VIP.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e amostras de tecidos

Neste estudo foram utilizadas amostras de cólon provenientes de necropsia de seis pacientes com idade entre 27 a 69 anos. Todos os pacientes envolvidos neste estudo tiveram a *causa mortis* não relacionada a patologias gastrintestinais (3 infartos cardíacos, 2 acidentes automobilísticos e 1 acidente vascular cerebral). Todas as amostras adquiridas tiveram o consentimento da família e o seu uso foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana do *Royal Melbourne Hospital* e da Universidade de Melbourne. Os tecidos foram coletados e fixados em solução de Zamboni (2% formol, 0.2% ácido pícrico em 0.1 M tampão fosfato pH 7.0) por 24h a 4°C. Em seguida as amostras passaram por banhos consecutivos (4 x 10 min) de dimetilsulfóxido (DMSO) seguidos de banhos em PBS (3 x 10 min). Após a fixação as amostras são abertas e esticadas em uma placa de petri com gel e fatiadas em pequenos cortes que foram posteriormente armazenados em solução de estoque (PBS, 30% glicose e 0.1% azida sódica) a 4°C.

Investigação imuno-histoquímica

Parte das amostras foram transferidas para um recipiente contendo uma mistura de 50% PBS, 30% glicose, 0.1% azida sódica e 50% de OCT (Tissue Tek, Elkhart, IN, USA) por um período de 24h antes de serem incluídas em OCT a 100%. Secções de 12µm de espessura foram feitas com o auxílio de um criostato Leica e permaneceram cerca de 1h à temperatura ambiente para secarem. Os fragmentos foram incubados com solução de soro de cavalo a 10% e triton X-100 a 1% por 30 minutos. A incubação com os anticorpos primários foi realizada por 24h a 4°C. A dupla marcação foi realizada utilizando a combinação de anticorpos descritos na Tabela 1. Após a incubação com anticorpos primários, as amostras passaram por banhos de PBS (3 x 10 min) e então incubadas por 1h à temperatura ambiente com os respectivos anticorpos secundários (Tabela 2). As amostras foram novamente submetidas a banhos de PBS (3 x 10 min) e montadas em meio Dako para amostras fluorescentes (DAKO, California, USA).

Após a caracterização morfológica, os neurônios Dogiel tipo I e tipo III foram excluídos deste estudo, pois este trabalho tem como objetivo somente a caracterização do tipo II (Figura 6).

Tabela 1: Relação de anticorpos primários utilizados para o estudo de imunofluorescência

ESPECIFICIDADE	TIPO	ORIGEM	DILUIÇÃO
Goat anti-calretinina	Policlonal	Zymed Lab., USA	1:1000
Mouse anti-calbindina	Policlonal	Dako, USA	1:1000
Rabbit anti-NOS	Policlonal	Zymed Lab., USA	1:400
Rabbit anti-VIP	Monoclonal	Peninsula Lab., UK	1:400
Rabbit anti-cChAT	Policlonal	Dako, USA	1:200

Tabela 2: Relação de anticorpos secundários utilizados para o estudo de imunofluorescência

ESPECIFICIDADE	ORIGEM	DILUIÇÃO
ALEXA Fluor 594 donkey anti-goat	A-21202; Mobitec, Germany	1:1000
ALEXA Fluor 647 donkey anti-rabbit	A-21447; Mobitec, Germany	1:1000
ALEXA Fluor 647 donkey anti-mouse	A-21432; Mobitec, Germany	1:1000

Aquisição e processamento de imagens

Para aquisição e análise de imagens foi utilizado microscópio confocal Bio-Rad MRC 1024 acoplado com Nikon diaphot 300 equipado com laser Krypton-argon (American Laser, Salt Lake City, USA). Imagens provenientes das amostras foram obtidas em duas diferentes ondas de excitações. Os filtros de excitação foram de 594 nm (ALEXA Fluor 594) e de 647 nm (ALEXA Fluor 647). Com auxílio de objetiva de 40x, aproximadamente 10 gânglios em cada plexo nervoso para cada amostra foram avaliados.

A imunorreatividade dos neurônios presentes nas amostras foi avaliada com o auxílio dos programas *Confocal Assistant 4.02*, *Adobe Photoshop 6.0* e *Corel Draw 11*. Cada reação de dupla marcação foi realizada em todas as amostras em um único experimento.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico ANOVA one-way. O nível de significância definido foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA) (ZAR, 1999).

RESULTADOS

Relação entre neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e calbindina-IR no cólon humano

Avaliou-se a expressão de calretinina e calbindina em gânglios nervosos dos plexos mioentérico e plexo submucoso do cólon de indivíduos não portadores de doenças intestinais. Aproximadamente 10 gânglios em cada plexo nervoso para cada amostra foram analisados (Tabela 3). Ambos anticorpos são imunorreativos para neurônios Dogiel tipo I e tipo II, e poucas vezes para o tipo III. Após a caracterização morfológica, os neurônios Dogiel tipo I e tipo III foram excluídos desta investigação, pois este trabalho tem como objetivo somente a caracterização do tipo II (Figura 6). Como o objetivo deste estudo é realizar uma caracterização neuronal, os plexos mioentérico e submucoso foram avaliados individualmente, o que no final desta avaliação nos permitirá uma visão geral da organização dos plexos entéricos do cólon.

Para verificar a correlação entre as duas proteínas avaliadas, os neurônios Dogiel tipo II foram classificados de acordo com a expressão das mesmas em: calr+/calb-, calr-/calb+ e calr+/calb+. A análise dos resultados no plexo mioentérico revelou que aproximadamente 55% dos neurônios são calr+/calb-, 35% calr-/calb+ e 20% calb+ /calb+ (Gráfico 1). Esses dados demonstram que cerca de 75% dos neurônios analisados são calretinina-IR, enquanto 55% são calbindina-IR. No plexo submucoso observou-se 51% dos neurônios calr+/calb-, 47% calr-/calb+ e 12% calr+/calb+, revelando que 63% dos neurônios são calretinina-IR enquanto 59% são calbindina-IR (Gráfico 2).

Apesar de não se observar diferenças estatísticas significantes entre a expressão dos dois anticorpos nos neurônios Dogiel tipo II analisados em ambos plexos entéricos, decidiu-se por continuar o estudo utilizando o anticorpo anti-calretinina devido ao maior número de neurônios identificados por este marcador e por apresentar um padrão de marcação neuronal mais eficiente (Figura 7).

Tabela 3: Número absoluto de neurônios Dogiel tipo II nos plexos submucoso e plexo mioentérico do cólon humano.

Paciente/Região	Plexo submucoso	Plexo mioentérico	Total
1	42	44	86
2	35	47	82
3	46	51	97
4	41	49	90
5	52	54	106
6	46	37	83

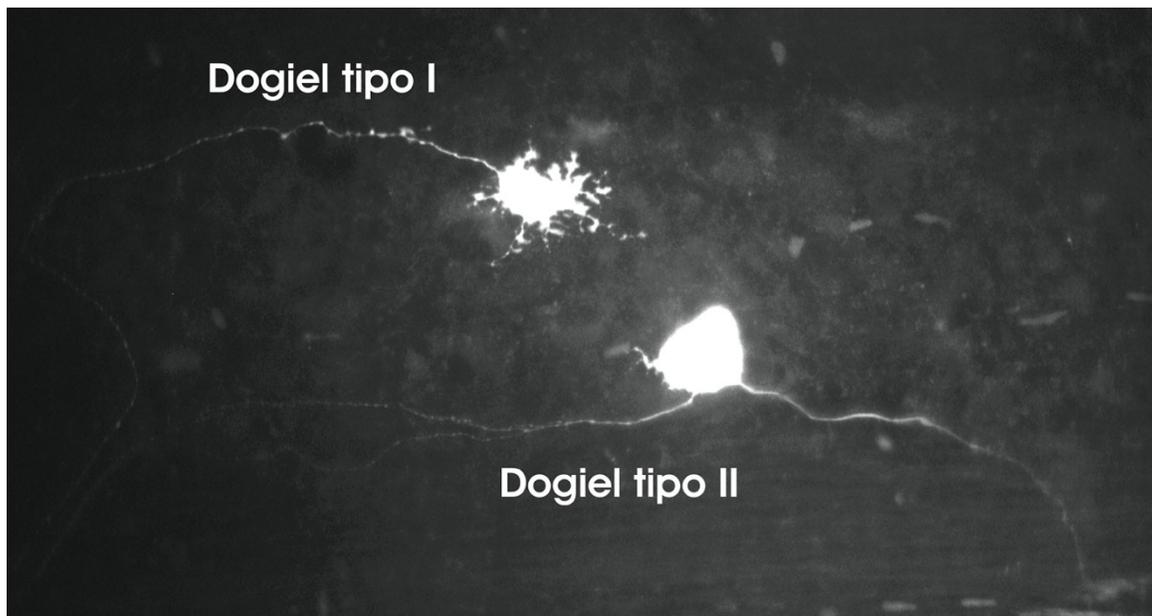


Figura 6: Diferenças morfológicas entre neurônios Dogiel tipo I e tipo II no cólon humano. Neurônios Dogiel tipo I corpo neuronal irregular e grande quantidade de dendritos. Neurônios Dogiel tipo II apresentam corpo neuronal regular e arredondado, além de poucos dendritos. Secção submetida à reação de imuno-histoquímica com anticorpo anti-calretinina. Objetiva de 40x. Imagem gentilmente cedida pela aluna Rachel Gwynne (pós-doutoranda da Universidade de Melbourne).

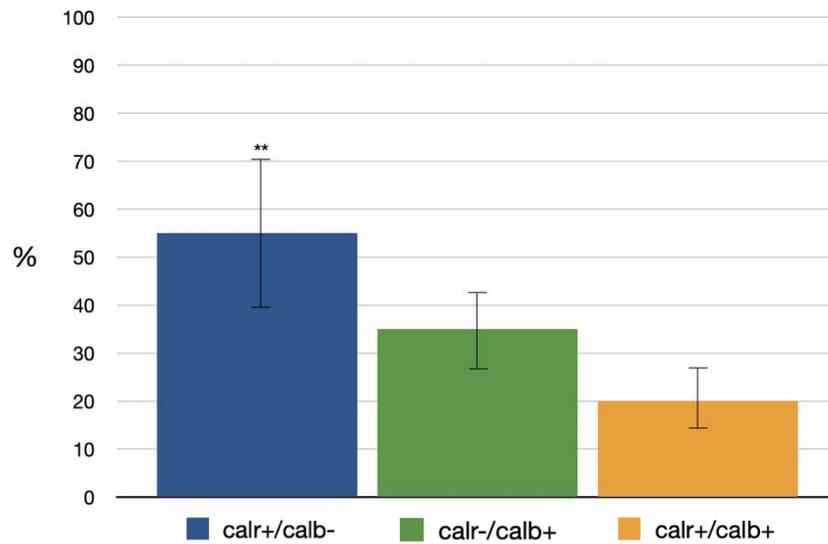


Gráfico 1: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e calbindina-IR no plexo mioentérico do cólon humano. Apesar de não haver diferença estatística relevante entre os grupos analisados, o número absoluto de neurônios calretinina-IR foi maior que o de neurônios calbindina-IR. **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

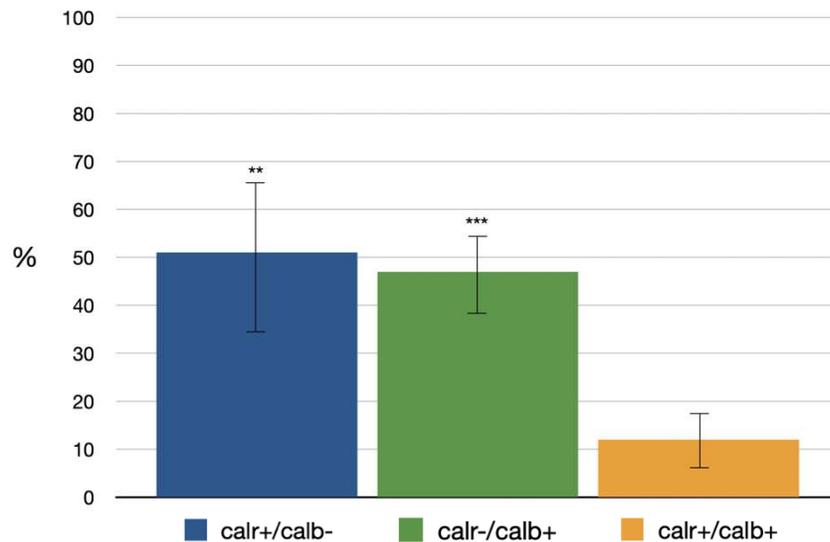


Gráfico 2: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e calbindina-IR no plexo submucoso do cólon humano. O número absoluto de neurônios calretinina-IR foi maior que o calbindina-IR apesar de não haver diferenças estatísticas entre eles. **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo; ***: diferença estatística entre o segundo e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

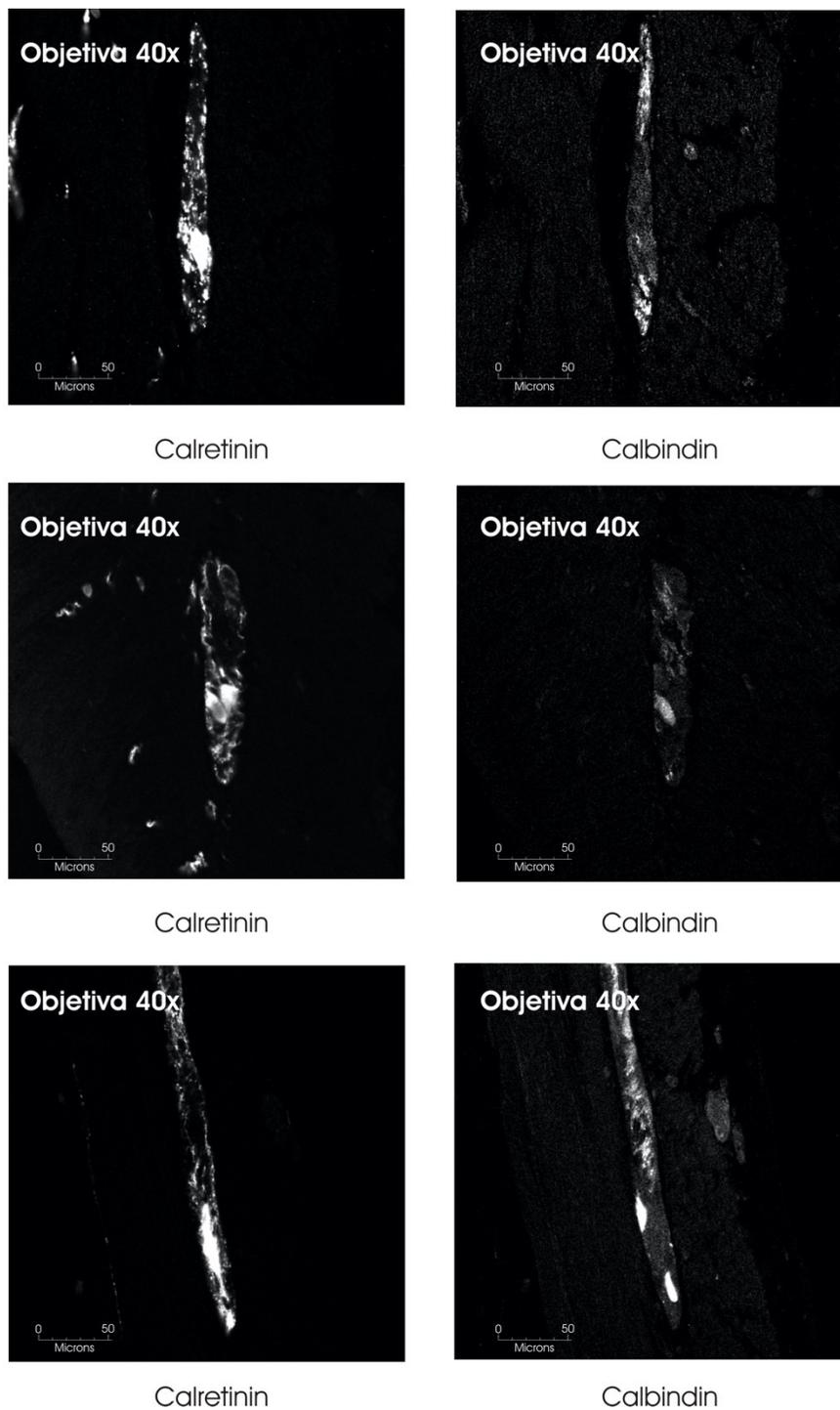


Figura 7: Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-calbindina no cólon humano. A análise das imagens revelou que o anticorpo anti-calretinina é um marcador neuronal mais eficiente que o anti-calbindina. Objetiva de 40x.

Relação entre calretinina e neuromoduladores em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano

Para caracterização dos neuromoduladores nos neurônios entéricos do cólon humano utilizou-se dupla marcação com calretinina e os neurotransmissores NO (NOS), ACh (cChAT) e VIP.

Relação entre a expressão de calretinina e NOS em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano

Para a avaliação da relação entre calretinina e NOS os neurônios foram classificados em três grupos: calr+/NOS-, calr-/NOS+ e calr+/NOS+. A análise dos dados de neurônios Dogiel tipo II do plexo mioentérico revelou que 57% dos neurônios expressaram somente calretinina e 43% expressaram somente NOS. Não foram observados neurônios positivos para ambos marcadores (Gráfico 3). Este resultado demonstrou que não há co-expressão entre calretinina e NOS em neurônios Dogiel tipo II do plexo mioentérico no cólon humano (Figura 8).

A avaliação dos neurônios Dogiel tipo II no plexo submucoso, entretanto, revelou que 47% dos neurônios expressaram somente calretinina, 40% expressaram somente NOS e 13% expressaram ambos marcadores (Gráfico 4). A análise destes resultados demonstra que ocorre dupla marcação usando calretinina e NOS no plexo no plexo submucoso, ao contrário do plexo mioentérico.

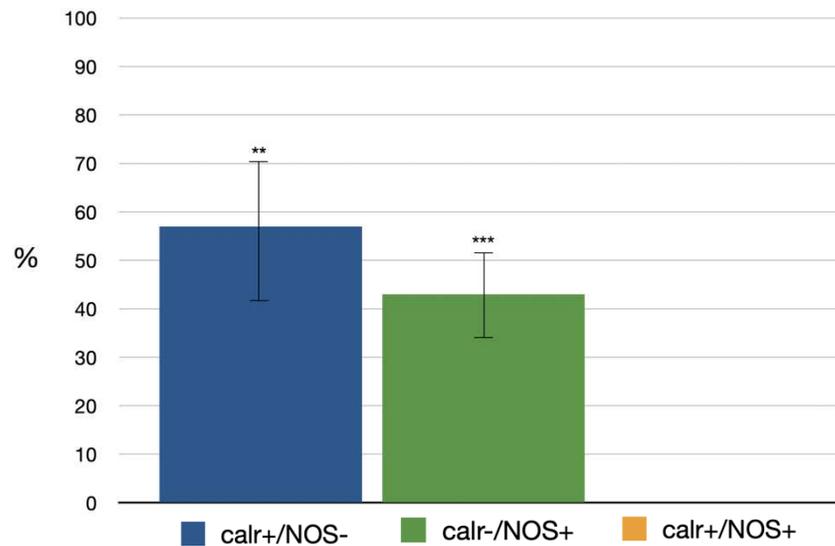


Gráfico 3: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calcitonina-IR e NOS-IR no plexo mioentérico do cólon humano. Não foram observados neurônios Dogiel tipo II que fossem ao mesmo tempo calcitonina-IR e NOS-IR. **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo; ***: diferença estatística entre o segundo e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

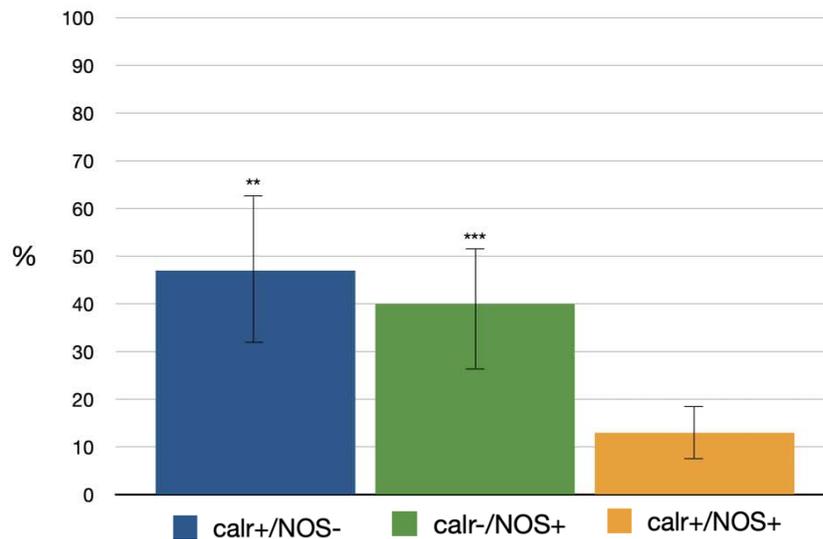


Gráfico 4: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calcitonina-IR e NOS-IR no plexo submucoso do cólon humano. Ao contrário do plexo mioentérico, no plexo submucoso encontramos neurônios Dogiel tipo II que expressem tanto calcitonina quanto NOS. **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo; ***: diferença estatística entre o segundo e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

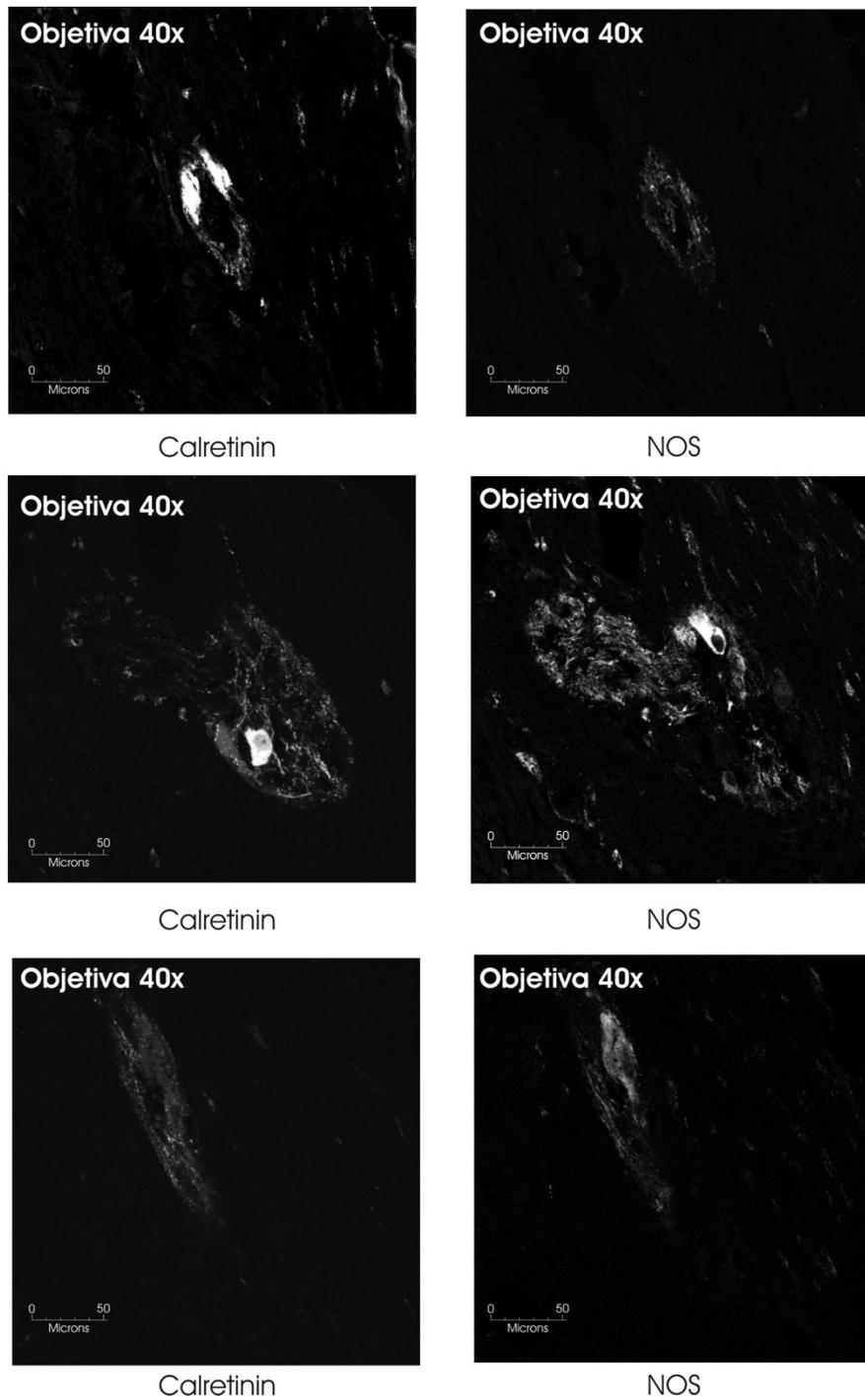


Figura 8: Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-NOS no cólon humano. A análise das imagens revelou que não existe correlação entre a expressão de calretinina e NOS em neurônios Dogiel tipo II do plexo mioentérico. Entretanto podemos observar essa relação no plexo submucoso, apesar de pequena. Objetiva de 40x.

Relação entre a expressão de calretinina e cChAT em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano

Foi realizada a avaliação sobre a relação entre calretinina e cChAT em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano. Os neurônios analisados foram classificados em três grupos: calr+/cChAT-, calr-/cChAT+ e calr+/cChAT+. A análise dos dados no plexo mioentérico revelou que nenhum dos neurônios expressou somente calretinina, 27% expressaram somente cChAT e a grande maioria (73%) expressou ambos os marcadores (Gráfico 5). No plexo submucoso obtivemos resultado semelhante ao encontrado do plexo mioentérico: nenhum dos neurônios analisados expressou somente calretinina, 18% expressaram somente cChAT e 82% expressaram ambos marcadores (Gráfico 6). Estes resultados sugerem que em ambos plexos nervosos do cólon, todos neurônios que expressem calretinina expressaram cChAT simultaneamente, embora nem todos neurônios cChAT-IR possuem calretinina (Figura 9).

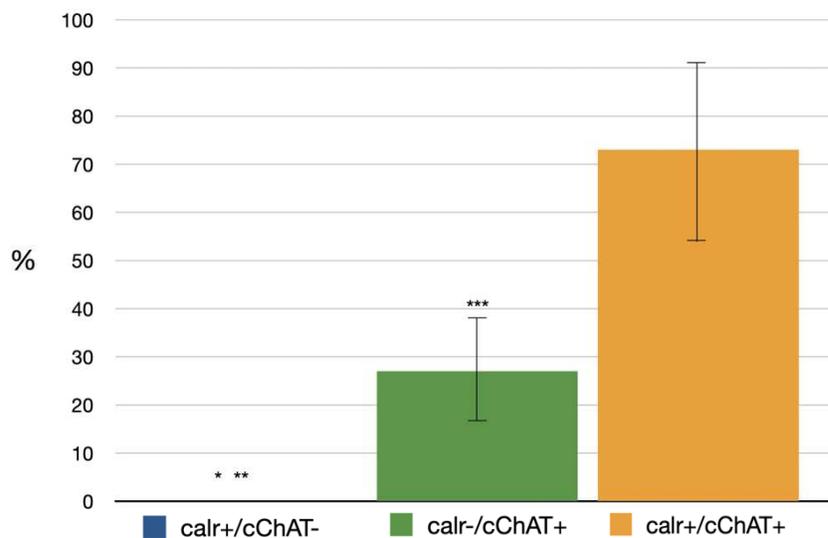


Gráfico 5: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e cChAT-IR no plexo mioentérico do cólon humano. A análise dos dados demonstrou que todos os neurônios calretinina-IR são também cChAT-IR, embora nem todos neurônios cChAT-IR expressem calretinina. *: diferença estatística entre o primeiro e o segundo grupo; **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo; ***: diferença estatística entre o segundo e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

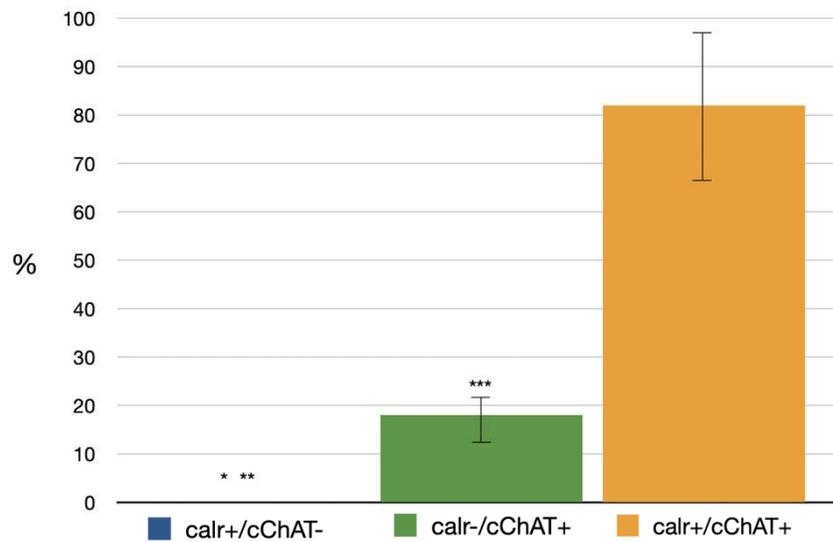


Gráfico 6: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR e cChAT-IR no plexo submucoso do cólon humano. Assim como no plexo mioentérico, a análise dos dados demonstrou que todos os neurônios calretinina-IR são também cChAT-IR, embora nem todos neurônios cChAT-IR expressem calretinina *: diferença estatística entre o primeiro e o segundo grupo; **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo; ***: diferença estatística entre o segundo e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

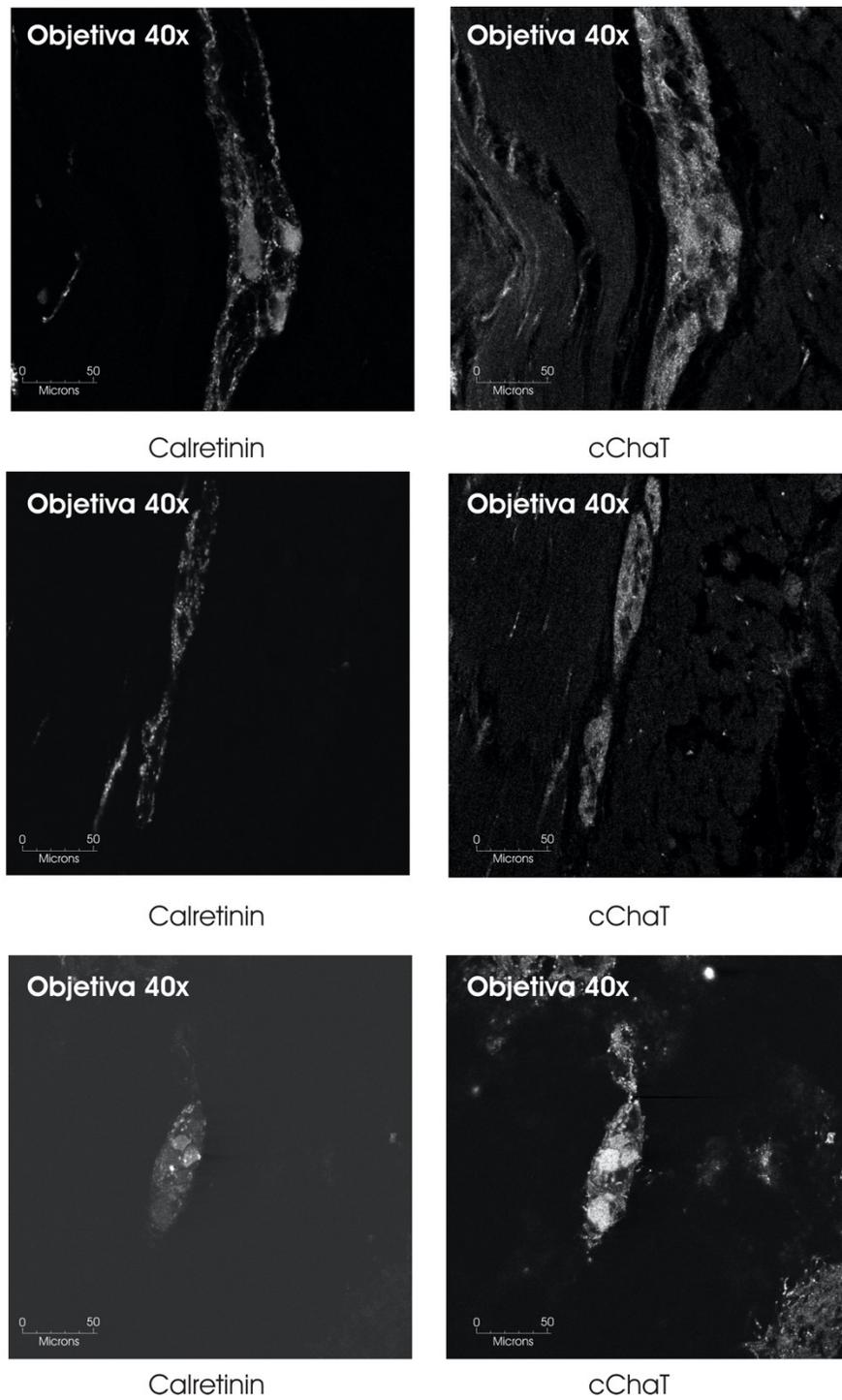


Figura 9: Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-cChAT no cólon humano. A análise das imagens revelou que todos os neurônios calretinina-IR são também cChAT-IR, embora nem todos neurônios cChAT-IR expressem calretinina. Objetiva de 40x.

Relação entre a expressão de calretinina e VIP em neurônios Dogiel tipo II do cólon humano

Avaliou-se a relação entre a expressão de calretinina e VIP nos neurônios Dogiel tipo II do plexo mioentérico e plexo submucoso do cólon humano. Os neurônios estudados foram classificados em três grupos: calr+/VIP-, calr-/VIP+ e calr+/VIP+. A análise dos dados no plexo mioentérico revelou que 15% dos neurônios expressaram somente calretinina, 32% expressaram somente VIP e 52% expressaram ambos marcadores (Gráfico 7). No plexo submucoso 8% dos neurônios expressaram somente calretinina, 52% expressaram somente VIP e 40% expressaram ambos marcadores (Gráfico 8). Este resultado demonstrou que a maior parte dos neurônios Dogiel tipo II calretinina-IR são também VIP-IR. Entretanto é possível observar neurônios que expressem somente um destes marcadores (Figura 10).

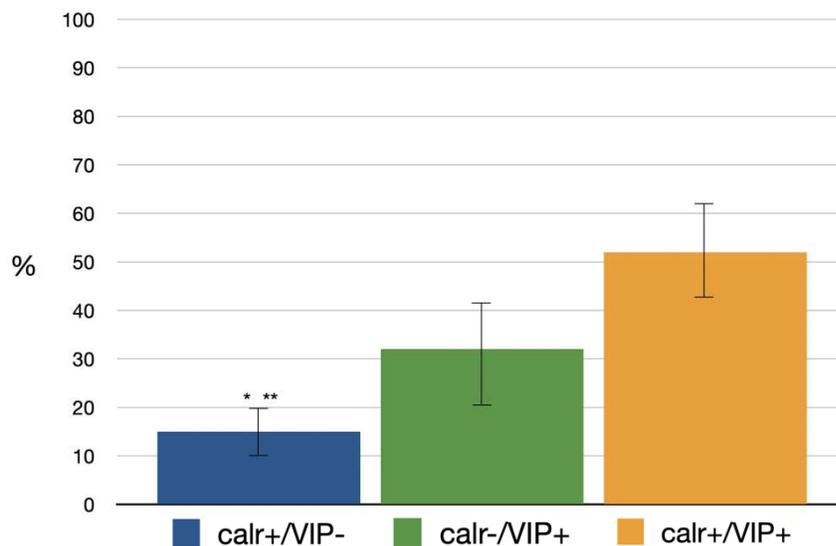


Gráfico 7: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II imunorreativos a calretinina e a VIP no plexo mioentérico do cólon humano. A análise dos dados demonstrou que a maior parte dos neurônios calretinina-IR são também VIP-IR, embora possamos observar neurônios que expressem somente calretinina e neurônios que expressem somente VIP. *: diferença estatística entre o primeiro e o segundo grupo; **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

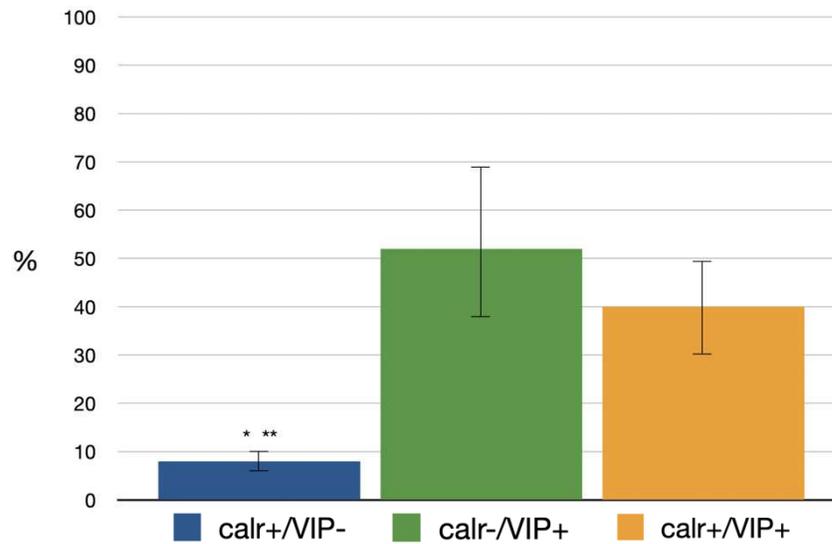


Gráfico 8: Porcentagem de neurônios Dogiel tipo II imunorreativos a calcitonina e a VIP no plexo submucoso do cólon humano. A análise dos dados demonstrou que a maior parte dos neurônios calcitonina-IR são também VIP-IR, embora possamos observar neurônios que expressem somente calcitonina e neurônios que expressem somente VIP. *: diferença estatística entre o primeiro e o segundo grupo; **: diferença estatística entre o primeiro e o terceiro grupo ($p < 0,05$).

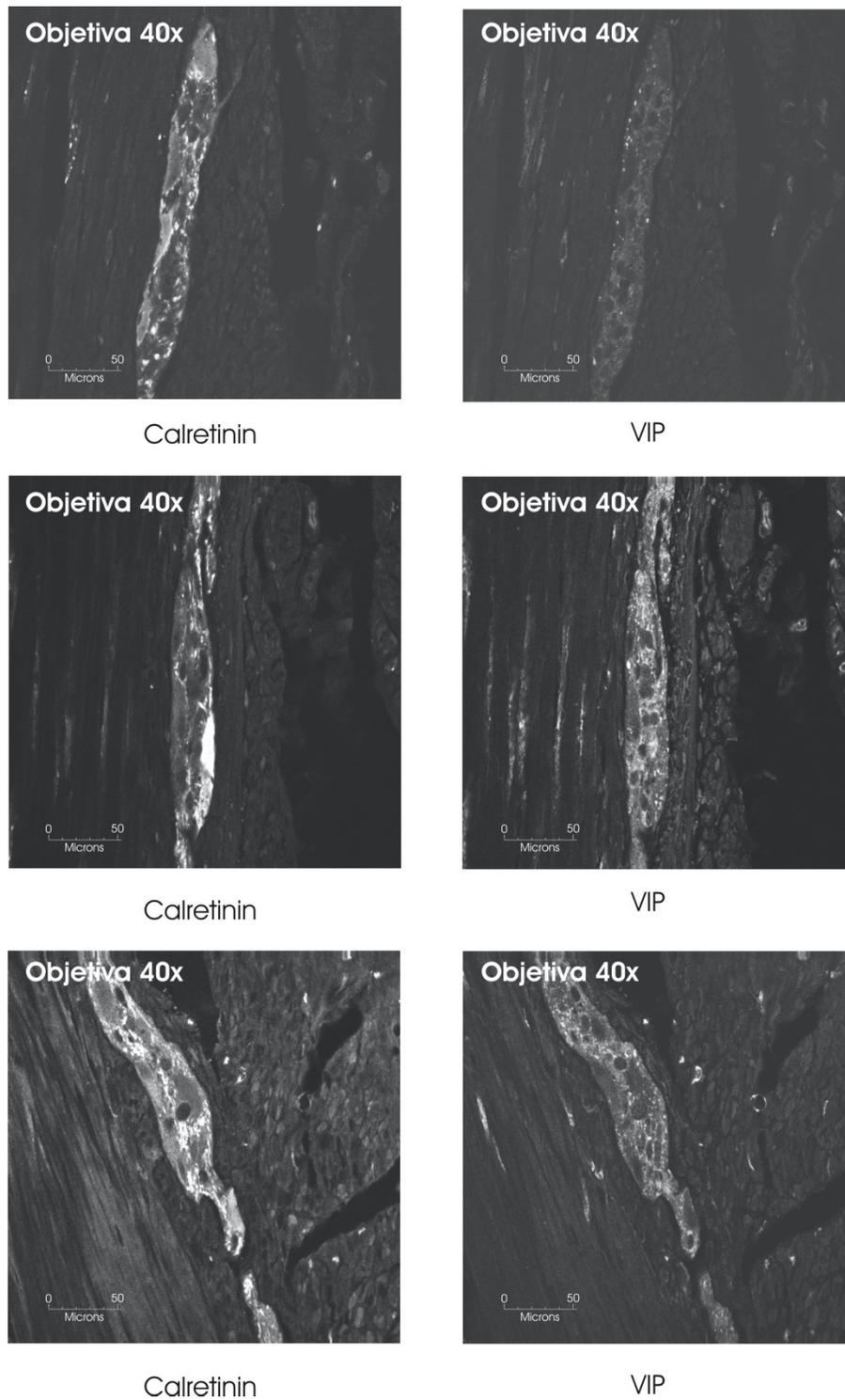


Figura 10: Dupla marcação de neurônios entéricos com anticorpos anti-calretinina e anti-VIP no cólon humano. A análise das imagens revelou que a maior parte dos neurônios calretinina-IR são VIP-IR. Entretanto podemos observar neurônios que são somente calretinina-IR e VIP-IR ($p < 0.05$). Objetiva de 40x.

DISCUSSÃO

O trato gastrintestinal (TGI) é o único órgão interno com seu próprio sistema nervoso, conhecido como sistema nervoso entérico, que está presente inteiramente dentro da parede intestinal e pode funcionar de forma totalmente independente do sistema nervoso central. O que é particularmente único no SNE e no TGI em comparação com todos os outros órgãos é que ele é capaz de responder a estímulos sensoriais *in vitro* (sem o envolvimento de aferentes extrínsecos) e pode gerar padrões motores neurogênicos complexos, mesmo quando isolados do animal (Furness, 1998). Às vezes é esquecido, mas o SNE é uma divisão inteira do sistema nervoso autônomo e desenvolveu todos os circuitos neurais necessários para responder não apenas a estímulos sensoriais, mas também desencadear vias neurais polissinápticas polarizadas que levam à contração muscular oral e relaxamento anal decorrentes de estímulos fisiológicos. A ativação de circuitos neurais entéricos, após estimulação local *in vitro*, é suficiente para impulsionar o conteúdo ingerido ao longo do intestino isolado (Furness, 2006).

Houve alguns avanços importantes para a compreensão dos neurônios do SNE nos últimos anos. Sabe-se que esses neurônios desempenham um papel importante na secreção de eletrólitos e água. Desde que os autores Kirchgessner e Gershon (Kirchgessner & Gershon, 1998) propuseram a terminologia “neurônio aferente primário intrínseco” para representar os neurônios mioentéricos Dogiel tipo II, que respondiam diretamente a estímulos mecânicos e/ou quimiossensíveis, sem transmissão sináptica (Furness, 2000), esta nova nomenclatura passou a ser utilizada por diversos autores, entre eles, Furness (Furness *et al.*, 1998).

Em contraste com a cobaia, o modelo animal mais comumente usado na neurociência entérica (Costa *et al.* 1996; Furness, 2006), o padrão de distribuição de calretinina em diferentes tipos de neurônios entéricos humanos é pouco conhecido (Brehmer, 2006), porém Brehmer e colaboradores (Brehmer *et al.*, 2004b) sugerem que o anticorpo anti-calretinina seria o mais adequado para identificação dos neurônios Dogiel tipo II, enquanto Furness e sua equipe sugerem o anticorpo anti-calbindina (Furness *et al.*, 2004a).

Este trabalho revelou que dentre as proteínas ligantes de cálcio já caracterizadas no SNE, a calretinina se mostrou mais eficiente que a calbindina tanto no plexo submucoso quanto no plexo mioentérico. Desta forma a calretinina foi usada como base para as outras comarcações, embora não houvesse uma diferença estatisticamente relevante entre elas. Após a análise das imagens

verificou-se que além do número absoluto de neurônios calretinina imunorreativos ser maior que os calbindina imunorreativos, o padrão de marcação da calretinina é mais fácil de ser visibilizado.

Brehmer (Brehmer, 2007) demonstrou um elo fundamental entre a morfologia e a química para a definição de subpopulações de neurônios mioentéricos humanos utilizando a imunohistoquímica para marcação de neurofilamentos. O autor ressaltou que posterior identificação morfológica e química de tipos de neurônios entéricos humanos pela aplicação de imunohistoquímica para neurofilamentos será de importância central para o desenvolvimento de diagnósticos histopatológicos de doenças intestinais. Uma vez que se determinou que os neurofilamentos coram apenas subpopulações de neurônios mioentéricos humanos (Ganns *et al.* 2006), outros marcadores estruturais devem ser incluídos em nossas investigações morfoquímicas.

Já foi anteriormente demonstrado que a calretinina pode ser co-localizada em neurônios mioentéricos SP+ no intestino delgado de humanos (Walters *et al.*, 1993), enquanto a co-localização de SOM e SP foi demonstrada por Accili *et al.*, 1995 e Hens *et al.*, 2001, mas não por Dhatt e Buchan, 1994.

Schuy e colaboradores (Schuy *et al.* 2011) encontraram uma pequena população de neurônios mioentéricos VIP+/NOS- (2%) e uma população substancial de neurônios NOS+/VIP- (até 40%) no intestino humano.

Neste trabalho foram utilizados os neuromoduladores NOS, cChAT e VIP em conjunto com a calretinina devido à ampla distribuição nos neurônios entéricos e por desempenharem importantes papéis no SNE de outras espécies (Furness, 2006). A co-expressão entre calretinina e NOS demonstrou que os neurônios do plexo mioentérico expressam somente calretinina ou NOS de forma isolada, e nunca ambos marcadores de forma conjunta. Já no plexo submucoso, revelou-se que existe uma pequena parcela de neurônios (cerca de 13%) que expressa os dois marcadores. Assim os resultados desta investigação apontaram que a co-expressão entre calretinina e NOS não é ideal para identificação neuroquímica dos IPANs.

Recentemente, analisando as camadas submucosa e mucosa do megacólon chagásico, Jabari e colaboradores (Jabari *et al.* 2012) encontraram uma ampla co-localização de calretinina com peptídeo intestinal vasoativo (VIP). No entanto Beuscher e sua equipe (Beuscher *et al.*, 2013) demonstraram que a imunorreatividade da calretinina no plexo submucoso não pode ser equiparada àquela observada no plexo mioentérico de intestinos humanos. No plexo nervoso submucoso, a calretinina marca uma população de neurônios distinta com o código químico

CALR+/VIP+/ChAT \pm e aparência multidendrítica. Esses neurônios, que inervam principalmente a mucosa, representam cerca de três quartos de todos os neurônios submucosos do cólon e cerca de um terço de todos os neurônios submucosos do intestino delgado. Em contraste, no plexo mioentérico, a calretinina é expressa em apenas cerca de um décimo da população de neurônios mioentéricos e principalmente não é co-localizada com VIP.

Já a análise da co-expressão entre calretinina e VIP realizada neste estudo demonstrou que cerca de metade dos neurônios com morfologia Dogiel tipo II (52%) apresenta a comarcação calretinina e VIP no plexo mioentérico e 40% no plexo submucoso. Este dado sobre a natureza imuno-histoquímica dos neurônios no plexo mioentérico e plexo submucoso no cólon humano reflete a especificidade funcional dos neurônios encontrados em diferentes plexos entéricos.

Avaliando intestinos humanos Beyer e seus colaboradores (Beyer *et al.*, 2013) encontraram que a maioria dos neurônios calretinina+ apresenta comarcação para cChAT, embora com intensidade consideravelmente diferente. No intestino grosso, os neurônios calretinina+/cChAT+ representavam a maior população (76% no plexo submucoso externo e 57% no plexo submucoso interno). No intestino delgado eles variavam entre 19% (plexo submucoso interno) e 30% (plexo submucoso externo). Em uma proporção substancial de neurônios calretinina+ a comarcação com cChAT não pôde ser observada (6% e 12% de todos os neurônios). Considerando todos os neurônios calretinina imunorreativos como 100%, a relação de neurônios cChAT+ e cChAT- variou entre 77,5% e 22,5% no plexo submucoso externo do intestino delgado e 92,7% a 7,3% no plexo submucoso externo do intestino grosso.

O presente estudo investigou a co-expressão entre calretinina e cChAT em neurônios Dogiel tipo II. Os resultados apontaram que no plexo mioentérico a grande maioria dos neurônios foi positiva para ambos os marcadores (73%), enquanto nenhum apresentou calretinina de forma isolada (calretinina+/cChAT-) e somente 27% mostrou cChAT isoladamente (calretinina-/cChAT+). Já no plexo submucoso, o resultado foi semelhante, alcançando 82% de co-expressão entre esses dois marcadores, o que demonstra que a combinação calretinina e cChAT é eficiente para identificação de neurônios Dogiel tipo II tanto no plexo mioentérico quanto no plexo submucoso.

Ressalta-se que, em contraste com os neurônios submucosos, os neurônios mioentéricos calretinina imunorreativos pertencem a pelo menos dois tipos diferentes de neurônios, Dogiel tipo II (aférente), e Dogiel tipo I (suposto motor e/ou interneurônios) (Beuscher *et al.*, 2013). Dado que

a caretinina é frequentemente utilizada como um marcador imuno-histoquímico para o diagnóstico histopatológico de neuropatias intestinais humanas, é importante considerar sua distribuição diferencial em pelo menos um tipo de neurônio submucoso e dois tipos de neurônios mioentéricos.

Visando diminuir a heterogeneidade funcional entre as diferentes classes neuronais do cólon humano, este trabalho procurou identificar as várias combinações de neuropeptídeos em um tipo específico de neurônio, o Dogiel tipo II. Porém não foi possível encontrar, com os marcadores utilizados, o código químico que abrangesse 100% desta classe neuronal em ambos os plexos entéricos. Considera-se a imunorreatividade distinta para subpopulações neuronais (Sayegh & Ritter, 2003) como possível causa para este desfecho, bem como a variação no código químico neuronal em decorrência de condições patológicas (Camilleri, 2001; Schneider *et al.*, 2001).

As análises realizadas até o momento não obtiveram identificação neuroquímica única para a totalidade dos diferentes tipos de neurônios entéricos humanos (Beuscher *et al.*, 2013; Beyer *et al.*, 2013; Brehmer *et al.*, 2004b), porém Brehmer (Brehmer, 2007) descreveu o valor da coloração imuno-histoquímica para neurofilamentos, um importante componente do citoesqueleto de subgrupos de neurônios, tanto para a identificação quanto para a discriminação entre diferentes tipos de neurônios, que são visibilizados por suas arquiteturas, em particular os IPANs mioentéricos em humanos e porcos.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho e os achados de Brehmer (Brehmer, 2007), o possível acréscimo da marcação de neurofilamentos em neurônios Dogiel tipo II como um terceiro neuropeptídeo na associação entre calretinina e cChAT poderia resultar em maiores níveis de positividade na identificação desta classe neuronal em estudos futuros.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, ainda não foi possível definir uma co-localização de neuromarcadores específica do tipo padrão para neurônios Dogiel tipo II, que os diferencie de todos os outros neurônios mioentéricos no intestino humano. No entanto, a combinação entre calretinina e cChAT é uma das mais promissoras já identificadas por estudos científicos (73% no plexo mioentérico e 82% no plexo submucoso) do cólon humano. Acredita-se que estudos futuros que visem avaliar a marcação neuroquímica dos IPANs e também de outros neurônios poderão alcançar maiores níveis de positividade, ao acrescentar, por exemplo, um terceiro marcador. Esses estudos de identificação podem ser importantes nas análises histopatológicas e na otimização do diagnóstico precoce de diversas patologias que afligem o trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accili, E. A., Dhatt, N., Buchan, A. M. J.** (1995). Neural somatostatin, vasoactive intestinal polypeptide and substance P in canine and human jejunum. *Neuroscience Letters*, **185**, 37-40. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)11219-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)11219-9)
- Auerbach, L.** (1862a). Ueber einen Plexus gangliosis myogastricus. *Jahres-Bericht. Abh. Schlesischen. Gesells. Vaterland. Cult.*, **39er**, 103-104.
- Auerbach, L.** (1862b). Ueber einen Plexus myentericus, einen bisher unbekanntem ganglionnervösen Apparat im Darmkanal der Wirbelthiere, Verlag von E. Morgenstern, Breslau.
- Auerbach, L.** (1864). Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, **30**, 457-460. <https://doi.org/10.1007/BF02280956>
- Balemba, O. B., Grøndahl, M. L., Mbassa, G. K., Semuguruka, W. D. and Hay Smith, A.** (1998). The organisation of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry. *Journal of Anatomy*, **192**, 257-267. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19220257.x>
- Berkley, H. J. and Baltimore, M. D.** (1893). The nerves and nerve endings of the mucous layer of the ileum, as shown by the rapid Golgi method. *Anatomischer Anzeiger*, **8**, 12-19.
- Beuscher, N., Jabari, S., Strehl, J., Neuhuber, W. Brehmer, A.** (2013). What neurons hide behind calretinin immunoreactivity in the human gut. *Histochemistry and Cell Biology*, **141**, 393-405. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1163-0>
- Beyer, J., Jabari, S., Rau, T. T., Neuhuber, W. Brehmer, A.** (2013). Substance P- and choline acetyltransferase immunoreactivities in somatostatin-containing, human submucosal neurons. *Histochemistry and Cell Biology*, **140**, 157-167.
- Bian, X., Bertrand, P. P. and Bornstein, J. C.** (2000). Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum. *Journal of Physiology (London)*, **528**, 551-560. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00551.x>
- Billroth, T.** (1858). Einige Beobachtungen über das ausgedehnte Vorkommen von Nervenastomosen im Tractus Intestinalis. *Arch. Anat. Physiol. Leipzig*, 148-158.
- Brehmer, A.** (2006). Structure of enteric neurons. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, **186**, 1-94.
- Brehmer, A.** (2007). *New research on neurofilament proteins*, Roland K. Arlen, 99-114.
- Brehmer, A., Blaser, B., Seitz, G., Schrödl, F. and Neuhuber, W.** (2004a). Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. *Histochemistry and Cell Biology*, **121**, 13-20. <https://doi.org/10.1007/s00418-003-0603-7>
- Brehmer, A., Croner, R., Dimmler, A., Papadopoulos, T., Schrodli, F. and Neuhuber, W.** (2004b). Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, **112**, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.03.005>
- Brehmer, A., Lindig, T. M., Schrodli, F., Neuhuber, W., Ditterich, D., Rexer, M. and Rupprecht, H.** (2005a). Morphology of enkephalin-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochemistry and Cell Biology*, **123**, 131-138. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0757-6>

- Brehmer, A., Schrödl, F. and Neuhuber, W.** (1999a). Morphological classifications of enteric neurons- 100 years after Dogiel. *Anatomy and Embryology*, **200**, 125-135. <https://doi.org/10.1007/s004290050267>
- Brehmer, A., Schrödl, F. and Neuhuber, W.** (2005b). Morphology of VIP/nNOS-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0107-8>
- Brehmer, A., Schrödl, F., Neuhuber, W., Hens, J. and Timmermans, J.-P.** (1999b). Comparison of enteric neuronal morphology as demonstrated by DiI-tracing under different tissue-handling conditions. *Anatomy and Embryology*, **199**, 57-62. <https://doi.org/10.1007/s004290050209>
- Brehmer, A. and Stach, W.** (1998). Regional structural differences in the neuronal composition of myenteric ganglia along the pig small intestine. *Anatomical Record*, **250**, 109-116. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199801\)250:1%3C109::AID-AR11%3E3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199801)250:1%3C109::AID-AR11%3E3.0.CO;2-S)
- Brookes, S. J. H., Steele, P. A. and Costa, M.** (1991). Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* **42**, 863-878. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90050-X)
- Cajal, S. R. Y.** (1895). *Elementos de histologia normal y de technica micrographica*, Nicolas Moya, Madrid.
- Cajal, S. R. Y.** (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, Maloine, Paris.
- Camilleri, M.** (2001). Enteric nervous system disorders: genetic and molecular insights for the neurogastroenterologist. *Neurogastroenterol Motil*, **13**, 277-295. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2001.t01-1-00277.x>
- Cervero, F.** (1994). Sensory innervation of the viscera: Peripheral basis of visceral pain. *Physiol. Rev.*, **74**, 95-138. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.95>
- Clerc, N., Furness, J. B., Li, Z. S., Bornstein, J. C. and Kunze, W. A. A.** (1998). Morphological and immunohistochemical identification of neurons and their targets in the guinea-pig duodenum. *Neuroscience* **86**, 679-694. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00025-6)
- Costa, M., Brookes, S. J. and Hennig, G. W.** (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, **47 Suppl 4**, iv15-19; discussion iv26. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15
- Costa, M., Brookes, S. J. H., Steele, P. A., Gibbins, I., Burcher, E. and Kandiah, C. J.** (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* **75**, 949-967. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00275-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00275-8)
- Costa, M. and Furness, J. B.** (1982). Neuronal peptides in the intestine. *Br. Med. Bull.*, **38**, 247-252. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071768>
- Dhatt, N. and Buchan, A. M. J.** (1994). Colocalization of neuropeptides with Calbindin D28k and NADPH diaphorase in the enteric nerve plexuses of normal human ileum. *Gastroenterology*, **197**, 680-690. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90115-5)
- Dogiel, A. S.** (1895). Zur Frage über die Ganglion der Darmgeflechte bei den Säugetieren. *Anatomischer Anzeiger*, **10**, 517-528.
- Dogiel, A. S.** (1899). Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch. Anat. Physiol. Leipzig, Anat Abt Jg 1899*, 130-158.
- Drasch, O.** (1881). Beiträge zur Kenntnis des feineren Baues des Dunndarmes, insbesondere über die Nerven desselben. *Sitz. Akad. Wiss.*, **82**, 168-198.

- Falck, B.** (1962). Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. *Acta Physiol. Scand.*, **197**, Suppl. 1-26.
- Fang, S., Wu, R. and Christensen, J.** (1993). Intramucosal nerve cells in human small intestine. *Journal of the Autonomic Nervous System*, **44**, 129-136. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(93\)90025-P](https://doi.org/10.1016/0165-1838(93)90025-P)
- Furness, J. B.** (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, **81**, 87-96. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00127-2)
- Furness, J. B.** (2006). *The Enteric Nervous System*. Massachusetts: Blackell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470988756>
- Furness, J. B., Alex, G., Clark, M. J. and Lal, V. V.** (2003). Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. *Anatomical Record*, **272A**, 475-483. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10064>
- Furness, J. B., Bornstein, J. C., Pompolo, S., Young, H. M., Kunze, W. A. A. and Kelly, H.** (1994). The circuitry of the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility*, **6**, 241-253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.1994.tb00190.x>
- Furness, J. B., Bornstein, J. C., Smith, T. K., Murphy, R. and Pompolo, S.** (1989). Correlated functional and structural analysis of enteric neural circuits. *Archives of Histology and Cytology*, **52**, 161-166. https://doi.org/10.1679/aohc.52.Suppl_161
- Furness, J. B., Clerc, N., Gola, M., Kunze, W. A. A. and Fletcher, E. L.** (2000). Identification of component neurons and organisation of enteric nerve circuits. In *Neurogastroenterology - from the Basics to the Clinics* (eds. Krammer, H. J., and Singer, M. V.), pp. 134-147. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Furness, J. B. and Costa, M.** (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience*, **5**, 1-20. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90067-6)
- Furness, J. B. and Costa, M.** (1987). *The enteric nervous system*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Furness, J. B., Costa, M. and Eckenstein, F.** (1983). Neurons localized with antibodies against choline acetyltransferase in the enteric nervous system. *Neuroscience Letters*, **40**, 105-109. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90287-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90287-2)
- Furness, J. B., Costa, M., Franco, R. and Llewellyn Smith, I. J.** (1980). Neuronal peptides in the intestine: distribution and possible functions. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, **22**, 601-617.
- Furness, J. B., Costa, M. and Keast, J. R.** (1984). Choline acetyltransferase and peptide immunoreactivity of submucous neurons in the small intestine of the guinea-pig. *Cell and Tissue Research*, **237**, 329-336. <https://doi.org/10.1007/BF00217152>
- Furness, J. B., Kearney, K., Robbins, H. L., Hunne, B., Selmer, I.-S., Neylon, C. B., Chen, M. X. and Tjandra, J. J.** (2004a). Intermediate conductance potassium (IK) channels occur in human enteric neurons. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, **112**, 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.02.003>
- Furness, J. B., Kuramoto, H. and Messenger, J. P.** (1990a). 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*, **31**, 203-210. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(90\)90186-M](https://doi.org/10.1016/0165-1838(90)90186-M)
- Furness, J. B., Robbins, H. L., Xiao, J., Stebbing, M. J. and Nurgali, K.** (2004b). Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. *Cell and Tissue Research*, **317**, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0895-5>

- Furness, J. B., Trussell, D. C., Pompolo, S., Bornstein, J. C. and Smith, T. K.** (1990b). Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. *Cell and Tissue Research*, **260**, 261-272. <https://doi.org/10.1007/BF00318629>
- Furness, J. B., Young, H. M., Pompolo, S., Bornstein, J. C., Kunze, W. A. A. and McConalogue, K.** (1995). Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology*, **108**, 554-563. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90086-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90086-1)
- Gabella, G.** (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* **6**, 425-436. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90135-4)
- Gabella, G. and Trigg, P.** (1984). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *Journal of Neurocytology*, **13**, 49-71. <https://doi.org/10.1007/BF01148318>
- Ganns, D., Schrödl, F., Neuhuber, W., Brehmer, A.** (2006). Investigation of general and cytoskeletal markers to estimate numbers and proportions of neurons in the human intestine. *Histol. Histopathol.*, **21**, 41-51.
- Gershon, M. D. and Kirchgessner, A. L.** (1991). 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*, **33**, 185-187. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(91\)90198-C](https://doi.org/10.1016/0165-1838(91)90198-C)
- Gershon, M. D., Kirchgessner, A. L. and Wade, P. R.** (1994). *Intrinsic reflex pathways of the bowel wall. In Innervation of the gut: pathophysiological implications* (eds. Taché, Y., Wingate, D. L., and Burks, T. F.), pp. 275-288. CRC Press, Boca Raton.
- Goniaew, K.** (1875). Die Nerven des Nahrungsschlauches. *Arch. Mikr. Anatomie*, **11**, 479-496. <https://doi.org/10.1007/BF02933812>
- Gunn, M.** (1968). Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *Journal of Anatomy*, **102**, 223-239.
- Henle, J.** (1871). *Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. Band III., Abt. 2. Nervenlehre.*, Vieweg und Sohn, Braunschweig.
- Hens, J., Vanderwinden, J.-M., De Laet M.-H., Scheuermann, D. W., Timmermans J.-P.** (2001). Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *Journal of Neurochemistry*, **76**, 464-471. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00032.x>
- Hens, J., Schrödl, F., Brehmer, A., Adriaensen, D., Neuhuber, W., Scheuermann, D. W., Schemann, M. and Timmermans, J.-P.** (2000). Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *Journal of Comparative Neurology*, **421**, 426-436. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000605\)421:3%3C429::AID-CNE10%3E3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000605)421:3%3C429::AID-CNE10%3E3.0.CO;2-9)
- Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R. and Arimura, A.** (1975). Immunohistochemical evidence for the presence of somatostatin, a powerful inhibitory peptide, in some primary sensory neurons. *Neuroscience Letters*, **1**, 231-235. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(75\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(75)90066-X)
- Hökfelt, T., Johansson, O. and Goldstein, M.** (1984). Chemical anatomy of the brain. *Science*, **225**, 1326-1334. <https://doi.org/10.1126/science.6147896>
- Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M. and Schultzberg, M.** (1980). Peptidergic neurones. *Nature*, **284**, 515-521. <https://doi.org/10.1038/284515a0>

- Holzer, P., Livingston, E. H. and Guth, P. H.** (1991). Sensory neurons signal for an increase in rat gastric mucosal blood flow in the face of pending acid injury. *Gastroenterology*, **101**, 416-423. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90020-L](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)90020-L)
- Hoyle, C. H. V. and Burnstock, G.** (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *Journal of Anatomy*, **166**, 7-22.
- Irwin, D. A.** (1931). The anatomy of Auerbach's plexus. *American Journal of Anatomy*, **49**, 141-166. <https://doi.org/10.1002/aja.1000490106>
- Isisawa, M.** (1939). Existence des ganglions nerveux musquex dans le chorion de l'intestin grele humain. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1495-1498.
- Jabari, S., da Silveira, A. B., de Oliveira, E. C., Neto, S. G., Quint, K., Neuhuber, W., Brehmer, A.** (2012). Selective survival of calretinin- and varoactive-intetinal-peptide-containing nerve elements in human chagasic submucosa and mucosa. *Cell Tissue Res.*, **349**, 473-481. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1406-8>
- Johnson, P. J., Shum, O. R., Thornton, P. D. and Bornstein, J. C.** (1999). Evidence that inhibitory motor neurons of the guinea-pig small intestine exhibit fast excitatory synaptic potentials mediated via P2X receptors. *Neuroscience Letters*, **266**, 169-172. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00275-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00275-X)
- Kirchgessner, A. L. Gershon, M. D.** (1988). Projections of submucosal neurons to the myenteric plexus of the guinea pig intestine: in vitro tracing of microcircuits by retrograde and anterograde transport. *Journal of Comparative Neurology*, **277**, 487-498. <https://doi.org/10.1002/cne.902770403>
- Lawrentjew, B. J.** (1929). Experimentelle-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. II. Über den Aufbau der Ganglien der Speiserohre nebst einigen Bemerkungen über das Vorkommen und die Verteilung zweier Arten von Nervenzellen in dem autonomen Nervensystem. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, **18**, 233-262.
- Lepard, K. J. and Galligan, J. J.** (1999). Analysis of fast synaptic pathways in myenteric plexus of guinea pig ileum. *American Journal of Physiology*, **276**, G529-G538. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.2.G529>
- Lewis, T.** (1927). *The blood vessels of the human skin and their responses*, Shaw & Sons Ltd, London.
- Lomax, A. E. G. and Furness, J. B.** (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell and Tissue Research*, **302**, 59-73. <https://doi.org/10.1007/s004410000260>
- Lomax, A. E. G., Sharkey, K. A., Bertrand, P. P., Low, A. M., Bornstein, J. C. and Furness, J. B.** (1999). Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon. *Journal of the Autonomic Nervous System*, **76**, 45-61. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(99)00008-9)
- Lundgren, O.** (2000). Sympathetic input into the enteric nervous system. *Gut*, **47 Suppl 4**, iv33-35; discussion iv36. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv33
- Maifrino, L. B. M., Liberti, E. A., and De Sousa, R. R.** (2007). Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the mouse colon. *J. Morphol. Sci.*, **24**, 192-195.
- Mann, P. T., Southwell, B. R., Ding, Y. Q., Shigemoto, R., Mizuno, N., Furness, J. B.** (1997). Localisation of neurokinin 3 (NK3) receptor immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.*, **289**: 1-9. <https://doi.org/10.1007/s004410050846>
- Manning, B. P., Sharkey, K. A. and Mawe, G. M.** (2002). Effects of PGE₂ in guinea pig colonic myenteric ganglia. *American Journal of Physiology*, **283**, G1388-G1397. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00141.2002>

- McMillin, D. L., Richards, D. G., Mein, E. A. and Nelson, C. D.** (1999). The abdominal brain and enteric nervous system. *J Altern Complement Med*, **5**, 575-586. <https://doi.org/10.1089/acm.1999.5.575>
- Meissner, G.** (1857). Über die Nerven der Darmwand. *Z. Ration. Med. N. F.*, **8**, 364-366.
- Michel, K., Reiche, D. and Schemann, M.** (2000). Projections and neurochemical coding of motor neurones to the circular and longitudinal muscle of the guinea pig gastric corpus. *Pflügers Archive European Journal of Physiology*, **440**, 393-408. <https://doi.org/10.1007/s004240000299>
- Nakanishi, S., Mantani, Y., Haruta, Y., Yokoyama, Y. and Hoshi, N.** (2020). Three-dimensional analysis of neural connectivity with cells in rat ileal mucosa by serial block-face scanning electron microscopy. *J. Vet. Med. Sci.*, **82**, 990-999. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0175>
- Norberg, K. A.** (1964). Adrenergic innervation of the intestinal wall studied by fluorescence microscopy. *International Journal of Neuropharmacology*, **3**, 379-382. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(64\)90067-X](https://doi.org/10.1016/0028-3908(64)90067-X)
- Nurgali, K., Stebbing, M. J. and Furness, J. B.** (2004). Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *Journal of Comparative Neurology*, **468**, 112-124. <https://doi.org/10.1002/cne.10948>
- Palmer, J. M., Wong Riley, M. and Sharkey, K. A.** (1998). Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. *American Journal of Physiology*, **275**, G922-G935. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.5.G922>
- Peters, A., Palay, S. L. and Webster, H. d.** (1991). *The fine structure of the nervous system*, Oxford University Press, New York.
- Pompolo, S. and Furness, J. B.** (1988). Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. *Journal of Neurocytology*, **17**, 771-782. <https://doi.org/10.1007/BF01216705>
- Portbury, A. L., Pompolo, S., Furness, J. B., Stebbing, M. J., Kunze, W. A. A., Bornstein, J. C. and Hughes, S.** (1995). Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections. *Journal of Anatomy*, **187**, 303-321.
- Porter, A. J., Wattchow, D. A., Brookes, S. J. and Costa, M.** (1999). Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **14**, 1180-1187. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.1999.02026.x>
- Powley, T. L.** (2000). Vagal input to the enteric nervous system. *Gut*, **47 Suppl 4**, iv30-32. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv30
- Purves, D. and Lichtman, J. W.** (1985). Geometrical differences among homologous neurons in mammals. *Science*, **228**, 298-302. <https://doi.org/10.1126/science.3983631>
- Purves, D., Rubin, E., Snider, W. D. and Lichtman, J.** (1986). Relation of animal size to convergence, divergence, and neuronal number in peripheral sympathetic pathways. *Journal of Neuroscience*, **6**, 158-163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-01-00158.1986>
- Remak, R.** (1840). Neue Beiträge zur Kenntnis vom organischen Nervensystem. *Med. Z. Ver. Heilk. Preuss.*, **9**, 7-8.
- Remak, R.** (1852). Über mikroskopische Ganglien an den Asten des N. vagus in der Wand des Magens bei Wirbeltieren. *Vers. Ges. Dtsch. Naturf. Aerzte.*, 181-183.

- Richardson, K. C.** (1958). Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *American Journal of Anatomy*, **103**, 99-135. <https://doi.org/10.1002/aja.1001030105>
- Rodrigo, J., Hernández, C. J., Vidal, M. A. and Pedrosa, J. A.** (1975). Vegetative innervation of the esophagus. III. Intraepithelial endings. *Acta Anatomica*, **92**, 242-258. <https://doi.org/10.1159/000144444>
- Sanders, K. M. and Smith, T. K.** (1986). Motorneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of the canine proximal colon. *Journal of Physiology (London)*, **380**, 293-310. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016286>
- Sayegh, A. I. and Ritter, R. C.** (2003). Morphology and distribution of Nitric Oxide Synthase-, Neurokinin-1 receptor-, Calretinin-, Calbindin-, and Neurofilament-M- immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. *The Anatomical Record*, **271**, 209-216. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10024>
- Schabadasch, A.** (1930). Die Nerven des Magens der Katze. *Z. Zellforsch.*, **10**, 254-319. <https://doi.org/10.1007/BF02450698>
- Schemann, M., and Neunlist, M.** (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.*, **16**, Suppl 1, 55-59. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x>
- Scheuermann, D. W., Stach, W. and Timmermans, J. P.** (1987). Topography, architecture and structure of the plexus submucosus internus Meissner of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. *Acta Anatomica*, **129**, 96-104. <https://doi.org/10.1159/000146383>
- Schultzberg, M., Hökfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld J, F., Brown, M., Elde, R., Goldstein, M. and Said, S.** (1980). 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* **5**, 689-744. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90166-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90166-9)
- Schuy, J., Schlabrakowski, A., Neuhuber, W., Brehmer, A.** (2011). Quantitative estimation and chemical coding of spiny type I neurons in human intestines. *Cells Tissues Organs*, **193**, 195-206. <https://doi.org/10.1159/000320542>
- Sharkey, K. A. and Mawe, G. M.** (2002). Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, **2**, 669-677. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(02\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(02)00215-1)
- Singh, S., Mandal, M. B., Patne, S. C. U., and Pandey, R.** (2017). Histological characteristics of colon and rectum of adults and neonate rats. *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol*, **7**, 891-894. <https://doi.org/10.5455/njppp.2017.7.0619922062017>
- Singh, S., Shariff, A., Roy, T. S., and Kumar, H.** (2013). Prenatal development of the myenteric plexus in human sigmoid colon. *J. Morphol. Sci.*, **30**, 156-166.
- Song, Z. M., Brookes, S. J. H. and Costa, M.** (1994). All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neuroscience Letters*, **180**, 219-222. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90524-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90524-X)
- Stöhr, P.** (1934). Mikroskopische Studien zur Innervation des Magendarmkanals III. *Z. Zellforsch.*, **21**, 243-278. <https://doi.org/10.1007/BF00374058>
- Sundler, F., Håkanson, R. and Leander, S.** (1980). Peptidergic nervous systems in the gut. *Clin. Gastroenterol.*, **9**, 517-543.
- Tan, L. L., Bornstein, J. C., and Anderson, C. R.** (2010). The neurochemistry and innervation patterns of extrinsic sensory and sympathetic nerves in the myenteric plexus of the C57B16

- mouse jejunum. *Neurociense*, **166**, 564-579. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.034>
- Tanano, A., Hamada, Y., Takamido, S., Kataoka, Y., Watanabe, J., Kamiyama, Y., and Yamada, H.** (2005). Structural development of PGP9.5-immunopositive myenteric plexus in embryonic rats. *Anatomy and Embryology*, **209**, 341-348. <https://doi.org/10.1007/s00429-005-0453-2>
- Timmermans, J.-P., Hens, J. and Adriaensen, D.** (2001). Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anatomical Record*, **262**, 71-78. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1%3C71::AID-AR1012%3E3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1%3C71::AID-AR1012%3E3.0.CO;2-A)
- Timmermans, J. P., Adriaensen, D., Cornelissen, W. and Scheuermann, D. W.** (1997). 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*, **118A**, 331-340. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00314-3)
- Timmermans, J. P., Barbiers, M., Scheuermann, D. W., Stach, W., Adriaensen, D. and De Groodt Lasseel, M. H. A.** (1993). Occurrence, distribution and neurochemical features of small intestinal neurons projecting to the cranial mesenteric ganglion in the pig. *Cell and Tissue Research*, **272**, 49-58. <https://doi.org/10.1007/BF00323570>
- Timmermans, J. P., Scheuermann, D. W., Stach, W., Adriaensen, D. and De Groodt Lasseel, M. H. A.** (1990). Distinct distribution of CGRP-, 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*, **260**, 367-379. <https://doi.org/10.1007/BF00318639>
- Walters, J. R. F., Bishop, A. E., Facer, P., Lawson, D. E. M., Rogers, J. H. and Polak, J. M.** (1993). Calretinin and calbindin-D28k immunoreactivity in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, **104**, 1381-1389. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90346-E](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90346-E)
- Young, H. M. and Furness, J. B.** (1995). An ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea-pig small intestine. *Journal of Comparative Neurology*, **356**, 101-114. <https://doi.org/10.1002/cne.903560107>
- Zar, J. H.** (1999). *Bioestatistical analysis*, 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 210-214.