

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

FERNANDA CHAVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA SEROTONINA E SEUS
RECEPTORES NO DESENVOLVIMENTO DA
CONSTIPAÇÃO INTESTINAL**

UBERLÂNDIA

2013

FERNANDA CHAVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA SEROTONINA E SEUS
RECEPTORES NO DESENVOLVIMENTO DA
CONSTIPAÇÃO INTESTINAL**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicada, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas

UBERLÂNDIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48a Oliveira, Fernanda Chaves de, 1987-
2013 Avaliação do papel da serotonina e seus receptores no desenvolvimento da constipação intestinal / Fernanda Chaves de Oliveira.
-- 2013.
47 f : il.

Orientadora: Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Serotonina - Teses. 3. Constipação - Teses. I. Freitas, Michelle Aparecida Ribeiro de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Dedico esse trabalho a uma pessoa que foi de grande importância para realização e concretização desse sonho, minha querida e grande amiga avó Fatima Braz Paulino. Ao meu esposo, meu grande incentivador e minha Mãe Elizabeth. Obrigada por fazerem parte da minha história.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro momento por estar presente em minha vida, sendo meu amigo e companheiro, e por guiar e direcionar todo o meu caminho;

Em especial ao meu filho, João Gabriel, um anjo, minha luz, fonte de incentivo e inspiração, força de todos os dias, meu TUDO que faz com que meus dias sejam radiantes de felicidades;

A toda minha família, meu suporte, ponto de partida. Minha mãe Elizabeth por toda renúncia e dedicação. Minha irmã, pela compreensão, suporte e horas de conversas sobre os trabalhos científicos. Obrigada a todos familiares pela credibilidade, confiança, paciência e esperança.

A minha orientadora Prof. Dra Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas a quem admiro pela conduta profissional e pessoal. Muitas vezes foi mais que uma orientadora, uma amiga, por isso tenho por ti um agradecimento imenso. Agradeço aos conhecimentos e as oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram dados no decorrer de todos esses anos. Agradeço ainda pelo incentivo, as palavras amigas e também as mais rígidas. Obrigada por confiar em mim e acreditar no meu trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alexandre Barcelos M. da Silveira. Meu agradecimento pelo exemplo profissional, pela oportunidade que me foi dada. Obrigado pelo incentivo e confiança que contribuíram para a minha formação científica, além de me proporcionar todos os conhecimentos deste trabalho.

Aos meus grandes amigos que pude conquistar durante a caminhada no mestrado, Débora, em especial, pois nunca me deixou desamparada, sempre disposta a ajudar o próximo, meu presente. Aos amigos Daniel, Taís, Moline, vocês fizeram dos meus dias mais felizes e com mais conhecimento. Agradeço a Deus por ter colocado vocês no meu caminho. A todos os amigos feitos no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Aos amigos mais distantes, que mesmo não estando trilhando o mesmo caminho, me fizeram mais forte e confiante. Agradeço vocês por estarem presentes em minha vida, dentre eles as amigas de graduação Talita e Iara, obrigada pela amizade, carinho e dedicação.

Aos amigos de laboratório, que estiveram sempre compartilhando da mesma rotina, em especial minha grande amiga Iliana Balga, você fez e fará a diferença em minha vida. A sua dedicação, incentivo é admirável, obrigada por tudo.

Obrigada aos professores, secretários, técnicos de laboratório, que nos acompanham para que no final tudo dê certo. Aos pacientes que fizeram parte desse trabalho, obrigada por nos permitir adquirir um pouco mais de conhecimento.

Obrigado a tudo e a todos que fizeram desse momento real e concretizado.

“BOM MESMO É IR A LUTA COM DETERMINAÇÃO, ABRAÇAR A VIDA E VIVER COM PAIXÃO, PERDER COM CLASSE E VIVER COM OUSADIA, POIS O TRIUNFO PERTENCE A QUEM SE ATREVE, E A VIDA É MUITO BELA PARA SER INSIGNIFICANTE.”

Charles Chaplin

RESUMO

A doença de Chagas afeta 8-10 milhões de pessoas na América. Na fase crônica da doença, os pacientes podem desenvolver alterações no trato gastrointestinal, e um deles é chamado megacôlon. Observa-se que a perturbação do sistema imunitário e do sistema nervoso entérico (SNE), esteja associada com esta forma de desenvolvimento. Algumas substâncias agem em ambos os sistemas e cumprem uma ligação entre os sistemas nervoso e imunológico. Uma dessas substâncias é a serotonina (5-HT), que compõe o grupo de aminas biogênicas (neurotransmissores). Cerca de 90% da serotonina existente no corpo humano é produzido no intestino. Dados anteriores indicaram que os níveis de serotonina intestinal pode proporcionar um equilíbrio entre o SNE e sistema imunitário. Para avaliar se os níveis de serotonina intestinal estão relacionados com a regulação do sistema imunológico, investigamos a relação entre a expressão de 5-HT, a intensidade do processo inflamatório e a denervação em amostras de cólon de pacientes com megacôlon. Foram avaliados, pela técnica de imunohistoquímica, amostras de cólon de pacientes submetidos a procedimentos de necropsia ou cirúrgico da Universidade Federal de Goiás (Goiânia, Minas Gerais, Brasil). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética UFU (ETIC n ° 110/11). Utilizaram-se os anticorpos ligados a marcadores de imunofluorescência para medir a presença de serotonina, linfócitos CD8 e periferina (marcador neuronal). Os nossos resultados indicaram que os baixos níveis de serotonina estão associados com o processo inflamatório intenso, alto grau de inflamação e com a constipação intestinal. Estes dados sugerem que a serotonina pode agir no intestino como um regulador do processo inflamatório e evitar a destruição neuronal.

Palavras chave: Doença De Chagas , Constipação intestinal, Serotonina, Sistema Nervoso Entérico.

ABSTRACT

Chagas' disease affects 8-10 million people in the Americas. In the chronic phase of this disease, patients can develop alterations in the gastrointestinal tract, and one of them is called megacolon. It is accepted that the disturbance of immune system and enteric nervous system (ENS) is associated with this form development. Some substances act in both systems and fulfill a link between the nervous and immune systems. One of these substances is the serotonin (5-HT) that composes the group of biogenic amines (neurotransmitters). About 90% of serotonin existent in the human body is produced in the intestine. Previous data indicated that the intestinal levels of serotonin may provide a balance between ENS and immune system. To evaluate whether serotonin intestinal levels are related with regulation of immune system, we investigated the relation among 5-HT expression, intensity of inflammatory process and denervation in colon samples from patients with megacolon. We evaluated, by immunohistochemistry technique, samples of colon from patients submitted to necropsy or surgical procedures at Federal University of Goias (Goiânia, Minas Gerais, Brazil). This work was approved by UFU Research Ethics Committee (ETIC n° 110/11). It was used antibodies linked with immunofluorescent markers to measure the presence of serotonin, CD8 lymphocytes and peripherin (neuronal marker). Our results indicated that low levels of serotonin are associated with intense inflammatory process, high degree of inflammation and with constipation intestinal. These data suggested that serotonin may act in the intestine as a regulator of inflammation process and avoid the neuronal destruction.

Keywords: Disease Chagas, Intestinal Constipation, Serotonin, Enteric nervous system,;

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Esquema do SNE observado em camadas (A) e em secção transversal (B). Existem dois plexos nervosos formados por gânglios; o plexo mientérico e o plexo submucoso, além das fibras nervosas que inervam as camadas musculares, a mucosa e as arteríolas intramurais. A ineração extrínseca tem acesso ao SNE através de nervos paravasculares e perivasculares (B)..... 22
- FIGURA 2** - Marcação de Periferina pela técnica de imunofluorescência. Indivíduos não infectados (A) apresentaram gânglios neuronais preservados, com corpos neuronais de formato regular e sem processo inflamatório. Indivíduos chagásicos (B) apresentaram gânglios disformes, corpos neuronais aumentados (seta)..... 32
- FIGURA 3** - Padrão de marcação de serotonina (azul) no SNE (verde). Em A, indivíduo não infectado. Em B, paciente chagásico constipado apresenta expressão de serotonina bem inferior à encontrada em pacientes não constipados..... 34
- FIGURA 4** - Padrão de marcação dos receptores de serotonina (vermelho) no SNE (verde). Em A, indivíduo não infectado. Em B, paciente chagásico constipado apresenta baixa expressão dos receptores de serotonina comparado aos indivíduos não infectados..... 35
- FIGURA 5** - Avaliação da relação entre a expressão de serotonina (azul) e a presença de linfócitos CD8 (vermelho) no SNE (verde). Em A, observamos indivíduo não infectado com acúmulo de serotonina (seta) próximo ao gânglio nervoso, o que parece afastar os linfócitos T CD8. Já em B, paciente chagásico portador de megacôlon, não apresenta serotonina próximo ao gânglio nervoso, o que parece não impedir a ação deletéria dos linfócitos T CD8 sobre seus neurônios (seta)..... 37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sexo, idade e diagnósticos dos indivíduos chagásicos e não chagásicos.....	28
TABELA 2 - Anticorpos primários	29
TABELA 3 - Anticorpos secundários	30
TABELA 4 - Análise morfométrica de neurônios imunorreativos à Peripherin nas regiões de plexo mientérico e plexo submucoso em amostras de cólon.....	33
TABELA 5 - Análise morfométrica da área imunorreativa de Serotonin na sérula das regiões de plexos nervosos e de mucosa de amostras de cólon.....	34
TABELA 6 - Análise morfométrica da área imunorreativa dos receptores de Serotonin nas regiões de plexos nervosos e de mucosa de amostras de cólon.....	36
TABELA 7 - Análise morfométrica da área imunorreativa de linfócitos CD8 nas regiões de plexos nervosos e de mucosa de amostras de cólon.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

SNE: Sistema Nervoso Entérico

SNC: Sistema Nervoso Central

IPANs: Neurônios Intrínsecos Primários Aferentes

VIP: Peptídeos Intestinais Vasoativos

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

5-HT: 5-Hidroxitriptamina: Serotonina

Tph: Triptofano Livre

Tph 1: Triptofano Livre 1

Tph 2: Triptofano Livre 2

CCK: Colecistoquinina

L TCD8: Linfócitos T CD8

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
a. Doença de Chagas.....	15
b. Sistema Nervoso Entérico.....	19
c. Serotonin.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
a. Pacientes.....	27
b. Preparo das amostras.....	28
c. 4.3. Imunohistoquímica.....	29
d. Aquisição de imagens dos gânglios.....	30
e. Análise Estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	32
a. Análise da inervação através da expressão de Periferina.....	32
b. Análise da expressão de serotonin.....	33
c. Análise da expressão dos receptores de serotonin.....	35
d. Análise da expressão de linfócitos T CD8.....	36
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 ao realizar estudos sobre a malária, na cidade de Lassance, interior de Minas Gerais (Lewinsohn, 1979). Pesquisando as doenças da região ele observou a presença de diversos insetos hematófagos nas casas de pau-a-pique e identificou neles um parasita flagelado, hoje conhecido como *Trypanosoma cruzi* no intestino de um triatomíneo. A partir daí, Chagas iniciou análises laboratoriais nesse parasito e descobriu que ele era nocivo para animais de laboratório. Após essa descoberta, rapidamente foi investigada e observada a presença desse parasito em animais silvestres, domésticos e no próprio homem. Após anos de estudo a respeito do parasito, Carlos Chagas descreveu aspectos relacionados à forma de transmissão, patologia, o agente causador, o vetor e as fases presentes na doença (Tanowitz et al., 1992).

A forma de transmissão da doença de Chagas pode ser caracterizada por mecanismo primário ou secundário. O mecanismo primário é representado pela forma vetorial, que ocorre através das fezes dos triatomíneos, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões” e o mecanismo secundário pode ser representado pela forma oral, transplante de órgãos, transfusão de sangue, transmissão congênita ou transmissão accidental. A infecção é transmitida, de pessoa a pessoa, através do sangue ou placenta. A maioria dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* alberga o parasito nos tecidos e sangue durante toda a vida (Coura, 2007). A transmissão oral tem sido a mais ocorrente no Brasil nos últimos anos, devido a contaminação de alimentos por triatomíneos infectados, os quais ao serem ingeridos, podem ocasionar a forma aguda da doença de Chagas. Em 2005 foi observado um surto da fase aguda da doença de Chagas em Santa Catarina, Brasil. Esse fato ocorreu através da ingestão de sucos contaminados através de barbeiros infectados triturados, os quais foram ingeridos por diversas pessoas, sendo três casos fatais (Andrade et al., 2011). Estes fatos vêm ocorrendo com certa frequência e são responsáveis pela presença de novos casos da doença em áreas onde a fase aguda não era detectada a mais de 15 anos (Dutra et al., 2009).

A infecção promovida pelo *T. cruzi* inicia a partir do momento da picada do inseto transmissor e ocorre por meio de fezes ou urina contaminadas com parasito. Após a sucção do sangue, que ocorre na maioria das vezes durante a noite, a forma tripomastigota penetra durante ou logo após o repasto sanguíneo através do local da picada (Dias & Laranja, 1948). O *T. cruzi*, na sua forma tripomastigota consegue penetrar ativamente através da mucosa ou pela conjuntiva ocular invadindo as células do hospedeiro, escapando dos mecanismos de defesa do organismo. Em

seguida o parasita, ao acessar vasos linfáticos e sanguíneos, é capaz de parasitar uma variedade de células em diversos órgãos. Dentro das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, inicia seu ciclo reprodutivo, e dão origem a novas formas tripomastigotas. Estas retornam à circulação sistêmica, reiniciando o ciclo (Dias, 1959).

O homem, ao ser infectado pelos parasitos, passa a ser portador da doença de Chagas, a qual é caracterizada por duas fases no decorrer da doença: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda dura de dois a quatro meses após a infecção pelo parasita, sendo caracterizada por sinais e sintomas clássicos de infecção (febre aguda, edema, dores musculares, sonolência, distúrbios respiratórios, meningoencefalite, miocardite, entre outros), e principalmente pela presença do sinal de Romaña, ou chagoma, uma lesão de porta de entrada, após a picada pelo mosquito vetor. Em crianças de até cinco anos de vida, os sintomas da infecção aguda apresentam-se de forma mais severa do que os observados em adultos. Nos jovens essa fase pode se apresentar como assintomática, não apresentando nenhuma alteração (Dias, 1994).

Durante a fase aguda, ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*. As formas tripomastigotas do parasita são encontradas no sangue do hospedeiro. A forma denominada amastigota pode ser observada difusamente em diversas células do organismo, incluindo os macrófagos, células da glia, células endoteliais, fibras musculares lisa, esquelética e cardíaca, fibroblastos, células de Schwann e neurônios (Tanowitz et al., 1992).

Após o período de fase aguda é observado um período marcado por uma longa fase crônica que é inicialmente assintomática, conhecida como fase aguda indeterminada. A transição entre a fase aguda e a fase crônica é acompanhada por uma diminuição da parasitemia devido à presença de uma resposta imune relativamente eficaz, que mantém a frequência parasitária abaixo dos níveis detectáveis durante toda a fase crônica. As formas crônicas mais freqüentes da doença de Chagas são as cardiopatias e dois tipos de enteromegalias, o megacolon e o megaesôfago, que atingem 95% da população humana com a doença (Andrade & Andrade, 1968).

A fase crônica da doença de Chagas é o período mais longo durante a evolução. O desenvolvimento ou não das formas sintomáticas da doença na fase crônica representa um dos aspectos diferenciais da doença de Chagas, podendo ocorrer um intervalo de 20 a 30 anos entre a fase aguda e a fase crônica sintomática. Alguns indivíduos portadores do chagoma chegam a falecer com 70 a 80 anos sem apresentar qualquer sintoma decorrente da infecção (Andrade, 1982).

A forma crônica cardíaca, pela sua gravidade e freqüência, é uma das formas mais bem estudadas da doença de Chagas, se caracterizando por produzir insuficiência cardíaca, transtornos do ritmo e da condução, fenômenos tromboembólicos e morte súbita. Pacientes portadores desta

forma clínica apresentam miocardite usualmente intensa e difusa, sendo acompanhada de cardiomegalia, quadros de trombose intracardíaca, lesões vasculares e fibrose (Koberle, 1956).

Pacientes portadores da forma digestiva apresentam sintomas decorrentes de comprometimento de órgãos deste sistema, principalmente do esôfago (Megaesôfago) e do cólon (Megacolon). Acredita-se que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do mega chagásico seja um processo degenerativo, que parece acontecer desde a fase aguda até a fase crônica, atingindo o Sistema Nervoso Entérico (SNE). Quando o paciente desenvolve o megacôlon chagásico, ocorrem distúrbios de motilidade associadas ao aumento do lúmen do órgão, obstipação e hipertrofia das camadas musculares. Essa forma da doença de Chagas pode estar presente como uma doença isolada ou associada ao megaesôfago e à cardiopatia chagásica. A principal expressão clínica do megacôlon chagásico é a constipação intestinal progressiva, seguida pela dificuldade na evacuação (Koberle, 1968).

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

No século 19, cientistas formularam a teoria da “autointoxicação intestinal” que atribuía o “envenenamento” à retenção dos próprios resíduos. Entretanto, há uma definição consensual que diz existir constipação intestinal quando ocorreram dois ou mais dos seguintes eventos, por no mínimo 12 semanas nos últimos 12 meses (Bassotti et al., 2004). Adicionalmente, subtipos de constipação, devidos a diferentes mecanismos, são reconhecidos: inércia colônica (motilidade lenta), dificuldade evacuatória (alteração funcional de assoalho pélvico, reto ou ânus) e constipação funcional quando há trânsito normal. Em estudo realizado em 1000 pacientes com constipação crônica, trânsito colônico normal foi a forma mais prevalente (59%), seguida por dificuldade evacuatória (25%), trânsito lento (13%) e combinação de distúrbio evacuatório com trânsito lento (3%) (Nyam et al., 1997).

Dados recentes indicam que a prevalência estimada em adultos na América do Norte varia de 1,9% a 27,2%, com média de 14,8%. O problema ocorre mais em mulheres, na proporção de 2,2:1, e em pessoas de mais de 65 anos. A constipação também é mais prevalente em indivíduos não-caucasianos e ocorre mais em crianças do que em adultos (Higgins & Johanson, 2004). Em

adultos, a constipação associa-se a outras co-morbidades (doenças neurológicas, psiquiátricas, proctológicas, endócrinas e metabólicas) e ao uso de muitos medicamentos com propriedades anticolinérgicas (opiôides, antidepressivos, diuréticos, anti-histamínicos, antiparkinsonianos, benzodiazepínicos, corticosteróides, fenotiazinas, propranolol, sais de ferro e laxativos em uso crônico que produzem o cólon catártico, isto é, aquele que funciona só à base de laxativos) (2005; Brandt et al., 2005).

Aceita-se que a ocorrência da constipação possa estar associada tanto à dieta e medicamentos adotadas pelo indivíduo quanto a desordens metabólicas e endócrinas apresentadas pelo mesmo. No entanto, sabe-se que é impossível que a constipação crônica ocorra sem a alteração de componentes do sistema nervoso entérico, como os neurônios, células de Cajal e células enterogliais (Lacerda-Filho et al., 2008). Sabe-se que, em patologias que afigem o trato gastrintestinal, a destruição de componentes do sistema nervoso entérico é comumente observada. Embora o mecanismo de lesão neuronal continue obscuro, a frequente observação de ganglionite e periganglionite aponta para a participação de células do sistema imune nesse processo patológico. Infiltrados inflamatórios são encontrados na muscular da mucosa, submucosa e camadas musculares (Adad et al., 2001; da Silveira et al., 2007a; da Silveira et al., 2007b).

Com o desenvolvimento da doença de Chagas, a dilatação ocasionada no cólon se torna irreversível, e isso representa a principal característica macroscópica do megacôlon, sendo sua causa primordial a perda de neurônios motores excitatórios. Essa perda leva a formação de um infiltrado constituído, sobretudo, por linfócitos, que podem ser os principais responsáveis pela lesão do SNE (da Silveira et al., 2007b). Nessa região podem ser observadas a presença de intensa destruição neuronal, chegando à completa aniquilação de alguns gânglios nervosos do plexo mientérico, ulcerações e inflamação crônica da mucosa (da Silveira et al., 2007a, da Silveira et al., 2007d).

Segundo da Silveira e cols (2011), o intestino contém uma população residente de células inflamatórias que contribuem para um estado fisiológico de inflamação basal. Dentre as células apresentadoras de antígeno no intestino pode-se observar a presença de células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, que no momento de um processo inflamatório apresentam-se em quantidade exacerbada. Dentre as células inflamatórias, observam-se também os eosinófilos e os mastócitos que são importantes, por terem capacidade de produzir substâncias envolvidas na defesa do hospedeiro e na função intestinal normal, incluindo as citocinas e as neurotrofinas (da Silveira et al., 2009b, da Silveira et al., 2008c, da Silveira et al., 2009d). Desta forma, a patologia ocasionada

pela forma digestiva da doença de Chagas está relacionada também com a denervação da complexa rede de neurônios intramurais, conhecidos como SNE (Kramer et al., 2011, Jabari et al., 2011).

1.2. Sistema Nervoso Entérico

O tubo digestivo apresenta uma estrutura de ineração extremamente complexa formada por fibras nervosas, neurônios agrupados em plexos, feixes de fibras nervosas e neuroglia. Esse conjunto de estruturas é denominado de Sistema Nervoso Entérico e apresenta um funcionamento relativamente independente do Sistema Nervoso Central (SNC). O SNE realiza funções complexas como: motilidade gastrointestinal, secreção de glândulas endócrinas e exócrinas, reflexo vasodilatador intrínseco (Furness, 1998, Furness et al., 1990a).

O SNE é considerado o “pequeno cérebro” do corpo humano, sendo localizado no trato digestório, mas pode exercer suas funções em outros órgãos como o pâncreas e sistema biliar. Essa localização desencadeia uma forma eficiente de deslocamento do controle visceral do SNC para o SNE (Furness et al., 1990a). As funções digestivas são reguladas por essa rede neural complexa, que se localiza desde a parede do intestino, se estendendo ao longo de todo comprimento a partir do esôfago, até o esfínter anal interno. Nesse sistema existem cerca de 80 a 100 milhões de neurônios dispersos ou reunidos em pequenos gânglios ou em dois plexos interconectados que são denominados como plexo mientérico e plexo submucoso. Ambos os plexos, constituintes do SNE, consistem de gânglios de neurônios entéricos e células enterogliais, interconectadas pelas fibras interganglionares (Furness et al., 1980, Furness et al., 1990b).

O plexo mientérico está localizado externamente ao submucoso, entre a camada longitudinal externa e a camada do músculo circular e formando uma rede contínua ao redor de todo trato digestivo tubular, do esôfago ao reto. Os neurônios presentes neste plexo controlam principalmente os movimentos gastrintestinais, sendo a maior parte dos mesmos de função eferentes (Furness et al., 1989).

O plexo submucoso é formado por uma rede contínua em torno da circunferência do SNE e por todo trato gastrintestinal, onde se observam duas ou três camadas de gânglios (Brehmer et al., 2004b, Brehmer et al., 1998). É encontrado no intestino delgado e no intestino grosso, com pouca predominância no esôfago e no estômago. Entre os neurônios que podem ser encontrados nesse plexo, alguns inervam a camada muscular interna e ocasionalmente a externa. São os responsáveis pelo controle da secreção epitelial gastrintestinal e do fluxo sanguíneo local (Brehmer et al., 2006).

Na constituição do SNE estão presentes neurônios entéricos organizados em gânglios ou isolados entre os feixes de fibras nervosas interconectantes. Eles podem ser classificados

funcionalmente como neurônios motores, interneurônios e neurônios intrínsecos primários aferentes (IPANs) ou neurônios sensitivos (Furness, 2006a). Estes podem ser identificados de acordo com a sua função, localização, forma, projeções, propriedades quantitativas e conexões (Furness, 2006b).

Os neurônios motores são divididos em dois grupos, os excitatórios e os inibitórios. Ambos estão localizados entre as regiões da muscular externa e da muscular interna, principalmente no plexo mientérico. Nesses neurônios podemos encontrar alguns neuromediadores, nos neurônios excitatórios são encontrados, por exemplo, a acetilcolina e a taquicinina, que são neurotransmissores que agem diretamente sobre o músculo liso e indiretamente podem agir através da rede de células intersticiais sobre o plexo muscular profundo. Já nos neurônios inibitórios é encontrado uma maior quantidade de neuromediadores, refletindo a existência de múltiplos mecanismos de transmissão inibitória, como o óxido nítrico, o trifosfato de adenosina, e os peptídeos intestinais vasoativos (VIP) e peptídeo de ativação pituitária, atuando diretamente no AMP cíclico presente no músculo liso ou indiretamente através de células intersticiais (Costa et al., 1980).

Os interneurônios podem ser localizados em todas as regiões do intestino, apresentando uma variação maior na constituição neuroquímica do que os outros neurônios. Devido a essa propriedade de variação apresentam funções diferentes dependendo da localidade onde atua, no SNE sua principal função é vincular os neurônios sensoriais aos motores, transmitindo e muitas vezes modulando o sinal. Outro tipo de neurônio que faz parte do SNE são os IPANs, denominados de neurônios sensoriais. A denominação IPANs foi dada a este tipo de neurônios, pois eles podem exercer papéis funcionais dos interneurônios, e também de neurônios motores. Apresentam a capacidade de traduzirem e também codificarem informações sobre o estado químico e físico do tecido que eles inervam. Eles transmitem informações para um circuito neuronal integrado, através do qual o estado funcional do órgão pode ser modificado (Furness, 2006a).

Experimentos realizados na década de 90 evidenciaram que os IPANs podem ser influenciados por processos inflamatórios que acontecem tanto no intestino delgado como no cólon. Em patologias inflamatórias intestinais, como são evidenciados na colite ulcerativa, os IPANs podem ter suas propriedades funcionais modificadas, alterando consequentemente a sinalização sensorial e o controle dos reflexos entéricos. Em modelos experimentais foram demonstrado a presença de prostaglandinas, como mediadores inflamatórios nesse processo (McKay and Fairweather, 1997).

Atualmente é aceito que o SNE contém mais de 30 neurotransmissores potenciais que podem afetar a atividade desses neurônios entéricos, músculos e células epiteliais. Esses neuromediadores possuem atividade considerável sobre o sistema imune. Um exemplo desses mediadores é a substância P, que estimula a produção de IL-2, a proliferação linfocitária, e também

o tráfego de linfócitos. Além disso, a substância P age como um dos ativadores de células *Natural Killer* e mastócitos e possui ação quimiotática para monócitos e neutrófilos. Outro neuromediador com atividade importante é o neuropeptídeo VIP, o qual tem a capacidade de inibir a resposta de células *Natural Killer* e de linfócitos T, bem como a produção de IL-2 e IL-4 por estas células (Furness et al., 1992). O sistema imune também influencia atividades do SNE através da secreção de vários tipos de substâncias, como por exemplo, a serotonina (Furness, 1998). No momento em que a mucosa encontra-se inflamada, ocorre alterações na produção de serotonina por células enteroendócrinas e o intestino passa a ser invadido por células imunes inatas e adaptativas (Li, 2011).

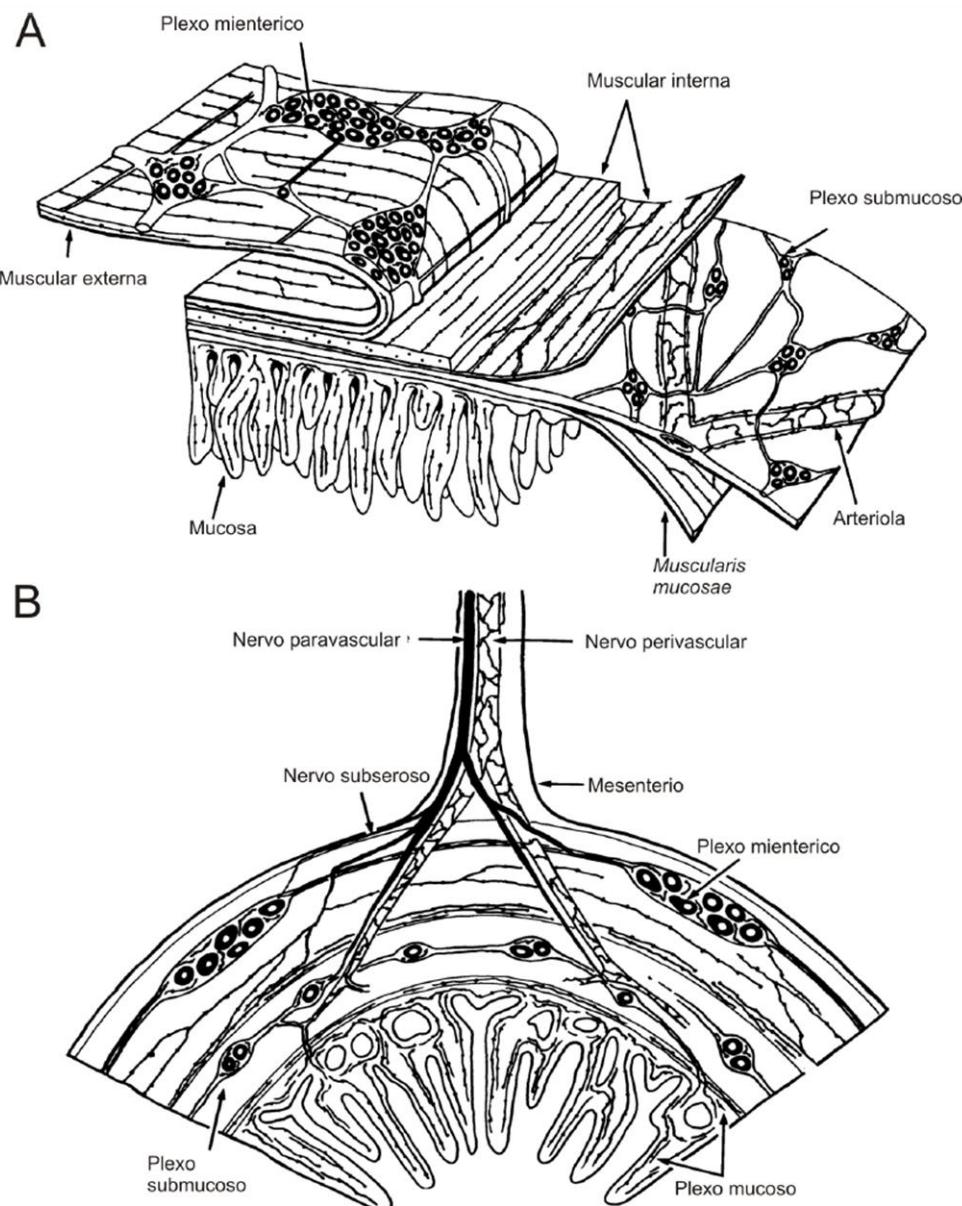


Figura 1: Esquema do SNE observado em camadas (A) e em secção transversal (B). Existem dois plexos nervosos formados por gânglios; o plexo mientérico e o plexo submucoso, além das fibras

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 (Furness & Costa, 1980), com permissão dos autores.

1.3. Serotonina

A serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT) compõe o grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores) que incluem também as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), sendo caracterizada como uma molécula sinalizadora gastrointestinal. Diferentes receptores são capazes de detectar este neurotransmissor, envolvido em várias patologias. Ela é sintetizada pelas células neuroendócrinas e por neurônios serotoninérgicos. Essa síntese é dependente da disponibilidade do triptofano livre (Tph) no plasma que é o aminoácido precursor dessa substância, sendo os responsáveis o Tph1 e o Tph2. No trato gastrointestinal a serotonina vem desempenhando um papel de neurotransmissor entérico, realizando a iniciação e propagação dos reflexos entéricos e a sinalização do intestino para o cérebro (Gershon, 1981, Gershon, 1982).

No núcleo da rafe, principalmente na parte dorsal da medula espinhal e no hipotálamo, pode ocorrer a secreção de serotonina por diversos neurônios. A serotonina atua como inibidora das vias de dor na medula, e estão relacionadas com as alterações de comportamento, ansiedade, sono, humor, depressão e supressão de apetite. Os mecanismos bioquímicos pelos quais os neurônios serotoninérgicos controlam essas funções ainda não estão totalmente esclarecidos (Crowell, 2004).

Sabe-se que a serotonina apresenta uma variedade de efeitos devido à presença de múltiplos subtipos de receptores presentes em neurônios, musculatura lisa e, possivelmente, nas células neuroendócrinas. Ela apresenta sete tipos ou famílias e múltiplos subtipos de receptores que já foram identificados, denominados como 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇. Os receptores 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ são distribuídos predominantemente no encéfalo (Sikander et al., 2009a). Os receptores de serotonina conhecidos por atuarem na função motora do intestino são os que pertencem aos subtipos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇ (Sikander et al., 2009a). Sobre esses receptores já foram descritas funções de efeitos contráteis suaves do músculo gástrico e também o relaxamento do colón (Sikander et al., 2009).

No intestino, a serotonina é responsável pela redução dos potenciais pós-sinápticos excitatórias registrado nos neurônios entéricos. A serotonina ainda pode fazer a contração ou relaxamento intestinal, dependendo das condições existentes. Assim, essa substância estimula neurônios colinérgicos, o que resulta na contração do músculo liso intestinal, ou, através da ativação de neurônios inibitórios nitrérgicos, estimula o relaxamento do músculo liso. Além disso, a

serotonina é apresentada como uma molécula sinalizadora, participando da transdução sensorial da mucosa. Quando aumenta a pressão intraluminal, as células enterocromafins (EC) liberam a 5-HT, o que estimula as fibras nervosas aferentes vagais e intrínsecas (entérica), iniciando o reflexo peristáltico. Assim sendo, a serotonina está diretamente envolvida na regulação gastrointestinal (Sikander, 2009).

Dentre os estudos que demonstram o envolvimento da serotonina no controle do transito intestinal, foi demonstrado que os receptores 5HT₄ são mediadores de diversas respostas do trato gastrintestinal. Estes, quando ativados, possuem a propriedade de aumentar a liberação de neurotransmissores, agindo indiretamente na sensibilidade visceral, relaxando células musculares lisas, atuando assim no processo de absorção de nutrientes localizados no lume intestinal. Esses receptores estão presentes em todos os segmentos do trato gastrintestinal humano, localizados principalmente nas camadas musculares e plexos mientéricos do estômago, cólon e reto humano (Gershon, 2000).

O reconhecimento da serotonina na transmissão de estímulos álgicos para o SNC, de como ela pode participar da motilidade digestiva e das secreções intestinais, estimulam a indústria farmacêutica a pesquisar intensivamente drogas que atuam nestes mecanismos. Além disso, já foram descritos resultados que indicam que os efeitos dos antagonistas dos receptores 5HT₃ podem resultar no aumento na velocidade do trânsito e da secreção intestinal, redução da complacência do cólon, além de influenciar diretamente a intensidade de processos inflamatórios no trato gastrintestinal através de sua ação em células do sistema imune (Gershon, 2000).

Alguns medicamentos que vem sendo mostrados por serem toleráveis e eficazes para as síndromes que ocasiona a constipação intestinal até agora são os antidepressivos, loperamida, antagonistas 5-HT3 e agonistas 5-HT4 (Spiller, 2002). Estes medicamentos apresentam a capacidade de aumentar os níveis de serotonina no intestino, impedindo a sua receptação após ser liberados, ocasionando desta forma uma redução no processo inflamatório ocasionado pela constipação intestinal (Gershon, 2009). Os antidepressivos são comumente utilizados em doses baixas e acredita-se que eles exerçam um papel de analgésico, em vez de um efeito antidepressivo (Spiller, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre o SNE de pacientes chagásicos nos últimos anos nos levaram a sugerir que a dilatação crônica do cólon se dê não só pela destruição de determinados grupos neurais, mas também pela interação do sistema imunológico com todo o trato digestório. Os dados que temos observado nos levam a sugerir que as lesões no SNE decorrentes da infecção chagásica levam o indivíduo a apresentar distúrbios de peristaltismo, falta de coordenação motora, retenção de fezes no reto e cólon sigmoide, hipertrofia muscular e a dilatação, levando ao aparecimento do megacôlon chagásico. Nossos dados sugerem que a destruição neuronal observada no mega chagásico possui relação direta com a intensidade do processo inflamatório e com a evolução da patologia (da Silveira et al., 2007a, da Silveira et al., 2009a, da Silveira et al., 2007c, da Silveira et al., 2009c, da Silveira et al., 2008a)

A partir destes dados, a caracterização da presença e distribuição dos receptores de serotonina baseia-se no fato de que a ativação ou inativação dos mesmos poderia conduzir a um processo de modulação do processo inflamatório desencadeado pela infecção chagásica, o que refletiria numa melhor regulação da peristalse intestinal e relativa redução da sensibilidade visceral.

Assim, para investigar a expressão de serotonina e de seus principais receptores no trato gastrointestinal, obtivemos um conjunto de amostras de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados. Acreditamos que a análise comparativa da expressão de serotonina, seus receptores, sua relação com o processo inflamatório e com a destruição neuronal nestes grupos de amostras poderá nos sugerir como se dão mecanismos referentes à manutenção da fisiologia do trato gastrintestinal diante do processo inflamatório crônico decorrente de uma infecção parasitária generalizada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a expressão de serotonina e seus receptores no trato gastrintestinal de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e relacionar estes dados com a intensidade do processo inflamatório e com a desnervação do órgão.

3.2. Objetivos Específicos

1 – Analisar o processo de destruição neuronal através da expressão do marcador pan-neuronal Peripherin em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados.

2 – Avaliar através de imunohistoquímica a expressão e distribuição de serotonina (5-HT) e seus receptores 5-HT₃ e 5-HT₄ em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados.

3 – Estudar a intensidade do processo inflamatório a partir da análise da presença de linfócitos T CD8 imunoreativos em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados.

4 – Relacionar o processo inflamatório com a expressão de serotonina e desnervação do órgão nas amostras analisadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes

Nesse trabalho utilizamos amostras de tecidos de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos controle, coletados por cirurgia ou necropsia no Hospital Escola da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, pelo Dr. Enio Oliveira. Foi obtido consentimento prévio de todos os indivíduos, pais ou responsáveis para a inclusão dos mesmos no trabalho de pesquisa. A utilização destas amostras com a finalidade de pesquisa científica foi previamente aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG), da Universidade de Erlangen-Nuremberg (Alemanha) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo o protocolo de análise final nº. 323/11 do comitê de ética em pesquisa para o protocolo registro CEP/UFU 110/11.

Os pacientes dos quais as amostras foram coletadas já apresentavam diagnóstico para doença de Chagas através de fixação do complemento, hemaglutinação ou imunofluorescência indireta para *T. cruzi*. O teste de fixação do complemento (1913), conhecido também como reação de Guerreiro e Machado, foi o único teste sorológico disponível por 50 anos. Em 1962, Cerisola e colaboradores descrevem a utilização do teste de hemaglutinação para o diagnóstico sorológico da infecção que é de fácil execução e bom desempenho. Pouco tempo depois (1966) Camargo aperfeiçoa a utilização do teste de imunofluorescência indireta. Este teste, de elevada sensibilidade, foi utilizado no inquérito nacional sorológico, com mais de um milhão de amostras em todo o Brasil, que determinou, com bastante precisão, a prevalência da doença. Dada a sua elevada sensibilidade, é ideal para estudos epidemiológicos, assim como para diagnóstico (Gomes, 1997). Os dados dos pacientes podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Sexo, idade e diagnósticos dos indivíduos chagásicos e não chagásicos

Grupos	Gênero	Idade	Megacôlon	Diagnóstico
<i>Não chagásicos</i>	M	46	Não	Adenocarcinoma retal
	M	75	Não	Adenocarcinoma sigmóide
	F	75	Não	Doença diverticular
	F	72	Não	Doença diverticular
	F	58	Não	Doença diverticular
	F	58	Não	Adenocarcinoma sigmóide
	F	43	Não	Doença diverticular
<i>Chagásicos portadores de megacôlon</i>	F	81	Não	Adenocarcinoma sigmóide
	F	57	Sim	Megacôlon
	M	62	Sim	Megacôlon
	M	60	Sim	Megacôlon
	F	62	Sim	Megacôlon
	M	58	Sim	Megacôlon
	F	76	Sim	Megacôlon
	F	43	Sim	Megacôlon
	F	69	Sim	Megacôlon
	M	59	Sim	Megacôlon
	F	61	Sim	Megacôlon
	F	53	Sim	Megacôlon
	F	48	Sim	Megacôlon
	F	58	Sim	Megacôlon

4.2. Preparo das amostras

As amostras de tecidos foram transportadas em soro fisiológico sobre o gelo (pH 7,3) para o laboratório. Em seguida, as amostras foram lavadas em solução Krebs, à temperatura ambiente e transferida para o meio de Dulbecco Eagle modificado (DME/F12-Ham, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, E.U.A.) contendo 10 mg/ml antibióticos/antimicóticos (Sigma), 50 mg/ml de gentamicina (Sigma), 2,5 mg/ml de anfotericina B (Sigma), 10% soro fetal bovino (Sigma), 4 mM de nicardipina e 2,1 mg / ml NaHCO₃, selados em um compartimento com 95% O₂ e 5% de

CO_2 a 37°C por 1-2 h. Posteriormente, os tecidos foram incubados por mais 2-5 h, no mesmo meio com 100 mM de colchicina adicionadas para aumentar a imunoreatividade do corpo neuronal. Para a fixação, as amostras foram clipadas na base de uma placa de Petri forradas de Sylgard, e transferidas para solução de formalina 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) à temperatura ambiente por 2-3 h. Após várias lavagens em 0,05 M Tris salina tamponada (TBS, pH 7,4), a camada muscular e plexos nervosos das amostras foram preparadas para a técnica de wholemounts. A presença da doença foi confirmada através de exames clínicos e laboratoriais (da Silveira et al., 2005).

4.3. Imunohistoquímica

As amostras foram pré-incubadas por 2 h em TBS 0,05 M (pH 7,4) com 1% de albumina sérica bovina (BSA), 0,5% Triton X-100, 0,05% thimerosal e 5% de soro de cabra. Depois de um enxágüe em TBS por 10 min, foram incubadas em uma solução contendo BSA, Triton X-100, thimerosal e os anticorpos primários (Tabela 1) por 72h (4°C). Depois de uma noite, as wholemounts foram lavadas em TBS a 4°C e em seguida os anticorpos secundários (Tabela 2) foram adicionados na mesma solução da mesma forma que os anticorpos primários (4h, temperatura ambiente), seguido por um banho em TBS (overnight; 4°C). Para reduzir a autofluorescência induzida por lipofuscina, as wholemounts foram incubadas em tampão de acetato de amónio (pH 5,0) contendo 1 mM CuSO₄ de 60 - 90 min seguido de um curto enxágüe em H₂O destilada (Brehmer et al., 2004a).

Tabela 2: Anticorpos primários

Anticorpo	Fonte	Código	Diluição
Anti-Peripherin	MERCK MILLIPORE	AB-1530	1:1000
Anti-CD8	MERCK MILLIPORE	CBL 1507	1:100
Anti-Serotonina (5-HT)	MERCK MILLIPORE	AB-938	1:1000
Anti-5-HT ₃	MERCK MILLIPORE	PC-347	1:500
Anti-5-HT ₄	MERCK MILLIPORE	HTS-110RTA	1:500

Tabela 3: Anticorpos secundários

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

Posteriormente, as amostras foram montadas em TBS-glicerol (1:1, pH 8,6). Incubações das amostras em soluções sem os anticorpos primários (controles negativos) foram realizadas para o controle da reação.

4.4.Aquisição de imagem dos gânglios

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

4.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste paramétrico Anova-One way, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos de pacientes. O nível de significância definido foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prim 3.0 (San Diego, CA). Foram calculadas a distribuição de frequências de todas as variáveis e as medidas de tendência central. As associações entre a variável dependente e as independentes foram testadas através de técnicas de regressão bivariadas e multivariadas (regressão linear simples, múltipla ou regressão logística, segundo seja a característica da variável). Foram aceitos erros aleatórios ao nível de $p=0,05$ para o de tipo I e $p=0,20$ para o erro tipo II.

5. RESULTADOS

5.1. Análise da inervação através da expressão de Periferina

Para verificarmos a inervação presente nas amostras de cólon, avaliamos a expressão de Periferina, um marcador pan-neuronal que se liga tanto ao corpo neuronal como aos seus prolongamentos (dendritos e axônios). Esse marcador tem se mostrado como um eficiente método de avaliação de inervação intestinal, sendo utilizados em vários estudos anteriores (Yuan et al., 2012, Liu et al., 2010, Holland et al., 2010). Nossos resultados revelaram que a inervação se apresentava comprometida em pacientes chagásicos portadores de megacôlon constipados, uma vez que a expressão de Periferina é, em relação aos indivíduos não infectados, significativamente menores (Tabela 4), corroborando assim com estudos anteriormente realizados. Os gânglios nervosos dos pacientes constipados encontravam-se em formato irregular e seus corpos neuronais em um formato aumentado, quando comparado ao grupo controle. Além disso, uma análise qualitativa das amostras apresentou alterações nos corpos neuronais, como aumento significativo de seu tamanho e relativa diminuição de seus prolongamentos (Figura 2).

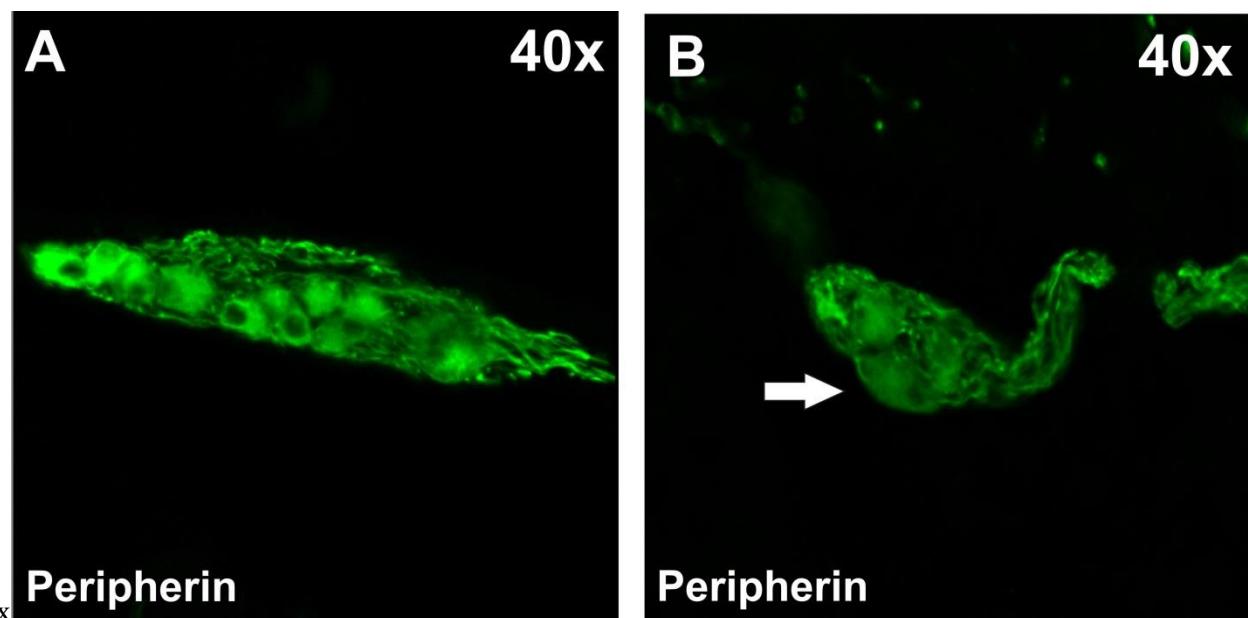


Figura 2: Marcação de Periferina pela técnica de imunofluorescência. Indivíduos não infectados (A) apresentaram gânglios neuronais preservados, com corpos neuronais de formato regular e sem processo inflamatório. Indivíduos chagásicos (B) apresentaram gânglios disformes, corpos neuronais aumentados (seta).

Tabela 4: Análise morfométrica de neurônios imunorreativos à Peripherin nas regiões de plexo mientérico e plexo submucoso em amostras de cólon.

Média da área imunoreativa de Peripherin nos plexos nervoso de amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados		
Pacientes / Região	Plexo mientérico	Plexo submucoso
Individuos não infectados	356 ± 32	232 ± 18
Pacientes chagásicos portadores de megacôlon	232* ± 23	175* ± 16

Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas \pm Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significante entre este grupo e o grupo não infectado. Foi analisada área total de $1066 \mu\text{m}^2$ para todas as amostras ($p < 0.05$).

5.2. Análise da expressão de serotonina

Expressão de serotonina nas amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon constipados e de indivíduos não constipados. Sua presença foi analisada em três regiões distintas do SNE: plexo mientérico, plexo submucoso e região de mucosa intestinal. A partir de nossas análises, os resultados revelaram que a expressão de serotonina nas regiões de plexos nervosos não sofre alterações significativas em pacientes chagásicos quando comparados com indivíduos não infectados, pois nessa região do SNE não ocorre síntese da serotonina (Tabela 5). No entanto, observamos que os pacientes chagásicos portadores de megacôlon constipados apresentaram uma intensa diminuição da expressão de serotonina na região da mucosa intestinal, local este onde a serotonina é produzida, principalmente por células neuroendócrinas, tem como destino o lume intestinal (Figura 3). Quando comparamos os pacientes constipados com o grupo controle observamos que o sistema nervoso intestinal dos pacientes constipados estava comprometido e que nessa região a síntese de serotonina foi reduzida de forma significativa.

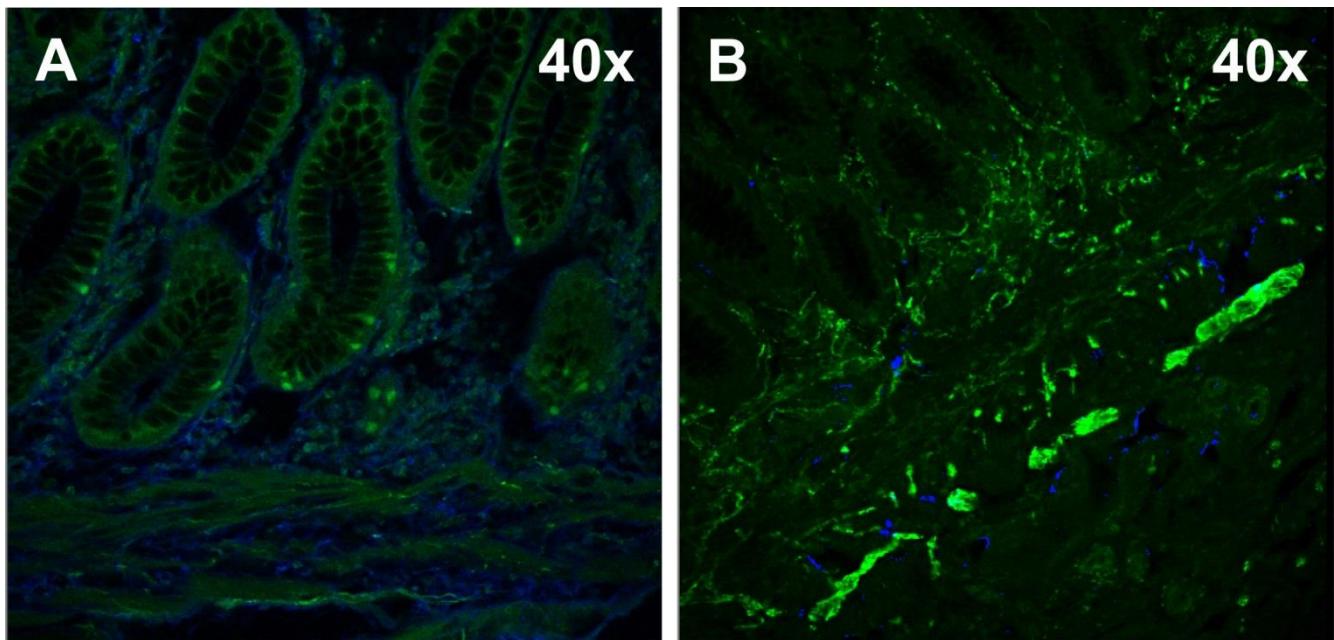


Figura 3: Padrão de marcação de serotonina (azul) no SNE (verde). Em A, indivíduo não infectado. Em B, paciente chagásico constipado apresenta expressão de serotonina bem inferior à encontrada em pacientes não constipados.

Tabela 5: Análise morfométrica da área imunorreativa de Serotonin nas regiões de plexos nervosos e de mucosa de amostras de cólon.

Média da área imunoreativa de Serotonin nos plexos nervoso e na região de mucosa de amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados

Pacientes / Região	Plexo mientérico	Plexo submucoso	Mucosa
Individuos não infectados	65 ± 7	103 ± 9	249 ± 15
Pacientes chagásicos portadores de megacôlon	58 ± 5	98 ± 10	$112^* \pm 11$

Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas \pm Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significantes entre este grupo e o grupo não infectado. Foi analisada área total de $1066 \mu\text{m}^2$ para todas as amostras ($p < 0.05$).

5.3. Análise da expressão dos receptores de serotonina 5HT₃ e 5HT₄

Uma vez analisada a expressão de serotonina, fez-se necessário a avaliação da presença de seus receptores. Os receptores de serotonina são os responsáveis pela ação desta substância em suas células alvo. Neste trabalho estudamos a expressão dos receptores de serotonina 5HT₃ e 5HT₄ nas regiões de plexo mientérico, plexo submucoso e de mucosa intestinal. A presença destes receptores juntamente com a serotonina é um indicativo de um transito intestinal normal, uma vez que a serotonina pode exercer sua função. No entanto, nossos dados revelaram que a expressão de ambos receptores se encontra significativamente menor no cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon constipados em comparação aos indivíduos não constipados em todas as regiões analisadas (Tabela 6). Esta diminuição da expressão dos receptores pode ser decorrente do processo inflamatório, da infecção parasitária ou mesmo um reflexo da diminuição da expressão da serotonina na região da mucosa intestinal (Figura 4).

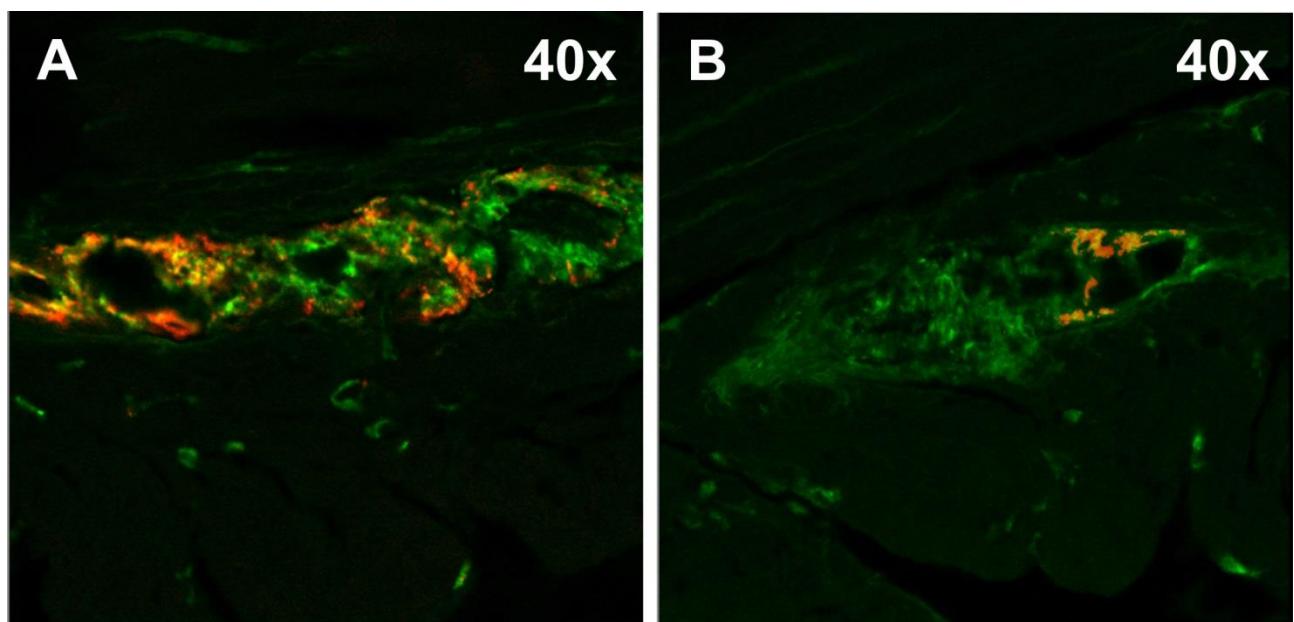


Figura 4: Padrão de marcação dos receptores de serotonina (vermelho) no SNE (verde). Em A, indivíduo não infectado. Em B, paciente chagásico constipado apresenta baixa expressão dos receptores de serotonina comparado aos indivíduos não infectados.

Tabela 6: Análise morfométrica da área imunorreativa dos receptores de Serotoninina nas regiões de plexos nervosos e de mucosa de amostras de cólon.

Média da área imunoreativa dos receptores de serotoninina 5HT₃ e 5-HT₄ nos plexos nervoso e na região de mucosa de amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados			
Pacientes / Região	Plexo mientérico	Plexo submucoso	Mucosa
Individuos não infectados	92 ± 8	131 ± 13	315 ± 25
Pacientes chagásicos portadores de megacôlon	48* ± 6	55* ± 5	101* ± 9

Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas \pm Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significante entre este grupo e o grupo não infectado. Foi analisada área total de 1066 μm^2 para todas as amostras ($p < 0.05$).

5.4.Análise da expressão de linfócitos T CD8

A presença de linfócitos T CD8 no intestino é um indicativo de que processos inflamatórios de maior intensidade estão presentes nesta região, essas células ocasionam um processo de deleção das regiões do SNE. Desta forma, analisamos a presença destas células nas regiões de plexos nervosos e na região de mucosa intestinal. Nossas análises revelaram que, a presença de linfócitos T CD8 é inversamente proporcional à presença de serotonina (Tabela 7), ou seja, nas regiões analisadas, onde pacientes chagásicos apresentavam baixa expressão de serotonina, houve uma grande presença de linfócitos T CD8. Já nos locais onde a expressão de serotonina estava próxima aos níveis normais, a presença de linfócitos T CD8 foi praticamente nula (Figura 5). Esses valores inversamente proporcionais se devem ao fato de que quando o SNE encontra-se comprometido a síntese de serotonina tem uma redução na região de mucosa, pois os neurônios estando comprometido esse neurotransmissor reduz sua função de transmitir informações entre os neurônios. Na presença dessas células inflamatórias a serotonina perde sua ação. Sabe- se que num estágio ainda controlado da inflamação a serotonina tem capacidade de se ligar a essas células imunes, pois dentre as células do sistema imune os linfócitos são os que apresentam o maior número de receptores para a serotonina, assim sendo ela tem a capacidade de ativar ou desativar essas células.

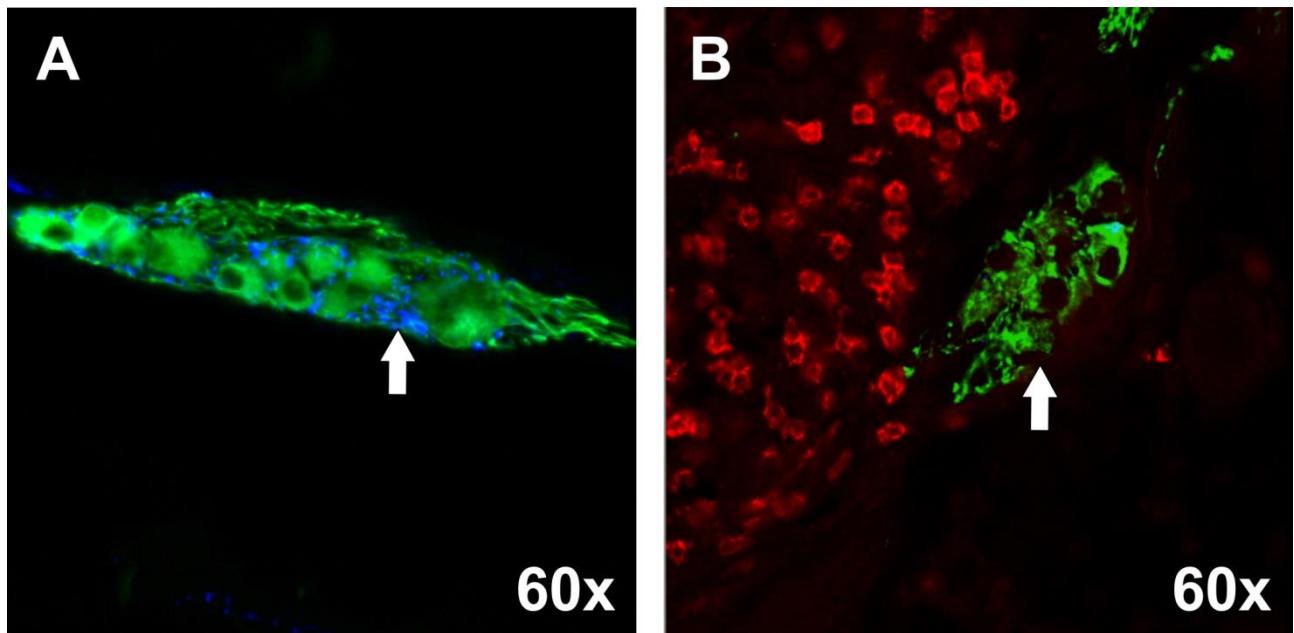


Figura 5: Avaliação da relação entre a expressão de serotonina (azul) e a presença de linfócitos CD8 (vermelho) no SNE (verde). Em A, observamos indivíduo não infectado com acúmulo de serotonina (seta) próximo ao gânglio nervoso, o que parece afastar os linfócitos T CD8. Já em B, paciente chagásico portador de megacôlon, não apresenta serotonina próximo ao gânglio nervoso, o que parece não impedir a ação deletéria dos linfócitos T CD8 sobre seus neurônios (seta).

Tabela 7: Análise morfométrica da área imunorreativa de linfócitos CD8 nas regiões de plexos nervosos e de mucosa de amostras de cólon.

Média da área imunoreativa de linfócitos CD8 nas regiões de plexos nervosos e na região de mucosa de amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados

Pacientes / Região	Plexo mientérico	Plexo submucoso	Mucosa
Individuos não infectados	10 ± 2	18 ± 3	51 ± 5
Pacientes chagásicos portadores de megacôlon	59* ± 6	245* ± 25	303* ± 29

Os valores são expressos como média das áreas imunorreativas \pm Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significante entre este grupo e o grupo não infectado. Foi analisada área total de $1066 \mu\text{m}^2$ para todas as amostras ($p < 0.05$).

6. DISCUSSÃO

O megacôlon chagásico é uma importante manifestação clínica da fase crônica da doença de Chagas e seu principal sintoma é a constipação. O desenvolvimento do megacôlon é caracterizado por um acúmulo fecal no lúmen intestinal, que comprime a mucosa e causa isquemia, com subsequentes lesões celulares regressivas e inflamatórias, sendo que a transição entre o reto e o sigmoide são as regiões mais afetadas pelo processo inflamatório (da Silveira et al., 2011). Acredita-se que o acúmulo de células inflamatórias nesses locais seja consequência do desenvolvimento do megacôlon chagásico, uma vez que a inflamação crônica induziria a lesões celulares e necrose, interferindo na função intestinal, principalmente por lesões degenerativas no SNE. Estudos realizados sobre esse sistema sugerem que a dilatação crônica, característica da fase crônica, se dê não só pela destruição de alguns grupos neuroniais, mas também por uma interação do sistema imunológico em todo trato digestivo (da Silveira et al., 2008b).

O SNE contém mais de 30 neurotransmissores potenciais, dentre eles encontramos a Serotonina. A serotonina tem a capacidade de influenciar diversas funções fisiológicas no organismo e cerca de 90% dela é produzido no intestino, onde executa diversas atividades (Gill et al., 2008). No intestino, a serotonina atua como neurotransmissor e molécula sinalizadora. Alguns dados sugerem que a serotonina e seus receptores podem induzir um processo de modulação do processo inflamatório desencadeado pela doença de Chagas e sua ação pode melhorar a regulação da peristalse intestinal e uma redução da sensibilidade visceral (Sikander et al., 2009b).

Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a destruição de neurônios está intimamente relacionada com a intensidade do processo inflamatório ocasionado pela infecção chagásica. A relação entre a serotonina e o processo inflamatório se deve ao fato de alguns estudos terem demonstrado que esta substância está intimamente envolvida no controle do trânsito intestinal e pode conduzir a modulação do processo inflamatório, isso se deve ao fato da maioria das células do sistema imune apresentar receptores para serotonina (Sikander et al., 2009b).

Em um primeiro momento fizemos a avaliação da Periferina, um marcador pan-neuronal, para a avaliação da inervação do SNE, podendo assim comprovar ou não a ocorrência de desnervação nesse sistema. As avaliações realizadas através da análise morfométrica de neurônios imunorreativos à Peripherin nas regiões de plexo mientérico e plexo submucoso em amostras de cólon comprovaram uma diminuição de neurônios nos pacientes chagásicos devido à baixa expressão desta proteína. Já a análise qualitativa das amostras demonstrou alterações nos corpos neuronais que estavam aumentados em tamanho com presença de prolongamentos mais curtos.

Esses resultados são corroborados por uma série de autores (Adad et al., 2001, da Silveira et al., 2007b, da Silveira et al., 2007d)

Em seguida, foi avaliada a expressão de serotonina e seus receptores no intuito de relacionar a expressão da mesma com o processo inflamatório e a destruição neuronal. A serotonina foi avaliada em três regiões distintas do SNE: plexo mientérico, plexo submucoso e região de mucosa intestinal. Quando se avaliou a presença nas duas primeiras regiões citadas não houve uma diferença significativa em comparação aos pacientes não portadores do megacôlon, os dados obtidos se mantiveram em um nível de igualdade. Já na mucosa intestinal observamos uma diferença entre os dois grupos avaliados, sendo que os pacientes portadores de megacôlon chagásico apresentaram uma intensa diminuição da expressão de serotonina, local este onde a serotonina é produzida, principalmente por células neuroendócrinas.

Vários estudos vêm sendo realizados a respeito das alterações da expressão de serotonina no intestino e a ocorrência de doenças no trato gastrintestinal, como o megacôlon chagásico e a síndrome do intestino irritável. Recentemente foi demonstrado que a transcrição do mRNA da serotonina está reduzida diante a presença de processos inflamatórios no intestino, ocasionado pela presença da doença crônica, ocorrendo consequentemente uma redução da produção de serotonina no intestino, principalmente na mucosa intestinal (Sikander et al., 2009b). Demonstrou-se também que a redução da sinalização de serotonina está relacionada, em casos de constipação crônica, com a síndrome de intestino irritável e outros sintomas como os observados no megacôlon chagásico. Todos estes apresentam em comum a presença de algum tipo de processo inflamatório, corroborando com nossos resultados que demonstraram que na presença do megacôlon chagásico há uma redução da produção de serotonina e futuros danos ao intestino (Gershon, 2009).

Também foi avaliada a atuação dos receptores de serotonina com maior importância dentro do intestino, os receptores 5HT₃ e 5HT₄, pois cerca de 95% dos receptores para serotonina são do tipo 5HT₃ e 5HT₄. Esses receptores desempenham papéis importantes quando ativados junto à serotonina, podendo melhorar a regulação da peristalse intestinal e auxiliar na redução da sensibilidade visceral. Os receptores 5HT₃ e 5HT₄ também foram analisados nas regiões de plexo mientérico, plexo submucoso e de mucosa intestinal. Nossos resultados demonstraram que a expressão de ambos receptores se encontra significativamente menor no cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon em comparação aos indivíduos não infectados. Acreditamos que a diminuição da expressão dos receptores pode ser decorrente do processo inflamatório, da infecção parasitária ou mesmo um reflexo da diminuição da expressão da serotonina na região da mucosa intestinal, que é ocasionado pela presença da doença de Chagas.

Gershon e cols. (2009) demonstraram que na presença destes receptores, a ação da serotonina é desempenhada de forma mais eficaz. Os receptores de 5HT₃ estão presentes no colón e

no reto, onde são expressos principalmente nos neurônios mientéricos. A ausência da expressão dos receptores 5HT₃ está associada à redução da velocidade do trânsito intestinal, do reflexo gastrocólico, aumento da complacência do cólon e influencia diretamente a intensidade de processos inflamatórios no trato gastrintestinal através da ausência da ação em células do sistema imune. A expressão desse receptor associado à serotonina demonstrou uma melhora estatisticamente significativa no alívio da dor abdominal, desconforto ou urgência fecal e satisfação do paciente (Gershon, 2009).

A avaliação da expressão do receptor 5HT₄ demonstra que a expressão desse receptor é responsável por diversas respostas sobre o trato gastrintestinal tendo efeito pro-cinético ao aumentar a liberação de neurotransmissores, ação indireta na sensibilidade visceral sendo capazes de relaxar células musculares lisas, atuam na absorção e secreção do líquido intraluminal, auxiliando na eliminação de fezes moles ou diarréicas (Kadowaki et al., 2002b). Outros trabalhos apontam também que o uso de agonistas de 5-HT₄ seja uma boa opção para prevenir a exacerbação dos processos inflamatórios no sistema gastrointestinal, prevenindo a destruição neuronal e a formação de megacôlon em pacientes chagásicos, uma vez que eles têm a capacidade de diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias regulando a co-estimulação da expressão de algumas moléculas como as das células gliais (da Silveira et al., 2011). Ainda nesse trabalho, foi demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de MHC classe II e co-estimulam algumas outras moléculas como a CD80 ou CD68 e, consequentemente, o processo inflamatório.

Para que pudéssemos confirmar todos os dados analisados anteriormente, comprovando a relação da inervação do SNE, com a redução de expressão de serotonina e seus receptores na mucosa intestinal, realizamos a avaliação da presença de células inflamatórias. Para isso, avaliamos a presença de linfócitos TCD8, principais responsáveis pela citotoxicidade do sistema imunológico e pela exacerbação do processo inflamatório na região intestinal. Desta forma, analisamos a presença destas células nas regiões de plexos nervosos e na região de mucosa intestinal. Nossos resultados revelaram que, a presença de linfócitos TCD8 nessas regiões foi inversamente proporcional à presença de serotonina, ou seja, nas regiões analisadas, onde pacientes chagásicos apresentavam baixa expressão de serotonina, houve uma grande presença de linfócitos TCD8, e nos locais onde a expressão de serotonina estava próxima aos níveis normais, a presença de linfócitos T CD8 foi praticamente nula.

Atualmente, o processo inflamatório é aceito como a causa principal da destruição neuronal, o que indica a ação de células inflamatórias em pacientes portadores do megacôlon chagásico. Ao avaliar a expressão de linfócitos TCD3, linfócitos B CD20, células NK e linfócitos T citotóxicos nos plexos mientéricos e submucosos, foi demonstrada a presença difusa destas células, associadas a processos inflamatórios e à ocorrência de fibrose. Dessa forma, o SNE é alvo de todo esse

processo patológico, tendo seu funcionamento comprometido e, consequentemente, o funcionamento do sistema gastrointestinal é prejudicado (da Silveira et al., 2007c).

De forma similar, Dutra e cols. (2009) demonstraram a grande relevância da presença de células inflamatórias no desenvolvimento da doença de Chagas, uma vez que os linfócitos T participam ativamente do desenvolvimento de todas as formas clínicas desta doença. Os infiltrados inflamatórios encontrados são compostos principalmente de linfócitos T CD3, CD4, linfócitos B, CD20, células NK CD57, células de macrófago CD68. A presença dessas células na lesão crônica sugere um papel de manutenção do parasita nos focos de lesão, o que também pode ser associado ao processo crônico de desnervação (Dutra et al., 2009).

Estes dados legitimam nossos resultados, demonstrando que na ocorrência do megacôlon chagásico ocorre um processo inflamatório exacerbado, induzindo a um comprometimento da ineração do SNE, o que pode ser diretamente associado com a expressão de serotonina. Apesar do papel da serotonina no desenvolvimento da forma digestiva de pacientes chagásicos não ter sido ainda abordado no meio científico, podemos sugerir através desse trabalho que a mesma está ligada à atenuação do processo inflamatório na fase crônica da doença de Chagas. Nossos dados sugerem que na presença de serotonina ocorre uma redução da presença de células inflamatórias no intestino do paciente chagásico evitando assim que o processo inflamatório leve ao megacôlon. Assim, nossos resultados indicam que a expressão de serotonina no intestino é capaz de reduzir a atividade de células inflamatórias intestinais, o que garantiria o funcionamento do SNE diante condições patológicas.

Assim, conclui-se que na presença de serotonina, o processo inflamatório decorrente da doença de Chagas pode ser reduzido e a instalação do megacôlon até evitada. A pesquisa científica no intuito de aumentar a produção de serotonina no intestino de pacientes chagásicos, ou mesmo medicamentos que visem a reposição dessa substância no organismo são de extrema importância para uma melhor qualidade de vida dos pacientes. Como exemplo de alguns fármacos que possuem esta ação, podemos citar a loperamida, antagonistas de 5HT₃ e agonistas de 5HT₄. Esses fármacos tem a capacidade de aumentar os níveis de serotonina no intestino, ocasionando assim uma possível redução no processo inflamatório da doença de Chagas. Possivelmente os antidepressivos, em baixas doses, possam estimular o trânsito intestinal, evitando a constipação e a instalação de processos inflamatórios, o que evitaria o desenvolvimento de uma série de patologias gastrintestinais.

CONCLUSÕES

1. A constipação intestinal e a exacerbação do processo inflamatório estão associadas à baixa expressão de serotonina e de seus receptores;
2. A expressão de serotonina no intestino é inversamente proporcional à presença de linfócitos TCD8 nesta região;
3. Há uma maior preservação do SNE de indivíduos competentes em expressar serotonina, possivelmente devido ao melhor controle do processo inflamatório;
4. A serotonina apresenta um possível efeito protetor no trato gastrintestinal, evitando a ocorrência de constipação intestinal e possivelmente do megacôlon chagásico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAD, S. J., CANCADO, C. G., ETCHEBEHERE, R. M., TEIXEIRA, V. P., GOMES, U. A., CHAPADEIRO, E. & LOPES, E. R. 2001. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch*, 438, 254-8.
- ANDRADE, J. P., MARIN-NETO, J. A., PAOLA, A. A., VILAS-BOAS, F., OLIVEIRA, G. M., BACAL, F., BOCCHI, E. A., ALMEIDA, D. R., FRAGATA FILHO, A. A., MOREIRA MDA, C., XAVIER, S. S., OLIVEIRA JUNIOR, W. A. & DIAS, J. C. 2011. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 97, 1-48.
- ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. 1968. [Pathology of prolonged experimental Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 10, 180-7.
- ANDRADE, Z. A. 1982. [Pathogenesis of Chagas' disease. New aspects]. *Arq Bras Cardiol*, 38, 255-60.
- BRANDT, L. J., PRATHER, C. M., QUIGLEY, E. M., SCHILLER, L. R., SCHOENFELD, P. AND TALLEY, N. J. (2005). SYSTEMATIC REVIEW ON THE MANAGEMENT OF CHRONIC CONSTIPATION IN NORTH AMERICA. *AM J GASTROENTEROL*, **100 SUPPL 1**, S5-S21.
- BREHMER, A. 2006. Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 186, 1-91.
- BREHMER, A., BLASER, B., SEITZ, G., SCHRODL, F. & NEUHUBER, W. 2004a. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. *Histochem Cell Biol*, 121, 13-20.
- BREHMER, A., CRONER, R., DIMMLER, A., PAPADOPOULOS, T., SCHRODL, F. & NEUHUBER, W. 2004b. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Auton Neurosci*, 112, 49-59.
- BREHMER, A., STACH, W., KRAMMER, H. J. & NEUHUBER, W. 1998. Distribution, morphology and projections of nitrergic and non-nitrergic submucosal neurons in the pig small intestine. *Histochem Cell Biol*, 109, 87-94.
- COSTA, M., BUFFA, R., FURNESS, J. B. & SOLCIA, E. 1980. Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparations. *Histochemistry*, 65, 157-65.
- COURA, J. R. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 Suppl 1, 113-22.
- CROWELL, M. D. 2004. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol*, 141, 1285-93.
- DA SILVEIRA, A. B. M., ARANTES, R. M. E., VAGO, A. R., LEMOS, E. M., ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R. & D'AVILA REIS, D. 2005. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology*, 131, 627-634.
- DA SILVEIRA, A. B., ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R., FURNESS, J. B. & D'AVILA REIS, D. 2007a. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology*, 134, 789-96.
- DA SILVEIRA, A. B., D'AVILA REIS, D., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., POOLE, D., CORREA-OLIVEIRA, R. & FURNESS, J. B. 2007 b. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Digestive diseases and sciences*, 52, 2877-83.
- DA SILVEIRA, A. B., LEMOS, E. M., ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R., FURNESS, J. B. & D'AVILA REIS, D. 2007c. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol*, 38, 1256-64.

- DA SILVEIRA, A. B., FREITAS, M. A., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., FURNESS, J. B., CORREA-OLIVEIRA, R. & D'AVILA REIS, D. 2008a. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology*, 135, 1337-42.
- DA SILVEIRA, A. B., FREITAS, M. A., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., FURNESS, J. B., CORREA-OLIVEIRA, R. & REIS, D. 2008b. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 1154-6.
- DA SILVEIRA, A. B., CHAVES, A. T., DE ARAUJO, F. F., SILVA GOMES, J. A., CORREA-OLIVEIRA, R., TOSHIO FUJIWARA, R., RIBEIRO FREITAS, M. A., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O. & D'AVILA REIS, D. 2009a. Expression of caspase-3 in enteric cells is related to development of chagasic megacolon. *Hum Pathol*, 40, 605-6.
- DA SILVEIRA, A. B., DE ARAUJO, F. F., FREITAS, M. A., GOMES, J. A., CHAVES, A. T., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., DA CUNHA SOUZA, G., BERNARDINO JUNIOR, R., FUJIWARA, R., D'AVILA REIS, D. & CORREA-OLIVEIRA, R. 2009b. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Human immunology*, 70, 65-7.
- DA SILVEIRA, A. B., FREITAS, M. A., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., FURNESS, J. B., CORREA-OLIVEIRA, R. & REIS, D. 2009c. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. *Hum Pathol*, 40, 244-51.
- DA SILVEIRA, A. B., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., FUJIWARA, R. T., OLIVEIRA, R. C. & BREHMER, A. 2011. Enteroglial cells act as antigen-presenting cells in chagasic megacolon. *Human pathology*, 42, 522-32.
- DIAS, E. & LARANJA, F. S. 1948. Chagas' disease and its control. *Abstr Int Congr Trop Med Malar*, 56, 91.
- DIAS, E. 1959. [Chagas' disease: an American problem]. *Hospital (Rio J)*, 55, 57-65.
- DIAS, J. C. 1994. [Chagas' disease. Epidemiology and prevention]. *Arq Bras Cardiol*, 63, 451-5.
- DUTRA, W. O., MENEZES, C. A., VILLANI, F. N., DA COSTA, G. C., DA SILVEIRA, A. B., REIS, D. & GOLLOB, K. J. 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 208-18.
- FURNESS, J. B., COSTA, M., FRANCO, R. & LLEWELLYN-SMITH, I. J. 1980. Neuronal peptides in the intestine: distribution and possible functions. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 22, 601-17.
- FURNESS, J. B., MORRIS, J. L., GIBBINS, I. L. & COSTA, M. 1989. Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 29, 289-306.
- FURNESS, J. B., BORNSTEIN, J. C. & SMITH, T. K. 1990a. The normal structure of gastrointestinal innervation. *J Gastroenterol Hepatol*, 5 Suppl 1, 1-9.
- FURNESS, J. B., KURAMOTO, H. & MESSENGER, J. P. 1990b. Morphological and chemical identification of neurons that project from the colon to the inferior mesenteric ganglia in the guinea-pig. *J Auton Nerv Syst*, 31, 203-10.
- FURNESS, J. B., BORNSTEIN, J. C., MURPHY, R. & POMPOLO, S. 1992. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. *Trends Neurosci*, 15, 66-71.
- FURNESS, J. B. 1998. Gastroenterology. *IDrugs*, 1, 623-4.
- FURNESS, J. B. 2006a. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Auton Neurosci*, 125, 81-5.
- FURNESS, J. B. 2006b. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton Neurosci*, 130, 1-5.

- GERSHON, M. D. 1981. The enteric nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 4, 227-72.
- GERSHON, M. D. 1982. Serotonergic neurotransmission in the gut. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 71, 26-41.
- GERSHON, D. 2000. Are mega-mergers good medicine for the pharmaceutical industry? *Nature*, 405, 257-8.
- GERSHON, M. D. 2009. Enteric serotonergic neurones ... finally! *J Physiol*, 587, 507.
- GILL, R. K., PANT, N., SAKSENA, S., SINGLA, A., NAZIR, T. M., VOHWINKEL, L., TURNER, J. R., GOLDSTEIN, J., ALREFAI, W. A. & DUDEJA, P. K. 2008. Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 294, G254-62.
- GOMES, Y. M. 1997. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. *Applied biochemistry and biotechnology*, 66, 107-19.
- HOLLAND, S. K., HESSLER, R. B., REID-NICHOLSON, M. D., RAMALINGAM, P. & LEE, J. R. 2010. Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23, 1173-9.
- JABARI, S., DA SILVEIRA, A. B., DE OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., QUINT, K., NEUHUBER, W. & BREHMER, A. 2011. Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon. *Histochemistry and cell biology*, 135, 47-57.
- KADOWAKI, M., WANG, X. O., SHIMATANI, H., YONEDA, S. & TAKAKI, M. 2002a. 5-HT4 receptor enhances the propulsive power of the peristaltic reflex in the rat distal colon. *Auton Neurosci*, 99, 62-5.
- KADOWAKI, M., WANG, X. O., SHIMATANI, H., YONEDA, S. & TAKAKI, M. 2002b. 5-HT4 receptor enhances the propulsive power of the peristaltic reflex in the rat distal colon. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 99, 62-5.
- KOBERLE, F. 1956. [Pathological findings in muscular hollow organs in experimental Chagas disease]. *Zentralbl Allg Pathol*, 95, 321-9.
- KOBERLE, F. 1968. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol*, 6, 63-116.
- KRAMER, K., DA SILVEIRA, A. B., JABARI, S., KRESSEL, M., RAAB, M. & BREHMER, A. 2011. Quantitative evaluation of neurons in the mucosal plexus of adult human intestines. *Histochemistry and cell biology*, 136, 1-9.
- LEWINSOHN, R. 1979. Carlos Chagas (1879-1934): the discovery of Trypanosoma cruzi and of American trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chagas's disease). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 73, 513-23.
- LIU, W., KINNEFORS, A., BOSTROM, M. & RASK-ANDERSEN, H. 2010. Expression of peripherin in human cochlea. *Cell and tissue research*, 342, 345-51.
- MCKAY, D. M. & FAIRWEATHER, I. 1997. A role for the enteric nervous system in the response to helminth infections. *Parasitol Today*, 13, 63-9.
- NYAM, D. C., PEMBERTON, J. H., ILSTRUP, D. M. AND RATH, D. M. (1997). LONG-TERM RESULTS OF SURGERY FOR CHRONIC CONSTIPATION. *DIS COLON RECTUM*, 40(3), 273-279.
- SIKANDER, A., RANA, S. V. & PRASAD, K. K. 2009a. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta*, 403, 47-55.
- SIKANDER, A., RANA, S. V. & PRASAD, K. K. 2009b. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 403, 47-55.
- TANOWITZ, H. B., KIRCHHOFF, L. V., SIMON, D., MORRIS, S. A., WEISS, L. M. & WITTNER, M. 1992. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*, 5, 400-19.
- YUAN, A., SASAKI, T., KUMAR, A., PETERHOFF, C. M., RAO, M. V., LIEM, R. K., JULIEN, J. P. & NIXON, R. A. 2012. Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments:

implications for differential vulnerability of CNS and peripheral nervous system axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32, 8501-8.