

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

MILENA APARECIDA DIONIZIO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO REGENERATIVO EM NEURÔNIOS DO SISTEMA
NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES DE
MEGACÓLON**

UBERLÂNDIA

2012

MILENA APARECIDA DIONIZIO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO REGENERATIVO EM NEURÔNIOS DO SISTEMA
NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES DE
MEGACÓLON**

**Dissertação apresentada à Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Faculdade de
Medicina, Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde.**

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre B. M. da
Silveira**

UBERLÂNDIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M838a Moreira, Milena Aparecida Dionizio, 1988-
2012 Avaliação do processo regenerativo em neurônios do sistema
 nervoso entérico de pacientes chagásicos portadores de megacólon /
Milena Aparecida Dionizio Moreira. -- 2012.
 46 f. : il.

 Orientador: Alexandre B. M. da Silveira.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 Inclui bibliografia.

 1. Ciências médicas - Teses. 2. Chagas, Doença de - Teses. 3.
Megacólon - Teses. 4. Neurônios - Teses. I. Silveira, Alexandre B. M.
da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Dedico este trabalho aos meus pais Adir e Maria Lúcia em retribuição ao amor, abnegação, exemplo e auxílio que me concedem a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de tudo, pela sabedoria e força. Sem Ele não conseguiríamos compreender a vida, tampouco existiríamos!

À minha família e amigos pelo incentivo, apoio, carinho e por acreditarem em mim quando nem mesmo eu acreditaria.

Ao Dr. Alexandre pela paciência, confiança e tempo dispensado a me ensinar o que é ser um verdadeiro pesquisador.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelas sugestões e ensinamentos.

À Gisele pela dedicação e rapidez em atender aos alunos “desesperados” da pós-graduação.

Aos colegas de mestrado pela troca de experiências e a todos que colaboraram direta ou indiretamente com este trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina (Serotonina)

ACh - Acetilcolina

ATP - Adenosina tri-fosfato

cChAT - Colina acetil transferase

CD - *Cluster of differentiation*

GAP-43 - *Growth Associated Protein 43* (Proteína associada ao crescimento 43)

IC - Imunocomplexos

IPANs - neurônios intrínsecos primários aferentes

MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

NK - *Natural killer*

NO - *Nitric oxide* (Óxido nítrico)

NOS - *Nitric oxide synthases* (Óxido nítrico sintetase)

NPY - Neuropeptídeo Y

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PGP 9.5 - Proteína gene produzida 9.5

SNA - Sistema nervoso autônomo

SNE - Sistema nervoso entérico

SP - Substância P

TBS - *Tris-buffered saline* (Tris salina tamponada)

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VIP - Polipeptídeo intestinal vasoativo

RESUMO

A doença de Chagas é uma das doenças parasitárias mais graves da América Latina, com impacto social e econômico que muito superam os efeitos combinados de outras doenças parasitárias, como malária, leishmaniose e esquistossomose. A doença de Chagas apresenta duas fases bem definidas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda tem duração de aproximadamente dois ou três meses. Após esta fase, o indivíduo entra em um estado assintomático, o que caracteriza o início da fase crônica. Na fase crônica da doença, a destruição de componentes do sistema nervoso entérico (SNE) leva ao desenvolvimento do megacólon. O megacólon é caracterizado pela dilatação do cólon associada a um infiltrado inflamatório que é a principal causa da destruição de neurônios entéricos. Estes neurônios, quando sofrem alguma agressão, podem apresentar um processo de regeneração. Sabendo da existência de vários tipos de neurônios entéricos com diferentes funções, este trabalho teve como objetivo a avaliação detalhada do processo de regeneração das subclasses neuronais do SNE de pacientes chagásicos portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Para isso, utilizamos um marcador de regeneração de neurônios e terminações nervosas (GAP-43) associado com um marcador pan-neuronal (Peripherina) e com marcadores de vários neuropeptídeos (cChat, substância P, neuropeptídeo Y, VIP e NOS). Desta forma, ao avaliar a capacidade de regeneração das várias subclasses neuronais, aferimos que os níveis de regeneração de cChat, substância P e neuropeptídeo Y são semelhantes em pacientes chagásicos e indivíduos não infectados. No entanto, a regeneração de neurônios positivos para VIP e NOS estão aumentados em pacientes chagásicos em comparação com indivíduos não infectados. Acreditamos que o aumento na taxa de regeneração desses neurônios seja consequência da destruição seletiva desses tipos neuronais, representando uma tentativa do organismo de repor classes neuronais mais lesadas.

Palavras chave: Doença de Chagas. Megacólon. Neurônios.

ABSTRACT

Chagas disease is one of the most serious parasitic diseases in Latin America, with social and economic impact that far outweigh the combined effects of other parasitic diseases such as malaria, leishmaniasis and schistosomiasis. Chagas' disease has two well-defined phases: acute and chronic phase. The acute phase lasts approximately two to three months. After this phase, the individual enters an asymptomatic state, which characterizes the early chronic phase. In the chronic phase of the disease, the destruction of enteric nervous system (ENS) components leads to the development of megacolon. The megacolon is characterized by colon dilatation associated with an inflammatory infiltrate which is the main cause of enteric neurons destruction. These neurons, when suffer some aggression, may exhibit a regeneration process. Knowing the existence of various types of enteric neurons with different functions, this study aimed to evaluate the detailed regeneration process of ENS neuronal subclasses from chagasic patients with megacolon and non-infected individuals. For this, we used a marker of neuronal regeneration (GAP-43) associated with a pan-neuronal marker (Peripherin) and various neuropeptides markers (cChat, substance P, neuropeptide Y, VIP and NOS). Thus, to assess the ability of various subclasses of neuronal regeneration, we verified that the levels of regeneration cChat, substance P and neuropeptide Y are similar in Chagas' patients and non-infected individuals. However, VIP and NOS neuronal regeneration levels are increased in chagasic patients when compared to non-infected individuals. We believe that the increase in regeneration rate of these neurons may be a consequence of the selective neuronal destruction, representing an attempt to replenish neuronal classes most affected.

Keywords: Chagas Disease. Megacolon. Neurons.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	8
Doença de Chagas.....	8
O mega chagásico.....	9
O Sistema Nervoso Entérico.....	13
Os neurônios entéricos, neuropeptídios e outros marcadores.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
Objetivos Específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Imunohistoquímica.....	22
Aquisição de imagem dos gânglios.....	23
Análise estatística.....	24
5 RESULTADOS.....	25
Análise da Capacidade Regenerativa das diferentes classes neuronais.....	26
6 DISCUSSÃO.....	33
7 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Doença de Chagas

Em 1907, Carlos Chagas recebeu de Oswaldo Cruz a incumbência de executar a campanha anti-palúdica nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, em Lassance, região norte do Estado de Minas Gerais. Foi informado de que ali existia um inseto hematófago, de hábitos noturnos, chamado pelos regionais de “barbeiro”. Observando a numerosa existência destes insetos decidiu examiná-los e encontrou no interior de seu intestino um flagelado que denominou *Trypanosoma cruzi* (KOBBERLE, 1957).

A existência deste flagelado no interior do barbeiro sugeriu a possível existência de uma doença infecciosa. Assim, Carlos Chagas iniciou investigações com animais e realizou testes na população da região constatando que o parasito descoberto era patogênico (KOBBERLE, 1957). Nesse período Carlos Chagas reportou nessa área 29 casos agudos e incontáveis casos crônicos (DIAS, MACHADO *et al.*, 2002).

Atualmente, estima-se que 16 milhões de pessoas apresentem a doença em todo continente americano, e está relacionada com questões ambientais e sociopolíticas como educação, habitação e migração (DIAS, 2001). No século passado, a principal forma de transmissão da doença de Chagas era via vetorial, ou seja, pelo inseto hematófago triatomíneo conhecido como “barbeiro” (ROMANA, 1956). Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas também pode ser transmitida por transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, por via placentária e até mesmo pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasita (DIAS, 1984; BENCHIMOL BARBOSA, 2006; MATSUDA, MILLER *et al.*, 2009).

Na transmissão direta pelo vetor, após o ato de sugar o sangue, o que ocorre na maioria das vezes durante a noite, o inseto libera fezes infectadas com a forma tripomastigota próximo ao local da picada. Os parasitas conseguem penetrar ativamente através da mucosa ou mesmo da conjuntiva ocular, e após invadirem as células do hospedeiro, o parasita tem acesso a vasos linfáticos e sanguíneos, indo parasitar uma variedade de células em outros órgãos. Dentro das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, reproduzem-se e dão origem a novas formas tripomastigotas, as quais retornam à circulação sistêmica, reiniciando o ciclo (KOBBERLE, 1968; BRENER, 1982).

Esta doença apresenta duas fases bem definidas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda, com duração de aproximadamente dois ou três meses, é caracterizada por abundância

de parasitas circulantes (forma amastigota), febre, astenia e mal estar. Após esta fase, o indivíduo entra em um estado assintomático, o que caracteriza o início da fase crônica. Anos após a fase aguda, o paciente chagásico pode continuar assintomático, caracterizando a forma indeterminada da doença, ou mesmo vir a desenvolver alterações patológicas no coração (forma cardíaca) e apresentar manifestações gastrointestinais, culminando na forma digestiva da doença (ROMANA, 1956; KOBERLE, 1968; ALTCHER, 2010).

A fase indeterminada representa um dos aspectos mais enigmáticos sobre a doença de Chagas, uma vez que pode haver um intervalo de 20 até 30 anos entre a fase aguda e a fase crônica sintomática. Alguns indivíduos chegam a falecer com 70 a 80 anos sem nunca apresentar qualquer sintoma decorrente da infecção. (ANDRADE, 1999; DIAS, 2001; PRATA, 2001).

Devido à gravidade e frequência da forma crônica cardíaca, esta é a forma mais bem estudada da doença, caracterizando-se 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 acompanhados de cardiomegalia, quadros de trombose intracardíaca, lesões vasculares e fibrose (DE REZENDE e RASSI, 1958; MARIN NETO, GALLO *et al.*, 1980; RASSI, RASSI *et al.*, 2000).

A forma digestiva da doença de Chagas, que ainda possui aspectos a serem elucidados, se manifesta principalmente como o megaesôfago e o megacólon (KOBERLE, 1968; CAMPOS e TAFURI, 1973). Um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do mega chagásico é um processo degenerativo, principalmente de gânglios nervosos do trato gastrointestinal, que aparentemente se inicia na fase aguda, persistindo até a fase crônica (ANDRADE e ANDRADE, 1966; KOBERLE, 1968; ANDRADE e ANDRADE, 1969).

O mega chagásico

Em 1916 surge o primeiro indício da existência da forma digestiva da doença de Chagas através da observação de que os portadores da doença apresentavam disfagia, necessitando do auxílio de água para completar a ingestão de alimentos. Mesmo a ingestão de líquidos poderia ser difícil, havendo a necessidade de que o mesmo fosse administrado em pequenas doses. Tal fenômeno, na época ainda sem explicação patogênica, foi denominado de “Mal do Engasgo” (CHAGAS, 1916).

A dificuldade de deglutição é um dos sinais do acometimento do esôfago. Dentre as manifestações da forma digestiva da doença de Chagas a esofagopatia é a mais precoce, acomete principalmente o sexo masculino e ocorre entre 10 e 20% dos casos (DIAS, 1996).

Outra manifestação da forma digestiva é a colopatia chagásica, podendo se apresentar como megacólon. Geralmente surge a partir da terceira década de vida e os segmentos intestinais mais acometidos são o sigmóide e o reto. Entretanto pode ser detectada desde a fase aguda variando de 7 a 25% dos casos, dependendo do tempo de evolução da doença (DIAS, 1996).

O megacólon se caracteriza como dilatação intestinal associada a um infiltrado inflamatório. Este infiltrado é constituído principalmente por linfócitos T CD3, linfócitos B CD20, e ainda, células *natural killers* (NK), macrófagos, mastócitos e linfócitos T citotóxicos (REIS, JONES *et al.*, 1993; CORBETT, RIBEIRO *et al.*, 2001; DA SILVEIRA, ADAD *et al.*, 2007).

Tanto os linfócitos B como os linfócitos T fazem parte da imunidade adaptativa, sendo específica para o patógeno. Uma resposta de células T eficaz requer estimulação adequada através de células apresentadoras de antígenos. Essas células são mecanicamente essenciais para a ativação das células T. Citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos podem criar um ambiente que irá influenciar a função das células T (DUTRA, MENEZES *et al.*, 2009).

Constituindo de 5% a 20% das células mononucleares do sangue, as células NK, são uma importante linha de defesa inespecífica, reconhecendo e lisando células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, bem como células tumorais (CRUVINEL WDE, MESQUITA *et al.*, 2010). Em pacientes chagásicos portadores de megacólon as células NK podem ser relacionadas com a continuidade do processo inflamatório da fase crônica da doença (CORBETT, RIBEIRO *et al.*, 2001).

Polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos) também apresentam atuação considerável no processo inflamatório do megacólon chagásico. Os eosinófilos são células importantes no combate a infecções, sendo sua ação antiparasitária, uma das mais potentes e eficazes do organismo, ocorrendo por citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (CRUVINEL WDE, MESQUITA *et al.*, 2010). Eosinófilos também atuam na resistência à infecção pelo *T. cruzi* e seu papel na patologia da fase crônica tem sido considerado por vários autores (MOLINA e KIERSZENBAUM, 1987; 1988a; b; 1989a; b).

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, com importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias e sensíveis a agentes quimiotáticos como

produtos de clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos. Estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos, atraídas por quimiocinas, como a IL-8, e são ativadas por diversos estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos (IC), quimiocinas e citocinas (CRUVINEL WDE, MESQUITA *et al.*, 2010).

Ainda em relação ao infiltrado inflamatório, os mastócitos são células derivadas de progenitores hematopoiéticos CD34+ na medula óssea; eles distribuem-se estrategicamente junto a vasos sanguíneos, nervos e sob o epitélio da pele e mucosas, são particularmente abundantes em áreas de contato com o meio ambiente e desempenham papel primordial nas reações inflamatórias agudas (CRUVINEL WDE, MESQUITA *et al.*, 2010). Essas células liberam moléculas pró-inflamatórias, como a histamina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Mastócitos funcionam como o principal elo de comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso entérico, detectando, codificando e transmitindo as informações entre estes sistemas. Os sinais enviados pelos mastócitos em resposta a um agente invasor agem tanto no sistema imune quanto em neurônios sensoriais (MACQUEEN, MARSHALL *et al.*, 1989; MCKAY, BIENENSTOCK *et al.*, 1993; MCKAY e PERDUE, 1993).

Os monócitos constituem 3% a 8 % dos leucócitos circulantes e, no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, dão origem a macrófagos e células dendríticas mielóides. Os macrófagos são fagócitos eficientes, engolfando patógenos e debris celulares. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido por meses a anos. Além de seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC, estimulando, assim, a resposta mediada por linfócitos T (CRUVINEL WDE, MESQUITA *et al.*, 2010). Os macrófagos são células que podem associar-se a sítios inflamatórios, promovendo a exacerbação do processo. Eles secretam várias citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6, as quais têm a capacidade de ativar processos de citotoxicidade mediados por células do sistema imune. Além disso, os macrófagos por si podem lesar parasitas ou células do próprio hospedeiro, devido a sua capacidade de produzir, quando ativados, substâncias citotóxicas, como óxido nítrico e radicais livres (DARYANI, HOSSEINI *et al.*, 2003).

O megacólon tem como sintoma característico a constipação e tanto o diagnóstico clínico como o anatômico é tardio, o que geralmente ocorre após a instituição da dilatação. Macroscopicamente, a falta de coordenação motora, a acalasia dos esfíncteres e a distensão provocada pelo acúmulo de conteúdo fecal se combinam para a formação do megacólon chagásico (CAMPOS e TAFURI, 1973).

Segundo Tafuri, (TAFURI, MARIA *et al.*, 1971) é lícito admitir uma a ocorrência de uma lesão progressiva nos plexos que se agrava de acordo com o desenvolvimento do mega. Considerando a estase de conteúdo fecal um dos fatores mais importantes para a ocorrência do megacólon, podemos compreender que ao ocorrer acúmulo de conteúdo fecal no lúmen do órgão, há compressão da mucosa e conseqüente dilatação o órgão. As alterações decorrentes da compressão fazem com que a mucosa sofra um processo de isquemia, favorecendo a difusão do processo inflamatório pelos plexos nervosos e camadas musculares. As células musculares também são atingidas em conseqüência ao maior esforço de contração devido à maior resistência do meio, ocorrendo com o tempo hipertrofia. Como o plexo submucoso está em íntima relação com as células musculares é fácil compreender como o processo inflamatório pode agravar o processo de destruição neuronal.

À microscopia ótica de luz observam-se: 1) infiltrados inflamatórios crônicos, focais e difusos na muscular da mucosa, na submucosa e nas camadas musculares; 2) lesões do sistema nervoso entérico, especialmente do plexo mientérico, periganglionite e ganglionite focais ou difusas com intensos fenômenos regressivos dos neurônios chegando à destruição completa dos gânglios nervosos do plexo mientérico, com consecutiva fibrose; 3) ulcerações e inflamação crônica da mucosa, focal ou difusa em casos mais avançados, podendo atingir a submucosa; 4) fibrose intersticial intermuscular, focal ou difusa, em decorrência da miosite, da periganglionite e da ganglionite (TAFURI e BRENER, 1967; TAFURI, 1970; CAMPOS e TAFURI, 1973; TAFURI, 1987). Alterações ultra-estruturais do plexo mientérico consistem em lesões focais de todos os componentes dos gânglios: neurônios, células de Schwann e fibras nervosas. Por isso, é comum, no mesmo gânglio, a existência de neurônios, às vezes, profundamente lesados ao lado de outros morfologicamente íntegros. Em casos mais graves, a lesão pode ser difusa e o gânglio acaba por ser substituído por tecido conjuntivo fibroso denso (TAFURI, 1971; TAFURI, MARIA *et al.*, 1971).

Na última década, estudos indicaram que, além da ocorrência de processos inflamatórios, as lesões na doença de Chagas são dependentes da presença de DNA do *T. cruzi* e do próprio parasita, mesmo que em pequena quantidade e demonstraram existir uma estreita correlação entre a presença de antígenos do parasita e a intensidade do infiltrado inflamatório (ALMEIDA, TEIXEIRA *et al.*, 1984; HIGUCHI MDE, GUTIERREZ *et al.*, 1993; VAGO, MACEDO *et al.*, 1996). Atualmente é aceito que o processo inflamatório é o principal responsável pela destruição dos componentes do sistema nervoso entérico (REIS, JONES *et al.*, 1993; CORBETT, RIBEIRO *et al.*, 2001; DA SILVEIRA, ADAD *et al.*, 2007).

O Sistema Nervoso Entérico

O trato gastrointestinal é inervado por dois componentes nervosos distintos, que, no entanto, são interligados. A inervação extrínseca é realizada pelo sistema nervoso autônomo, representado por neurônios simpáticos, parassimpáticos e neurônios aferentes viscerais. A inervação intrínseca é feita pelo SNE (PHILLIPS e POWLEY, 2007).

Por muito tempo acreditou-se que a maioria dos órgãos e tecidos possuía apenas uma inervação dupla: simpático e parassimpático. Entretanto, foi comprovado que, a maioria das fibras adrenérgicas fazia contato com dois plexos principais do trato gastrintestinal. A inervação adrenérgica é vista principalmente na mucosa e próxima a camada epitelial (LUNDGREN, 2000).

As fibras noradrenérgicas participantes da inervação extrínseca do trato gastrintestinal se originam em corpos celulares localizados em gânglios nervosos pré-vertebrais simpáticos. Essa inervação fornece uma rede de fibras para a parede do músculo liso, artérias e gânglios do plexo mientérico e submucoso. Quando estimulados, estes neurônios noradrenérgicos agem inibindo a peristalse, regulando o fluxo sanguíneo dos vasos intestinais e controlando a secreção de eletrólitos (MCMILLIN, RICHARDS *et al.*, 1999; COSTA, BROOKES *et al.*, 2000; LUNDGREN, 2000; POWLEY, 2000).

A inervação parassimpática é realizada principalmente pelo nervo vago. Esse nervo apresenta funções sensoriais (fibras aferentes) como também motoras (fibras eferentes). As fibras aferentes estão presentes no músculo liso, mucosa e plexo mientérico, enquanto as fibras eferentes se restringem ao plexo mientérico em estreita relação com os neurônios deste plexo. Os estímulos vagais utilizam acetilcolina como neurotransmissor, sendo esta responsável por estimular a peristalse e aumentar o aporte sanguíneo intestinal (POWLEY, 2000; PHILLIPS e POWLEY, 2007).

O sistema nervoso entérico é uma divisão do sistema nervoso autônomo e representa a inervação intrínseca do trato gastrintestinal. Ele tem papel essencial no controle da motilidade, fluxo sanguíneo, transporte de água e eletrólitos, e secreção ácida no trato digestivo, e representa o meio através do qual os neurônios extrínsecos controlam a função gastrointestinal. O SNE é capaz de funcionar independentemente do controle central, embora o sistema nervoso central normalmente modifique sua atividade (FURNESS e COSTA, 1980).

Corpos de células nervosas, seus processos e células gliais entéricas incorporadas na parede do intestino são os principais componentes do SNE. A parede intestinal é formada por

camadas musculares (muscular externa, da mucosa e interna) interligadas entre si por feixes de neurônios. Os corpos de células nervosas são agrupadas em pequenos agregados, os gânglios entéricos, os quais são conectados por feixes de células dos processos nervosos formando dois principais plexos no trato digestivo: o plexo mientérico, também chamado plexo de Auerbach e o plexo submucoso, que é frequentemente chamado de plexo de Meissner (FURNESS e COSTA, 1980).

Abaixo do epitélio mucoso se encontram uma rede de feixes de finas fibras nervosas que constituem o plexo submucoso. É esparsa no esôfago, mas proeminente no estômago, intestino delgado, cólon e vesícula biliar (FURNESS e COSTA, 1980).

O plexo mientérico constitui uma rede de pequenos gânglios neuronais interconectados por feixes nervosos situados entre as camadas musculares (interna e externa) do trato gastrintestinal. Este plexo forma uma rede contínua em torno da circunferência e por toda extensão do sistema digestivo. Os gânglios encontrados neste plexo variam no tamanho e forma. Essas diferenças estão relacionadas à porção do intestino analisada e à espécie de animal em questão (IRWIN, 1931; GABELLA, 1981).

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

Os neurônios entéricos, neuropeptídeos e outros marcadores

A organização do SNE é semelhante em humanos e outros mamíferos. O controle fisiológico exercido pelos neurônios entéricos sobre a motilidade, secreção e outros processos digestivos é similar em diferentes espécies; bem como, o mecanismo de ação de drogas que modificam a neurotransmissão. (FURNESS, YOUNG *et al.*, 1995a).

O SNE possui aproximadamente o mesmo número de células nervosas da medula espinhal, cerca de 200 a 600 milhões de neurônios, o que demonstra a grande importância desse sistema (FURNESS e COSTA, 1980). Tais neurônios podem ser identificados pela função, morfologia e correlação neuroquímica. Funcionalmente, podem ser divididos em:

neurônios motores excitatórios, neurônios motores inibitórios, interneurônios e neurônios aferentes primários intrínsecos (FURNESS, 2008).

Mais de 30 potenciais neurotransmissores que afetam a atividade neuronal, muscular e de células epiteliais estão presentes no SNE. Além do mais, um único neurônio pode possuir vários neurotransmissores em adição de outras proteínas neuro-específicas. A combinação de atributos químicos os quais são relacionados com as funções dos neurônios e seus locais no circuito nervoso fornecem um código químico pelo qual os neurônios podem ser identificados. Em geral, mais de uma substância contribui para o processo de transmissão (FURNESS, 2008).

Substâncias co-localizadas não têm o mesmo status de transmissoras. Uma ou mais substâncias tem o papel principal na transmissão, estas são transmissoras primárias. Por exemplo, neurônios vasoconstritores simpáticos em muitas espécies contêm norepinefrina e neuropeptídeo Y (NPY). O transmissor primário é a norepinefrina, o NPY tem um papel subsidiário ou modulador. As contribuições relativas de diferentes transmissores podem variar entre neurônios com funções comuns, dependendo da localização e da atividade, neurônios motores inibitórios do intestino são bons exemplos. Alguns neurônios contêm mais do que um transmissor primário e vários transmissores subsidiários ou neuromoduladores; algumas classes de neurônios entéricos têm cinco ou mais transmissores ou neuromoduladores (FURNESS, 2008).

Os neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs) são numerosos, aproximadamente 500 por milímetros de comprimento do intestino delgado e, pela técnica de imunohistoquímica, o seu melhor marcador é a calretinina, uma proteína intracelular. Eles são transdutores de estímulos fisiológicos, incluindo o movimento das vilosidades da mucosa, a contração do músculo intestinal e mudanças na química do conteúdo intestinal. Os IPANs são os primeiros neurônios em reflexos intrínsecos que influenciam os padrões de secreção e motilidade do intestino. Portanto, são diretamente sensíveis aos estímulos mecânicos e químicos da mucosa intestinal e a soma de eventos sinápticos causados pela transmissão de IPANs resultam em ativação de numerosos interneurônios e neurônios motores (LOMAX e FURNESS, 2000; FURNESS, JONES *et al.*, 2004; DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007).

Outro tipo de neurônio entérico são os interneurônios que formam cadeias interconectadas ligando neurônios motores e IPANs que correm ao longo do intestino. Podem ser identificados em todas as regiões intestinais e suas características regionais podem variar mais que em outros tipos de neurônios. Por exemplo, o íleo e o cólon contêm os mesmos, ou

muito parecidos, neurônios motores e neurônios aferentes intrínsecos primários, mas seus complementos de interneurônios são muito diferentes. Esta classe neuronal possui como marcadores a somatostatina, o NPY e em alguns casos a serotonina (5-HT) (LOMAX e FURNESS, 2000; FURNESS, 2008).

Os neurônios motores excitatórios inervam o músculo liso longitudinal e circular e a muscular da mucosa de todo trato digestivo. O transmissor primário desses neurônios é a acetilcolina (ACh) o qual age no músculo através de receptores muscarínicos. O principal marcador dos neurônios motores excitatórios é a enzima precursora da ACh, denominada colina-acetil-transferase (cChAT). As taquicininas, representadas pela substância P (SP), neuroquinina A, neuropeptídeo K, e neuropeptídeo gama (γ) contribuem para a transmissão excitatória, mas tem um papel secundário comparado ao da ACh (FURNESS, YOUNG *et al.*, 1995a; FURNESS, 2008).

Em contrapartida, os neurônios motores inibitórios liberam uma combinação de transmissores que contribuem para relaxamento do trato gastrointestinal. O neurotransmissor primário desses neurônios é o óxido nítrico (NO) que recebe contribuição secundária de outras substâncias como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e adenosina tri-fosfato (ATP). É possível que exista mais de um transmissor primário para esta subclasse neuronal, entretanto os papéis relativos desses transmissores se diferem entre regiões e espécies. O principal marcador dos neurônios motores inibitórios é a enzima precursora do NO, a óxido nítrico sintetase (NOS) (FURNESS, YOUNG *et al.*, 1995a; LOMAX e FURNESS, 2000; FURNESS, 2008).

Esses neurônios quando sofrem alguma agressão e necessitam se adaptar à novas influências microambientais (como doenças intestinais) podem apresentar um processo de regeneração denominado plasticidade neuronal. A plasticidade é a capacidade do sistema nervoso em regenerar suas conexões ou adaptar suas funções às atuais necessidades do organismo (SCHAFER, VAN GINNEKEN *et al.*, 2009).

Esse processo de plasticidade neuronal pode ser identificado através de um marcador de diferenciação neuronal chamado de proteína associada ao crescimento (GAP-43). GAP-43 é uma proteína integral de membrana, expressada em condições de crescimento embrionário ou quando há desenvolvimento ou regeneração de neurônios (SKENE, JACOBSON *et al.*, 1986; BASI, JACOBSON *et al.*, 1987; VENTO e SOINILA, 1999; DA SILVEIRA, FREITAS, DE OLIVEIRA, NETO, LUQUETTI, FURNESS, CORREA-OLIVEIRA e D'AVILA REIS, 2008).

No sistema nervoso autônomo, especialmente no SNE, GAP-43 é fortemente expresso nos gânglios mientéricos e submucoso em todas as idades, dando assim provas da capacidade do SNE em se adaptar às mudanças que ocorrem ao longo da vida (STEWART, COWEN *et al.*, 1992; GIARONI, DE PONTI *et al.*, 1999). Além de neurotransmissores, os neuropeptídeos possuem também atividade considerável sobre o sistema imune que influencia atividades do SNE através da secreção de vários tipos de substâncias. A substância P é considerada uma proteína que além de neuromediador, possui ação pró-inflamatória nas células do sistema imunológico. Ela estimula a proliferação linfocitária, o tráfego de linfócitos através dos linfonodos e a produção de IL-2. Além disso, a substância P age como um dos ativadores de células *Natural Killer* (NK) e possui ação quimiotática para mastócitos, macrófagos, e neutrófilos (MCKAY e FAIRWEATHER, 1997; CRUVINEL WDE, MESQUITA *et al.*, 2010).

O neuropeptídeo VIP tem ação antiinflamatória quando inibe a resposta de células NK e de linfócitos T, bem como a produção de IL-2 e IL-4 por estas células e a apresentação de antígenos. Por outro lado VIP também estimula a quimiotaxia de macrófagos e a produção de IL-5 por linfócitos (MCKAY e FAIRWEATHER, 1997; KODALI, DING *et al.*, 2004). O óxido nítrico, no sistema imune, parece exercer efeitos pró e antiinflamatórios (NATHAN, 1992). Os efeitos pró-inflamatórios do NO não são evidentes sob condições fisiológicas agudas. Como efeitos antiinflamatórios, podemos citar a inibição de adesão de neutrófilos, atividade da cicloxigenase, formação de citocinas e reabsorção óssea (SCHMIDT, KLATT *et al.*, 1994).

A caracterização das alterações no SNE na doença de Chagas teve grande ênfase nos últimos anos (ADAD, CANCELADO *et al.*, 2001; BERN, MONTGOMERY *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, ADAD *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, LEMOS *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, FREITAS, DE OLIVEIRA, NETO, LUQUETTI, FURNESS, CORREA-OLIVEIRA e D'AVILA REIS, 2008; NASCIMENTO, DE SOUZA LISBOA *et al.*, 2010; RAMOS JUNIOR, CORREIA *et al.*, 2010). Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa indicaram a existência de um significativo processo de regeneração neuronal em pacientes chagásicos que não desenvolveram o megacólon. No entanto, resta elucidar se essa regeneração neuronal ocorre em todas as subclasses neuronais ou permanece restrita a alguns grupos de neurônios.

2 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa estabeleceu nos anos de 2006, 2007 e 2008 importantes colaborações para o desenvolvimento de nossa linha de pesquisa. A primeira com o Dr. Enio Oliveira, professor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás. O Dr. Enio é o responsável pela coleta de amostras do trato gastrointestinal de pacientes chagásicos destinados à intervenção cirúrgica devido a complicações da doença de Chagas. A segunda, mas não menos importante colaboração, foi estabelecida com o Dr. John B. Furness, diretor do laboratório de Anatomia e Biologia Celular da Universidade de Melbourne, Austrália. O Dr. Furness é uma das mais respeitadas personalidades científicas em todo o mundo na área de pesquisa sobre o SNE. Finalmente, estabelecemos colaboração com o Dr. Axel Brehmer, professor da Universidade de Nuremberg (Alemanha). Atualmente o Dr. Brehmer é o maior especialista mundial em sistema nervoso entérico humano. Estas colaborações nos permitiram iniciar a caracterização de neurônios do trato gastrointestinal de pacientes chagásicos conforme a expressão de neuropeptídeos, o que, além de nos responder algumas perguntas referentes ao desenvolvimento do megacolon chagásico, nos apresentou um leque de possibilidades, principalmente no que diz respeito às terapêuticas.

Nossos estudos mais recentes tem como foco a relação entre o sistema imune e sua influência no funcionamento do trato gastrointestinal (DA SILVEIRA, CHAVES *et al.*, 2009; DA SILVEIRA, DE ARAUJO *et al.*, 2009; DA SILVEIRA, FREITAS *et al.*, 2009). Esses resultados apontaram para a necessidade de se esclarecer quais subtipos neuronais estão mais sujeitos ao processo de regeneração no trato gastrointestinal no sistema nervoso entérico de pacientes chagásicos. Acreditamos que ao desvendarmos certos aspectos ligados ao estabelecimento e desenvolvimento do megacolon chagásico, estaremos contribuindo não só para a aplicação de novas metodologias terapêuticas na doença de Chagas, mas sim em um amplo espectro de doenças que afligem o sistema digestivo, como doença de Chron, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável e doença de Hirschsprung.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar as subclasses neuronais do SNE quanto à capacidade regenerativa em pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon.

Objetivos Específicos

1 - Avaliar através de imunohistoquímica a relação entre a presença das subclasses de neurônios do SNE e a expressão marcador de regeneração neuronal GAP-43. Para isso será utilizado um conjunto de anticorpos monoclonais direcionados para identificação de neurônios e fibras nervosas (Periferina, Calretinina, NPY, Substância P, cChAT, VIP e NOS)

2 - Estabelecer associações entre as subclasses de neurônios que são preferencialmente destruídas pela forma digestiva da doença de Chagas, as subclasses neuronais que melhor se recuperam após a lesão causada pela doença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Nesse trabalho utilizamos amostras de tecidos de pacientes chagásicos portadores de megacólon 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).

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

<i>Grupos</i>	<i>Gênero</i>	<i>Idade</i>	<i>Megacólon</i>	<i>Diagnóstico</i>
<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
	F	81	Não	Adenocarcinoma sigmóide
<i>Chagásicos com megacólon</i>	F	57	Sim	Megacólon
	M	62	Sim	Megacólon
	M	60	Sim	Megacólon
	F	62	Sim	Megacólon
	M	58	Sim	Megacólon
	F	76	Sim	Megacólon
	F	43	Sim	Megacólon
	F	69	Sim	Megacólon
	M	59	Sim	Megacólon
	F	61	Sim	Megacólon
	F	53	Sim	Megacólon
	F	48	Sim	Megacólon
F	58	Sim	Megacólon	

As amostras de tecidos foram transportadas em soro fisiológico sobre o gelo (pH = 7,3) para o laboratório. Após sua chegada (1 a 6 horas após a ressecção), as amostras são 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 lg/mL de gentamicina (Sigma), 2,5 lg/mL de anfotericina B (Sigma), 10% soro fetal bovino (Sigma), 4 1M nicardipina e 2,1 mg/mL NaHCO₃, selados em um compartimento com 95% O₂ e 5% de CO₂ a 37 °C por 1 a 2 horas. Posteriormente, os tecidos foram incubados por mais 2 a 5 horas, no mesmo meio com

100 IM 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 a 3 horas. Após várias lavagens em 0,05 M Tris salina tamponada (TBS, pH = 7,4), a camada muscular e plexos nervosos das amostras serão preparadas para a técnica de wholemounts. A presença da doença foi confirmada através de exames clínicos e laboratoriais (DA SILVEIRA, A. B. M., ARANTES, R. M. E. *et al.*, 2005).

Imunohistoquímica

As amostras foram pré-incubadas por 2 horas 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 enxágue em TBS por 10 min, foram incubadas em uma solução contendo BSA, Triton X-100, thimerosal e os anticorpos primários (Tabela 1) por 72 horas (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 (4 horas, 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 amônio (pH = 5,0) contendo 1 mM CuSO₄ de 60 a 90 minutos seguido de um curto enxágue em H₂O destilada (BREHMER, BLASER *et al.*, 2004).

Tabela 2: Anticorpos primários

Anticorpo	Fonte	Código	Diluição
Anti-Periferina	INVITROGEN	A-21272	1:1000
Anti-Calretinina	DAKO	M7245	1:200
Anti-Substância P	INVITROGEN	180091	1:1000
Anti-cChAT	Advanced Targeting Systems	AB-N34	1:500
Anti-Neuropeptídeo Y	SIGMA	N9528	1:200
Anti-NOS	SIGMA	N7280	1:100
Anti-VIP	SIGMA	V3508	1:500
Anti-Gap-43	SIGMA	G8043	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. No total 20 amostras foram preparadas a partir de cada amostra coletada. Foram realizadas as seguintes marcações:

Anticorpos	Intenção
Periferina / GAP-43 / Calretinina	Aferir regeneração de neurônios sensitivos
Periferina / GAP-43 / cChAT / SP	Aferir regeneração de neurônios motores excitatórios
Periferina / GAP-43 / NPY	Aferir regeneração de interneurônios
Periferina / GAP-43 / VIP / NOS	Aferir regeneração de neurônios motores inibitórios

Aquisição de imagem dos gânglios

Para a aquisição das imagens dos gânglios do sistema nervoso entérico, 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, 647 nm de excitação; z-steps 0,6 μ m). A lente objetiva de 20x (abertura numérica 0,75) foi utilizada para a localização dos gânglios, enquanto a lente objetiva de 40x foi utilizada para a aquisição de imagens para as Séries-Z com o auxílio do programa Confocal Assistant 4.02 software. Imagens dos gânglios foram preparadas usando o Adobe Photoshop CS (8.0.1).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste Anova-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 foi realizadas utilizando o Software GraphPad Prim 3.0 (San Diego, CA). Foram calculadas a distribuição de freqüências de todas as variáveis e as medidas de tendência central utilizando diversos parâmetros: média, mediana, percentis, desvio padrão. 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). Para todas as análises, foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ e o poder obtido foi de 80%.

5 RESULTADOS

Avaliação da Inervação

A análise das amostras marcadas com Periferina de pacientes não infectados pela doença de Chagas evidenciou gânglios neuronais preservados, com corpos neuronais de formato regular e sem processo inflamatório. A quantificação da área imunoreativa demonstrou média de $338 \mu\text{m}^2$. (Fig. 1) (Graf. 1)

As amostras dos pacientes chagásicos mostraram gânglios disformes, corpos neuronais aumentados e com área imunoreativa ($175 \mu\text{m}^2$) significativamente reduzida quando comparado ao grupo controle. (Fig. 1) (Graf. 1)

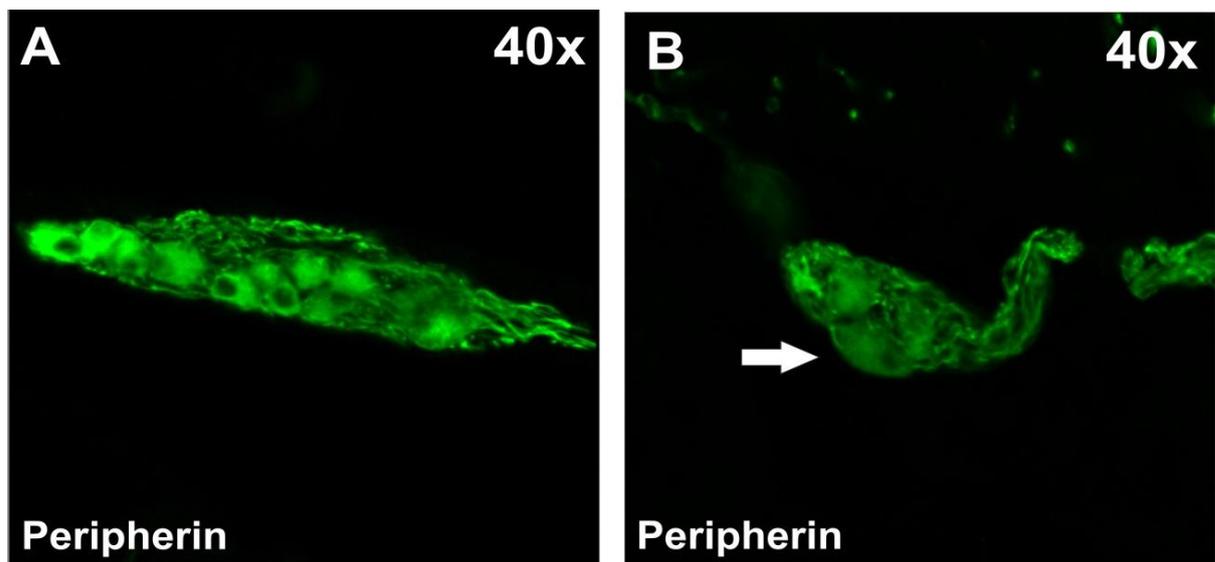


Figura 1: Marcação de Periferina pela técnica de imunofluorescência. Indivíduos não infectados (A) apresentaram gânglios neuronais preservados, com corpos neuronais de formato regular e sem processo inflamatório. Indivíduos chagásicos (B) apresentaram gânglios disformes, corpos neuronais aumentados (seta).

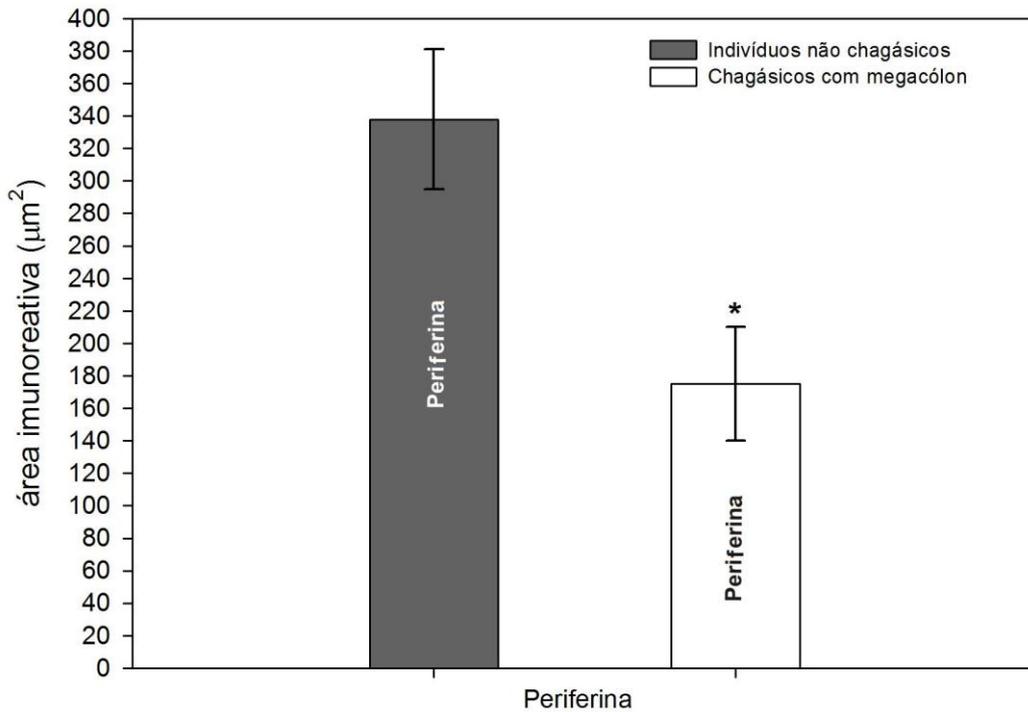


Gráfico 1: Análise morfométrica de neurônios do cólon marcados com Periferina imunoreativa. Indivíduos não infectados em cinza e indivíduos chagásicos com megacólon em branco. Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas \pm Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significantes entre o grupo chagásico e o grupo não infectado. Foi analisada área total de $1066 \mu\text{m}^2$ para todas as amostras ($p < 0,05$).

Análise da Capacidade Regenerativa das diferentes classes neuronais

As amostras com dupla marcação de Calretinina e GAP-43 apontaram pequena redução da área de neurônios aferentes primários intrínsecos (IPAN) em processo de regeneração em portadores de megacólon comparados com os pacientes do grupo controle (Fig. 2) (Graf. 2).

Amostras marcadas com a associação de NPY e GAP-43 mostraram-se semelhantes tanto em portadores de megacólon chagásico quanto em indivíduos não infectados com a doença (Fig. 2) (Graf. 2).

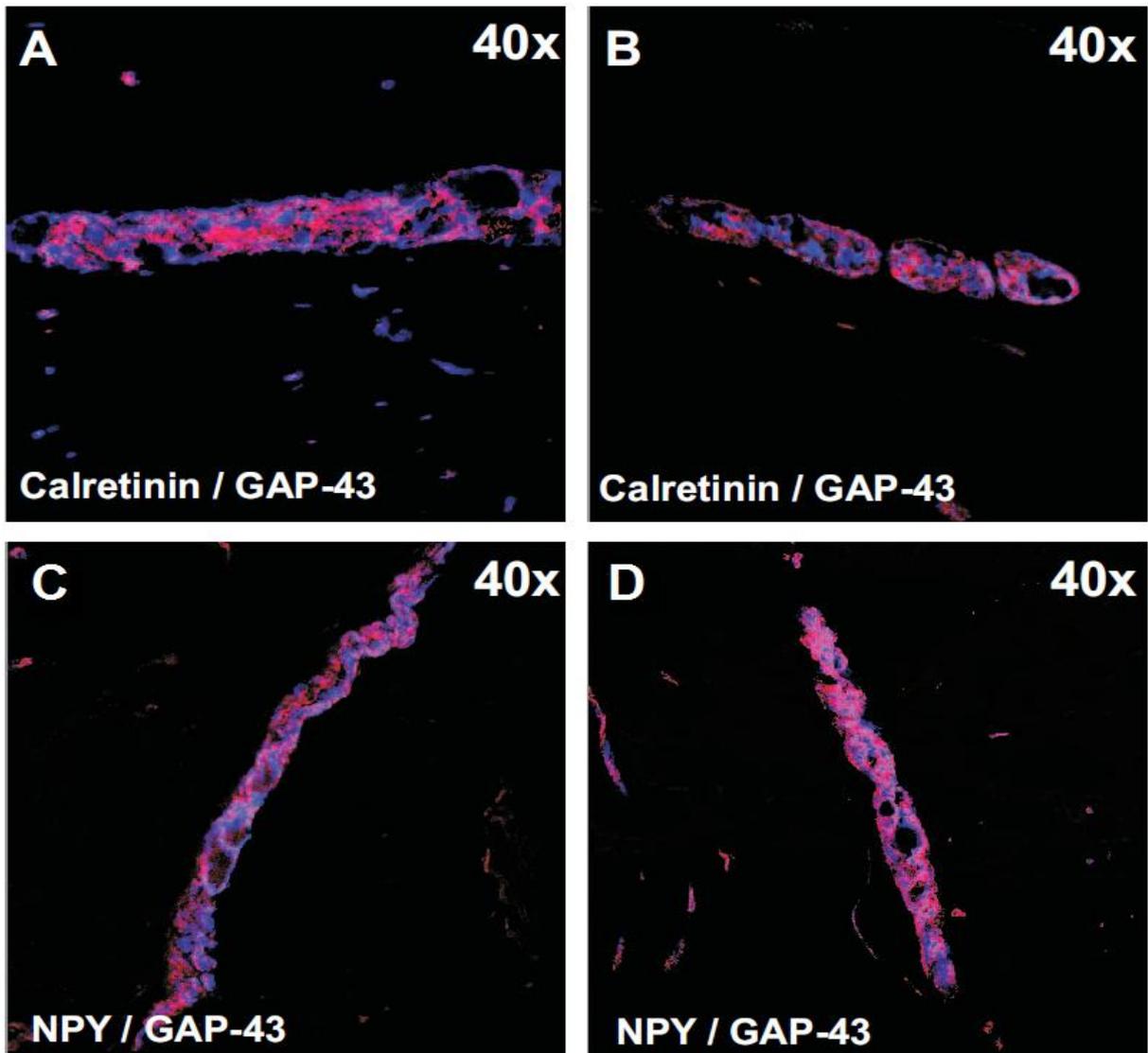


Figura 2: Caracterização do processo regenerativo em amostras de cólon de pacientes chagásicos com megacólon e não infectados marcados através de Calretinina e NPY em associação ao GAP-43. Neuropeptídeos se encontram em azul e o marcador de regeneração neuronal GAP-43 em vermelho. IPANs em processo de regeneração (Calretinina + GAP-43) demonstrados em não infectados (A) e em chagásicos (B). Pacientes chagásicos apresentaram pequena redução no processo regenerativo de IPANs. Interneurônios em processo de regeneração (NPY + GAP-43) demonstrados em não infectados (C) e em chagásicos (D).

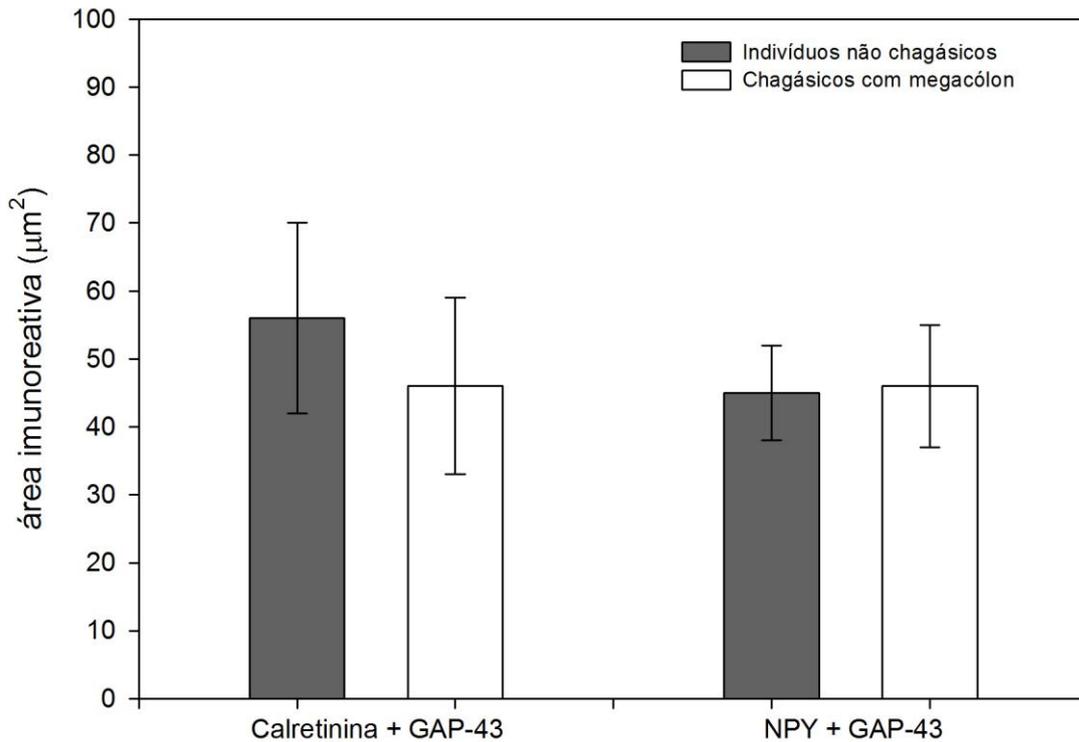


Gráfico 2: Análise morfométrica de IPANs e Interneurônios do cólon marcados com combinações de Calretinina + GAP-43 e NPY + GAP-43. Indivíduos não infectados em cinza e indivíduos chagásicos com megacólon em branco. Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas \pm Desvio Padrão. As análises não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Foi analisada área total de $1066 \mu\text{m}^2$ para todas as amostras ($p < 0,05$).

A análise de lâminas marcadas com as combinações de cChat e GAP-43, e ainda com Substância P e GAP-43 mostraram diminuição no processo regenerativo de células motoras excitatórias do plexo mientérico de pacientes com megacólon comparados com indivíduos não infectados, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Foram encontrados muitos neurônios em regeneração na camada muscular do plexo mientérico, mas estes não foram quantificados por não possuírem marcação por SP. (Fig. 3) (Graf. 3)

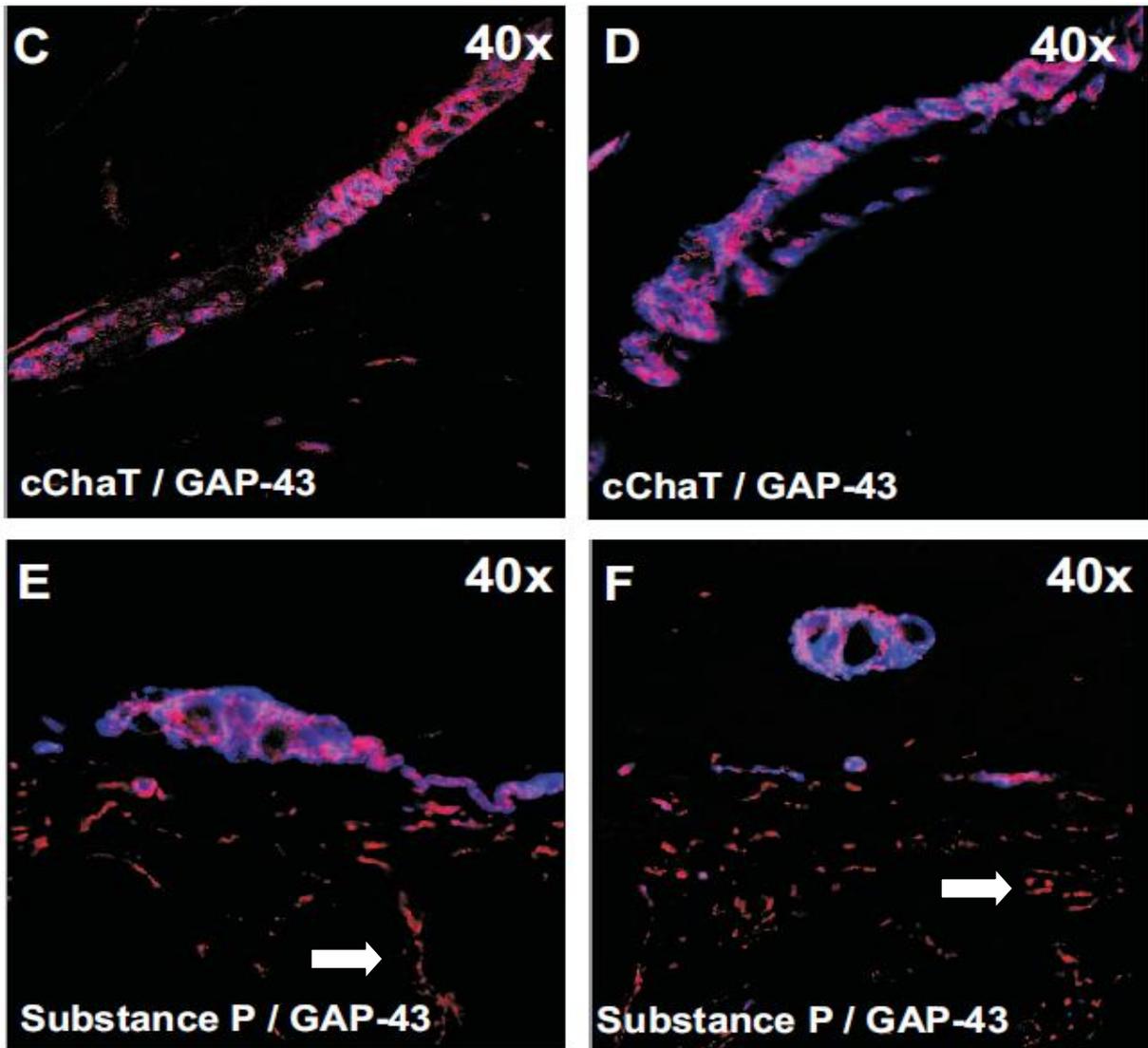


Figura 3: Caracterização do processo regenerativo em amostras de cólon de pacientes chagásicos com megacólon e não infectados marcados através de cChAT e Substância P em associação ao GAP-43. Neuropeptídeos se encontram em azul e o marcador de regeneração neuronal GAP-43 em vermelho. Neurônios motores excitatórios em processo de regeneração cChAT + GAP-43 demonstrados em não infectados (C) e em chagásicos (D) e substância P + GAP-43 demonstrados em não infectados (E) e em chagásicos (F). Alguns filamentos neuronais localizados na camada muscular foram demonstrados (setas E e F) mas não foram quantificados por não possuírem marcação para substância P.

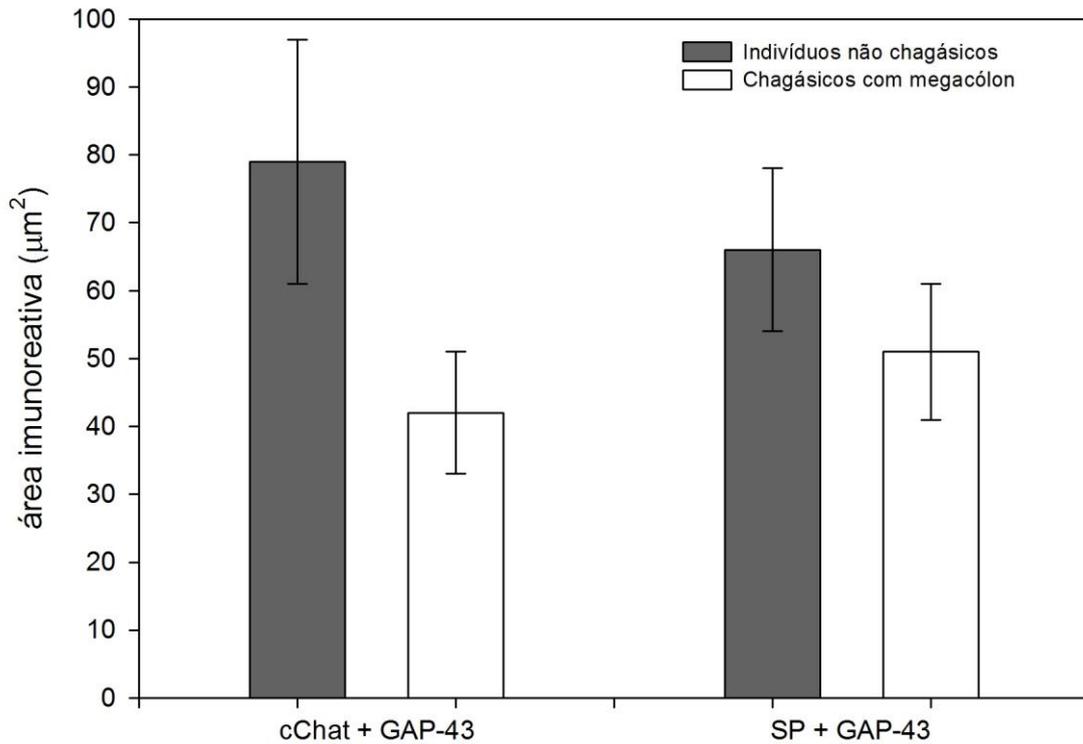


Gráfico 3: Análise morfológica de neurônios motores excitatórios do cólon marcados com combinações de cChaT + GAP-43 e Substância P + GAP-43. Indivíduos não infectados em cinza e indivíduos chagásicos com megacólon em branco. Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas \pm Desvio Padrão. As análises não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Foi analisada área total de $1066 \mu\text{m}^2$ para todas as amostras ($p < 0,05$).

As lâminas com dupla marcação tanto de VIP e GAP-43, quanto de NOS e GAP-43, evidenciaram aumento significativo na taxa de regeneração de neurônios motores inibitórios do plexo mientérico de pacientes chagásicos portadores de megacólon comparados aos pacientes do grupo controle (Fig. 4) (Graf. 4).

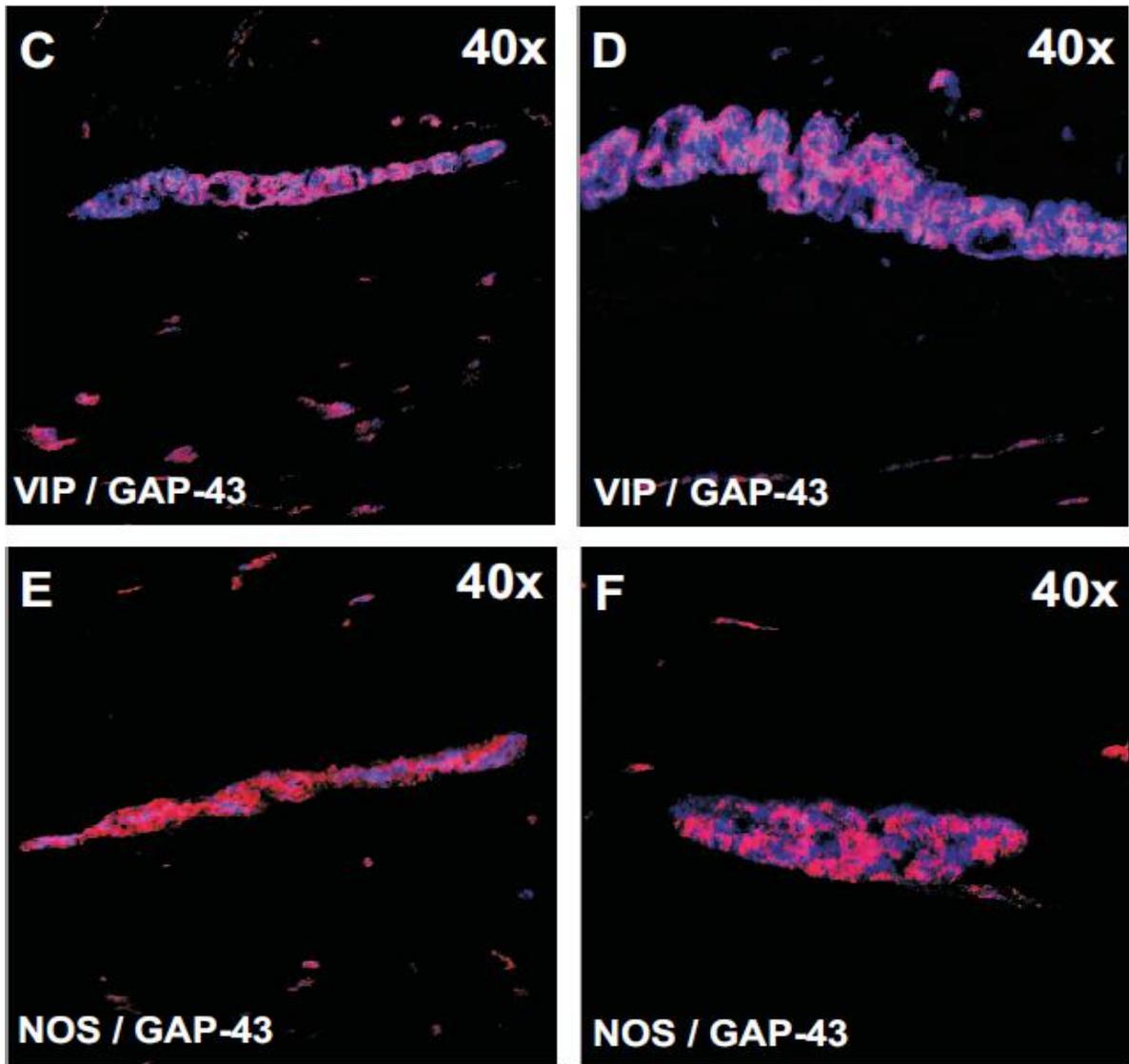


Figura 4: Caracterização do processo regenerativo em amostras de cólon de pacientes chagásicos com megacólon e não infectados marcados através de VIP e NOS em associação ao GAP-43. Neuropeptídeos se encontram em azul e o marcador de regeneração neuronal GAP-43 em vermelho. Neurônios motores inibitórios em processo de regeneração VIP + GAP-43 demonstrados em não infectados (C) e em chagásicos (D) e NOS + GAP-43 demonstrados em não infectados (E) e em chagásicos (F). Observamos que o processo regenerativo em ambos os neurônios motores inibitórios (VIP e NOS) está aumentado em pacientes chagásicos com megacólon (D e F) em comparação aos não-infectados (C e E)

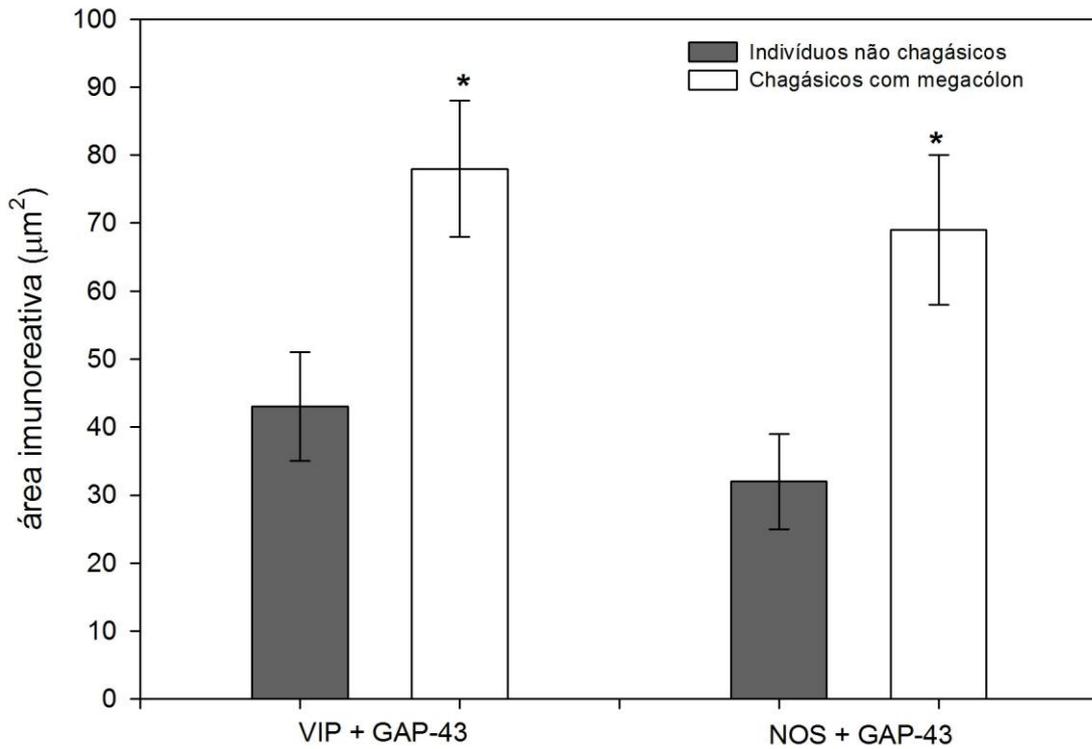


Gráfico 4: Análise morfométrica de neurônios motores inibitórios do cólon marcados com combinações de VIP + GAP-43 e NOS + GAP-43. Indivíduos não infectados em cinza e indivíduos chagásicos com megacólon em branco. Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas \pm Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significantes entre o grupo chagásico e o grupo não infectado. Foi analisada área total de $1066 \mu\text{m}^2$ para todas as amostras ($p < 0,05$).

Tabela 4: Área imunoreativa de neurônios e sua respectiva taxa de regeneração no plexo mientérico de amostras de cólon provenientes de pacientes chagásicos portadores de megacólon e de indivíduos não infectados.

Neuropeptídeo	Indivíduos não chagásicos	Chagásicos portadores de megacólon
Periferina	338 ± 43	$175 \pm 35^*$
Calretinina-GAP	56 ± 14	46 ± 13
cChat-GAP	79 ± 18	42 ± 9
SP-GAP	66 ± 12	51 ± 10
NPY-GAP	45 ± 7	46 ± 9
VIP-GAP	43 ± 8	$78 \pm 10^*$
NOS-GAP	32 ± 7	$69 \pm 11^*$

6 DISCUSSÃO

O megaesôfago e o megacólon são as alterações mais comuns no trato digestório na doença de Chagas (KOEBERLE, 1963). Atualmente, a deservação é aceita como uma das causas de desenvolvimento do megacólon chagásico (KOEBERLE, 1970; DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007). A destruição neuronal na doença de Chagas na fase aguda ocorre pela grande concentração do parasita no tecido, porém, na fase crônica está também relacionada ao processo inflamatório envolvido nesta doença (DA SILVEIRA, A. B., ARANTES, R. M. *et al.*, 2005; DA SILVEIRA, LEMOS *et al.*, 2007). A inter-relação entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico é muito importante para a compreensão das doenças intestinais, podendo ser definitivo para determinação de manifestações clínicas e para o desenvolvimento de processos inflamatórios no intestino (SATO, LEO *et al.*, 2008).

As primeiras descrições, relacionando alterações no plexo mientérico e a doença de Chagas, datam de 1930, entretanto ainda necessitavam de comprovações anatomopatológicas. Tal comprovação se deu através do pesquisador Koeberle, a partir de 1953 e seus estudos quantitativos dos neurônios do esôfago. Seus colaboradores continuaram os estudos pelos demais seguimentos digestivos, tais como estômago, intestino delgado e cólon (DE REZENDE, 1979).

Alguns trabalhos comprovaram a destruição neuronal no plexo mientérico de pacientes chagásicos e demonstraram uma relação com o processo inflamatório em porções do trato gastrintestinal (DA SILVEIRA, A. B., ARANTES, R. M. *et al.*, 2005; DA SILVEIRA, ADAD *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, LEMOS *et al.*, 2007). Posteriormente evidenciou-se que esta destruição neuronal poderia ser seletiva, ou seja, alguma das diferentes classes de neurônios seria preferencialmente destruída (DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007). Surge então o questionamento sobre como seria o processo regenerativo nas diferentes classes neuronais do Sistema Nervoso Entérico, se realmente uma classe era preferencialmente destruída ou sua área imunorreativa estaria reduzida pelo fato de não apresentar processo regenerativo satisfatório.

Assim, este estudo, no intuito de esclarecer os processos que circundam a destruição do SNE nos pacientes chagásicos, avaliou a regeneração das diferentes subclasses neuronais em pacientes com megacólon. Ressaltamos que este é o primeiro trabalho que se propôs a esta elucidação através do estudo da regeneração neuronal nestes pacientes.

Neste trabalho, a área inervada foi mensurada através da substância Periferina, um marcador de neurônios periféricos, e nossos resultados mostraram redução significativa da área de neurônios em amostras de pacientes chagásicos portadores de megacólon. Esses dados estão em conformidade com estudos prévios, demonstrando que a perda neuronal tem papel de destaque no desenvolvimento do megacólon (ADAD, CANCELADO *et al.*, 2001; DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, LEMOS *et al.*, 2007).

Previamente, foi evidenciado que os IPANs, os neurônios motores excitatórios (marcados por cChat) e os interneurônios apresentavam quantidades semelhantes em indivíduos não infectados e em indivíduos chagásicos (DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007). No presente estudo, a análise da capacidade regenerativa destas classes neuronais demonstrou que a regeneração destes neurônios também é semelhante tanto em chagásicos como em não infectados. Isto confirma resultados anteriores, pois como a destruição destas classes não é acentuada, não é necessário um aumento do processo regenerativo.

Os neurônios motores são divididos em dois grupos, os excitatórios e os inibitórios. Ambos inervam as camadas musculares e a muscular da mucosa em todo trato gastrintestinal (FURNESS, YOUNG *et al.*, 1995b). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que existe um aumento de neurônios motores excitatórios que sintetizam substância P em pacientes chagásicos (DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, FREITAS, DE OLIVEIRA, NETO, LUQUETTI, FURNESS, CORREA-OLIVEIRA e REIS, 2008). A substância P, além de participar do processo de neurotransmissão, também atua na resposta inflamatória como fator pró-inflamatório (CRUVINEL WDE, MESQUITA *et al.*, 2010). Acreditamos que o aumento de substância P em pacientes chagásicos represente uma tentativa do organismo em combater o parasita através do aumento da resposta inflamatória. Neste trabalho foi evidenciada uma pequena redução no processo regenerativo de neurônios que sintetizam a substância P nos pacientes portadores de megacólon chagásico. Como o número destes neurônios está aumentado nestes pacientes, já era esperado que o processo regenerativo estivesse diminuído.

Dados anteriores indicavam que o número de neurônios motores inibitórios, marcados através de VIP e NOS estão diminuídos em pacientes chagásicos com megacólon (DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007). O peptídeo intestinal vasoativo além de participar do relaxamento da musculatura do cólon, tem papel antiinflamatório (KODALI, DING *et al.*, 2004). O óxido nítrico também participa do relaxamento do cólon, mas na resposta inflamatória pode atuar tanto como antiinflamatório, como também pró-inflamatório (NATHAN, 1992). Acreditamos que, por apresentar propriedades antiinflamatórias, o parasita

teria uma maior liberdade para atacar estes tipos neurônios sem uma grande interferência do sistema imunológico, acarretando uma destruição preferencial dos mesmos. A redução de neurônios inibitórios tem íntima relação com o desenvolvimento do megacólon (DA SILVEIRA, D'AVILA REIS *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstraram que o processo de regeneração encontra-se muito aumentado nas classes neuronais marcadas com VIP e NOS. Este dado aponta que, na tentativa de reparar a perda de neurônios inibitórios causado pela infecção do parasita e pelo recorrente processo inflamatório próximo aos plexos nervosos, o organismo intensifica o processo de regeneração por parte destes neurônios para compensar sua função até então suprimida.

Nossos resultados corroboram com observações clínicas que indicam a perda da capacidade de relaxamento das camadas musculares do cólon em pacientes chagásicos que desenvolvem o megacólon. Esta perda produz alterações na motilidade do cólon levando ao acúmulo de fezes, intensificação do processo inflamatório devido a destruição e células comprimidas e pela falta de irrigação sanguínea adequada, o que conseqüentemente leva à dilatação do órgão. Assim, nossos resultados explicariam as causas dos sintomas mais comuns no megacólon chagásico, como a incoordenação do segmento reto-sigmóide, hiperatividade de estímulos colinérgicos e acalasia do esfíncter anal interno (DE REZENDE, 1979).

Diante destes achados acreditamos que a compreensão do processo regenerativo dos neurônios motores inibitórios (VIP e NOS) pode nos indicar a causa do desenvolvimento do megacólon chagásico e nos indicar possíveis formas de prevenção do mesmo. Acreditamos que nossos resultados possam abrir caminhos para o desenvolvimento de novas drogas e mecanismos terapêuticos que serão utilizados para retardar o desenvolvimento do megacólon e até mesmo para preveni-lo. A complementação destes resultados virá de trabalhos posteriores que tenham como objetivo a caracterização dos efeitos e das células produtoras de neurotrofinas, o que permitirá conhecer as condições exatas que promovem o processo de regeneração neuronal. Além disto, acreditamos que estes dados possam ajudar na compreensão e prevenção não somente da forma digestiva da doença de Chagas, mas também de outras doenças que atingem o trato gastrointestinal.

7 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- 1) Pacientes chagásicos com megacólon apresentaram alteração no formato dos gânglios neuronais e redução significativa da área.
- 2) O processo regenerativo de neurônios aferentes primários e interneurônios é semelhante em indivíduos não chagásicos e chagásicos portadores de mega.
- 3) As células motoras excitatórias do plexo mientérico de pacientes com megacólon apresentaram redução no processo regenerativo.
- 4) Neurônios motores inibitórios dos pacientes chagásicos portadores de megacólon apresentaram aumento significativo na taxa de regeneração.

A redução da área imunoreativa em pacientes chagásicos, principalmente de neurônios motores inibitórios, e consequente aumento no processo regenerativo, evidencia a tentativa do organismo em compensar a perda neuronal e ainda demonstra a íntima relação entre a destruição de neurônios inibitórios e a formação do megacólon chagásico. Logo, desenvolver medicamentos que reduzam a destruição desses neurônios e/ou aumentem sua regeneração podem retardar e até evitar a formação megacólon.

REFERÊNCIAS

ADAD, S. J. et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Arch**, v. 438, n. 3, p. 254-8, Mar 2001. ISSN 0945-6317 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11315622 >.

ALMEIDA, H. O. et al. [Inflammation associated with cardiac muscle cells parasitized by *Trypanosoma cruzi*, in chronic Chagas' disease patients]. **Arq Bras Cardiol**, v. 42, n. 3, p. 183-6, Mar 1984. ISSN 0066-782X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6383295 >.

ALTCHEH, J. [Chagas disease, 100 years after its identification]. **Arch Argent Pediatr**, v. 108, n. 1, p. 4-5, Feb 2010. ISSN 1668-3501 (Electronic) 0325-0075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204232> >.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. [Chagas' disease and neuron changes in Auerbach's plexus. (Experimental study in mice)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 8, n. 5, p. 219-24, Sep-Oct 1966. ISSN 0036-4665 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4967920 >.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 71-80, 1999. ISSN 0074-0276 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10677693 >.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. [Immunochemical study of experimental Chagas' disease]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 11, n. 1, p. 44-7, Jan-Feb 1969. ISSN 0036-4665 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4976981 >.

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

BASI, G. S. et al. Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. **Cell**, v. 49, n. 6, p. 785-91, Jun 19 1987. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3581170 >.

BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **Int J Cardiol**, v. 112, n. 1, p. 132-3, Sep 10 2006. ISSN 0167-5273 (Print)

0167-5273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600406> >.

BERN, C. et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **Jama**, v. 298, n. 18, p. 2171-81, Nov 14 2007. ISSN 1538-3598 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000201 >.

BREHMER, A. et al. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitroergic and non-nitroergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. **Histochem Cell Biol**, v. 121, n. 1, p. 13-20, Jan 2004. ISSN 0948-6143 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14663589 >.

BRENER, Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. **Bull World Health Organ**, v. 60, n. 4, p. 463-73, 1982. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6814776 >.

CAMPOS, J. V.; TAFURI, W. L. Chagas enteropathy. **Gut**, v. 14, n. 11, p. 910-9, Nov 1973. ISSN 0017-5749 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4202602 >.

CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanosomíase americana. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 5-37, 1916.

CORBETT, C. E. et al. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. **Dis Colon Rectum**, v. 44, n. 7, p. 993-8, Jul 2001. ISSN 0012-3706 (Print) 0012-3706 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11496080 >.

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 Suppl 4, p. iv15-9; discussion iv26, Dec 2000. ISSN 0017-5749 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11076898 >.

CRUVINEL WDE, M. et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-61, Aug 2010. ISSN 1809-4570 (Electronic) 0482-5004 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21125178 >.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 6, p. 789-96, Jun 2007. ISSN 0031-1820 (Print)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288632> >.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. Pt 5, p. 627-34, Nov 2005. ISSN 0031-1820 (Print)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255821> >.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Dig Dis Sci**, v. 52, n. 10, p. 2877-83, Oct 2007. ISSN 0163-2116 (Print)

0163-2116 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17385032 >.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. **Parasitology**, v. 135, n. 11, p. 1337-42, Sep 2008. ISSN 1469-8161 (Electronic)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664306> >.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 11, p. 1154-6, Nov 2008. ISSN 1878-3503 (Electronic)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554673> >.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**, v. 38, n. 8, p. 1256-64, Aug 2007. ISSN 0046-8177 (Print)

0046-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17490721> >.

DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, p. 627-634, 2005.

DARYANI, A.; HOSSEINI, A. Z.; DALIMI, A. Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. **Veterinary parasitology**, v. 113, n. 2, p. 123-34, Apr 18 2003. ISSN 0304-4017 (Print)

0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695037> >.

DE REZENDE, J. M. [Chagas disease of the digestive tract (author's transl)]. **Rev Med Chil**, v. 107, n. 1, p. 71-2, Jan 1979. ISSN 0034-9887 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=111328 >.

DE REZENDE, J. M.; RASSI, A. [Involvement of the esophagus in Chagas' disease; megaesophagus & cardiopathy.]. **Hospital (Rio J)**, v. 53, n. 1, p. 1-15, Jan 1958. ISSN 0018-5469 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13524820 >.

DIAS, J. C. [General aspects of the prevention of Chagas' disease in Brazil]. **Rev Paul Med**, v. 102, n. 6, p. 279-81, Nov-Dec 1984. ISSN 0035-0362 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6442940 >.

DIAS, J. C. Tropical diseases and the gender approach. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 30, n. 3, p. 242-60, Sep 1996. ISSN 0085-4638 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8897725 >.

DIAS, J. C. [Chagas disease, environment, participation, and the state]. **Cad Saude Publica**, v. 17 Suppl, p. 165-9, 2001. ISSN 0102-311X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11426278 >.

DIAS, J. C. et al. [Chagas' disease in Lassance, Minas Gerais State: Clinical-epidemiological re-evaluation ninety years after the discovery by Carlos Chagas]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 2, p. 167-76, Mar-Apr 2002. ISSN 0037-8682 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12011926 >.

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

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 208-18, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19753476 >.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20 Suppl 1, p. 32-8, May 2008. ISSN 1365-2982 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18402640 >.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1980. ISSN 0306-4522 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6154268 >.

FURNESS, J. B. et al. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Prog Neurobiol**, v. 72, n. 2, p. 143-64, Feb 2004. ISSN 0301-0082 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15063530 >.

FURNESS, J. B. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, v. 108, n. 2, p. 554-63, Feb 1995a. ISSN 0016-5085 (Print).

Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7835599>.

FURNESS, J. B. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, v. 108, p. 554-563, 1995b.

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

GIARONI, C. et al. Plasticity in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 117, n. 6, p. 1438-58, Dec 1999. ISSN 0016-5085 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10579986>.

GOMES, Y. M. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 107-19, May 1997. ISSN 0273-2289 (Print)
 0273-2289 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9248034> >.

HIGUCHI MDE, L. et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 423, n. 3, p. 157-60, 1993. ISSN 0174-7398 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7901937>.

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

KOBERLE, F. [50 Years of Chagas' disease.]. **Munch Med Wochenschr**, v. 99, n. 34, p. 1193-8, Aug 23 1957. ISSN 0027-2973 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13483455>.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, v. 6, p. 63-116, 1968. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4239747>.

KOBERLE, F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. **Bull World Health Organ**, v. 42, n. 5, p. 739-43, 1970. ISSN 0042-9686 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4988694>.

KODALI, S. et al. Vasoactive intestinal peptide modulates Langerhans cell immune function. **J Immunol**, v. 173, n. 10, p. 6082-8, Nov 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15528344 >.

KOEBERLE, F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas Disease. **Gut**, v. 4, p. 399-405, Dec 1963. ISSN 0017-5749 (Print)
 0017-5749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14084752 >.

LOMAX, A. E.; FURNESS, J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. **Cell Tissue Res**, v. 302, n. 1, p. 59-72, Oct 2000. ISSN 0302-766X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11079716 >.

LUNDGREN, O. Sympathetic input into the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 Suppl 4, p. iv33-5; discussion iv36, Dec 2000. ISSN 0017-5749 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11076905 >.

MACQUEEN, G. et al. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. **Science**, v. 243, n. 4887, p. 83-5, Jan 6 1989. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2911721 >.

MARIN NETO, J. A. et al. Mechanisms of tachycardia on standing: studies in normal individuals and in chronic Chagas' heart patients. **Cardiovasc Res**, v. 14, n. 9, p. 541-50, Sep 1980. ISSN 0008-6363 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7214398 >.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; SZURSZEWski, J. H. Heme-oxygenase-2 immunolabelling in pig jejunum. **Acta Histochem**, Feb 19 2009. ISSN 1618-0372 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19232687 >.

MCKAY, D. M.; BIENENSTOCK, J.; PERDUE, M. H. Inhibition of antigen-induced secretion in the rat jejunum by interferon alpha/beta. **Reg Immunol**, v. 5, n. 1, p. 53-9, Jan-Feb 1993. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8347470 >.

MCKAY, D. M.; FAIRWEATHER, I. A role for the enteric nervous system in the response to helminth infections. **Parasitol Today**, v. 13, n. 2, p. 63-9, Feb 1997. ISSN 0169-4758 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15275125 >.

MCKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. *Cells and mediators* (1). **Dig Dis Sci**, v. 38, n. 8, p. 1377-87, Aug 1993. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8344092 >.

MCMILLIN, D. L. et al. The abdominal brain and enteric nervous system. **J Altern Complement Med**, v. 5, n. 6, p. 575-86, Dec 1999. ISSN 1075-5535 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10630351 >.

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. A study of human myocardial tissue in Chagas' disease: distribution and frequency of inflammatory cell types. **Int J Parasitol**, v. 17, n. 7, p. 1297-305, Oct 1987. ISSN 0020-7519 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3429121 >.

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. Immunohistochemical detection of deposits of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil peroxidase in the myocardium of patients with Chagas' disease. **Immunology**, v. 64, n. 4, p. 725-31, Aug 1988a. ISSN 0019-2805 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3049321 >.

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. Kinetics of development of inflammatory lesions in myocardial and skeletal muscle in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Parasitol**, v. 74, n. 3, p. 370-4, Jun 1988b. ISSN 0022-3395 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3132546 >.

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. Eosinophil activation in acute and chronic chagasic myocardial lesions and deposition of toxic eosinophil granule proteins on heart myofibers. **J Parasitol**, v. 75, n. 1, p. 129-33, Feb 1989a. ISSN 0022-3395 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2918433 >.

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. **Immunology**, v. 66, n. 2, p. 289-95, Feb 1989b. ISSN 0019-2805 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2647628 >.

NASCIMENTO, R. D. et al. Characterization of enteroglial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. **Hum Pathol**, v. 41, n. 4, p. 528-34, Apr 2010. ISSN 1532-8392 (Electronic) 0046-8177 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20004942 >.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb J**, v. 6, n. 12, p. 3051-64, Sep 1992. ISSN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1381691>.

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. **Auton Neurosci**, v. 136, n. 1-2, p. 1-19, Oct 30 2007. ISSN 1566-0702 (Print). Disponível em:

<
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17537681>.

POWLEY, T. L. Vagal input to the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 Suppl 4, p. iv30-2; discussion iv36, Dec 2000. ISSN 0017-5749 (Print). Disponível em: <

<
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11076904>.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001. ISSN 1473-3099 (Print). Disponível em: <

<
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11871482>.

RAMOS JUNIOR, A. N. et al. History, current issues and future of the brazilian network for attending and studying Trypanosoma cruzi/HIV coinfection. **J Infect Dev Ctries**, v. 4, n. 11, p. 682-8, 2010. ISSN 1972-2680 (Electronic)

1972-2680 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21252444>.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, v. 23, n. 12, p. 883-9, Dec 2000. ISSN 0160-9289 (Print). Disponível em: <

<
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11129673>.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993. ISSN 0002-9637 (Print). Disponível em: <

<
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8517482>.

ROMANA, C. [The developmental cycle of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi Chagas 1909. in its tissular and hematic phases]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 1, p. 255-69, Jun 1956. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13369154> >.

SATO, H. et al. Prevalence and molecular phylogenetic characterization of Trypanosoma (Megatrypanum) minasense in the peripheral blood of small neotropical primates after a quarantine period. **J Parasitol**, v. 94, n. 5, p. 1128-38, Oct 2008. ISSN 0022-3395 (Print).

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18576832 >.

SCHAFER, K. H.; VAN GINNEKEN, C.; COPRAY, S. Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 292, n. 12, p. 1940-52, Dec 2009. ISSN 1932-8494 (Electronic) 1932-8486 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19943347 >.

SCHMIDT, K.; KLATT, P.; MAYER, B. Uptake of nitric oxide synthase inhibitors by macrophage RAW 264.7 cells. **The Biochemical journal**, v. 301 (Pt 2), p. 313-6, Jul 15 1994. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519006> >.

SKENE, J. H. et al. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. **Science**, v. 233, n. 4765, p. 783-6, Aug 15 1986. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3738509 >.

STEWART, H. J. et al. GAP-43 immunoreactivity is widespread in the autonomic neurons and sensory neurons of the rat. **Neuroscience**, v. 47, n. 3, p. 673-84, 1992. ISSN 0306-4522 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1533902 >.

SZABOLCS, M. J. et al. Peripherin: a novel marker for the immunohistochemical study of malformations of the enteric nervous system. **Pediatr Pathol Lab Med**, v. 16, n. 1, p. 51-70, Jan-Feb 1996. ISSN 1077-1042 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8963631 >.

TAFURI, W. L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 19, n. 3, p. 405-17, May 1970. ISSN 0002-9637 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4986557 >.

TAFURI, W. L. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. **Virchows Arch A Pathol Pathol Anat**, v. 354, n. 2, p. 136-49, 1971. ISSN 0042-6423 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5000755 >.

TAFURI, W. L. [Pathogenesis of Chagas' disease]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 29, n. 4, p. 194-9, Jul-Aug 1987. ISSN 0036-4665 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3130653 >.

TAFURI, W. L.; BRENER, Z. [Injuries of Meissner and Auerback plexus of albino mice intestines in the chronic phase of experimental trypanosomiasis cruzi]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 9, n. 3, p. 149-54, May-Jun 1967. ISSN 0036-4665 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4973670 >.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. [Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 13, n. 2, p. 76-91, Mar-Apr 1971. ISSN 0036-4665 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5005737 >.

VAGO, A. R. et al. PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891-2, Sep 28 1996. ISSN 0140-6736 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8826826 >.

VENTO, P.; SOINILA, S. Quantitative comparison of growth-associated protein GAP-43, neuron-specific enolase, and protein gene product 9.5 as neuronal markers in mature human intestine. **J Histochem Cytochem**, v. 47, n. 11, p. 1405-16, Nov 1999. ISSN 0022-1554 (Print) 0022-1554 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10544214 >.