

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

**MARIA FERNANDA ATTIE CURY**

**AVALIAÇÃO DE NEUROTROFINAS NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO  
NEURONAL DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES  
CHAGÁSICOS PORTADORES DE MEGACÓLON**

**UBERLÂNDIA**

**2014**

MARIA FERNANDA ATTIE CURY

**AVALIAÇÃO DE NEUROTROFINAS NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO  
NEURONAL DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES  
CHAGÁSICOS PORTADORES DE MEGACÓLON**

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

**Área de concentração:** Ciências da Saúde  
**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Barcelos  
Morais da Silveira

UBERLÂNDIA  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C982a Cury, Maria Fernanda Attie, 1963

2014

Avaliação de neurotrofinas no processo de regeneração neuronal do sistema nervoso entérico de pacientes chagásicos portadores de megacôlon /  
Maria Fernanda Attie Cury. - 2014.

42 p. : il.

Orientador: Alexandre Barcelos Morais da Silveira.

Coorientadora: Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas.

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. Sistema nervoso entérico - Teses. 4. Megacôlon - Teses. I. Silveira, Alexandre Barcelos Morais da. II. Freitas, Michelle Aparecida Ribeiro de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

---

CDU: 61

MARIA FERNANDA ATTIE CURY

**AVALIAÇÃO DE NEUROTROFINAS NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO  
NEURONAL DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES CHAGÁSICOS  
PORTADORES DE MEGACÓLON**

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

**Área de concentração:** Ciências da Saúde  
**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Barcelos  
Morais da Silveira

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Micena Roberta Alves Miranda e Silva  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Luis Borges Bispo da Silva  
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Michelle A. Ribeiro de Freitas  
Universidade Federal de Uberlândia

UBERLÂNDIA  
2014

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Alexandre Barcelos Moraes da Silveira, pela orientação e pelo direcionamento do trabalho desde o início. Agradeço pela oportunidade e pela confiança.

Ao Dr. Enio Chaves Oliveira, pela confiança em captar e nos conceder as amostras de cólon utilizadas neste trabalho e pelo suporte científico em todas as suas etapas.

Ao Dr. Axel Brehmer, pela amizade e pela parceria ao longo de tantos anos.

Às técnicas Karin Löschner, Stefanie Link, Anita Hecht, Andrea Hilpert, Hedwig Symowski e Inge Zimmermann, do Laboratório do Sistema Nervoso Entérico da Universidade de Erlangen-Nuremberg (Alemanha), pelo permanente suporte técnico em nossas investigações e pela valiosa ajuda na preparação de nosso artigo científico.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e ao DFG (Deutsche Forschungs Gemeinschaft), pelo suporte financeiro (BR 1815/4-1).

Aos colegas do grupo do Mestrado, em especial aos que compartilharam este projeto.

À equipe do Serviço de Psiquiatria da UFU, pela compreensão e pelo apoio na concretização deste trabalho.

À minha família, que compartilhou e colaborou comigo na concretização de mais este projeto.

A todos os outros participantes do grupo que contribuíram para a realização deste trabalho.

## **RESUMO**

A forma digestiva decorrente da doença de Chagas é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na fase crônica da doença. Pacientes portadores da forma digestiva apresentam uma série de sintomas relacionados à obstrução do órgão. No megacôlon, os órgãos exibem grande aumento do lúmen e hipertrofia da camada muscular. Análises histológicas dos órgãos afetados têm demonstrado lesões inflamatórias do sistema nervoso entérico (SNE), associadas com uma grande redução no número de neurônios. Embora o mecanismo de lesão neuronal continue obscuro, a frequente observação de ganglionite e periganglionite em pacientes com megacôlon aponta para a participação de células do sistema imune nesse processo. Indivíduos não portadores de megacôlon também apresentaram processos de denervação e inflamação, porém menos intensas em relação aos portadores de megacôlon. Conhecendo que a inter-relação entre o SNE e o sistema imune é muito rica, é de extrema importância compreender os mecanismos que atuam em comum entre estes dois sistemas, o que pode elucidar e mostrar novos caminhos para o controle efetivo de doenças que afigem o trato gastrintestinal. Dados preliminares de nossos estudos utilizando a proteína GAP-43, marcador de regeneração neuronal, sugerem que esse processo de plasticidade neuronal esteja ocorrendo no cólon de pacientes portadores da infecção crônica. A hipótese é que o desenvolvimento do megacôlon chagásico esteja intimamente relacionado com a expressão de neurotrofinas, substâncias capazes de estimular o processo de regeneração neuronal. A partir desses dados uma nova linha investigativa abriu-se no estudo da patologia do megacôlon chagásico. Para a compreensão do desenvolvimento dessa patologia, avaliamos o grau de destruição das diferentes classes neuronais, a taxa de regeneração e as substâncias envolvidas com as mesmas, sendo essa a hipótese norteadora da dissertação aqui apresentada.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Megacôlon, Sistema nervoso entérico, Neurotrofinas.

## **ABSTRACT**

Patients with the digestive form of Chagas' disease exhibit a number of symptoms related to obstruction of the organ. Histological analysis of affected organs have demonstrated inflammatory lesions of the enteric nervous system (ENS), associated with a large reduction in the number of neurons caused, mainly, by inflammatory process. However, previous studies presented that some substances, like neurotrophins, may restrict neuronal destruction levels. The objective of this study is to characterize the neurotrophins expression in tissues from chagasic patients with chagasic megacolon and verify its involvement in megacolon development. For this, we used samples from chagasic patients with megacolon ( $n=8$ ) and non-infected individuals ( $n=8$ ) that, after preparation, were submitted to confocal fluorescence immunohistochemistry. To identify the sources and expression level of neurotrophins (NGF, GDNF and NT3), we performed a co-localization with Peripherin (neuronal marker) and S-100 (glial cell marker). Our results presented that, in the colon, the glial cells are the main sources of neurotrophins in all analyzed groups. Besides, chagasic patients with megacolon presented high expression of all investigated neurotrophins when compared with non-infected individuals. Our data point that neurotrophins might perform a protective role in the enteric nervous system and that prevent the megacolon installation. By the other side, chagasic patients that do not express an adequate level of neurotrophins may progress to megacolon form. We believe that this data can suggest new treatment protocols, like drugs administration qualified to elevate neurotrophins levels, what could prevent the megacolon installation and maintain the normal function of the gastrointestinal tract.

Keywords: Chagas disease, Megacolon, Enteric nervous system, Neurotrophins

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACh** - Acetilcolina

**a-FGF** – Fator de crescimento fibroblástico acídico

**ATP** - Adenosina tri-fosfato

**cChaT** - Colina acetil transferase

**CD** - *Cluster of differentiation*

**b-FGF** – Fator de crescimento fibroblástico básico

**BSA** – Albumina sérica bovina

**CNTF** –Fator Neurotrófico Ciliar

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

**GDNF**-Fator Neurotrófico Derivado das células da Glia

**GFAP**-Proteína acídica Fibrilar da Glia – IR- Imunorreativa / Não IR –Não imunorreativa

**IC** - Imunocomplexos

**IPANs** - neurônios intrínsecos primários aferentes

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

**NGF** – Fator de Crescimento Neuronal

**NO** – *Nitric oxide* (Óxido nítrico)

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

**NPY** - Neuropeptídeo Y

**NT3** – Fator neurotrófico 3

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**PGP 9.5** - Proteína gene produzida 9.5

**SNA** - Sistema nervoso autônomo

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SNE** - Sistema nervoso entérico

**SP** - Substância P

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

**T. cruzi** - *Trypanosoma cruzi*

**TK** - Taquicininas

**TrKA/TrkB/TrKC** – Receptor Tirosina Quinase A , B, C

**VIP** - Polipeptídeo intestinal vasoativo

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
Doença da Chagas.....	09
Megacôlon Chagásico.....	11
O sistema Nervoso Entérico.....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
Objetivo Geral.....	20
Objetivos Específicos.....	20
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
Pacientes.....	21
Imunohistoquímica.....	22
Aquisição de imagem dos gânglios.....	23
Análise estatística.....	23
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
Caracterização de estruturas neurais e células enterogliais através da expressão de Periferina e de S-100.....	24
Periferina/ S-100/ Imunorreações de Neurotrofinas.....	24
Periferina/ S-100/ Imunorreações de receptores de Neurotrofinas.....	27
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>9. ANEXO: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....</b>	<b>42</b>

## **1.INTRODUÇÃO**

### ***Doença de Chagas***

Em fins de 1907, encarregado por Oswaldo Cruz, Carlos Chagas viajou para Lassance, arraial quase às margens do Rio São Francisco, onde a malária devastava o acampamento dos trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil. Instalou sua casa e seu laboratório em um vagão de trem. No povoado, observando a infinidade de insetos hematófagos, barbeiros, alojados nas paredes de pau-a-pique das moradias, decidiu examiná-los. Encontrou neles um novo parasita, que chamou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz, seu amigo e mentor. Verificou que o parasita era patogênico para animais de laboratório e descobriu sua presença em animais domésticos. Paralelamente, Chagas já havia detectado, nos habitantes da região, alterações patológicas inexplicáveis (KÖBERLE, 1957).

A presença desse parasita em insetos sugeriu a possível existência de uma doença infecciosa em animais e no próprio homem. Começou, então, a pesquisar as ligações entre o novo parasita e a condição mórbida daquela população. Dois anos depois, em agosto de 1911, Carlos Chagas expôs suas descobertas na Academia Nacional de Medicina, no Rio de Janeiro, descrevendo detalhadamente as fases aguda e crônica da doença, além de suas diferentes formas clínicas. Entretanto, tais relatos não foram bem aceitos pela comunidade científica e foram até mesmo negados por alguns de seus contemporâneos, chegando mesmo a ser denominado de “o homem que procura na selva doenças que não existem”. Após 1920, a doença de Chagas foi simplesmente esquecida e por mais de 10 anos foi considerada sem importância para a saúde pública (KÖBERLE, 1968; PRATA, 1999).

Em 1934, Mazza demonstrou vários casos agudos da doença de Chagas no norte da Argentina, exatamente onde outros pesquisadores falharam em encontrar qualquer pessoa infectada pelo o parasita. Da mesma forma que Carlos Chagas, Mazza foi criticado por “descobrir novas doenças ao invés de procurar cura para as que já existiam”. Resistindo aos ataques, ele e sua equipe persistiram em suas investigações, identificando mais de 1000 casos agudos até 1944, comprovando ser a doença de Chagas, naquela época, um problema de saúde pública. Apesar da “re-descoberta” da doença por Mazza, seu significado real foi reconhecido somente com o aperfeiçoamento da técnica de fixação de complemento e de seu uso como diagnóstico na população. A partir de então, a doença de Chagas passou a ser denominada de trypanosomiasis americana (KÖBERLE, 1961; KÖBERLE, 1968; PRATA, 1999).

Dentre as formas de transmissão da doença de Chagas, destacamos a via vetorial, a via placentária e a via transfusional, sendo esta última, atualmente, a forma mais comum de contágio no Brasil. Quando a infecção se dá a partir da picada do inseto transmissor, ela ocorre através de fezes contaminadas. Após o ato de sugar o sangue, o que ocorre na maioria das vezes durante a noite, o inseto elimina fezes infectadas com a forma tripomastigota próximo ao local da picada. Os parasitas conseguem penetrarativamente através da mucosa ou mesmo da conjuntiva ocular e, após invadirem as células do hospedeiro, podem escapar dos mecanismos de defesa do organismo. Em seguida, 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 (BRENER, 1982; KOBERLE, 1968).

Pacientes portadores da doença de Chagas podem apresentar formas clínicas distintas. A forma aguda representa, na realidade, uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*. As formas amastigotas são encontradas difusamente em células do organismo, incluindo macrófagos, células gliais, células adiposas, células endoteliais, fibras musculares lisas, esquelética e cardíaca, fibroblastos, células de Schwann e neurônios. O sinal de Romaña, ou chagoma, é considerado uma lesão de porta de entrada. Seu aparecimento de 10 a 15 dias após a inoculação e sua duração de 30 a 60 dias sugerem uma reação de hipersensibilidade mediada por células. Portadores da forma aguda da doença podem vir a falecer de miocardite, de meningoencefalite ou de complicações, como broncopneumonia. Em crianças de até cinco anos de vida, os sintomas da infecção aguda são mais severos do que aqueles observados em adultos. Ambos os sexos são igualmente susceptíveis à infecção (DIAS, 2001; KOBERLE, 1968; KOBERLE, 1970).

Na fase crônica, os indivíduos podem apresentar sintomas resultantes do comprometimento do sistema digestivo e/ou cardíaco, ou podem ainda persistir na forma assintomática da doença, também denominada de forma indeterminada. Esta 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). A forma crônica cardíaca, pela sua gravidade e frequência, é uma das formas mais bem estudadas da doença de Chagas, 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; RASSI, 1958; MARIN NETO et al., 1980; RASSI et al., 2000).

Pacientes portadores da forma digestiva apresentam sintomas decorrentes de comprometimento de órgãos deste sistema, principalmente do esôfago (megaesôfago) e do cólon (megacôlon). Acredita-se que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do mega chagásico seja um processo degenerativo, principalmente de gânglios nervosos do trato gastrintestinal, que aparentemente se inicia na fase aguda, persistindo até a fase crônica (ANDRADE; ANDRADE, 1966; ANDRADE; ANDRADE, 1969; KOBERLE, 1968).

### ***O Megacôlon chagásico***

A primeira suspeita da existência da forma digestiva na doença de Chagas surgiu em 1916, quando o próprio Carlos Chagas observou que, durante a infecção aguda, alguns adultos exibiam uma acentuada disfagia para alimentos cuja ingestão necessitava de ser acompanhada de água. Os pacientes relatavam que o trânsito do alimento era interrompido no esôfago, causando imensa dor. Mesmo a ingestão de líquidos poderia ser difícil, sendo às vezes impossível, havendo desta forma, a necessidade de que o líquido fosse administrado em pequenas doses. Tal fenômeno, sem explicação patogênica, foi denominado então de “Mal do Engasgo” (CHAGAS, 1916).

As formas digestivas da doença de Chagas estão presentes notadamente nas regiões abaixo da linha equatorial, ocorrendo a esofagopatia em aproximadamente 7 a 10% dos casos e a colopatia em 3 a 7 % dos casos. O megacôlon chagásico atinge, sobretudo, o sigmóide e o reto. Pode manifestar-se como uma doença isolada, mas frequentemente é encontrado associado ao megaesôfago ou à cardiopatia chagásica. É mais comum no adulto (30 a 60 anos) e mais incidente no sexo masculino (DIAS, 2001).

Segundo Tafuri (TAFURI et al., 1971) é lícito admitir uma progressividade das lesões dos plexos, que se agravam proporcionalmente à duração e ao grau do mega. O acúmulo de fezes no cólon provoca dilatação da luz e compressão da mucosa. A compressão, por sua vez, leva à isquemia e, secundariamente, à degeneração, necrose e ulceração da mucosa. Na mucosa, assim ulcerada, inicia-se um processo inflamatório secundário e independente da inflamação induzida pela própria doença de Chagas. Esse processo inflamatório atinge o plexo mioentérico já previamente lesado pelo *T. cruzi*, agravando ainda mais a destruição do sistema nervoso entérico (SNE). Por sua vez, o plexo submucoso sofre as consequências das lesões do plexo mioentérico, devido às relações sinápticas entre eles. A inflamação secundária à estase, somada à destruição dos plexos e dos componentes intersticiais, evolui para a fibrose intersticial da submucosa e do conjuntivo intermuscular. Por sua vez, o aumento da resistência do meio, exige maior esforço das fibras musculares para a contração. Com o tempo, ocorrem hipertrofia e alterações regressivas das fibras musculares. Essas últimas são

consequências dos distúrbios das trocas metabólicas entre as células musculares e o interstício induzido pela própria inflamação (alterações vasculares, edema, infiltrado celular e fibrose) que se interpõe entre eles. Como o plexo submucoso está em íntima relação com as células musculares, é fácil compreender como a miosite e suas sequelas podem lesar ainda mais os gânglios.

Acreditamos na existência de uma interconexão entre sistema imune e neuro-endócrino. Essa ligação promoveria uma troca de informações bi-direcional entre sistema imune e sistema nervoso entérico. A ativação de mastócitos, além de realizar papéis na fisiologia gastrintestinal, desempenha um papel crucial no processo inflamatório, sendo um dos principais codificadores de sinais intestinais que irão culminar em respostas motoras, percepções viscerais e ativação de células do sistema imunológico nas patologias gastrintestinais (GUI, 1998).

### ***O Sistema Nervoso Entérico***

O trato gastrintestinal possui dois componentes nervosos responsáveis por sua inervação. Um componente extrínseco, de neurônios originados do sistema nervoso central (SNC), e um componente intrínseco, representado pelo sistema nervoso entérico. A inervação extrínseca do trato gastrintestinal é constituída de neurônios simpáticos e parassimpáticos. No sistema nervoso simpático, a noradrenalina é o neurotransmissor mais comum em neurônios pós-ganglionares que inervam o intestino. Os corpos destes neurônios encontram-se em gânglios nervosos pré-vertebrais e paravertebrais, enquanto seus axônios conectam-se ao trato gastrintestinal através dos nervos mesentéricos. Quando estimulados, estes neurônios agem inibindo a peristalse, regulando o fluxo sanguíneo dos vasos intestinais e controlando a secreção de eletrólitos (COSTA et al., 2000; LUNDGREN, 2000; McMillin et al., 1999; POWLEY, 2000a).

O sistema nervoso parassimpático atua no trato gastrintestinal através do nervo vago e dos nervos pélvicos. O nervo vago possui corpos neuronais localizados no SNC, enquanto seus axônios inervam grande parte do intestino. Por sua vez, os nervos pélvicos possuem corpos neuronais na medula espinhal, ao nível do sacro, e os axônios no trato gastrintestinal. Os estímulos vagais utilizam acetilcolina como neurotransmissor, sendo esta responsável por estimular a peristalse e aumentar o aporte sanguíneo intestinal (POWLEY, 2000b).

Uma considerável quantidade de tecido nervoso, de que consiste o SNE, está inserida na parede do trato gastrintestinal. O SNE apresenta neurônios e células de suporte (células da glia) agrupados em pequenos grupos denominados de gânglios entéricos, sendo estes interconectados por fibras nervosas. Os gânglios entéricos, apesar de pequenos, são tão numerosos que o sistema como

um todo possui milhões de neurônios. Essas células conectam-se, através de fibras nervosas, com outros neurônios que, por sua vez, inervam as camadas musculares do trato gastrintestinal, do epitélio secretor, dos vasos sanguíneos, do sistema biliar e do pâncreas.

As primeiras descrições dos plexos entéricos e seus gânglios nervosos foram realizados por Meissner (MEISSNER, 1857), Billroth (BILLROTH, 1858) e Auerbach (AUERBACH, 1862A; AUERBACH, 1862B; AUERBACH, 1864). Remark (REMAK, 1840; REMAK, 1852) tinha previamente notado a presença de gânglios microscópicos nas paredes da faringe e do estômago, mas suas descrições não sugerem que esse autor tenha os reconhecido como constituintes de plexos nervosos.

Após sua descoberta, os plexos e os gânglios entéricos atraíram considerável atenção da comunidade científica, e numerosos trabalhos sobre sua organização foram realizados. Estes estudos forneceram informações detalhadas sobre os tamanhos, as estruturas e as conexões entre os gânglios entéricos. Destacamos as brilhantes descrições de Meissner e Auerbach que, utilizando técnicas hoje consideradas rudimentares, elucidaram a organização geral dos plexos entéricos. Não nos surpreendemos que, após mais de cem anos da realização destes trabalhos, eles continuem servindo como base para estudos sobre o trato gastrintestinal.

A maior parte dos neurônios entéricos é encontrada em dois plexos; o plexo mioentérico (plexo de Auerbach) e o plexo submucoso (plexo de Meissner). O plexo mioentérico constitui uma rede de pequenos gânglios neuronais interconectados por feixes nervosos situados entre as camadas musculares (interna e externa) do trato gastrintestinal. Este plexo forma uma rede contínua em torno da circunferência e por toda a extensão do sistema digestivo (Figura 1). Os gânglios encontrados neste plexo variam no tamanho e na forma. Essas diferenças estão relacionadas à porção do intestino analisada e à espécie de animal em questão (GABELLA, 1981; IRWIN, 1931). Corpos neuronais isolados são ocasionalmente encontrados fora do plexo mioentérico, sendo geralmente identificados na camada muscular adjacente ao plexo. Funcionalmente, a maior parte dos neurônios encontrados neste plexo são neurônios eferentes (GABELLA; TRIGG, 1984). A ineração das camadas musculares se dá através de projeções de feixes nervosos provenientes do plexo mioentérico. Estes feixes estão dispostos paralelamente às fibras musculares (RICHARDSON, 1958).

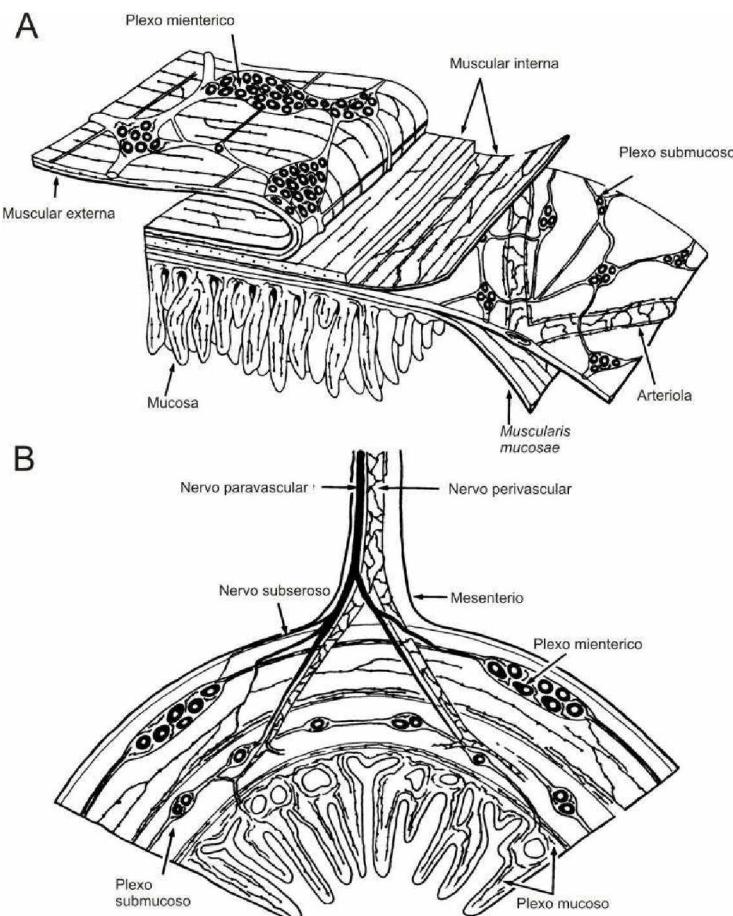
O plexo submucoso, descrito por Meissner (MEISSNER, 1857) e Billroth (BILLROTH, 1858), é formado por gânglios interconectados por feixes nervosos, assim como o plexo mioentérico. Embora a presença de gânglios nervosos neste plexo seja mais evidente nos intestino delgado e no cólon, eles podem ser observados no esôfago e no estômago. Os feixes nervosos que interconectam os gânglios do plexo submucoso são delgados em relação aos encontrados no plexo mioentérico (GONIAEW, 1875; HENLE, 1871; TIMMERMANS et al., 2001). Da mesma forma que o plexo

mioentérico, o plexo submucoso forma uma rede contínua em torno da circunferência e por todo o trato gastrintestinal (Imagem 1). Em grandes mamíferos, como suínos e o ser humano, o plexo submucoso é formado por distintos, porém interconectados, plexos que se situam em diferentes níveis. Duas ou três camadas de gânglios podem ser observadas (GUNN, 1968; HOYLE; BURNSTOCK, 1989; SCHABADASCH, 1930). A organização entre os gânglios no plexo submucoso e os tipos funcionais de neurônios, no que diz respeito à forma e à natureza química encontradas nestes gânglios, difere-se entre as espécies (SCHEUERMANN et al., 1987; TIMMERMANS et al., 1990). Como não se sabe ao certo a quem se devem os créditos pela descoberta dos componentes individuais dos plexos submucoso, parece razoável se referir aos plexos como plexo submucoso interno e externo (TIMMERMANS et al., 2001). Entre os neurônios encontrados no plexo submucoso externo, alguns proveem ineração à camada muscular interna e, algumas vezes, para a muscular externa (FURNESS et al., 1990; PORTER et al., 1999; SANDERS; SMITH, 1986). O plexo submucoso interno possui poucos neurônios que inervam as camadas musculares, mas possui muitos que inervam a mucosa (PORTER et al., 1999).

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

Estudos que visam avaliação de fibras nervosas no SNE têm sido realizados através da utilização de um marcador denominado PGP 9.5 (*protein gene related peptide*). A PGP 9.5 é uma proteína codificada por uma família de genes cujos produtos hidrolisam proteínas associadas à ubiquitina e inativam a cadeia de poliubiquitina para gerar monômeros livres de ubiquitina (sistema de degradação de proteínas). As análises da estrutura primária da PGP 9.5 e do seu cDNA revelaram nessa proteína uma grande homologia com isoenzimas relacionadas à ubiquitina, sugerindo que a PGP 9.5 poderia fazer parte de uma família multigênica de isoenzimas. A proteína PGP 9.5 é composta de 223 aminoácidos (24-27 kDa) e apresenta-se conservada através de uma variedade de espécies. Estima-se que a PGP 9.5 represente de 1 a 2% do total de proteínas solúveis dentro da célula nervosa. Segundo estudos realizados por Krammer, a PGP 9.5 marca fibras nervosas e corpos neuronais do plexo mioentérico, do plexo submucoso, da camada muscular própria e lâmina própria (KRAMMER; KUHNEL, 1993). Desta forma, esse marcador é utilizado para a avaliação destes componentes do SNE em patologias que afligem o trato gastrintestinal, como a doença de

Hirschsprung (MEYRAT et al., 2001; NEMETH; PURI, 2000) e mesmo em modelos experimentais (ARANTES et al., 2004; KULKARNI-NARLA et al., 1999).



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

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

O fator de crescimento neuronal (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser descrita (LEVI-MONTALCINI; ANGELETTI, 1961), uma vez que seu papel no desenvolvimento, na diferenciação e na manutenção de neurônios sensitivos e simpáticos foi estabelecido (HALEGOUA et al., 1991;

LEVI-MONTALCINI, 1987; STEPHANI et al., 1987; THOMAS et al., 1991). Uma série de células produz o NGF, entre as quais podemos destacar os neurônios, as células da glia, células musculares, fibroblastos e até mesmo algumas células do sistema imunológico, tais como os linfócitos B e linfócitos T (Edling *et al.*, 2004). Além do NGF, uma série de neurotrofinas passou a ser caracterizada devido a seus efeitos sobre o tecido nervoso. Dentre elas, destacamos o Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF), os Fatores de Crescimento Fibroblástico acídico (a-FGF) e básico (b-FGF), e o Fator Neurotrófico Derivado de Células Gliais (GDNF), entre outros (OTTEN et al., 1994; SCULLY; OTTEN, 1995a; SCULLY; OTTEN, 1995b).

O GDNF é um polipeptídeo originalmente conhecido pela sua ação estimulante em neurônios do sistema nervoso central, como neurônios dopaminérgicos mesencefálicos e neurônios motores (LIN et al., 1993). O GDNF é também responsável pelo desenvolvimento e pela sobrevivência de neurônios entéricos (SAARMA; SARIOLA, 1999). Foi demonstrado os efeitos tróficos substanciais do GDNF sobre populações de neurônios autonômicos, sobretudo sobre neurônios do SNE, sendo esses efeitos distintos daqueles produzidos por outras neurotrofinas e fatores neurotróficos (EBENDAL et al., 1995; RAUCH et al., 2006). Como ocorre com o NGF, neurônios, células da glia e células musculares são os principais produtores de GDNF (PETERS et al., 1998).

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

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

Na doença inflamatória intestinal, a glia entérica, aparentemente, realiza um papel central no controle da inflamação (GEBOES et al., 1992). Von Boyen et al. (VON BOYEN et al., 2004) demonstraram que, sob influência de citocinas pró-inflamatórias, células da glia entérica GFAP não IR podem se tornar GFAP-IR. O aumento da expressão de GFAP por células enterogliais tem sido também observado em tecidos coletados de pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Crohn. Recentes estudos sobre doença de Crohn têm confirmado que a lesão de células do sistema nervoso entérico é caracterizada por severa diminuição do número de células da glia, mesmo em tecidos sem evidência de processo inflamatório. Uma significativa redução de células da glia, tanto do plexo mioentérico como do plexo submucoso, é também uma das características histopatológicas da enterocolite necrosante (CORNÉT et al., 2001).

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

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

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

Os interneurônios são identificados em todas as camadas do trato gastrintestinal, e possivelmente variam entre as regiões mais que os outros tipos de neurônios. Por exemplo, o íleo e cólon contêm os mesmos, ou muito similares, neurônios motores e neurônios aferentes, mas seus interneurônios são completamente diferentes (PORTBURY et al., 1995). Os neurônios sensoriais do intestino são denominados de neurônios intrínsecos primários aferentes (IPANs). Esse nome surgiu

devido ao fato de estes neurônios exercerem, em algumas situações, papéis funcionais de interneurônios (p. ex. quando recebem sinapses excitatórias provenientes de outros neurônios) e mesmo de neurônios eferentes (p. ex. quando liberam neurotransmissores no epitélio da mucosa causando vasodilatação) (HOLZER et al., 1991; Lewis, 1927).

Os IPANs traduzem e codificam informações sobre o ambiente químico e o estado físico do tecido que eles inervam e convertem essa informação para um circuito neuronal integrado, através do qual o estado funcional dos órgãos pode ser modificado. Nos plexos mioentérico e submucoso, esses neurônios se conectam a outros IPANs, a interneurônios e a neurônios motores (DOGIEL, 1899; GERSHON; KIRCHGESSNER, 1991). Recentes evidências indicam que os IPANs são afetados por processos inflamatórios tanto no intestino delgado como no cólon. A exposição desta classe de neurônios a ambientes acometidos por processos inflamatórios alteraria as suas propriedades, promovendo anormalidades quanto à sinalização sensorial e ao controle dos reflexos entéricos (SHARKEY; MAWE, 2002). A hipótese de que distúrbios nos IPANs estariam envolvidos no desenvolvimento de patologias intestinais foi confirmada através de experimentos utilizando animais que demonstraram alterações funcionais entéricas após processos inflamatórios no trato gastrintestinal ou exposição prolongada a prostaglandinas (MANNING et al., 2002; PALMER et al., 1998).

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

## **2.JUSTIFICATIVA**

Nosso grupo de pesquisa estabeleceu, na década passada, 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 gastrintestinal 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. Essas colaborações permitiram-nos iniciar a caracterização de neurônios do trato gastrintestinal de pacientes chagásicos, conforme a expressão de neuropeptídeos, o que, além de nos responder algumas perguntas referentes ao desenvolvimento do megacôlon chagásico, nos apresentam um leque de possibilidades, principalmente no que diz respeito às terapêuticas.

Nossos estudos mais recentes têm como foco a relação entre o sistema nervoso entérico, suas alterações frente a patologias e os efeitos no funcionamento do trato gastrintestinal. Esses resultados apontaram para a necessidade de se esclarecer quais classes de neurotrofinas estariam envolvidas no processo de regeneração neuronal, apontado anteriormente por nosso grupo, e quais receptores seriam os mais relevantes para uma regeneração efetiva dos componentes neurais desse sistema. Além disto, pretendemos caracterizar as principais fontes de neurotrofinas e sua localização preferencial no trato gastrintestinal. Acreditamos que, ao desvendarmos certos aspectos ligados ao estabelecimento e ao desenvolvimento do megacôlon chagásico, estaremos contribuindo não só para a aplicação de novas metodologias terapêuticas na doença de Chagas, mas também para 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 a expressão de fatores neurotróficos e seus receptores no sistema nervoso entérico do cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar, no sistema nervoso entérico do cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados, a expressão das neurotrofinas NGF, GDNF e NT3.

Analisar, no sistema nervoso entérico do cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados, a expressão dos receptores de neurotrofinas (Tirosina Quinases) TrkA, TrkB, TrkC e p75.

Identificar a expressão de neurotrofinas e seus receptores em células enterogliais e neuronais do sistema nervoso entérico.

Estabelecer associações entre a expressão das neurotrofinas e seus receptores e o quadro clínico dos pacientes.

## **4.METODOLOGIA**

### ***Pacientes***

Neste projeto, utilizamos amostras de tecidos de pacientes chagásicos portadores de megacôlon, de pacientes chagásicos não 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 desses indivíduos no trabalho de pesquisa. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU nº 110/11).

Nosso grupo de pesquisa possui uma coleção única de amostras provenientes do trato gastrintestinal de pacientes portadores da doença de Chagas que desenvolveram o megacôlon chagásico ( $n=8$ ), tão como amostras de indivíduos não chagásicos ( $n=8$ ) (submetidos à cirurgia devido a patologias intestinais, tal como o câncer). A presença da doença foi confirmada através de exames clínicos e laboratoriais (DA SILVEIRA et al., 2005b). A qualidade dessas amostras foi avaliada através de técnicas histológicas e de imunohistoquímica, o que demonstrou a preservação de sua imunoreatividade.

As amostras de tecidos foram transportadas em soro fisiológico sobre o gelo (pH 7,3) para o laboratório. Após sua chegada (1-6 h após a ressecção), 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 $\mu$ g/ml antibióticos/antimicóticos (Sigma), 50 $\mu$ g/ml de gentamicina (Sigma), 2,5 $\mu$ g/ml de anfotericina B (Sigma), 10% soro fetal bovino (Sigma), 4 $\mu$ M nicardipina e 2,1 $\mu$ g/ml NaHCO<sub>3</sub>, selados em um compartimento com 95%O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 2h. Posteriormente, os tecidos foram incubados por mais 5h, no mesmo meio com 100 $\mu$ M de colchicina, adicionada 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 0,1M (pH 7,4) à temperatura ambiente por 2h. Após várias lavagens em 0,05M Tris salina tamponada (TBS, pH 7,4), a camada muscular e os plexos nervosos das amostras foram preparados para a técnica de wholemounts. A presença da doença foi confirmada através de exames clínicos e laboratoriais (DA SILVEIRA et al., 2005b).

## Imunohistoquímica

As amostras de tecido foram pré-incubadas por 2h em solução de TBS 0,05 M (pH 7,4), com 1% de albumina sérica bovina (BSA), 0,5% Triton X-100, 0,05% thimerosal e 5% de soro de cabra. Para reduzir a autofluorescência induzida por lipofuscina, as wholemounts foram incubadas em tampão de acetato de amônio (pH 5,0) contendo 1 mM CuSO<sub>4</sub> por 1h, seguido de um curto enxágue em H<sub>2</sub>O destilada (BREHMER et al., 2004). Após um enxágue em TBS por 10min, foram incubadas em uma solução contendo BSA, Triton X-100, thimerosal e os anticorpos primários (Tabela 1) por 72h a 4°C. Após este período, as wholemounts foram lavadas em TBS e, em seguida, os anticorpos secundários (Tabela 2) foram adicionados às amostras em temperatura de 4°C por um período de 2h. Em seguida, as amostras foram lavadas por um banho em TBS (5 minutos) e montadas em meio sintético.

Anticorpo	Fonte	Código	Diluição
Anti-Periferina	INVITROGEN	A-21272	1:1000
Anti-NGF	DAKO	M7245	1:200
Anti-GDNF	INVITROGEN	180091	1:1000
Anti-NT3	Advanced Targeting Systems	AB-N34	1:500
Anti-NT4/5	SIGMA	N9528	1:200
Anti-TrkA	SIGMA	N7280	1:100
Anti-TrkB	SIGMA	V3508	1:500
Anti-TrkC	SIGMA	G8043	1:500
Anti-p75	DAKO	M6332	1:500

**Tabela 1:** Anticorpos primários

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

**Tabela 2:** Anticorpos secundários

## **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, 647nm de excitação; z-steps 0,6μm). 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).

## **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada a partir do teste não 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 Prism 3.0 (San Diego, CA). Foram calculadas a distribuição de frequências 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). Foram aceitos erros aleatórios ao nível de  $p=0.05$  para o de tipo I e  $p=0.2$  para o erro tipo II.

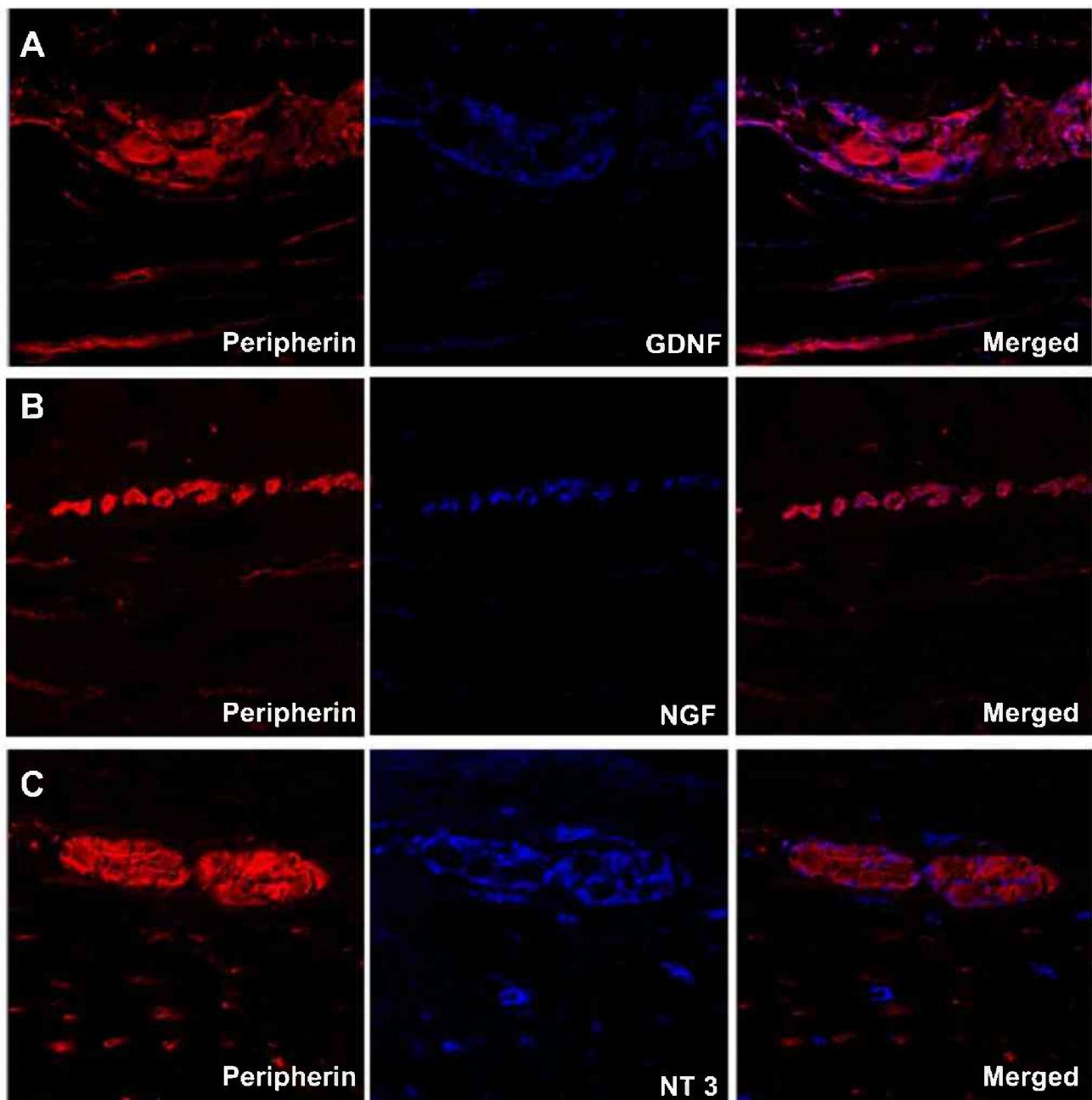
## **5.RESULTADOS**

### **Caracterização de estruturas neurais e células enterogliais através da expressão de Periferina e de S-100**

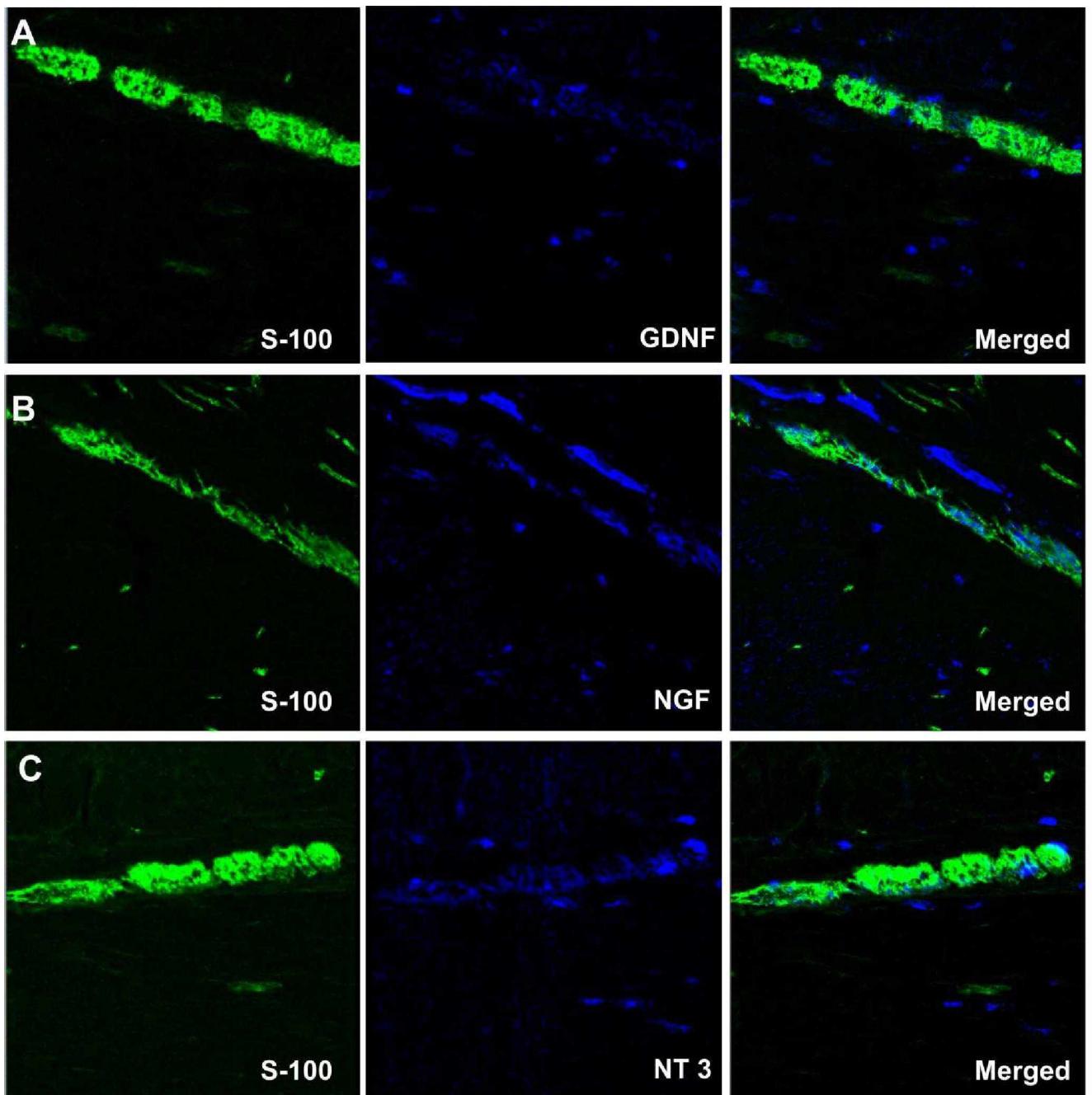
Os dados quantitativos de expressão periferina e S-100 demonstraram que, em comparação com indivíduos não infectados, pacientes com megacôlon chagásico apresentaram um processo de denervação que foi revelado pela análise de área imunoreativa de periferina. Além disso, foi observado que as amostras oriundas de pacientes chágasicos apresentaram perda significativa de células enterogliais. Estas informações estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram o processo de denervação e destruição de componentes do sistema nervoso entérico em pacientes portadores de megacôlon chagásico (DA SILVEIRA et al., 2008; DA SILVEIRA et al., 2007c).

### **Periferina/ S-100/ Imunoreações de Neurotrofinas**

As reações com periferina, S-100, neurotrofinas e anticorpos demonstraram que todas as neurotrofinas analisadas (GDNF, NGF e NT-3) estão concentradas principalmente nos plexos neuronais em relação com as camadas musculares de pacientes chágasicos e indivíduos não infectados. No entanto, quando comparados os dois plexos neuronais (submucoso e mioentérico), não houve diferença na concentração proporcional entre essas duas substâncias. As análises de expressão de neurotrofinas mostraram que o GDNF é expresso por ambos os neurônios e por células enterogliais, enquanto que o NGF é expresso quase exclusivamente por neurônios. Já a N-T3 é altamente expressa por células enterogliais e, em menor grau, por neurônios (Figura 1 e 2).



**Figura 1:** Demonstração de estruturas neurais e neurotrofinas através da expressão de periferina e dos fatores neurotróficos NGF, GDNF e NT3. Observamos que a expressão de GDNF e NT3 está localizada fora dos corpos neuronais enquanto a expressão de NGF está coincidente com a expressão de periferina, demonstrando a co-localização de NGF e corpos neuronais.



**Figura 2:** Demonstração de células enterogliais e neurotrofinas através da expressão de S-100 e dos fatores neurotróficos NGF, GDNF e NT3. Observamos que boa parte da expressão de GDNF e NT3 está localizada dentro das células enterogliais, enquanto a expressão de NGF está fora destas células.

Os dados quantitativos de expressão de neurotrofinas foram obtidos a partir de uma proporção relativa entre as neurotrofinas (GDNF, NGF e NT-3 área) e os neurônios (área periferina). Os resultados encontrados indicam que os pacientes com doença de Chagas têm uma expressão aumentada, estatisticamente relevante, de todas as neurotrofinas estudadas (GDNF, NGF e NT-3), em comparação com indivíduos não infectados (Tabela 3).

---

**Média da área imunorreativa de neurotrofinas em relação à área de periferina nos plexos entéricos em pacientes chagásicos portadores de megacôlon e indivíduos não infectados**

---

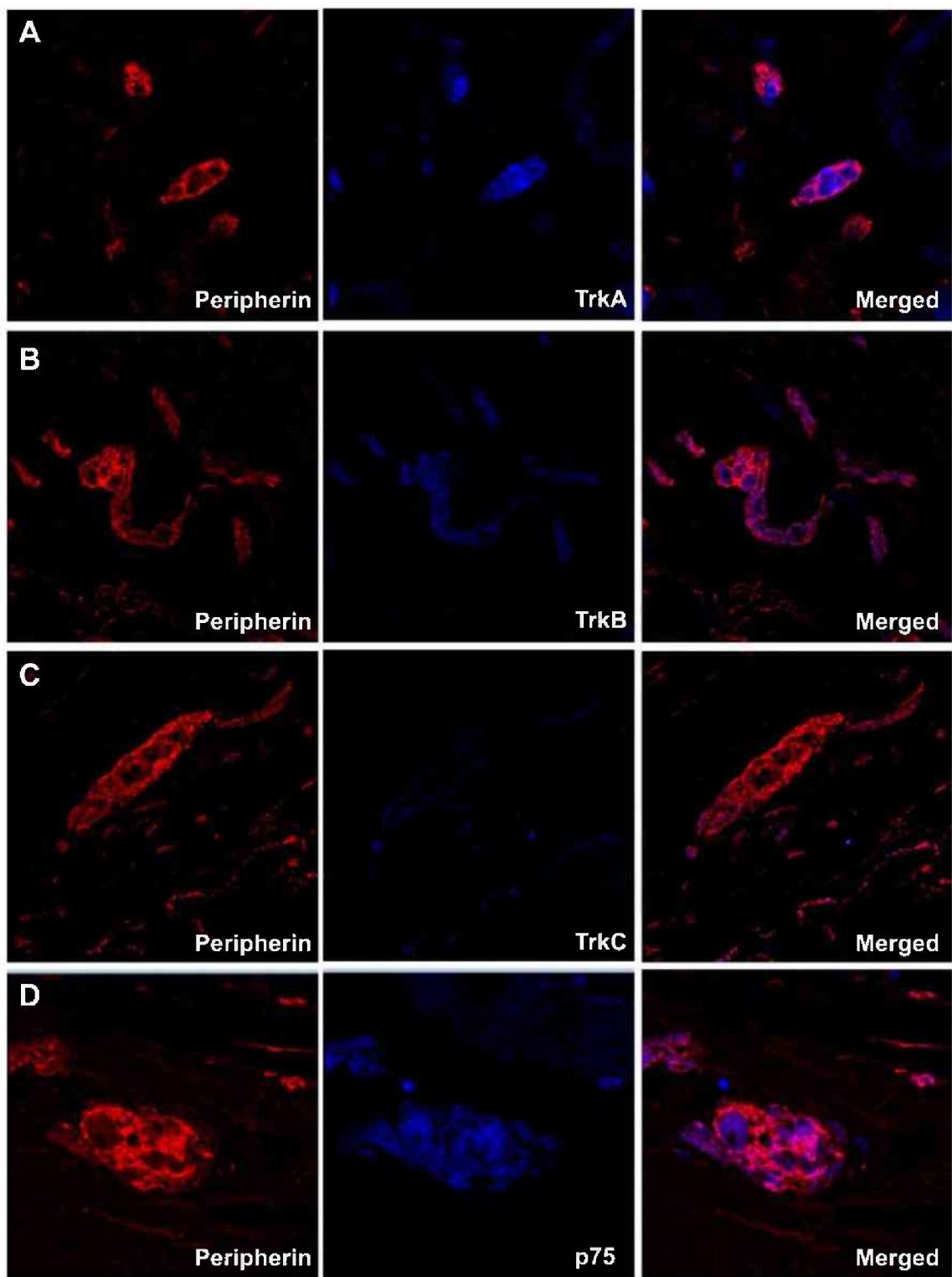
Grupos / Neurotrofinas	GDNF		NGF		NT3	
	Plexo Submucoso	Plexo Mioentérico	Plexo Submucoso	Plexo Mioentérico	Plexo Submucoso	Plexo Mioentérico
Indivíduos não infectados	246 ± 20	243 ± 18	190 ± 29	186 ± 23	162 ± 19	147 ± 21
Pacientes chagásicos portadores de megacôlon	368* ± 32	306* ± 35	278* ± 24	254* ± 28	240* ± 18	202* ± 27

---

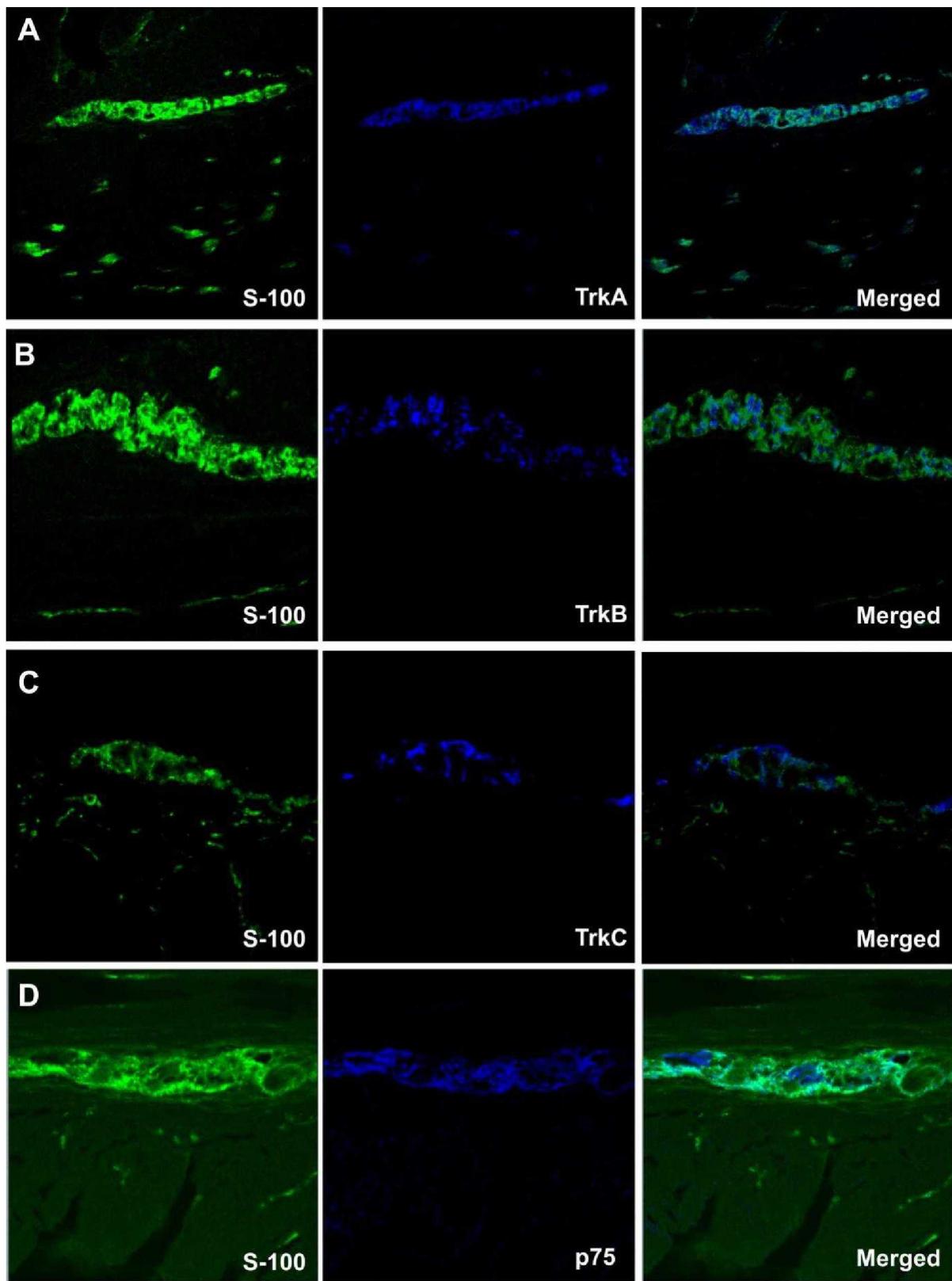
**Tabela 3:** Média da área de neurotrofinas, em relação à área de neurônios nos plexos entéricos. Os valores são expressos como média das áreas imunorreativas ± Desvio Padrão. \* Diferenças estatisticamente significantes entre o grupo chagásico e o grupo não infectado. Foi analisada área total de 3198  $\mu\text{m}^2$  para todas as amostras ( $p < 0.05$ ).

#### **Periferina/ S-100/ Imunoreações de receptores das Neurotrofinas.**

Nas seções processadas para avaliar a expressão de receptores de neurotrofinas (Trk A, Trk B, Trk C e p75), observou-se que os receptores estão presentes principalmente em corpos de neurônios e células enterogliais, ocorrendo essencialmente na região de plexos. Outras análises indicaram que Trk A e Trk B são expressos predominantemente em células enterogliais. Por outro lado, a Trk C apresentou baixa expressão, tanto em neurônios e células enterogliais, enquanto a p75 foi altamente expresso nestes dois tipos de células (Figura 3 e 4).



**Figura 3:** Demonstração da expressão dos receptores de neurotrofinas em estruturas neuronais. Observamos que existe uma baixa expressão de TrkC em relação a todos os outros receptores de neurotrofinas em pacientes chagásicos portadores de megacôlon.



**Figura 4:** Demonstração da expressão dos receptores de neurotrofinas em células enterogliais. Observamos que existe uma co-expressão da maior parte dos receptores de neurotrofinas nas células enterogliais de pacientes chagásicos.

A análise quantitativa dos receptores de neurotrofinas indicou que chagásicos apresentam elevada expressão de Trk A, Trk B e p75, em comparação com indivíduos não infectados. O Trk C apresentou o menor nível entre os receptores de neurotrofinas e a análise não revelou diferenças estatísticas entre os pacientes chagásicos e os indivíduos não infectados (Tabela 4). Os dados quantitativos da expressão dos receptores foram realizados por uma proporção relativa entre os receptores (Trk A, Trk B, TrkC e p75) e os neurônios (área periferina).

**Média da área imunoreativa dos receptores de neurotrofinas em relação à área de periferina nos plexos entéricos do cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados**

Receptor de neurotrofinas / Grupos		Indivíduos não infectados	Pacientes chagásicos portadores de megacôlon
TrkA	Plexo submucoso	93 ± 13	152* ± 19
	Plexo mioentérico	218 ± 21	211* ± 25
TrkB	Plexo submucoso	71 ± 9	112* ± 13
	Plexo mioentérico	118 ± 22	171* ± 19
TrkC	Plexo submucoso	23 ± 7	33 ± 10
	Plexo mioentérico	38 ± 11	42 ± 10
p75	Plexo submucoso	192 ± 29	274* ± 40
	Plexo mioentérico	234 ± 35	302* ± 29

**Tabela 4:** Média da área de receptores de neurotrofinas em relação à área neuronal. Os valores são expressos como média das áreas imunorreativas ± Desvio Padrão. \* Diferença estatisticamente significante entre o grupo chagásico e o grupo não infectado. Foi analisada área total de 3198  $\mu\text{m}^2$  para todas as amostras ( $p < 0.05$ ).

## 6.DISCUSSÃO

No presente estudo, caracterizamos as principais neurotrofinas e seus receptores em amostras de pacientes chagásicos com megacôlon e indivíduos não infectados. Este é o primeiro trabalho a avaliar a relação entre a destruição, a perda enteroglial e a distribuição de neurotrofinas em pacientes com megacôlon chagásico. Resultados prévios de nosso laboratório indicaram que os pacientes chagásicos com megacôlon apresentam alto nível de inflamação, e este processo leva à denervação e destruição do componente glial no intestino (DA SILVEIRA et al., 2011; JABARI et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que pacientes com megacôlon chagásico apresentaram níveis aumentados do marcador de regeneração GAP-43 durante o processo de destruição neuronal. Acreditamos que o elevado nível de GAP-43 seria um indício da tentativa de recuperação dos componentes neuronais danificados, ou mesmo uma forma de evitar uma maior destruição de células do sistema nervoso entérico (DA SILVEIRA et al., 2008; MOREIRA et al., 2013).

Nos últimos anos, estudos utilizando culturas de células enterogliais identificaram que, em condições inflamatórias, as células enterogliais aumentam a produção de neurotrofinas (VON BOYEN et al., 2002a; VON BOYEN et al., 2006a; VON BOYEN et al., 2004). Esses dados corroboram com os resultados desta pesquisa, pois o mesmo aumento do nível de expressão de neurotrofinas foi encontrado em células enterogliais de pacientes com megacôlon chagásico. Nossos resultados confirmam que tanto células enterogliais quanto os neurônios são importantes fontes de neurotrofinas. Observou-se que a produção de neurotrofinas está concentrada nos plexos neuronais (submucosa e mioentérico), e ambos, neurônios e células enterogliais, participam desse processo.

Outros dados importantes dizem respeito à distribuição de receptores de neurotrofinas. Nossos resultados demonstraram que, em um processo inflamatório, há aumento da expressão de TrkA e p75, enquanto que os receptores TrkB e TrkC não sofrem alterações significantes nos seus níveis de expressão. Estes resultados indicam que os receptores envolvidos essencialmente nos neurônios e nas células da glia, que poderiam estar diretamente envolvidos com o processo de regeneração, seriam o TrkA e o p75, enquanto que os receptores TrkB e TrkC, provavelmente, não estão envolvidos neste processo, e sua ativação é reservada a outras funções destas células.

É razoável sugerir que o processo de regeneração neuronal é mediado pela expressão das neurotrofinas e sua ação em seus receptores expressos no sistema nervoso entérico (VON BOYEN et al., 2002a; VON BOYEN et al., 2002b; VON BOYEN et al., 2006b). Acreditamos que existem alguns fenômenos presentes em doenças neurodegenerativas que são regulados pelas

neurotrofinas e que o conhecimento destes processos pode ajudar no desenvolvimento de novas terapias.

Acredita-se que, no sistema nervoso entérico, tanto a recuperação neuronal como a manutenção de seu bom funcionamento são mediados por fatores neurotróficos (HOEHNER et al., 1996; JOHANSSON et al., 2008; JOHANSSON et al., 2007), mas, em pacientes portadores da doença de Chagas, ainda restavam a caracterização de sua expressão tal como a identificação de suas fontes e onde eles podem agir (pela caracterização de receptores). Este estudo nos permitiu compreender melhor como o sistema nervoso entérico se comporta no desenvolvimento do megacôlon e, trabalhando com amostras de pacientes chagásicos, temos a oportunidade única de observar o comportamento do sistema nervoso entérico frente a um processo de denervação causado por uma infecção parasitária. Hoje, cerca de 11 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* e, potencialmente, podem desenvolver o megacôlon chagásico a qualquer momento (DIAS et al., 2014). Além disso, compreender melhor os fenômenos entéricos da doença de Chagas permite-nos inferir melhor como o sistema nervoso entérico se comporta diante de outras patologias intestinais e, talvez, identificar novos alvos para tratamentos mais eficazes, que sejam comuns em todas essas patologias.

Nas últimas décadas, demonstrou-se que o sistema imune desempenha um papel importante no desenvolvimento do megacôlon chagásico (DA SILVEIRA et al., 2007a; DA SILVEIRA et al., 2005a; DA SILVEIRA et al., 2009). Foi anteriormente demonstrado que o processo inflamatório nesta patologia é constituído principalmente por linfócitos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. Foi demonstrado também que, quanto mais intenso o processo inflamatório, maior é o nível de destruição neuronal e, consequentemente, a gravidade do megacôlon (DA SILVEIRA et al., 2007b; DA SILVEIRA et al., 2007c; DE ARAUJO et al., 2011; DUTRA et al., 2009). A maioria dessas células do sistema imunológico são fontes de neurotrofinas e, por isso, podemos sugerir que, embora elas ajam promovendo um processo inflamatório para destruir o parasita no tecido, elas também podem estar produzindo neurotrofinas como uma tentativa de salvar o maior número possível de neurônios previamente lesados. Corroborando com esta hipótese, a figura 3 apresenta a existência de alguns pontos de neurotrofinas em torno de gânglios neuronais que não correspondem nem a neurônios e nem a células enterogliais. Essas marcações são provavelmente células do sistema imune produtoras de neurotrofinas. No entanto, apenas pequenas concentrações de neurotrofinas estão fora de gânglios neuronais, o que sugere que as células do sistema imunológico por si só não são suficientes para produzir uma quantidade satisfatória de neurotrofinas. Conclui-se que, embora o sistema nervoso entérico atue como principal fonte de neurotrofinas, é necessária a cooperação do sistema imunitário para completar a função de reparação da perda neuronal.

Conhecer o padrão de expressão de neurotrofinas e seus receptores no SNE de pacientes portadores de megacôlon chagásico poderia nos indicar quais as principais estruturas que conferem, verdadeiramente, proteção ao sistema nervoso entérico em situações fisiológicas e em processos patológicos, em que processo inflamatório está instalado e é responsável, em grande parte, pela destruição neuronal. Como exemplo, sugerimos que a ativação de receptores TrkA e TrkB com substâncias ou drogas sinérgicas às neurotrofinas poderiam, na verdade, aumentar os níveis de regeneração do sistema nervoso entérico, uma vez que o aumento de neurotrofinas no processo inflamatório não é suficiente para aumentar a ativação destes receptores. Já o receptor p75 não seria um alvo terapêutico de primeira escolha, uma vez que já apresenta um aumento de expressão, e drogas sinergistas neste receptor não seriam muito eficientes em elevar sua ativação.

A partir destes dados, estamos certos de que vamos ser capazes de sugerir novas modalidades de tratamento que atendam à preservação de seu estado atual, assim como poderemos evitar o agravamento do megacôlon chagásico, além de uma possível aplicação em outras patologias inflamatórias do trato gastrintestinal.

## **7.CONCLUSÃO**

A instalação do megacôlon chagásico parece estar relacionada com a expressão de neurotrofinas.

Pacientes chagásicos que expressam uma maior taxa de neurotrofinas nos plexos nervosos parecem não desenvolver o megacôlon.

As células enterogliais parecem ser a principal fonte de neurotrofinas em pacientes chagásicos.

Uma maior expressão dos receptores TrkA e TrkB parece desempenhar um efeito protetor nos plexos nervosos, impedindo a destruição neuronal e o desenvolvimento do mega chagásico.

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 8, 219-224, 1966.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 Suppl 1, 71-80, 1999.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. Immunochemical study of experimental Chagas' disease. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, 11, 44-47, 1969.
- ARANTES, R. M.; MARCHE, H. H.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in Trypanosoma cruzi-infected mice. **Am J Pathol**, 164, 1361-1368, 2004.
- AUERBACH, L. Ueber einen Plexus gangiosus myogastricus. Jahres-Bericht. Abh. Schlesischen Gesells. **Vaterland. Cult.**, 39er, 103-104, 1862a.
- Ueber einen **Plexus myentericus**, einen bisher unbekannten **ganglionervosen Apparat im Darmkanal der Wirbelthiere**, Verlag von E. Morgenstern, Breslau, 1862b.
- Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darms. **Arch. Pathol. Anat. Physiol.**, 30, 457-460, 1864.
- BILLROTH, T. Einige Beobachtungen über das ausgedehnte Vorkommen von Nervenanastomosen im Tractus Intestinalis. **Arch. Anat. Physiol.** Leipzig, 148-158, 1858.
- BREHMER, A.; BLASER, B.; SEITZ, G.; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitroergic and non-nitroergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. **Histochem Cell Biol**, 121, 13-20, 2004.
- BRENER, Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. **Bull World Health Organ**, 60, 463-473, 1982.
- BUSH, T. G.; SAVIDGE, T. C.; FREEMAN, T. C.; COX, H. J.; CAMPBELL, E. A.; MUCKE, L.; JOHNSON, M. H.; SOFRONIEW, M. V. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell**, 93, 189-201, 1998.
- CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanosomiase americana. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 8, 5-37, 1916.
- CORNET, A.; SAVIDGE, T. C.; CABARROCAS, J.; DENG, W. L.; COLOMBEL, J. F.; LASSMANN, H.; DESREUMAUX, P.; LIBLAU, R. S. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, 13306-13311, 2001.
- COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, 47 Suppl 4, iv15-19; discussion iv26, 2000.
- COSTA, M.; BROOKES, S. J. H.; STEELE, P. A.; GIBBINS, I., BURCHER, E.; KANDIAH, C. J. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. **Neuroscience** 75, 949-967, 1996.
- DA SILVEIRA, A. B.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.; D'AVILA REIS, D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. **Parasitology**, 134, 789-796. doi: 10.1017/S0031182007002296, 2007a.
- DA SILVEIRA, A. B.; ARANTES, R. M.; VAGO, A. R.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'AVILA REIS, D. Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, 131, 627-634. doi: 10.1017/S0031182005008061, 2005a.

- DA SILVEIRA, A. B.; D'AVILA REIS, D.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; POOLE, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Dig Dis Sci**, 52, 2877-2883. doi: 10.1007/s10620-006-9680-5, 2007b.
- 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. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. **Hum Immunol**, 70, 65-67. doi: 10.1016/j.humimm.2008.10.015, 2009.
- DA SILVEIRA, A. B.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; FUJIWARA, R. T.; OLIVEIRA, R. C.; BREHMER, A. Enteroglial cells act as antigen-presenting cells in chagasic megacolon. **Hum Pathol**, 42, 522-532. doi: 10.1016/j.humpath.2010.06.016, 2011.
- 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. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. **Parasitology**, 135, 1337-1342. doi: 10.1017/S0031182008004770, 2008.
- DA SILVEIRA, A. B.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.; D'AVILA REIS, D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**, 38, 1256-1264. doi: 10.1016/j.humpath.2007.01.020, 2007c.
- 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. Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, 131, 627-634, 2005b.
- DE ARAUJO, F. F.; DA SILVEIRA, A. B.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CHAVES, A. T.; ADAD, S. J.; FIUZA, J. A.; FARES, R. C.; FERREIRA, K. S.; FUJIWARA, R. T.; SILVA GOMES, J. A. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Hum Pathol**, 42, 299-301. Doi: 10.1016/j.humpath.2010.10.002, 2011.
- DE REZENDE, J. M. Chagas disease of the digestive tract (author's transl). **Rev Med Chil**, 107, 71-72, 1979.
- DE REZENDE, J. M.; RASSI, A. Involvement of the esophagus in Chagas' disease; megaesophagus & cardiopathy. **Hospital (Rio J)**, 53, 1-15, 1958.
- DIAS, J. C. Chagas disease, environment, participation, and the state. **Cad Saude Publica**, 17 Suppl, 165-169, 2001.
- DIAS, J. C.; COURA, J. R.; YASUDA, M. A. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, 47, 123-125. doi: 10.1590/0037-8682-0248-2013, 2014.
- DOGIEL, A. S. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. **Arch. Anat. Physiol.** Leipzig, Anat Abt Jg 1899, 130-158, 1899.
- DRASCH, O. Beiträge zur Kenntnis des feineren Baues des Dunndarmes, insbesondere über die Nerven desselben. **Sitz. Akad. Wiss.**, 82, 168-198, 1881.
- DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; VILLANI, F. N.; DA COSTA, G. C.; DA SILVEIRA, A. B.; REIS, D.; GOLLOB, K. J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104 Suppl 1, 208-218, 2009.

- EBENDAL, T.; TOMAC, A.; HOFFER, B. J.; OLSON, L. Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates fiber formation and survival in cultured neurons from peripheral autonomic ganglia. **J Neurosci Res**, 40, 276-284, 1995.
- EDLING, A. E.; NANAVATI, T.; JOHNSON, J. M.; TUOHY, V. K. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. **J Neurosci Res**, 77, 709-717, 2004.
- FERRI, G.-L.; PROBERT, L.; COCCHIA, D.; MICHETTI, F.; MARANGOS, P. J.; POLAK, J. M. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. **Nature**, 297, 409-410, 1982.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 81, 87-96, 2000.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, 5, 1-20, 1980.
- FURNESS, J. B.; KURAMOTO, H.; MESSENGER, J. P. Morphological and chemical identification of neurons that project from the colon to the inferior mesenteric ganglia in the guinea-pig. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 31, 203-210, 1990.
- FURNESS, J. B.; YOUNG, H. M.; POMPOLO, S.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. A.; MCCONALOGUE, K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, 108, 554-563, 1995.
- GABELLA, G. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. **Neuroscience** 6, 425-436, 1981.
- GABELLA, G.; TRIGG, P. Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. **Journal of Neurocytology**, 13, 49-71, 1984.
- GEBOES, K.; RUTGEERTS, P.; ECTORS, N.; MEBIS, J.; PENNINCKX, F.; VANTRAPPEN, G.; DESMET, V. J. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. **Gastroenterology**, 103, 439-447, 1992.
- GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER, A. L. Identification, characterization and projections of intrinsic primary afferent neurones of the submucosal plexus: Activity-induced expression of c-fos immunoreactivity. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 33, 185-187, 1991.
- GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER, A. L.; WADE, P. R. Intrinsic reflex pathways of the bowel wall. In: TACHÉ, Y.; WINGATE, D. L.; BURKS, T. F. (Eds.) **Innervation of the gut: pathophysiological implications**, pp. 275-288, Boca Raton, CRC Press, 1994.
- GONIAEW, K. Die Nerven des Nahrungsschlauches. **Arch. Mikr. Anat.**, 11, 479-496, 1875.
- GUI, X. Y. Mast cells: a possible link between psychological stress, enteric infection, food allergy and gut hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. **J Gastroenterol Hepatol**, 13, 980-989, 1998.
- GUNN, M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. **Journal of Anatomy**, 102, 223-239, 1968.
- HALEGOUA, S.; ARMSTRONG, R. C.; KREMER, N. E. Dissecting the mode of action of a neuronal growth factor. **Curr Top Microbiol Immunol**, 165, 119-170, 1991.
- HENLE, J. **Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen**. Band III., Abt. 2. Nervenlehre, Vieweg und Sohn, Braunschweig, 1871.
- HOEHNER, J. C.; WESTER, T.; PAHLMAN, S.; OLSEN, L. Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. **Gastroenterology**, 110, 756-767, 1996.
- HOLZER, P.; LIVINGSTON, E. H.; GUTH, P. H. Sensory neurons signal for an increase in rat gastric mucosal blood flow in the face of pending acid injury. **Gastroenterology**, 101, 416-423, 1991.
- HOYLE, C. H. V.; BURNSTOCK, G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. **Journal of Anatomy**, 166, 7-22, 1989.

- IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. **American Journal of Anatomy**, 49, 141-166, 1931.
- JABARI, S.; DE OLIVEIRA, E. C.; BREHMER, A.; DA SILVEIRA, A. B. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochem Cell Biol**. doi: 10.1007/s00418-014-1250-x, 2014.
- JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. **Journal of Neuroscience**, 3, 2206-2218, 1983.
- JOHANSSON, M.; JONSSON, M.; NORRGARD, O.; FORSGREN, S. New aspects concerning ulcerative colitis and colonic carcinoma: analysis of levels of neuropeptides, neurotrophins, and TNFalpha/TNF receptor in plasma and mucosa in parallel with histological evaluation of the intestine. **Inflamm Bowel Dis**, 14, 1331-1340. doi: 10.1002/ibd.20487, 2008.
- JOHANSSON, M.; NORRGARD, O.; FORSGREN, S. Study of expression patterns and levels of neurotrophins and neurotrophin receptors in ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, 13, 398-409. doi: 10.1002/ibd.20072, 2007.
- KOBERLE, F. 50 Years of Chagas' disease. **Munch Med Wochenschr**, 99, 1193-1198, 1957.
- Pathology and pathological anatomy of Chagas' disease. **Bol Oficina Sanit Panam**, 51, 404-428, 1961.
- Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, 6, 63-116, 1968.
- The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. **Bull World Health Organ**, 42, 739-743, 1970.
- KRAMMER, H. J.; KUHNEL, W. Immunohistochemistry for intermediate filaments in the enteric nervous system of porcine small intestine. **Ann. Anat.**, 174, 275-278, 1993.
- KULKARNI-NARLA, A.; BEITZ, A. J.; BROWN, D. R. Catecholaminergic, cholinergic and peptidergic innervation of gut-associated lymphoid tissue in porcine jejunum and ileum. **Cell Tissue Res**, 298, 275-286, 1999.
- LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science**, 237, 1154-1162, 1987.
- LEVI-MONTALCINI, R.; ANGELETTI, P. U. Growth control of the sympathetic system by a specific protein factor. **Q Rev Biol**, 36, 99-108, 1961.
- LEWIS, T. **The blood vessels of the human skin and their responses**. London, Shaw & Sons Ltd, 1927.
- LIN, L. F. H.; DOHERTY, D. H.; LILE, J. D.; BEKTESH, S.; COLLINS, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**, 260, 1130-1132, 1993.
- LOMAX, A. E. G.; FURNESS, J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. **Cell and Tissue Research**, 302, 59-73, 2000.
- LUNDGREN, O. Sympathetic input into the enteric nervous system. **Gut**, 47 Suppl 4, iv33-35; discussion iv36, 2000.
- MANNING, B. P.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Effects of PGE2 in guinea pig colonic myenteric ganglia. **American Journal of Physiology**, 283, G1388-G1397, 2002.
- MARIN NETO, J. A.; GALLO, L.; JR., MANCO, J. C.; RASSI, A.; AMORIM, D. S. Mechanisms of tachycardia on standing: studies in normal individuals and in chronic Chagas' heart patients. **Cardiovasc Res**, 14, 541-550, 1980.
- MCMILLIN, D. L.; RICHARDS, D. G.; MEIN, E. A.; NELSON, C. D. The abdominal brain and enteric nervous system. **J Altern Complement Med**, 5, 575-586, 1999.
- MEISSNER, G. Über die Nerven der Darmwand. Z. Ration. **Med. N. F.**, 8, 364-366, 1857.
- MEYRAT, B. J.; LESBROS, Y.; LAURINI, R. N. Assessment of the colon innervation with serial biopsies above the aganglionic zone before the pull-through procedure in Hirschsprung's disease. **Pediatr Surg Int**, 17, 129-135, 2001.

- MICHEL, K.; REICHE, D.; SCHEMANN, M. Projections and neurochemical coding of motor neurones to the circular and longitudinal muscle of the guinea pig gastric corpus. **Pflügers Archive European Journal of Physiology**, 440, 393-408, 2000.
- MOREIRA, M. D.; BREHMER, A.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T.; DE FREITAS, M. A.; DA SILVEIRA, A. B. Regenerative process evaluation of neuronal subclasses in chagasic patients with megacolon. **Hum Immunol**, 74, 181-188. doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.012, 2013.
- NEMETH, L.; PURI, P. The innervation of human bowel mucosa and its alterations in Hirschsprung's disease using a whole-mount preparation technique. **Pediatr Surg Int**, 16, 277-281, 2000.
- OTTEN, U.; SCULLY, J. L.; EHRHARD, P. B.; GADIENT, R. A. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. **Prog Brain Res**, 103, 293-305, 1994.
- PALMER, J. M.; WONG RILEY, M.; SHARKEY, K. A. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. **American Journal of Physiology**, 275, G922-G935, 1998.
- PETERS, R. J.; OSINSKI, M. A.; HONGO, J. A.; BENNETT, G. L.; OKRAGLY, A. J.; HAAK-FRENDSCHO, M.; EPSTEIN, M. L. GDNF is abundant in the adult rat gut. **J Auton Nerv Syst**, 70, 115-122, 1998.
- PORTBURY, A. L.; POMPOLO, S.; FURNESS, J. B.; STEBBING, M. J.; KUNZE, W. A. A.; BORNSTEIN, J. C.; HUGHES, S. Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections. **Journal of Anatomy**, 187, 303-321, 1995.
- PORTER, A. J.; WATTCHOW, D. A.; BROOKES, S. J.; COSTA, M. Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 14, 1180-1187, 1999.
- POWLEY, T. L. Vagal input to the enteric nervous system. **Gut**, 47 Suppl 4, iv30-32; discussion iv36, 2000a.
- \_\_\_\_\_. Vagal input to the enteric nervous system. **Gut**, 47, iv30-iv32, 2000b.
- PRATA, A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 Suppl 1, 81-88, 1999.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, 1, 92-100, 2001.
- RASSI, A.; JR., RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, 23, 883-889, 2000.
- RAUCH, U.; HANGEN, A.; HAGL, C.; HOLLAND-CUNZ, S.; SCHAFER, K. H. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. **Int J Colorectal Dis**, 21, 554-559, 2006.
- REMAK, R. Neue Beiträge zur Kenntnis vom organischen Nervensystem. **Med. Z. Ver. Heilk. Preuss.**, 9, 7-8, 1840.
- \_\_\_\_\_. Über mikroskopische Ganglien an den Asten des N. vagus in der Wand des Magens bei Wirbeltieren. **Vers. Ges. Dtsch. Naturf. Aerzte**, 181-183, 1852.
- RICHARDSON, K. C. Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. **American Journal of Anatomy**, 103, 99-135, 1958.
- RUHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. Enteric glia. **Neurogastroenterol Motil**, 16 Suppl 1, 44-49, 2004.
- SAARMA, M.; SARIOLA, H. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). **Microsc Res Tech**, 45, 292-302, 1999.

- SANDERS, K. M.; SMITH, T. K. Motor neurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of the canine proximal colon. **Journal of Physiology** (London), 380, 293-310, 1986.
- SCHABADASCH, A. Die Nerven des Magens der Katze. **Z. Zellforsch.**, v. 10, 254-319, 1930.
- SCHEUERMANN, D. W.; STACH, W.; TIMMERMANS, J. P. Topography, architecture and structure of the plexus submucosus internus Meissner of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. **Acta Anatomica**, 129, 96-104, 1987.
- SCULLY, J. L.; OTTEN, U. Glucocorticoids, neurotrophins and neurodegeneration. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 52, 391-401, 1995a.
- \_\_\_\_\_. NGF: not just for neurons. **Cell Biol Int**, 19, 459-469, 1995b.
- SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, 2, 669-677, 2002.
- STEPHANI, U.; SUTTER, A.; ZIMMERMANN, A. Nerve growth factor (NGF) in serum: evaluation of serum NGF levels with a sensitive bioassay employing embryonic sensory neurons. **J Neurosci Res**, 17, 25-35, 1987.
- 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**, 13, 76-91, 1971.
- TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J Anat**, 194 ( Pt 1), 1-14, 1999.
- THOMAS, S. M.; HAYES, M.; D'ARCANGELO, G.; ARMSTRONG, R. C.; MEYER, B. E.; ZILBERSTEIN, A.; BRUGGE, J. S.; HALEGOUA, S. Induction of neurite outgrowth by v-src mimics critical aspects of nerve growth factor-induced differentiation. **Mol Cell Biol**, 11, 4739-4750, 1991.
- TIMMERMANS, J.-P.; HENS, J.; ADRIAENSEN, D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. **Anatomical Record**, 262, 71-78, 2001.
- TIMMERMANS, J. P.; ADRIAENSEN, D.; CORNELISSEN, W.; SCHEUERMANN, D. W. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 118A, 331-340, 1997.
- TIMMERMANS, J. P.; SCHEUERMANN, D. W.; STACH, W.; ADRIAENSEN, D.; DE GROODT LASSEEL, M. H. A. Distinct distribution of CGRP-, enkephalin-, galanin-, neuromedin U-, neuropeptide Y-, somatostatin-, substance P-, VIP- and serotonin-containing neurons in the two submucosal ganglionic neural networks of the porcine small intestine. **Cell and Tissue Research**, 260, 367-379, 1990.
- VON BOYEN, G. B.; REINSHAGEN, M.; STEINKAMP, M.; ADLER, G.; KIRSCH, J. Enteric nervous plasticity and development: dependence on neurotrophic factors. **J Gastroenterol**, 37, 583-588, 2002a.
- \_\_\_\_\_. Gut inflammation modulated by the enteric nervous system and neurotrophic factors. **Scand J Gastroenterol**, 37, 621-625, 2002b.
- VON BOYEN, G. B.; STEINKAMP, M.; GEERLING, I.; REINSHAGEN, M.; SCHAFER, K. H.; ADLER, G.; KIRSCH, J. Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, 12, 346-354, 2006a.
- VON BOYEN, G. B.; STEINKAMP, M.; REINSHAGEN, M.; SCHAFER, K. H.; ADLER, G.; KIRSCH, J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**, 53, 222-228, 2004.

\_\_\_\_\_. Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. **J Neuroendocrinol**, 18, 820-825. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01478.x, 2006b.

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

## **ANEXO : APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 – Bloco A – Sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº. 323/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU**  
110/11

**Projeto Pesquisa:** “Imunopatologia da forma digestiva da doença de Chagas”.

**Pesquisador Responsável:** Alexandre Barcelos Moraes da Silveira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto. O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Entrega de relatório parcial: outubro de 2012

Entrega de Relatório Final: julho de 2013

### **SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO**

**OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA**

Uberlândia, 27 de maio de 2011.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado

Coordenadora do CEP/UFU