

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

**NEUROREGULAÇÃO E IMUNOREGULAÇÃO NO MEGACÓLON CHAGÁSICO:
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NEUROTROFINAS, SEROTONINA E
CONCENTRAÇÃO DE MASTÓCITOS**

NATHÁLIA SEGATTO FERREIRA

UBERLÂNDIA
2018

NATHÁLIA SEGATTO FERREIRA

**NEUROREGULAÇÃO E IMUNOREGULAÇÃO NO MEGACÓLON CHAGÁSICO:
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NEUROTROFINAS, SEROTONINA E
CONCENTRAÇÃO DE MASTÓCITOS**

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

Área de concentração: Ciências da Saúde

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barcelos
Morais da Silveira**

UBERLÂNDIA

2018

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

- F383n Ferreira, Nathália Segatto, 1994-
 Neuroregulação e imunoregulação no megacólon chagásico:
 avaliação da expressão de neurotrofinas, serotonina e concentração de
 mastócitos / Nathália Segatto Ferreira. – 2018.
 36 f. : il.
- Orientador: Alexandre Barcelos Morais da Silveira.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.771>
 Inclui bibliografia.
1. Ciências médicas - Teses. 2. Chagas, Doença de - Teses. 3.
 Megacólon - Teses. 4. Mastócitos - Teses. I. Silveira, Alexandre
 Barcelos Morais da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
 de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Segatto Ferreira

Neuroregulação e imunoregulação no megacólon chagásico: avaliação da expressão de neurotrofinas, serotonina e concentração de mastócitos.

Presidente da banca: Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira

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

Área de concentração: Ciências da Saúde

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Profa. Dra. Renata Cristina de Paula

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho a minha mãe, Vera e minha avó, Josefina, em retribuição ao amor, exemplo e por não medirem esforços para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida e ao meu pai, Gerson, vivo em minha memória e em meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido saúde, força e sabedoria e por tranquilizar meu coração nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Alexandre, pela orientação, atenção e pelos ensinamentos que foram essenciais para a realização deste trabalho;

À Dra. Michelle, pelas oportunidades, confiança e apoio ao longo desses anos.

À minha família pelo incentivo, apoio e carinho.

À toda equipe do Centro Diagnóstico de Patologia pelo apoio, em especial à Roseane e Sabrina, pela amizade, convivência e pelos momentos de descontração.

RESUMO

A doença de Chagas é considerada um problema de saúde de pública por ser uma grave doença parasitária que ainda atinge cerca de 6 milhões de pessoas em todo o mundo. O megacólon chagásico é uma das manifestações mais graves da doença, caracterizado por constipação intestinal, dilatação no cólon sigmóide e reto. A análise histológica do mega chagásico mostra lesões do sistema nervoso entérico, associadas a uma grande redução no número de neurônios, causadas principalmente por um processo inflamatório. Dados anteriores sugerem que a expressão de mastócitos e de serotonina poderia estar envolvida no controle da homeostase intestinal, evitando o desenvolvimento do megacólon chagásico. Além disso, algumas substâncias, como as neurotrofinas, podem restringir os níveis de destruição neuronal, o que já foi demonstrado em outras doenças neurodegenerativas. Este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão neurotrofinas, serotonina e mastócitos em pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e avaliar a relação entre a concentração de mastócitos, serotonina e o desenvolvimento do megacólon. Foram utilizadas amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados, que após a preparação, foram submetidas à imunohistoquímica. Nossos resultados demonstraram que pacientes chagásicos sem megacólon apresentam uma grande quantidade de serotonina e poucos mastócitos, enquanto chagásicos com mega apresentaram um grande quantidade de mastócitos e baixa expressão de serotonina. Quanto às neurotrofinas, nossos dados apontam que as células enterogliais são a principal fonte de neurotrofinas. Os pacientes com megacólon apresentaram uma alta expressão de todas as neurotrofinas analisadas, quando comparados com os pacientes chagásicos sem mega e indivíduos não infectados. Assim, nós sugerimos que a alta expressão neurotrofinas e de serotonina pode conferir neuroproteção ao sistema nervoso entérico durante a instalação do megacólon chagásico.

Palavras-chave: Doença de Chagas, megacólon, serotonina, neurotrofinas, mastócitos

ABSTRACT

Chaga's disease is considered a public health problem because it is a serious parasitic disease that still affects about 6 million people worldwide. Chagasic megacolon is one of the most serious manifestations of the disease, characterized by intestinal constipation, dilatation of the sigmoid colon and rectum. The histological analysis of the mega chagasic shows lesions of the enteric nervous system, associated with a large reduction in the number of neurons, caused mainly by an inflammatory process. Previous data suggest that the expression of mast cells and serotonin could be involved in the control of intestinal homeostasis, avoiding the development of the chagasic megacolon. In addition, some substances, such as neurotrophins, may restrict levels of neuronal destruction, as has been demonstrated in other neurodegenerative diseases. This study aimed to characterize the expression neurotrophins, serotonin and mast cells in chagasic patients with and without megacolon and to evaluate the relationship between mast cell concentration, serotonin and megacolon development. Colon samples were used from chagasic patients with and without megacolon and non-infected individuals, who were submitted to immunohistochemistry after preparation. Our results demonstrated that chagasic patients without megacolon present a high amount of serotonin and few mast cells, while mega chagasic patients presented a large amount of mast cells and low serotonin expression. As for neurotrophins, our data indicate that enteroglial cells are the main source of neurotrophins. Patients with megacolon had a high expression of all the neurotrophins analyzed, when compared to nonmega chagasic patients and uninfected individuals. Thus, we suggest that high neurotrophin and serotonin expression may confer neuroprotection to the enteric nervous system during the installation of the chagasic megacolon.

Key-words: Chaga's disease, megacolon, serotonin, neurotrophins, mast cells

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	9
1.1 Doença de Chagas	9
1.2 Células imunes.....	11
1.3 Sistema nervoso entérico	14
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Pacientes e amostras	19
4.2 Investigação imunohistoquímica para S-100, periferina e neurotrofinas	20
4.3 Investigação imunohistoquímica para mastócitos e serotonina	21
4.4 Análise estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Relação entre a concentração de mastócitos e a expressão de serotonina.....	23
5.2 Expressão de periferina, S-100	24
5.3 Expressão de neurotrofinas	25
5.4 Periferina,/S-100/Imunorreações de neurotrofinas	25
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES.....	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

O processo de descoberta da doença de Chagas teve início em 1907, quando Carlos Chagas chegou a Lassance, no norte de Minas Gerais, para atuar na profilaxia da malária que acometia os trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil. Durante sua estadia, Chagas identificou na população local alterações patológicas ainda não descritas em outras doenças. Paralelamente, observou nas casas de pau-a-pique uma grande quantidade de insetos hematófagos e decidiu examiná-los, identificando neles um novo parasito, ao qual deu o nome de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz. Verificou que este parasito era patogênico para animais de laboratório e domésticos e começou a pesquisar se a presença do parasito tinha relação com a condição mórbida desenvolvida pela população local. Em abril de 1909 Chagas detectou o *Trypanosoma cruzi* no sangue de uma criança, oficializando a descoberta da doença de Chagas (KOBERLE, 1968; PRATA, 1999).

Atualmente, estima-se que 6 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, com maior concentração de casos na América Latina, onde 70 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença de Chagas. No entanto, com o processo de globalização e migrações internacionais, têm surgido novos casos da doença em regiões não endêmicas. No Brasil, cerca de 1,2 milhões de indivíduos são afetados pela doença de Chagas e aproximadamente 25 milhões estão expostos ao risco da infecção. Dentre os reservatórios do parasito, podem ser citados os marsupiais, morcegos, primatas não humanos, cães e gatos. Os reservatórios e vetores do parasito estão distribuídos geograficamente do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile (DIAS E AMATO NETO, 2011; DIAS *et al.*, 2014; COURA & JUNQUEIRA, 2015; BESTETTI *et al.*, 2016; CUCUNUBÁ *et al.*, 2016).

A transmissão vetorial da doença de Chagas ocorre por meio do contato do hospedeiro vertebrado com fezes e/ou urina de triatomíneos, contaminadas com a forma tripomastigota metacíclica do parasito. Os insetos se infectam durante a sucção de sangue de indivíduos infectados, quando tripomastigotas são ingeridas e no intestino do inseto passam por alterações fisiológicas e morfológicas, transformando-se em epimastigotas e, posteriormente, em tripomastigotas metacíclicas. O barbeiro, ao realizar o repasto sanguíneo, elimina em suas fezes e/ou urina, as tripomastigotas, que através da mucosa ou conjuntiva ocular, infectam células do hospedeiro vertebrado, incluindo macrófagos, neurônios e fibroblastos. No interior destas, o parasito diferencia-se em amastigota, reproduz-se e dá origem a novas

tripomastigotas, que rompem a célula parasitada e vão para a corrente sanguínea, podendo infectar novos tecidos e órgãos (KOBBERLE, 1968; BRENER, 1982).

Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas pode também ser transmitida pelas vias congênita, transfusional, oral e por acidentes de laboratório. Atualmente, as vias alternativas de transmissão, como a oral, mostram-se importantes meios de disseminação da doença, devido à seleção rigorosa de doadores de sangue e órgãos e ao controle dos vetores domésticos. A transmissão oral tem sido a mais ocorrente no Brasil nos últimos anos e ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados com fezes e/ou urina de triatomíneos, sendo responsável por aproximadamente 60% dos novos casos da doença no Brasil (DIAS e AMATO NETO, 2011; DIAS *et al.*, 2014).

A doença de Chagas pode ser classificada de acordo com sua evolução clínica em duas fases distintas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda pode ser resultante de uma infecção primária ou da reativação de uma fase crônica, com duração que varia de 2 a 4 meses. Caracteriza-se por sintomas clássicos de infecção (febre, esplenomegalia, astenia, meningoencefalite, miocardite) e pelo sinal de Romanã ou chagoma de inoculação, uma lesão de porta de entrada evidenciada após a picada do barbeiro. Nesta fase, tripomastigotas do parasito podem ser encontradas em abundância no sangue periférico, enquanto as amastigotas estão presentes em diversas células, como neurônios, células de Schwann, células da glia, macrófagos e fibras musculares cardíaca, lisa e esquelética (KOBBERLE, 1970; PRATA, 1990; TANOWITZ *et al.*, 1992).

A maioria dos indivíduos não tratados durante a fase aguda evoluiu para a forma crônica indeterminada da doença, caracterizada pela presença da infecção (confirmada por métodos parasitológicos indiretos e/ou sorológicos) associada à ausência de sintomas e exames radiológicos normais. A forma indeterminada pode persistir por toda a vida de um indivíduo chagásico. No entanto, após um intervalo de 20-30 anos, alguns indivíduos podem evoluir para a forma clínica sintomática da doença, com comprometimento digestivo, cardíaco e raramente neurológico (KOBBERLE, 1961; TAFURI, 1987).

A forma cardíaca é o principal alvo dos estudos relacionados à doença de Chagas, devido a sua frequência e graves consequências, que incluem arritmias, tromboembolismo, aneurisma do ventrículo esquerdo e morte súbita. Observa-se também um aumento no tamanho do órgão nos estágios mais avançados da cardiopatia chagásica crônica (TAFURI, 1987; 1999).

Na forma digestiva, os pacientes apresentam sintomas relacionados ao comprometimento dos órgãos do trato digestivo. Os órgãos mais afetados são o esôfago e o

cólon, constituindo o megaesôfago e o megacólon, respectivamente. Acredita-se que o mega chagásico seja resultante de um processo de deservação do sistema nervoso entérico (SNE), que parece ter início na fase aguda e persiste até a fase crônica da doença (KOBBERLE, 1970; TAFURI *et al.*, 1971).

Em 1916 surge o primeiro indício da existência da forma digestiva da doença, descrito pelo próprio Carlos Chagas, quando observou que alguns pacientes apresentavam disfagia, que consiste na dificuldade ou incapacidade de ingerir alimentos sólidos, precisando de água para deglutí-los. Na época, este fenômeno foi denominado “mal do engasgo” (CHAGAS, 1916).

O megacólon é caracterizado por constipação intestinal grave, dilatação do reto e sigmóide e desnutrição. É mais incidente em indivíduos adultos (30 a 60 anos) e do sexo masculino (COURA e DIAS, 2009).

Dados da literatura não deixam dúvidas quanto ao papel que as lesões dos componentes do SNE exercem no desenvolvimento do mega chagásico. Koberle (1968), ao analisar amostras de esôfago e cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de mega chagásico demonstrou que os pacientes portadores da forma digestiva apresentaram uma redução no número de neurônios. Para ele, é necessária uma redução de 85% dos neurônios para que ocorra o megaesôfago e 55% para o megacólon. Da Silveira *et al.* (2005) demonstraram que pacientes chagásicos portadores de megaesôfago apresentam uma redução significativa de neurônios associada com um aumento de células inflamatórias quando comparados ao chagásicos sem mega e indivíduos não infectados. Demonstraram também que a baixa contagem neuronal nem sempre está relacionada ao desenvolvimento do megaesôfago, já que alguns pacientes chagásicos assintomáticos também apresentam uma redução no número de neurônios entéricos, mostrando a importância de avaliar outros componentes do sistema nervoso entérico.

1.2 Células imunes

Assim como nas outras formas clínicas da doença de Chagas, a participação da imunidade mediada por células exerce uma grande importância na forma digestiva. Quando um indivíduo passa por um processo de imunossupressão (radioterapia, AIDS), o parasitismo é intensificado, o que demonstra que a imunidade é proveniente de respostas celulares (GAZZINELLI *et al.*, 1988; TAFURI, 1999; VAGO *et al.*, 2003; ARAUJO *et al.*, 2007).

Lemos et al. (1998) realizaram um estudo utilizando sangue periférico de pacientes com a forma digestiva grave da doença de Chagas. No processo inflamatório que ocorre no sangue, foi observada uma diminuição significativa no número de linfócitos T CD3⁺ e de linfócitos B CD19⁺ e uma inversão na relação CD4/CD8. Através da análise de subpopulações de células T, foi demonstrado que essa inversão é proveniente da redução do número absoluto de linfócitos T CD4⁺, sem alterações no número de linfócitos CD8⁺. Os pacientes também apresentaram aumento no percentual de expressão de CD4⁺ e CD8⁺ expressando HLA-DR (antígeno leucocitário humano), sugerindo que estas células estão ativas, já que células T expressam moléculas de MHC somente quando ativadas. Os portadores de mega apresentaram uma diminuição no número de linfócitos T CD4⁺ CD28⁺ no sangue periférico. Quando a molécula CD28 não está presente, a estimulação celular através do receptor de célula T promove a inibição da proliferação celular e, em algumas situações, pode induzir uma baixa responsividade antígeno-específica ou anergia. Esses fatores sugerem que a redução das células CD4⁺ CD28⁺ pode estar associada à progressão da doença e a uma resposta imune deficiente.

Na análise histológica, observa-se ganglionite, periganglionite, neurite e fenômenos degenerativos neuronais, que podem levar a destruição completa dos gânglios mientéricos e consequentemente à fibrose (TAFURI *et al.*, 1971). O infiltrado inflamatório é composto principalmente por linfócitos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos. Há uma prevalência de linfócitos T CD3⁺ e CD68⁺ e uma elevação na quantidade de CD4⁺ quando comparado com o número de CD8⁺, além da presença de células expressando TIA-1. A proteína TIA-1 é expressa por células T citotóxicas e células *natural killer*, conhecidas por induzir apoptose em células infectadas e células cancerígenas (DA SILVEIRA, ADAD, *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, LEMOS, *et al.*, 2007; DE ARAÚJO *et al.*, 2011).

Os mastócitos foram descritos pela primeira vez por Paul Ehrlich, em 1878, e desde então são vistos como células efetoras de processos alérgicos. Hoje, sabe-se que os mastócitos estão presentes em vários estados de saúde e doença, sendo consideradas células imunes multifuncionais, envolvidas na reparação tecidual, angiogênese, cicatrização de feridas e nas respostas imunes inata e adaptativa. Estão extensamente distribuídos pelos tecidos e são encontrados principalmente na pele, mucosa respiratória e trato gastrointestinal, locais nos quais a entrada de agentes patogênicos é potencial ou ocorre contato com substância nocivas (DA SILVA *et al.*, 2014).

A maturação dos mastócitos, seu fenótipo e funções são consequências diretas do micorambiente local e influenciam significativamente sua capacidade de reconhecer e

responder de forma específica a diversos estímulos, através da secreção de vários mediadores biológicos ativos. Quando ativados, os mastócitos podem liberar três classes de mediadores: mediadores pré-formados, como as aminas biogênicas (serotonina, histamina), proteases, citocinas e quimiocinas, armazenados em seus grânulos citoplasmáticos; mediadores neoformados, como metabólitos fosfolipídicos, derivados de lipídios da membrana e mediadores neosintetizados, como citocinas, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio, secretados após a transcrição, cuja regulação é dependente do tipo do estímulo e do receptor envolvido no processo (DA SILVA *et al.*, 2014; WANG *et al.* 2013).

Os mastócitos contribuem para a manutenção da homeostase da mucosa ao apoiar a produção de IgA. No nível basal, a permeabilidade epitelial paracelular e transcelular é fortemente regulada por proteases liberadas por essas células, mantendo assim a arquitetura do epitélio intestinal, regulando a migração epitelial (LEE *et al.*, 2013). Além disso, a serotonina (5- hidroxitriptofano ou 5-HT) produzida por células enterocromafins e por mastócitos no intestino e a histamina produzida por mastócitos na mucosa atuam como mediadores pró-inflamatórios no intestino e modulam a permeabilidade intestinal (WANG *et al.*, 2013).

Na doença de Chagas, as manifestações gastrointestinais em pacientes com mastocitose sistêmica são comuns e muitas vezes perigosas. Embora o aumento do número de mastócitos ativados tenha sido encontrado no segmento intestinal envolvido, seus números por si só não dão uma visão sobre sua capacidade pró-inflamatória substancial. Estudos abrangentes não foram realizados para caracterizar completamente a distribuição e fenótipo dos mastócitos em segmentos de cólon de pacientes com megacólon chagásico. Sua concentração pode ser aumentada a partir do processo inflamatório observado no megacólon chagásico, embora os estudos tenham produzido resultados irregulares e às vezes conflitantes (JACOB *et al.*, 2005; DA SILVEIRA, ADAD, *et al.*, 2007).

Almeida *et al.* (1989) evidenciaram no estômago de ratos infectados com *T. cruzi* uma redução dos níveis de acetilcolina e aumento dos níveis de histamina e do número de mastócitos na parede gástrica. Pinheiro *et al.* (1992), analisando ratos na fase aguda da infecção chagásica verificaram no miocárdio desses animais um aumento da concentração de mastócitos associados aos focos inflamatórios.

1.3 Sistema nervoso entérico

A inervação do trato gastrointestinal ocorre por meio de dois diferentes componentes nervosos: um componente extrínseco, constituído por neurônios simpáticos e parassimpáticos originados no sistema nervoso central (SNC) e um componente intrínseco, representado pelo SNE (PHILLIPS e POWLEY, 2007).

O SNE é uma importante rede neural, que atua na integração, modulação e coordenação de diversas funções motoras do trato gastrintestinal e pode executar essas funções independentemente do sistema nervoso central. É composto por aproximadamente 100 milhões de neurônios, agrupados ou dispersos em dois plexos conectados entre si (plexo submucoso e plexo mientérico) ou em pequenos gânglios. Esses neurônios estão presentes em todas as camadas do trato gastrointestinal, estendendo-se do músculo liso do esôfago ao esfíncter interno do ânus (FURNESS e COSTA, 1980; FURNESS *et al.*, 1983).

O plexo mientérico está localizado entre as camadas musculares longitudinal e circular, formando uma rede contínua em todo o trato digestivo tubular. A maior parte dos neurônios presentes neste plexo são eferentes e controlam principalmente os movimentos gastrointestinais. O plexo submucoso está localizado na submucosa, é encontrado em abundância no intestino delgado e grosso e controla principalmente a secreção gastrointestinal e o fluxo sanguíneo local (BREHMER *et al.*, 2004; BREHMER, 2006). As fibras extrínsecas simpáticas e parassimpáticas se conectam aos dois plexos. Apesar da capacidade do SNE de executar suas funções independentemente da inervação extrínseca, a estimulação pelos componentes nervosos simpáticos e parassimpáticos pode influenciar as funções do trato gastrointestinal, intensificando-as ou inibindo-as (FURNESS *et al.*, 1983; PHILLIPS e POWLEY, 2007).

As células da glia formam uma vasta rede na mucosa do trato gastrointestinal e desempenham um importante papel na manutenção da integridade tecidual. Podem ser caracterizadas pela expressão de S-100 e, em algumas situações, de GFAP (proteína glial fibrilar ácida). Elas produzem algumas citocinas, como IL-6 e possuem receptores de citocinas e também de neurotransmissores. Estes neurotransmissores têm a capacidade de modular a expressão de citocinas pelas células gliais (BUSH *et al.*, 1998; DA SILVEIRA *et al.*, 2009). Alguns estudos sugerem que a destruição dessas células pode estar relacionada com o desenvolvimento dos megas (DA SILVEIRA *et al.*, 2011), enquanto outros propõem que este grupo de células atua na mediação da interação entre o sistema nervoso entérico e o sistema imunológico (SHARKEY, 2015).

O sistema imune influencia as atividades do SNE através da secreção de diversas substâncias, como as neurotrofinas e os neuromediadores do SNE, como a serotonina, possuem atividade considerável sobre o sistema imune (LIN *et al.*, 2005), o que reforça a hipótese de que a interação entre esses dois sistemas está ligada ao desenvolvimento do megacólon chagásico.

As neurotrofinas, ou fatores neurotróficos, são uma família de peptídeos conhecidos por desempenhar um importante papel no desenvolvimento, diferenciação, sobrevivência e regeneração neuronal. É aceito que essas substâncias podem representar um elo entre o sistema imune e o sistema nervoso e alguns estudos demonstraram que uma instabilidade de neurotrofinas pode surgir durante um processo inflamatório (LIN *et al.*, 2005). As neurotrofinas incluem o fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado da glia (GNDF) e neurotrofina 3 (NT-3). NGF protege os neurônios durante lesões no SNC e periférico, aumentando sua sobrevivência e facilitando a rebrota axonal. No intestino normal, a concentração de NGF é baixa ou ausente, mas em condições inflamatórias, ocorre uma regulação positiva. GNDF age estimulando o desenvolvimento de projeções neuronais, diferenciação neuronal e são capazes de proteger os neurônios da apoptose em várias condições. NT-3 medeia o crescimento de mastócitos intestinais (VON BOYEN *et al.*, 2006; WEINKAUF e PEREIRAPERRIN, 2009).

Estudos têm sugerido que essas neurotrofinas podem desempenhar um importante papel na doença de Chagas, como já foi demonstrado em outras doenças gastrointestinais, como colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal (VON BOYEN *et al.*, 2002; NEUNLIST *et al.*, 2003). No entanto, o envolvimento das neurotrofinas no megacólon chagásico não está determinado.

A serotonina é um neurotransmissor da família das aminas biogênicas, caracterizada como uma molécula sinalizadora gastrointestinal. É sintetizada por neurônios serotoninérgicos e por células neuroendócrinas ou enterocromafins, sob dependência da disponibilidade plasmática do seu aminoácido precursor, o triptofano (Tph). A serotonina é responsável por iniciar e propagar reflexos entéricos e realizar a sinalização entre o intestino e o cérebro. No SNC, está relacionada com alterações comportamentais, humor, sono, ansiedade, supressão de apetite, fome e inibição das vias de dor (GERSHON, 1981; RAO e GERSHON, 2016).

A ampla diversidade de efeitos da serotonina se deve a presença de diversos receptores presentes na musculatura lisa, em neurônios e em células neuroendócrinas. Existem sete famílias e vários tipos de receptores de serotonina, denominados 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄,

5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇. Os subtipos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇ atuam na função motora do intestino, enquanto 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ estão presentes no encéfalo (GERSHON, 2012; 2013).

A serotonina (5-HT) desempenha diversas funções no intestino, onde 90% da 5-HT circulante é produzida. É responsável por reduzir os potenciais pós-sinápticos excitatórios de neurônios entéricos e pode contrair ou relaxar o intestino, de acordo com as condições existentes. Além disso, é considerada uma molécula sinalizadora, devido à sua participação na transdução sensorial da mucosa. As células enterocromafins liberam 5-HT quando há um aumento da pressão intraluminal, estimulando as fibras nervosas e dando início ao reflexo peristáltico. Tais funções mostram o envolvimento direto da serotonina na regulação intestinal (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; GROSS *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A história natural do megacólon chagásico leva progressivamente ao desenvolvimento de complicações para aproximadamente dois terços dos pacientes chagásicos. As principais complicações são o desenvolvimento de estenoses fibróticas, destruição de componentes do SNE e dilatação do órgão. Assim, as mudanças estruturais no sistema nervoso entérico são preditivas da evolução da doença de Chagas, sugerindo que a neuroproteção diminui a gravidade da doença e pode desempenhar um papel na evolução do megacólon chagásico. No entanto, os componentes e mecanismos envolvidos na interação entre o SNE e o sistema imune ainda não foram completamente elucidados.

O conhecimento dos aspectos inflamatórios e imunológicos envolvidos no desenvolvimento do megacólon chagásico poderia melhorar a qualidade de vida de indivíduos chagásicos, bem como de indivíduos portadores de outras doenças inflamatórias intestinais, através de tratamentos voltados para a modulação desses mecanismos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a expressão de neurotrofinas, serotonina e a presença de mastócitos no cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e analisar se há relação entre a expressão das mesmas com as alterações estruturais e funcionais que ocorrem no sistema nervoso entérico durante o desenvolvimento do megacólon chagásico.

3.2 Objetivos específicos

Nas amostras de tecido de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e indivíduos não infectados:

- Identificar a origem e o nível de expressão das neurotrofinas NGF, GDNF e NT-3, através da co-localização com um marcador neuronal (periferina) e um marcador de células da glia (S-100);
- Estabelecer associações entre a presença de mastócitos, expressão de serotonina e desenvolvimento do megacólon chagásico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes e amostras

Nesse trabalho foram utilizadas amostras de tecido do cólon de 12 pacientes chagásicos com megacólon, 12 pacientes chagásicos sem megacólon e 12 indivíduos não infectados, coletadas 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. Os pacientes não foram acompanhados em termos de idade, gênero ou origem étnica. Razões para a ressecção do tecido foram complicações no cólon causadas pela doença de Chagas, enquanto que indivíduos não infectados tinham adenocarcinoma ou doença diverticular como os principais motivos. Todas as amostras cirúrgicas foram coletadas da mesma região topográfica do cólon (reto e sigmóide) e os pacientes foram submetidos à baixa ressecção anterior ou procedimento cirúrgico de Duhamel. O uso de tecidos humanos para esses experimentos foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Erlangen-Nuremberg, bem como pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU nº 110/11).

As amostras foram coletadas do segmento dilatado e tinham, pelo menos, 4,0 cm de comprimento e a circunferência do tecido variou de acordo com o grau de dilatação. As amostras foram enxaguadas com PBS (solução salina-fosfato tamponada) pH 7,2-7,4 e fixadas. Durante a fixação, as amostras de intestino foram distendidas com solução fixadora (solução recentemente diluída de paraformaldeído a 4% em PBS pH 7,2-7,4) utilizando uma seringa. Em seguida, os segmentos inflados foram colocados na solução fixadora durante 2-4 horas. Depois desse tempo, os segmentos inflados foram abertos, recortados em pequenas partes e armazenados em timerosal 0,03 % em 0,1 M de fosfato tamponado com solução salina (pH 7,2-7,4) à 4 ° C. Alternadamente, os segmentos curtos foram presos em uma placa de Petri e transferidos para formalina 4 % tamponada com fosfato 0,1 M (pH 7,4) à temperatura ambiente por 2-3 h. Após várias lavagens em solução salina tamponada com TRIS 0,05 M (TBS, pH 7,4), três músculos longitudinais / montagens inteiras do plexo mientérico (2,0 cm de comprimento, 1,0 cm de largura) por segmento (derivado de cada paciente) foram preparadas. No dia seguinte, os pequenos segmentos de tecido foram transferidos para uma mistura de PBS-sacarose-azida OCT (temperatura ótima de corte) composto (Tissue Tek, Elkhart, IN, EUA) a uma proporção de 1: 1 por mais 24 horas antes de

serem embebidos em 100% OCT. Secções de 12 µm de espessura foram cortadas e montadas em lâminas de microscópio e secas durante 1 hora em temperatura ambiente.

4.2 Investigação imunohistoquímica para S-100, periferina e neurotrofinas

A imunohistoquímica de marcação dupla foi realizada combinando periferina (marcador neuronal) e S-100 (marcador pan-glial) com as neurotrofinas. Detalhes dos anticorpos primários estão listados na tabela 1. A especificidade dos anticorpos para seus alvos foi provada por vários trabalhos anteriores (BRUNONI *et al.*, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2015). As secções foram incubadas primeiro em soro normal de burro (NDS) 10% com 1% v / v Triton X-100 durante 1 hora. A incubação com os anticorpos primários foi realizada durante 24 horas a 4°C com antisoro diluído contendo 10% de NDS. A marcação dupla ou tripla foi alcançada usando uma combinação de periferina e S-100 com marcadores NGF, GDNF e NT-3. Após a incubação com antisoro primário, as preparações foram enxaguadas em PBS (3×10 min) e depois incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários (Donkey anti-goat, donkey anti-mouse e donkey anti-rabbit, diluição 1: 1000, Molecular Probes, Alemanha). Mais 3 lavagens de 10 minutos em PBS foram feitas antes que o tecido fosse montado em meio de fluorescência.

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários para imunohistoquímica de periferina, S-100 e neurotrofinas

Anticorpo primário	Fonte	Companhia	Código	Anticorpo secundário
Anti-periferina	Goat	Santa Cruz Biotechnology	SC-7604	ALEXA Fluor 488 Donkey anti-goat
Anti-S-100	Mouse	DAKO Ink	Z-0311	ALEXA Fluor 488 Donkey anti-mouse
Anti-NGF	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	SC-549	ALEXA Fluor 555 Donkey anti-mouse
Anti-GDNF	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	SC-13147	ALEXA Fluor 555 Donkey anti-mouse
Anti-NT3	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	SC-33907	ALEXA Fluor 555 Donkey anti-mouse

A análise foi realizada considerando especificamente a área marcada de, pelo menos, 10 gânglios neuronais por paciente em ambos os plexos submucoso e mientérico. Antes da incubação, eles foram visualizados usando um microscópio de varredura confocal a laser (Nikon Eclipse E1000-M, Tóquio, Japão) equipado com um sistema confocal (Nikon Digital Eclipse C1) com três canais (configuração do laser: laser de argônio 488 nm, laser de 40 nm de névoa de hélio [ambos de Melles Griot, Carlsbad, Califórnia, EUA], diodo de 638 nm laser [Coherent, Santa Clara, Califórnia, EUA]). Uma lente objetiva seca de 20× (abertura numérica: 0,75) foi usada com o fator de zoom definido para 2.0 em todas as seções exploradas. As imagens foram criadas usando três comprimentos de onda excitatórios diferentes e as fotos das lâminas foram preparadas usando o programa EZ-C1 FreeViewer (Gold Version 3.30 build 647) da Nikon Corporation.

Anti-periferina, um marcador pan-neuronal intestinal muito utilizado, e anti-S-100, que mostra forte reatividade cruzada em células enterogliais humanas, foram utilizados para determinar a co-localização entre neurotrofinas e componentes neuronais ou enterogliais. Secções através de gânglios foram selecionadas aleatoriamente de forma sinuosa até um total de 3 mm² e analisadas em cada plexo ganglionado. As imagens de uma única seção ótica no mesmo plano de foco foram criadas nos gânglios aplicando 2 diferentes comprimentos de onda excitatórios (488 nm argon laser, 543 nm helium-neon laser). As imagens foram preparadas usando Confocal Assistant 4.02 e CorelDraw 13. Para a análise de área das estruturas reativas, as imagens foram analisadas individualmente e mescladas, e a área positiva foi contada em micrômetro quadrado.

4.3 Investigação imunohistoquímica para mastócitos e serotonina

Para identificar os mastócitos, foi utilizado o anti-CD117 (C-19, soro de coelho policlonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e para avaliar a expressão de serotonina foi utilizado anti-serotonina (Merck Millipore, AB-938, 1: 1000, Berlim, Alemanha). Para confirmar a identidade dos mastócitos, as marcações com azul de toluidina foram realizadas (Figura 1F). O controle negativo para CD117 é demonstrado na figura 1D e para serotonina na figura 1E. Vinte campos aleatórios foram avaliados para cada camada de cólon (submucosa, plexo mientérico e muscular interna e externa). As imagens foram adquiridas por microscopia confocal e controles negativos foram realizados em todas os experimentos, removendo o anticorpo primário.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste Anova-Oneway, 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 GraphPadPrism 3.0 (San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Relação entre a concentração de mastócitos e a expressão de serotonina

Através da imunohistoquímica para mastócitos, foi observado que enquanto os pacientes chagásicos sem megacólon (Figura 1B) apresentaram focos de mastócitos leves e escassos, pacientes chagásicos com megacólon (Figura 1C) apresentaram focos intensos de mastócitos em diversos locais. Indivíduos não infectados (Figura 1A) apresentaram apenas um leve aumento no número de mastócitos em relação aos pacientes chagásicos sem megacólon. Em todos os grupos analisados, os mastócitos estavam concentrados principalmente na mucosa. No entanto, a concentração de serotonina demonstrou uma distribuição oposta. Enquanto pacientes chagásicos sem megacólon apresentaram altos níveis de serotonina, pacientes com megacólon apresentaram baixas concentrações deste neuropeptídeo e indivíduos não infectados apresentaram uma concentração intermediária (Tabela 2).

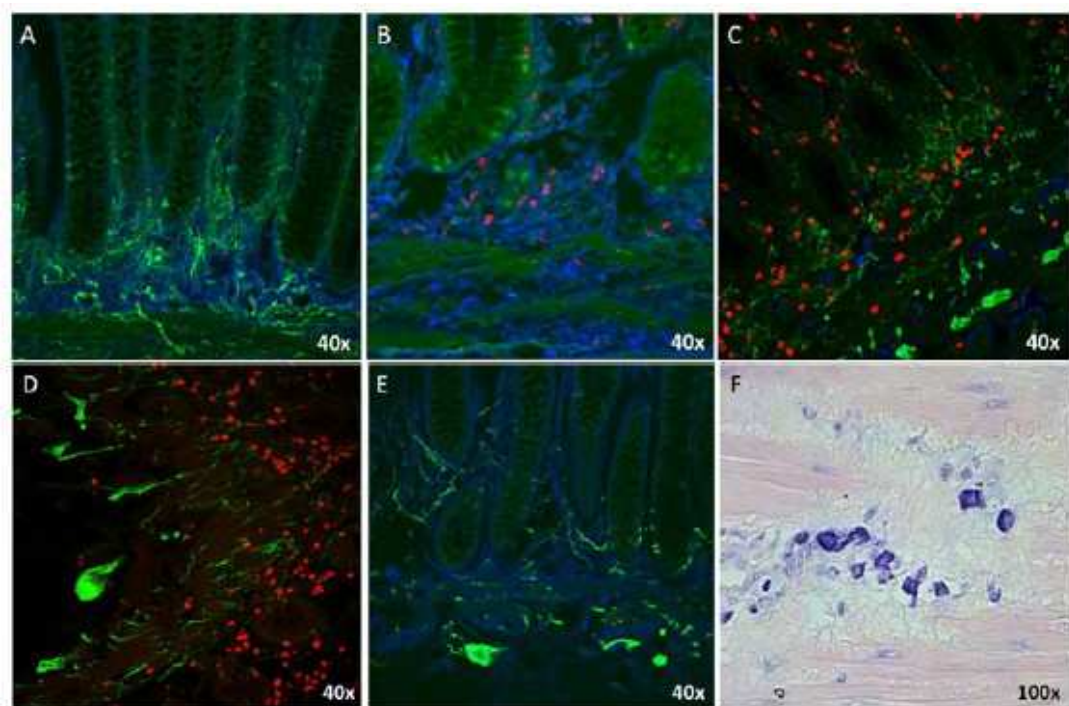


Figura 1- Imunohistoquímica para serotonina (5-HT) e mastócitos (CD-117) no cólon de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados. A imunohistoquímica de serotonina (azul) demonstrou que indivíduos não infectados (A) e pacientes chagásicos sem megacólon (B) apresentam uma alta expressão desta substância em comparação com pacientes chagásicos com megacólon (C). Por outro lado, indivíduos não infectados (A) e chagásicos sem megacólon (B) quase não apresentaram mastócitos (vermelho), enquanto os pacientes chagásicos com megacólon apresentaram essas células em grande quantidade (C). Os

controles negativos foram realizados para serotonina (D) e mastócitos (E). A coloração com azul de toluidina foi realizada para confirmar a identidade dos mastócitos (células azuis) (F).

Tabela 2: Número médio de mastócitos e área média de serotonina no cólon de pacientes chagásicos com e sem megacólon e indivíduos não infectados.

Pacientes	Número médio de mastócitos	Área média de serotonina (μm^2)
Indivíduos não infectados	42 ± 4	312 ± 26
Pacientes chagásicos sem megacólon	$70^a \pm 8$	$413^a \pm 35$
Pacientes chagásicos com megacólon	$264^{ab} \pm 11$	$51^{ab} \pm 16$

^aDiferença estatisticamente significativa entre este grupo e indivíduos não-infectados.

^bDiferença estatisticamente significativa entre este grupo e os pacientes chagásicos sem megacólon. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

5.2 Expressão de periferina e S-100

A análise da área imunoreativa de periferina demonstrou que pacientes chagásicos com megacólon apresentaram um intenso processo de desnervação quando comparados aos pacientes chagásicos sem mega e indivíduos não infectados. Além disso, a análise da área imunoreativa de S-100 mostrou que, enquanto pacientes chagásicos com megacólon apresentam perda de células enterogliais, pacientes chagásicos sem megacólon apresentam maior expressão dessas células (Gráfico 1).

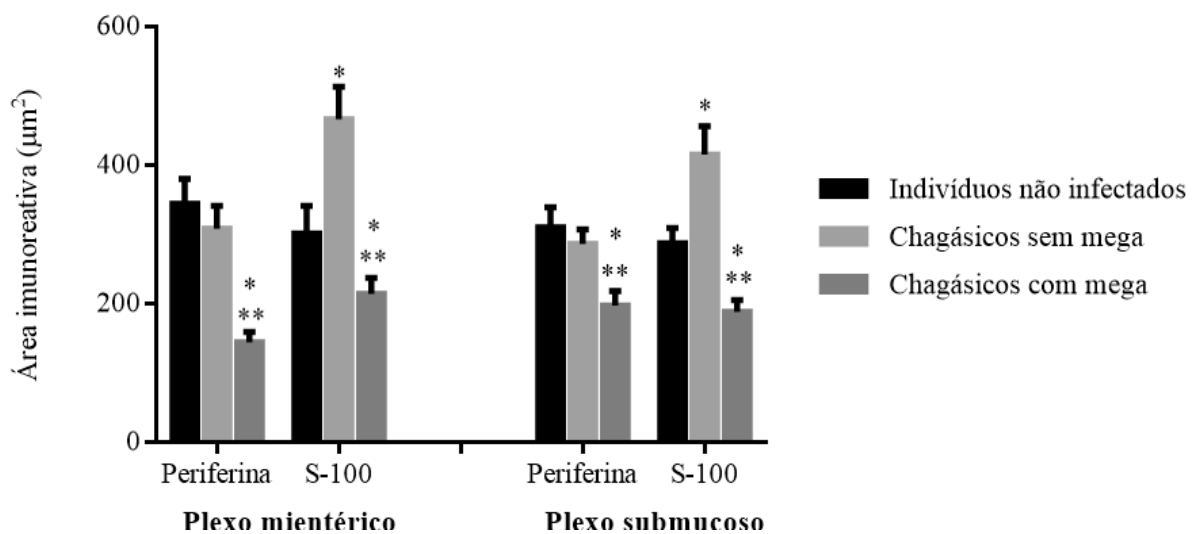


Gráfico 1- Área média de periferina e S-100 nos plexos neuronais de pacientes chagásicos com e sem megacólon e indivíduos não infectados. (*) Diferença estatisticamente significativa entre este grupo e indivíduos não infectados (**) Diferença estatisticamente significativa entre este grupo e pacientes chagásicos sem megacólon. $p < 0,05$

5.3 Expressão de neurotrofinas

A análise da área imunorreativa de GDNF no plexo mientérico demonstrou que pacientes chagásicos com megacólon apresentam menor expressão dessa neurotrofina quando comparados aos chagásicos sem mega, e no plexo submucoso exibem menor expressão quando comparados aos indivíduos não infectados e chagásicos sem mega. Quanto á expressão de NGF, em ambos os plexos, os chagásicos com mega apresentam maior expressão dessa neurotrofina quando comparados aos chagásicos sem mega. Os pacientes chagásicos sem megacólon apresentam maior expressão de GDNF e NGF que os indivíduos não infectados, nos dois plexos analisados (Gráfico 2).

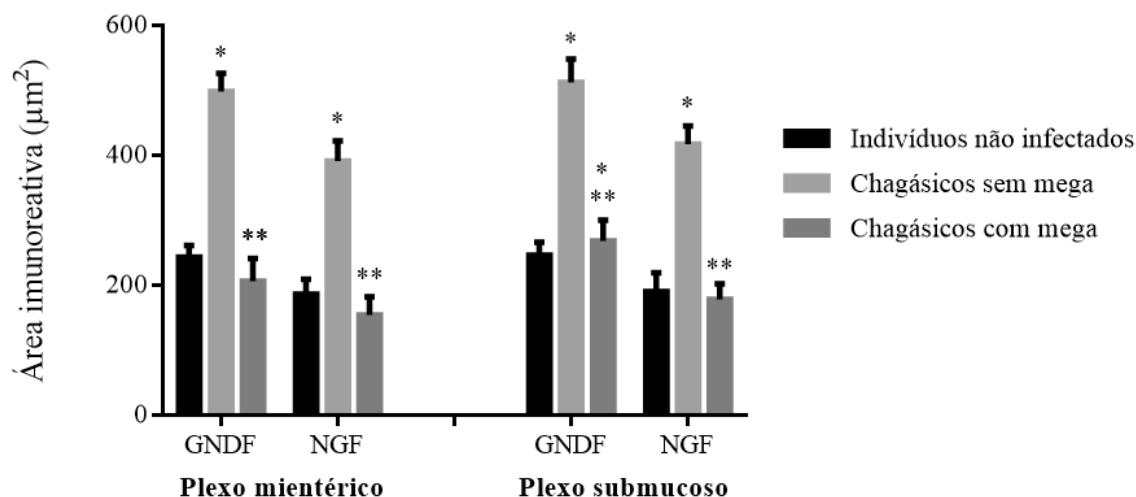


Gráfico 2- Área imunorreativa de neurotrofinas nos plexos neuronais de pacientes chagásicos com e sem megacólon e indivíduos não infectados. (*) Diferença estatisticamente significativa entre este grupo e indivíduos não infectados (**) Diferença estatisticamente significativa entre este grupo e pacientes chagásicos sem megacólon. $p < 0,05$

5.4 Periferina / S-100 / Imunorreações de neurotrofinas

A co-localização com os anticorpos periferina, S-100 e neurotrofinas demonstrou que todas as neurotrofinas analisadas (GDNF, NGF e NT3) concentraram-se principalmente nos plexos neuronais em relação às camadas musculares em pacientes chagásicos e indivíduos não infectados. No entanto, quando comparamos os plexos neuronais (submucoso e mientérico) não houve diferença significativa entre a concentração dessas substâncias. A análise de expressão de neurotrofinas mostrou que GDNF e NGF são expressas principalmente por neurônios e que as células enterogliais expressam todas neurotrofinas em baixos níveis (Figuras 2 e 3).

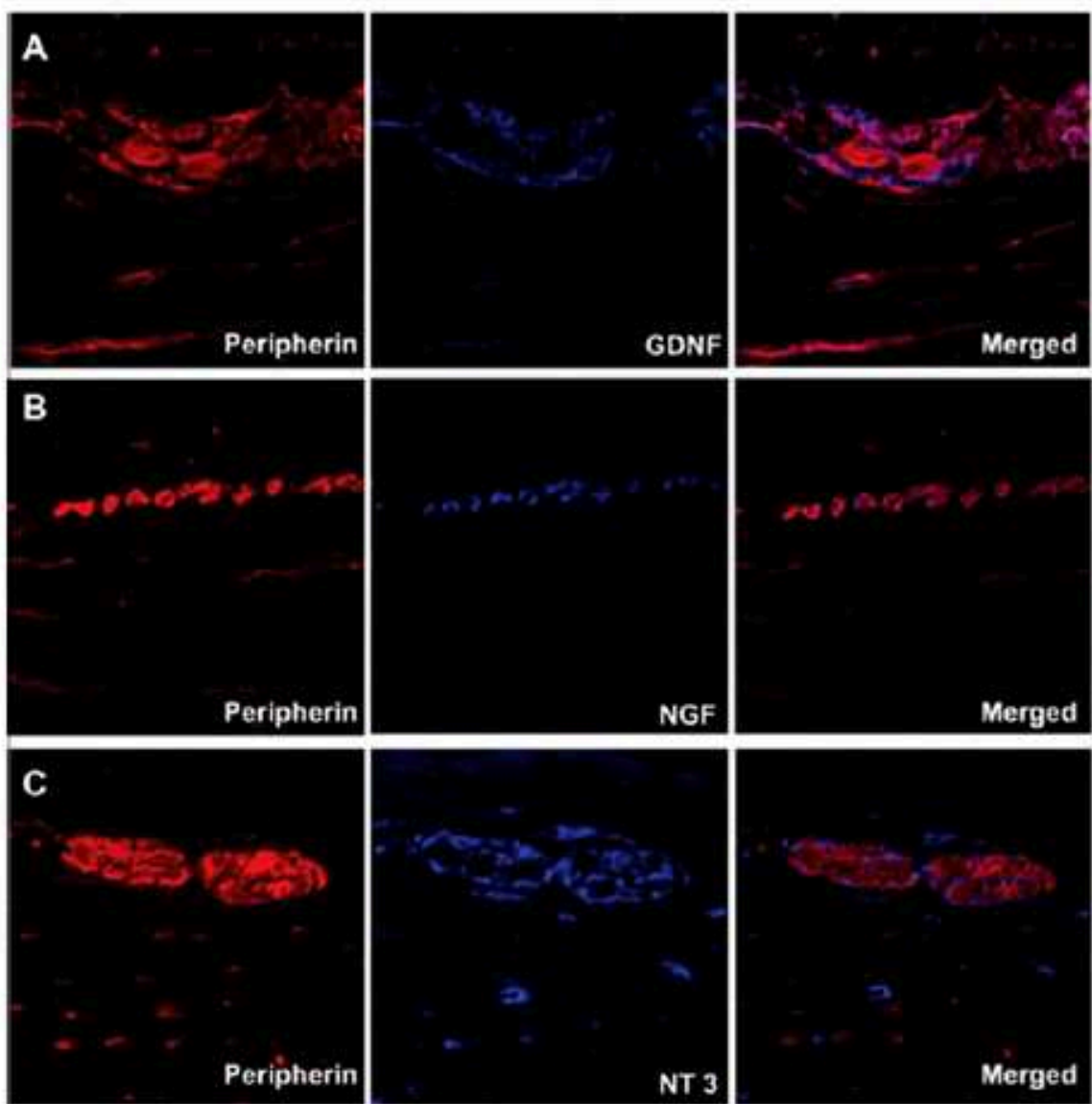


Figura 2- Relação entre a expressão de periferina (marcador neuronal) e neurotrofinas. O GDNF é expresso principalmente fora dos neurônios (A), enquanto NGF (B) e NT3 (C) são expressas pelos neurônios. Essas observações podem ser verificadas nas imagens mescladas.

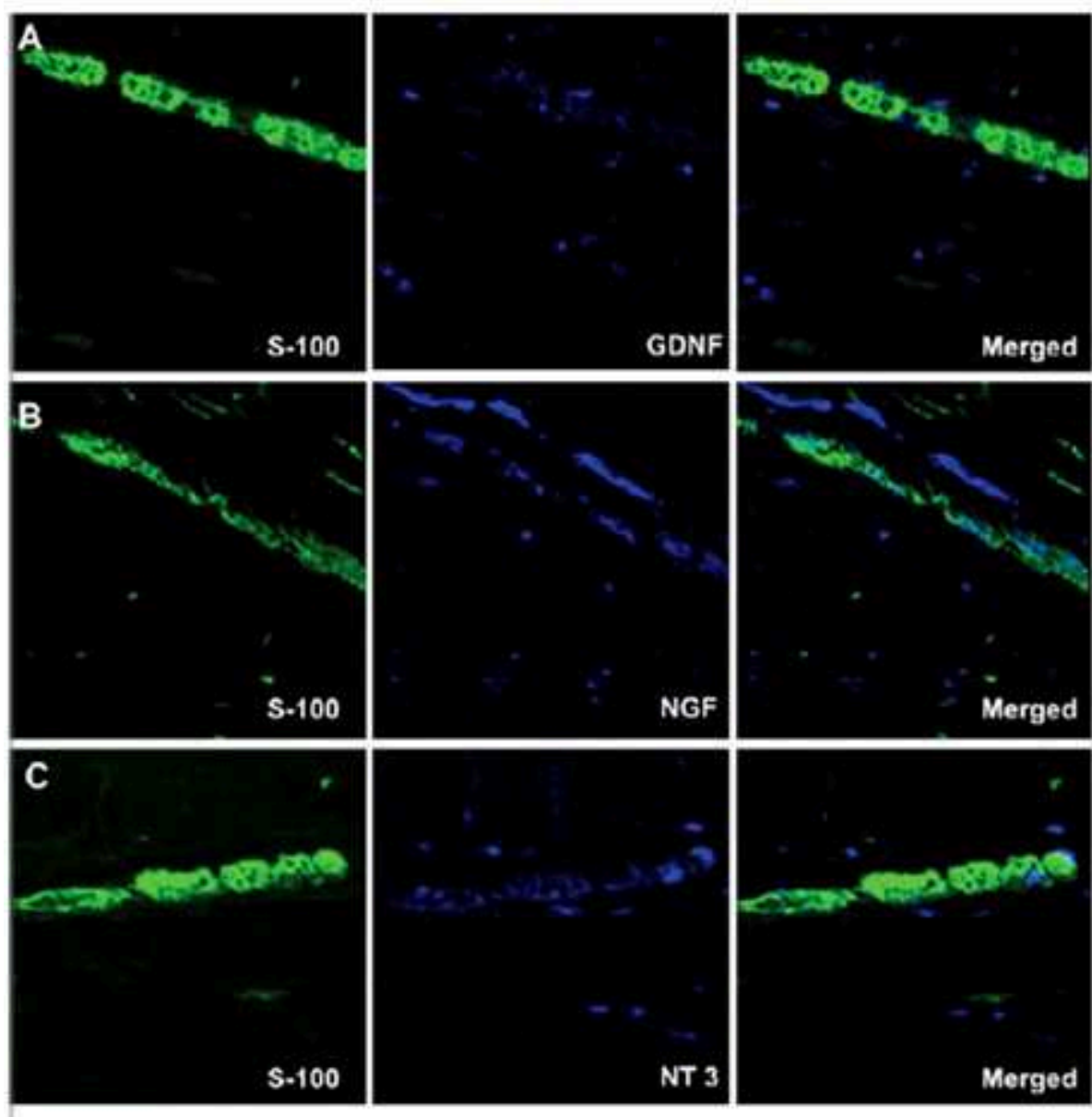


Figura 3- Relação entre a expressão S-100 (marcador enteroglial) e neurotrofinas. O GDNF é altamente expresso dentro das células enterogliais (A), NGF (B) e NT3 (C) são expressas tanto dentro como fora dos componentes gliais. Essas observações podem ser verificadas nas imagens mescladas.

6. DISCUSSÃO

O megacólon chagásico é uma das manifestações mais comuns da forma digestiva da doença de Chagas, ocasionado por um processo de desnervação do SNE. Esse processo é resultante da ação direta do *T. cruzi* no tecido e também por uma resposta inflamatória local, que na tentativa de eliminar o parasito, pode intensificar o dano tecidual. No entanto, o desenvolvimento ou não das formas sintomáticas da doença durante a fase crônica constitui um dos aspectos mais enigmáticos sobre a doença de Chagas, já que alguns indivíduos podem manifestar sintomas até 30 anos após a infecção, enquanto outros nunca manifestam nenhum sintoma da infecção chagásica (TAFURI *et al.*, 1971; PRATA, 1990). Assim, nós acreditamos na existência de uma interconexão entre sistema imune e sistema neuroendócrino, a qual promoveria uma troca de informações bi-direcional entre sistema imune e sistema nervoso entérico.

Sabe-se que os mastócitos desempenham um papel importante na homeostase intestinal. Estudos anteriores demonstraram que essas células também podem estar envolvidas na cura da colite estabelecida e isso está associado à sua proliferação no intestino. No entanto, o excesso de atividade no intestino dessas células pode levar a uma intensificação do processo inflamatório, o que poderia acelerar a velocidade de evolução do megacólon chagásico, como já foi sugerido por vários outros trabalhos. Por outro lado, a presença de serotonina parece estar relacionada ao melhor controle da motilidade intestinal e à inibição da atividade linfocitária no trato gastrointestinal, o que dificulta o desenvolvimento e evolução do megacólon chagásico. Os receptores H1 e H2 da histamina são expressos na superfície do mastócito, mas não há dados disponíveis se os mastócitos também expressam receptores de serotonina em sua superfície (DA SILVA *et al.*, 2014).

No entanto, outros autores sugeriram que a liberação de mediadores de mastócitos (prostaglandina D2, leucotrieno B4, leucotrieno C4, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) pode ser modulada por um mecanismo de receptor de serotonina. Com a realização de um evento mediado pelo receptor de serotonina, pode-se considerar que os efeitos do antagonismo da serotonina na atividade dos mastócitos são principalmente mediados entre o subtipo de receptor 5-HT_{2A} (CONTI E SHAIK-DASTHAGIRISAHEB, 2015; ACOSTA-ANDRADE *et al.*, 2016). É plausível que a redução da atividade de mastócitos após o antagonismo do receptor de serotonina possa simultaneamente atenuar interações induzidas pelos mastócitos. Assim, um papel de antagonismo dos receptores de serotonina nos danos em tecidos entéricos pode ser sugerido (GILFILLAN e BEAVEN, 2011). Nossos dados corroboram essa hipótese.

Demonstramos que os pacientes sem megacólon apresentam uma grande quantidade de serotonina e uma quantidade modesta de mastócitos e, portanto, o trato gastrointestinal desses pacientes não apresentava sintomas clínicos e os mesmos permaneceram assintomáticos por toda a vida. Os pacientes com megacólon exibem uma característica clínica florescente, seguida de constipação, perda de motilidade e dilatação do sigmóide e reto. Histologicamente, esses pacientes apresentam uma diminuição da presença de serotonina e muitos mastócitos. Esses dados sugerem que os mastócitos e a presença de serotonina estão diretamente conectados a mecanismos de proteção intestinal contra o desenvolvimento de megacólon. Assim, uma maior disponibilidade de serotonina poderia levar a um mecanismo protetor contra o aumento do número de mastócitos e, conseqüentemente, um atraso na implementação do processo inflamatório que levaria à forma gastrointestinal da doença de Chagas.

Uma descoberta central no presente estudo foi à caracterização das neurotrofinas em amostras de pacientes chagásicos com megacólon e indivíduos não infectados. Este é o primeiro estudo para avaliar a relação entre destruição neuronal, perda enteroglia e distribuição de neurotrofinas em pacientes chagásicos com megacólon. Nossos dados anteriores indicaram que pacientes chagásicos com megacólon apresentam alto nível de inflamação, e esse processo leva à desnervação e destruição dos componentes da glia no intestino (DA SILVEIRA *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2009). Além disso, demonstramos que o cólon de pacientes chagásicos aumentou os níveis de GAP-43 durante o processo de destruição neuronal (MOREIRA *et al.*, 2013). Acreditamos que o alto nível de GAP-43 indica uma tentativa de recuperar os danos componentes ou mesmo evitar uma maior perda de células nervosas no sistema nervoso entérico no entérico.

Nos últimos anos, um estudo usando cultura de células enterogliais demonstrou que, sob condições inflamatórias, as células da glia aumentam a produção de neurotrofinas (VON BOYEN *et al.*, 2002). Esses dados corroboram nossos resultados porque o mesmo nível aumentado de neurotrofinas foi encontrado em células enterogliais de pacientes chagásicos sem megacólon. Nossos resultados confirmaram que, tanto as células enterogliais, quanto os neurônios são importantes fontes de neurotrofinas. Observou-se que a produção de neurotrofinas está concentrada nos plexos neuronais (submucoso e mientérico) e ambos neurônios e células enterogliais participam desse processo.

É razoável sugerir que a recuperação neuronal seja por fatores neurotróficos, mas foi necessário identificá-los, suas fontes e onde devem agir. Este estudo nos permitiu inferir como o sistema nervoso entérico se comporta sob desenvolvimento de megacólon, e apenas na doença de Chagas nós podemos observar um processo de desnervação no intestino causado

por uma infecção parasitária. Hoje, aproximadamente de 6 milhões de pessoas estão infectadas por *T. cruzi* e elas são capazes de desenvolver o megacólon chagásico a qualquer momento (LEMOS *et al.*, 1998). Além disso, a compreensão da doença de Chagas permitirá a compreensão de outras doenças intestinais e talvez apontar novos alvos mais eficazes para o tratamento.

Nas últimas décadas, foi demonstrado que o sistema imunológico tem um papel importante no desenvolvimento do megacólon chagásico. Foi previamente demonstrado que o processo inflamatório apresentado no megacólon é constituído principalmente por linfócitos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos (D'AVILA REIS *et al.*, 2001; BASSOTTI *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, ADAD, *et al.*, 2007; DA SILVEIRA, LEMOS, *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2008). Foi demonstrado que quanto maior o processo inflamatório, maior a perda neuronal e a gravidade do megacólon. A maioria dessas células imunes são fontes de neurotrofinas e por isso, podemos sugerir que, embora atuem na promoção um processo inflamatório para destruir o parasita no tecido, elas também secretam neurotrofinas como uma tentativa de salvar neurônios (DOWNING e MIYAN, 2000). Podemos observar nas figuras (2,3) algumas marcações de neurotrofinas em torno de gânglios neuronais que não combinam com neurônios ou células enterogliais, as quais são provavelmente células imunes que produzem neurotrofinas. No entanto, apenas pequenas concentrações de neurotrofinas estão fora dos gânglios neuronais, o que sugere que as células imunes sozinhas não são suficientes para produzir uma quantidade satisfatória de neurotrofinas. Concluimos que embora o sistema nervoso entérico atue como a principal fonte de neurotrofinas, ele precisa da cooperação do sistema imunológico para cumprir o papel da reparação da perda neural.

Acreditamos que conhecer o padrão de expressão de neurotrofinas e seus receptores no SNE de pacientes com megacólon chagásico pode identificar os principais componentes que fornecem proteção para neurônios, bem como os componentes que não participam ativamente de sua proteção. Como exemplo, nós sugerimos a ativação dos receptores TrkA e TrkB ativando substâncias ou uso de drogas sinérgicas de neurotrofinas, o que poderia realmente aumentar os níveis de regeneração do SNE. A partir desses dados, estamos certos de que seremos capazes de sugerir novas modalidades de tratamentos que abordam a recuperação do paciente e a prevenção de piora de seus estados.

7. CONCLUSÕES

- Acreditamos que a serotonina pode estar envolvida no controle do processo inflamatório desencadeado por mastócitos, e que sua presença em grandes quantidades no intestino pode representar um mecanismo de prevenção contra o desenvolvimento do megacólon;
- A alta expressão de neurotrofinas em pacientes chagásicos sem megacólon sugere que essas substâncias podem exercer uma função protetora no SNE em um processo inflamatório e prevenir a instalação do megacólon. Assim, acreditamos que a administração de medicamentos qualificados para elevar os níveis de neurotrofinas no intestino pode impedir a instalação do megacólon e manter a função normal do trato gastrointestinal.

8. REFERÊNCIAS

- ACOSTA-ANDRADE, C. et al. A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2411-21, Oct 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00726-016-2230-3>>.
- ALMEIDA, A. P. et al. Gastric acetylcholine and histamine content of normal and Trypanosoma cruzi-infected rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 22, n. 10, p. 1229-36, 1989.
- ARAUJO, F. F. et al. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Front Biosci**, v. 12, p. 2797-806, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.2741/2273>>.
- BASSOTTI, G. et al. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? **Lab Invest**, v. 87, n. 7, p. 628-32, Jul 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/labinvest.3700564>>.
- BESTETTI, R. B.; RESTINI, C. B.; COUTO, L. B. Carlos Chagas Discoveries as a Drop Back to Scientific Construction of Chronic Chagas Heart Disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 1, p. 63-70, Jul 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/abc.20160079>>.
- BREHMER, A. Structure of enteric neurons. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 186, p. 1-91, 2006.
- BREHMER, A. et al. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. **Auton Neurosci**, v. 112, n. 1-2, p. 49-59, May 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.03.005>>.
- BRENER, Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. **Bull World Health Organ**, v. 60, n. 4, p. 463-73, 1982.
- BRUNONI, A. R. et al. Assessment of non-BDNF neurotrophins and GDNF levels after depression treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation in a factorial, randomized, sham-controlled trial (SELECT-TDCS): an exploratory analysis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 56, p. 91-6, Jan 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.08.009>>.
- BUSH, T. G. et al. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 189-201, Apr 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81571-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81571-8)>.
- CONTI, P.; SHAIK-DASTHAGIRISAHEB, Y. B. Mast Cell Serotonin Immunoregulatory Effects Impacting on Neuronal Function: Implications for Neurodegenerative and Psychiatric Disorders. **Neurotox Res**, v. 28, n. 2, p. 147-53, Aug 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12640-015-9533-0>>.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900006>>.
- COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region--Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a

proposal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 825-30, Nov 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0074-02760150153>>.

CUCUNUBÁ, Z. M. et al. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasit Vectors**, v. 9, p. 42, Jan 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1315-x>>.

D'AVILA REIS, D. et al. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 2, p. 177-8, 2001 Mar-Apr 2001.

DA SILVA, E. Z.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **J Histochem Cytochem**, v. 62, n. 10, p. 698-738, Oct 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1369/0022155414545334>>.

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.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Enteroglia cells act as antigen-presenting cells in chagasic megacolon. **Hum Pathol**, v. 42, n. 4, p. 522-32, Apr 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.016>>.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0031182008004770>>.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglia cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. **Hum Pathol**, v. 40, n. 2, p. 244-51, Feb 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.04.025>>.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.01.020>>.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Hum Pathol**, v. 42, n. 2, p. 299-301, Feb 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.10.002>>.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am J Gastroenterol**, v. 93, n. 6, p. 884-9, Jun 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.270_r.x>.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V. [Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44 Suppl 2, p. 68-72, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000800011>>.

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**, v. 47, n. 1, p. 123-5, 2014 Jan-Feb 2014.

DOWNING, J. E.; MIYAN, J. A. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. **Immunol Today**, v. 21, n. 6, p. 281-9, Jun 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01635-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01635-2)>.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1980. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90067-6)>.

FURNESS, J. B.; COSTA, M.; ECKENSTEIN, F. Neurones localized with antibodies against choline acetyltransferase in the enteric nervous system. **Neurosci Lett**, v. 40, n. 2, p. 105-9, Sep 1983. ISSN 0304-3940.

GAZZINELLI, R. T. et al. Idiotypic/anti-idiotypic interactions in schistosomiasis and Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 39, n. 3, p. 288-94, Sep 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.288>>.

GERSHON, M. D. The enteric nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 4, p. 227-72, 1981. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.04.030181.001303>>.

GERSHON, M. D. Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 123, p. 268-80; discussion 280, 2012.

GERSHON, M. D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 20, n. 1, p. 14-21, Feb 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32835bc703>>.

GILFILLAN, A. M.; BEAVEN, M. A. Regulation of mast cell responses in health and disease. **Crit Rev Immunol**, v. 31, n. 6, p. 475-529, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v31.i6.30>>.

GROSS, E. R. et al. Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 2, p. 408-17.e2, Aug 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.007>>.

JACOB, C. et al. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. **J Biol Chem**, v. 280, n. 36, p. 31936-48, Sep 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M506338200>>.

KOBERLE, F. [Pathology and pathological anatomy of Chagas' disease]. **Bol Oficina Sanit Panam**, v. 51, p. 404-28, Nov 1961.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, v. 6, p. 63-116, 1968. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60472-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60472-8)>.

KOBERLE, F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. **Bull World Health Organ**, v. 42, n. 5, p. 739-43, 1970.

LEE, H. et al. Mucosal mast cell count is associated with intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 19, n. 2, p. 244-50, Apr 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.5056/jnm.2013.19.2.244>>.

LEMOS, E. M. et al. Decreased CD4(+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal chagas disease. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 88, n. 2, p. 150-5, Aug 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/clin.1998.4549>>.

LIN, A. et al. Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. **Exp Neurol**, v. 191, n. 2, p. 337-43, Feb 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.003>>.

MOREIRA, M. D. et al. Regenerative process evaluation of neuronal subclasses in chagasic patients with megacolon. **Hum Immunol**, v. 74, n. 2, p. 181-8, Feb 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.012>>.

NEUNLIST, M. et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 84-90, Jan 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/gut.52.1.84>>.

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 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2007.04.005>>.

PINHEIRO, M. C. et al. [A quantitative analysis of the mastocytes and eosinophilic granulocytes in the myocardium of Wistar rats chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. A contribution to the knowledge of myocardial fibrosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 25, n. 1, p. 45-50, 1992 Jan-Mar 1992.

PRATA, A. [Classification of Chagas' infection in humans]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 23, n. 2, p. 109-13, 1990 Apr-Jun 1990.

PRATA, A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 81-8, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700008>>.

RAO, M.; GERSHON, M. D. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 9, p. 517-28, 09 2016.

SHARKEY, K. A. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. **J Clin Invest**, v. 125, n. 3, p. 918-25, Mar 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI76303>>.

TAFURI, W. L. [Pathogenesis of Chagas' disease]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 29, n. 4, p. 194-9, 1987 Jul-Aug 1987.

TAFURI, W. L. Immunopathology of Chagas disease - a historical overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 247-8, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700040>>.

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, 1971 Mar-Apr 1971.

TANOWITZ, H. B. et al. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, n. 4, p. 400-19, Oct 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.400>>.

VAGO, A. R. et al. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaesophagus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 97, n. 3, p. 308-9, 2003 May-Jun 2003.

VON BOYEN, G. B. et al. Gut inflammation modulated by the enteric nervous system and neurotrophic factors. **Scand J Gastroenterol**, v. 37, n. 6, p. 621-5, Jun 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00365520212498>>.

VON BOYEN, G. B. et al. Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 5, p. 346-54, May 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000219350.72483.44>>.

WANG, G. D. et al. Mast cell expression of the serotonin1A receptor in guinea pig and human intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 304, n. 10, p. G855-63, May 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00421.2012>>.

WEINKAUF, C.; PEREIRAPERRIN, M. Trypanosoma cruzi promotes neuronal and glial cell survival through the neurotrophic receptor TrkC. **Infect Immun**, v. 77, n. 4, p. 1368-75, Apr 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.01450-08>>.

YAMAMOTO, K. et al. Electrical stimulation with periodic alternating intervals stimulates neuronal cells to produce neurotrophins and cytokines through activation of mitogen-activated protein kinase pathways. **Eur J Oral Sci**, v. 123, n. 6, p. 403-8, Dec 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/eos.12224>>.