

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT_{3A} NO SISTEMA IMUNE DE
PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES E NÃO
PORTADORES DO MEGACÓLON CHAGÁSICO**

JEFFERSON ALVIM DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT_{3A} NO SISTEMA IMUME DE
PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES E NÃO
PORTADORES DO MEGACÓLON CHAGÁSICO**

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

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

JEFFERSON ALVIM DE OLIVEIRA

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

- O48a Oliveira, Jefferson Alvim de, 1973
2018 Avaliação do receptor 5-HT3A no sistema inume de pacientes chagásicos portadores e não portadores do megacôlon chagásico [recurso eletrônico] / Jefferson Alvim de Oliveira. - 2018.
- Orientador: Alexandre Barcelos Moraes da Silveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.867>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
1. Ciências médicas. 2. Chagas, Doença de. 3. Sistema nervoso entérico. 4. Linfócitos. I. Silveira, Alexandre Barcelos Moraes da, 1978, (Orient.) 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



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 044/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Relação entre Sistema Nervoso Entérico e sistema imune em patologias do trato digestivo. Discente: **Jefferson Alvim de Oliveira - Matrícula nº 11712CSD016** - Título do Trabalho: **"O papel do receptor de serotonina 5-HT3A na forma digestiva da doença de chagas."** Às 14:00 horas do dia 17 de dezembro do ano de 2018, no anfiteatro do bloco 8B - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas (UFU), Renata Cristina de Paula (UFMG) e Alexandre Barcelos Morais da Silveira (UFU) – orientador do discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira (UFU) apresentou a Comissão Examinadora e o discente, agradeceu a presença do público e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato aprovado reprovado. Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16:30 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira (Orientador) (UFU)

Profa. Dra. Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas (UFU)

Profa. Dra. Renata Cristina de Paula (UFMG)

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e continua sendo uma das doenças mais negligenciadas na América Latina. Entre suas principais formas clínicas, encontra-se o megacôlon chagásico. Apesar de ser conhecido há mais de meio século, suas causas ainda são obscuras. Evidências recentes indicam uma estreita relação entre o sistema imune e o sistema nervoso entérico no desenvolvimento dessa etiologia chagásica. Acredita-se que a baixa expressão do receptor de serotonina 5-HT_{3A} nos linfócitos possa estar ligada ao desenvolvimento do megacôlon. Para isso caracterizou-se a distribuição dos linfócitos CD4, CD8 e CD20 e sua expressão no receptor 5-HT_{3A}. Os resultados demonstraram que pacientes chagásicos sem megacôlon apresentam maior expressão do receptor 5-HT_{3A} em todos os linfócitos analisados em comparação com pacientes chagásicos com megacôlon. Acredita-se que a alta expressão desse receptor possa levar à imunomodulação e prevenir a instalação de megacôlon chagásico.

Palavras-chave: doença de Chagas; megacôlon; sistema nervoso entérico; 5-HT3A; linfócitos

ABSTRACT

Chagas' disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and remains one of the most neglected diseases in Latin America. Among its main clinical forms, the chagasic megacolon is found. Despite being known for more than half a century, his causes still obscure. Recent evidence indicates a close relationship between the immune system and the enteric nervous system in the development of this chagasic etiology. We believe that the low expression of 5-HT_{3A} serotonin receptor on lymphocytes could be linked to the megacolon's development. For this we characterize the distribution of CD4, CD8 and CD20 lymphocytes and their 5-HT_{3A} receptor expression. Our results demonstrated that chagasic patients without megacolon present higher expression of the 5-HT_{3A} receptor in all analyzed lymphocytes compared with chagasic patients with megacolon. We believe that the high expression of this receptor may lead to immunomodulation and prevent chagasic megacolon's installation.

Keywords: Chagas' disease; megacolon; enteric nervous system; 5-HT3A; lymphocytes

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
DOENÇA DE CHAGAS	7
SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO.....	10
SEROTONINA.....	12
FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	14
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVOS	24
REFERÊNCIAS.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina (Serotonina)

ACh - Acetilcolina

ATP - Adenosina tri-fosfato

cChaT - Colina acetil transferase

CD - *Cluster of differentiation*

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

IC - Imunocomplexos

IPANs - neurônios intrínsecos primários aferentes

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

NK - *Natural killer*

NO - *Nitric oxide* (Óxido nítrico)

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

NPY - Neuropeptídeo Y

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PGP 9.5 - Proteína gene produzida 9.5

SNA - Sistema nervoso autônomo

SNE - Sistema nervoso entérico

SP - Substância P

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

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VIP - Polipeptídeo intestinal vasoativo

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 quando ele estava realizando estudos a respeito da malária, na cidade de Lassance, interior de Minas Gerais (LEWINSOHN, 1979). Em seus estudos, foi identificado um parasita flagelado, hoje conhecido como *Trypanosoma cruzi* intestino de um triatomíneo. A partir daí, Chagas iniciou análises laboratoriais nesse parasito e descobriu que ele era nocivo para animais de laboratório. Após essa descoberta, rapidamente foi observada a presença desse parasito em animais domésticos e no próprio homem. Desta forma, Carlos Chagas descreveu aspectos relacionados à forma de transmissão, patologia, o agente causador, o vetor e as fases presentes na doença (TANOWITZ *et al.*, 1992).

As formas de transmissão da doença de Chagas podem ser caracterizadas em mecanismos primários, tais como a via vetorial, a via placentária, a via transfusional e a via oral, sendo esta última a forma mais comum atualmente no Brasil. A transmissão oral ocorre através da contaminação de alimentos, os quais ao serem ingeridos, podem ocasionar a forma aguda da doença de Chagas. Em 2005 ocorreu um surto no estado de Santa Catarina, através da ingestão de sucos contaminados, onde diversas pessoas adquiriram a fase aguda da doença sendo que três casos foram fatais (ANDRADE *et al.*, 2011). Estes fatos que vem ocorrendo em algumas regiões do Brasil são responsáveis pela presença de novos casos de doença de Chagas em áreas onde casos agudos não tinham sido detectados a mais de 15 anos (DUTRA *et al.*, 2009). Os mecanismos de transmissão podem ser também caracterizados como secundários no caso de transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais, infecção induzida, entre outros, sendo esses casos raros de acontecer (COURA, 2007).

Quando a infecção ocorre a partir da picada do inseto transmissor, a mesma ocorre por meio de fezes contaminadas eliminadas pelo inseto. Após a sucção do sangue, o que ocorre na maioria

das vezes durante a noite, o inseto elimina fezes e urina contaminadas com a forma tripomastigota que penetram durante ou logo após o repasto sanguíneo pelo local da picada (DIAS; LARANJA, 1948). O *T. cruzi*, na sua forma tripomastigota consegue penetrar ativamente 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 diversos órgãos. Dentro das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, reproduzem-se e dão origem a novas formas tripomastigotas. Estas retornam à circulação sistêmica, reiniciando o ciclo (DIAS, 1959).

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

No momento em que acontece a fase aguda, na realidade, há a presença de uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*. As formas tripomastigotas do parasita são encontradas circulando pelo sangue do hospedeiro. Já a outra forma denominada amastigota pode ser observada difusamente em diversas células do organismo. As células onde estas formas estão em maior concentração incluem os macrófagos, células da glia, células endoteliais, fibras musculares lisa, esquelética e cardíaca, fibroblastos, células de Schwann e neurônios (TANOWITZ *et al.*, 1992).

Após o período de fase aguda que vai de dois a quatro meses é observado logo em seguida um período marcado por uma longa fase crônica que é inicialmente assintomática, e foi denominada por Carlos Chagas como a forma crônica indeterminada. A transição entre a fase crônica e a fase

aguda é acompanhada por uma diminuição da parasitemia devido à presença de uma resposta imune relativamente eficaz, que mantêm a frequência parasitária abaixo dos níveis detectáveis durante toda a fase crônica. As formas crônicas mais freqüentes da doença de Chagas, são as cardiopatias, que atingem 95% da população humana com a doença, e dois tipos de enteromegalias o megacôlon ou megaesôfago (ANDRADE; ANDRADE, 1968).

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

Quando o paciente desenvolve uma das formas, no caso, o megacôlon chagásico, ocorre distúrbios de motilidade que estão associadas com o aumento do cólon e obstrução. Nesse caso, o reto e o cólon são os segmentos mais comprometidos, que exibem alargamento luminal marcante e hipertrofia muscular. Essa forma da doença de Chagas pode manifestar-se como uma doença isolada, mas frequentemente é encontrado associado ao megaesôfago ou à cardiopatia chagásica. A expressão clínica básica é megacôlon e constipação progressiva e dificuldade na evacuação. Nestes períodos clínicos ocorre inchaço e, secundariamente, a presença de abdômen proeminente sendo que a disfunção motora ocorre nos segmentos de desnervação do cólon (KÖBERLE, 1968).

Com o desenvolvimento da doença, a dilatação ocasionada no cólon se torna irreversível, e isso representa a principal característica macroscópica do megacôlon chagásico, sendo que a sua causa primordial é a perda de neurônios excitatórios. Essa perda leva a formação de um infiltrado constituído, sobretudo por linfócitos, que podem ser os principais responsáveis pela lesão do sistema nervoso entérico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b). Nessa região pode-se observar também a presença de intensos fenômenos regressivos de neurônios, chegando à destruição completa dos

gânglios nervosos do plexo mientérico, ulcerações e inflamação crônica da mucosa (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; DA SILVEIRA *et al.*, 2007d).

Recentes estudos indicam que o trato gastrintestinal contém uma população residente de células inflamatórias que contribuem para um estado fisiológico de inflamação basal. Dentro as células apresentadoras de antígeno no intestino pode-se observar a presença de células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, que no momento de um processo inflamatório apresentam-se em quantidade exacerbada. Dentre as células inflamatórias, observam-se também os eosinófilos e os mastócitos que são importantes, pois tem a capacidade de produzir substâncias envolvendo a defesa do hospedeiro e a função intestinal normal, incluindo entre elas as citocinas e neurotrofinas (DA SILVEIRA *et al.*, 2009b; DA SILVEIRA *et al.*, 2008b; DA SILVEIRA *et al.*, 2009c).

Desta forma, a patologia ocasionada pela forma digestiva da doença de Chagas está relacionada também com adenervação complexa rede de neurônios intramuraishoje conhecidos como sistema nervoso entérico. Através da realização de análises histológicas realizadas em órgãos afetados demonstraram-se lesões inflamatórias nesse sistema, podendo assim afetar toda rede responsável pelo sistema digestivo do hospedeiro, associado com uma grande redução no número de neurônios (JABARI *et al.*, 2011; KRAMER *et al.*, 2011).

1.2. SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

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

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

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

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

Na constituição do SNE é observado também a presença dos neurônios entéricos que se encontram organizados em gânglios ou isolados entre os feixes de fibras nervosas interconectantes. Eles podem ser classificados funcionalmente como neurônios motores, interneurônios e neurônios intrínsecos primários aferentes (IPANs) (FURNESS, 2006a). Esses podem ser identificados de

acordo com a sua função, localização, forma, projeções, propriedades quantitativas e conexões (FURNESS, 2006b).

O SNE contém mais de 30 neurotransmissores potenciais que podem afetar a atividade desses neurônios entéricos, músculos e células epiteliais. Esses neuromediadores possuem atividade considerável sobre o sistema imune. Um exemplo desses mediadores é a substância P, que estimula a produção de IL-2, a proliferação linfocitária, e também o tráfego de linfócitos. Além disso, a substância P age como um dos ativadores de células *Natural Killer* e mastócitos e possui ação quimiotática para monócitos e neutrófilos. Outro neuromediador com atividade importante é o neuropeptídeo VIP, o qual tem a capacidade de inibir a resposta de células *Natural Killer* e de linfócitos T, bem como a produção de IL-2 e IL-4 por estas células. O sistema imune, por sua vez, também influencia atividades do SNE através da secreção de vários tipos de substâncias, como por exemplo, a serotonina (FURNESS, 1998).

1.3. SEROTONINA

A serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT) compõe o grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores) que incluem também as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), sendo caracterizada como uma molécula sinalizadora gastrointestinal. Diferentes receptores são capazes de detectarem estenotransmissor, envolvido em várias patologias. Cerca de 90% da serotonina presente no corpo humano é produzida no intestino. Ela é sintetizada pelas células neuroendócrinas e por neurônios serotoninérgicos. Essa síntese é dependente da disponibilidade do triptofano livre no plasma que é aminoácido precursor dessa substância, sendo os responsáveis o Tph1 e o Tph2. No trato gastrointestinal a serotonina vem desempenhando um papel de neurotransmissor entérico, realizando a iniciação e propagação dos reflexos entéricos e a sinalização do intestino para o cérebro (GERSHON, 1981; GERSHON, 1982).

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

Sabe-se que a serotonina apresenta essa gama de efeitos devido à presença de múltiplos subtipos de receptores presentes em neurônios, musculatura lisa e, possivelmente, de células neuroendócrinas. Ela apresenta sete tipos ou famílias e múltiplos subtipos de receptores que já foram identificados, que são denominados como 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇. Os receptores 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ são distribuídos predominantemente no encéfalo. Os receptores de serotonina conhecidos por afetarem a função motora do intestino são os que pertencem aos subtipos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇ (SIKANDER *et al.*, 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que a serotonina está intimamente envolvida no controle do trânsito intestinal. O antagonista 5HT₃, *Alosetron*, ainda não disponível no Brasil, por agir se ligando aos receptores 5HT₃ e impedindo a ligação da serotonina, melhorou o quadro de pacientes com diarréia grave decorrente da Síndrome do Intestino Irritável (*Irritable Bowel Syndrome*) ao gerar um quadro de constipação intestinal. Os pacientes tratados com esse fármaco apresentaram melhora significativa como alívio da dor abdominal, diminuição de desconforto intestinal e relativa ausência de urgência fecal (GRUNDY, 2008).

Receptores 5HT₄ são mediadores de diversas respostas do trato gastrintestinal. Quando ativados, possuem a propriedade de aumentar a liberação de neurotransmissores, agindo indiretamente na sensibilidade visceral ao serem capazes de relaxar células musculares lisas, e de atuarem no processo de absorção de nutrientes localizados no lume intestinal. Esses receptores estão presentes em todos os segmentos do trato gastrointestinal humano, localizados nas camadas musculares, plexos mientéricos, estômago, cólon e reto humano (KADOWAKI *et al.*, 2002).

Dados experimentais sugerem a possibilidade de algumas variações genéticas serem responsáveis por alterações da proteína transportadora de serotonina, o que levaria a modificações funcionais do cólon. O reconhecimento da importância da serotonina na transmissão de estímulos sensoriais dolorosos para o SNC e de como ele pode participar da motilidade digestiva e das secreções intestinais estimularam a indústria farmacêutica a pesquisar intensivamente drogas que atuam através deste mecanismo. Os efeitos dos antagonistas dos receptores 5HT₃ incluem o retardamento da velocidade do trânsito, redução da secreção intestinal, aumento da complacência do cólon e influencia diretamente a intensidade de processos inflamatórios no trato gastrintestinal através de sua ação em células do sistema imune (GERSHON, 2000).

Outros compostos, para os quais a eficácia não foi rigorosamente definida, mas que podem apresentar grande valor são os fármacos antidepressivos. Estes medicamentos apresentam a capacidade de aumentar os níveis de serotonina no intestino, impedindo a sua recaptação após serem liberados, levando desta forma uma redução no processo inflamatório ocasionado pela constipação intestinal (GERSHON, 2009).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

Existe um amplo espectro de doenças inflamatórias intestinais abrangendo diversos tipos e graus de inflamação intestinal, que afetam diretamente o funcionamento do sistema nervoso entérico humano. A maior parte destas patologias envolvem processos de inflamação intestinal decorrente de infecções, fármacos (em particular os anti-inflamatórios não hormonais, isquemia e radiação). No entanto as etiologias destas condições ainda continuam obscuras. Provavelmente, patologias que afligem o sistema nervoso entérico e consequentemente o trato gastrintestinal apresentam múltiplas causas, envolvendo uma interação entre suscetibilidade geneticamente mediada, fatores ambientais e função imunológica alterada. Estes distúrbios provavelmente constituem uma série de síndromes apresentando aspectos sobrepostos. Existem numerosos

modelos de experimentação animal para as doenças inflamatórias intestinais, mas nenhum reflete verdadeiramente as doenças humanas. Uma vez iniciado processo de alteração do sistema nervoso entérico, a diferença entre os pacientes com doenças inflamatórias intestinais e os indivíduos não afetados reside no comprometimento da capacidade de inibir a inflamação mucosa e de recuperação funcional do sistema nervoso entérico (FURNESS, 1998; FURNESS, 2000).

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 se encontram em gânglios nervosos pré-vertebrais e paravertebrais, enquanto seus axônios se conectam 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, 2000).

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 os 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 neurotransmisor, sendo esta responsável por estimular a peristalse e aumentar o aporte sanguíneo intestinal (POWLEY, 2000). Uma considerável quantidade de tecido nervoso, que consiste o SNE, está inserida na parede do trato gastrintestinal. O SNE apresenta neurônios e células de suporte (células enterogliais) são 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 se conectam 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 estômago, mas suas descrições não sugerem que este autor reconheceu os mesmos como constituintes de plexos nervosos. Após a sua descoberta, os plexos e gânglios entéricos atraíram considerável atenção da comunidade científica, e numerosos trabalhos sobre sua organização foram realizados. Estes estudos forneceram informações detalhadas sobre os tamanhos, estruturas e conexões entre os gânglios entéricos. Destaca-se as brilhantes descrições de Meissner e Auerbach que, utilizando técnicas hoje consideradas rudimentares, elucidaram a organização geral dos plexos entéricos. É surpreendente que, após mais de cem anos da realização destes trabalhos, os mesmos continuem servindo como base para estudos sobre o trato gastrintestinal.

A maior parte dos neurônios entéricos são encontrados em dois plexos; o plexo mientérico (plexo de Auerbach) e no plexo submucoso (plexo de Meissner). O plexo mientérico constitui uma rede de pequenos gânglios neuronais interconectados por feixes nervosos situados entre as camadas musculares (interna e externa) do trato gastrintestinal. Este plexo forma uma rede contínua em torno da circunferência e por toda extensão do sistema digestivo (Figura 1). Os gânglios encontrados neste plexo variam no tamanho e forma. Essas diferenças estão relacionadas à porção do intestino analisada e à espécie de animal em questão (GABELLA, 1981; IRWIN, 1931). Corpos neuronais isolados são ocasionalmente encontrados fora do plexo mientérico, 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 mientérico. Estes feixes estão dispostos paralelamente às fibras musculares (RICHARDSON, 1958).

O plexo submucoso, descrito por Meissner (MEISSNER, 1857) e Billroth (BILLROTH, 1858), é formado de gânglios interconectados por feixes nervosos, assim como o plexo mientérico. Embora a presença de gânglios nervosos neste plexo seja mais evidente no intestino delgado e no cólon, os mesmos podem ser observados no esôfago e estômago. Os feixes nervosos que interconectam os gânglios do plexo submucoso são delgados em relação aos encontrados no plexo mientérico (GONIAEW, 1875; HENLE, 1871; TIMMERMANS *et al.*, 2001). Da mesma forma que o plexo mientérico, o plexo submucoso forma uma rede contínua em torno da circunferência e por todo trato gastrintestinal (Ilustração 1). Em grandes mamíferos, como suínos e o ser humano, o plexo submucoso é formado de 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 natureza química encontrados nestes gânglios diferem entre as mais variadas 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 do plexo 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 provêm inervação à camada muscular interna, e algumas vezes, para a muscular externa (FURNESS *et al.*, 1990b; 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 inervação extrínseca (nervo vago e mesentérico) e o plexo mientérico e também observou conexões entre os plexos mientérico e submucoso. Drasch (DRASCH, 1881) confirmou a conexão entre os plexos mientérico e submucoso, reconhecendo que as fibras do plexo submucoso realizavam a inervação da mucosa.

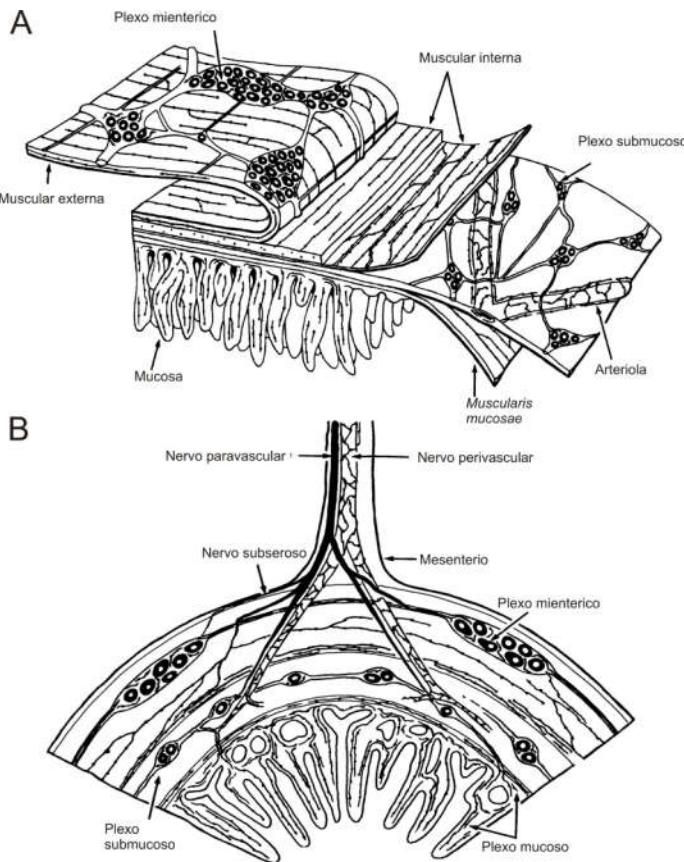


Ilustração 1: Esquema do SNE observado em camadas (A) e em secção transversal (B). Existem dois plexos nervosos formados por gânglios; o plexo mientérico e o plexo submucoso, além das fibras nervosas que inervam as camadas musculares, a mucosa e as arteríolas intramurais. A ineração extrínseca tem acesso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

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 a ubiquitina e inativam 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 a 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 1-2% 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 mientérico, do plexo submucoso, da camada muscular própria e lâmina própria (KRAMMER; KUHNEL, 1993). Desta forma, esse marcador é utilizado para avaliação destes componentes do SNE em patologias que afigem 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).

Os neuropeptídeos encontrados no SNE possuem atividade considerável sobre o sistema imune. A substância P é considerada uma proteína que além de neuromediador, possui ação pró-inflamatória nas células do sistema imunológico. Ela estimula a proliferação linfocitária, o tráfego de linfócitos através dos linfonodos e a produção de IL-2. Além disto, a substância P age como um dos ativadores de células *Natural Killer* (NK) e possui ação quimiotática para mastócitos, macrófagos e neutrófilos. Já o neuropeptídeo VIP inibe a resposta de células NK e de linfócitos T, bem como a produção de IL-2 e IL-4 por estas células. Por outro lado VIP estimula a quimiotaxia de macrófagos e a produção de IL-5 por linfócitos (MCKAY; FAIRWEATHER, 1997).

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 os 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 e outros(1998) depletaram camundongosadultos de células GFAP-imunoreativas (IR) para avaliar a importância das mesmasnafisiologia intestinal. Foi observado que em apenas duas semanas todos os animais morreram devido a um quadro de jejunioileite fulminante. Este quadro foi independente de processos infecciosos, sendo o mesmo caracterizado por degeneração de neurônios mientéricos 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 e outros (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 mientérico, como do plexo submucoso é também uma das características histopatológicas da enterocolite necrosante (CORN^Et *et al.*, 2001).

Recentemente foi demonstrado que pacientes portadores de megacôlon chagásico apresentam uma diminuição na expressão de células enterogliais que expressam GFAP em relação a pacientes chagásicos que não desenvolveram a forma digestiva da doença. Especula-se que esse tipo celular pode representar um fator de proteção aos neurônios do sistema nervoso entérico, seja pela modulação do processo inflamatório ou por impedir a invasão do parasita nos corpos neuronais (DA SILVEIRA *et al.*, 2011; DA SILVEIRA *et al.*, 2009c; DA SILVEIRA *et al.*, 2007d; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Os neurônios entéricos são classificados de acordo com várias propriedades, como forma, características fisiológicas, especificidade imunohistoquímica, estruturas por eles inervadas, neurotransmissores utilizados e conexões estabelecidas. Com a evolução das técnicas imunohistoquímicas, a complexidade do SNE começou a ser revelada. O desenvolvimento da técnica de fluorescência por Falck (FALCK, 1962) permitiu que autores como Norberg (NORBERG, 1964) identificassem com exatidão os axônios terminais de neurônios simpáticos pós-ganglionares. Os neurônios colinérgicos entéricos foram identificados pela técnica de imunohistoquímica somente no início da década de 80 (FURNESS *et al.*, 1983). Desde as primeiras descrições de Hokflef e sua equipe (HÖKFELT *et al.*, 1975) sobre a presença de somatostatina (SOM) em neurônios entéricos, a localização de outros neuropeptídeos tornou-se alvo de inúmeros estudos (COSTA; FURNESS, 1982; FURNESS *et al.*, 1980; SCHULTZBERG *et al.*, 1980; SUNDLER *et al.*, 1980). A partir destes estudos foi revelada a presença de colecistoquinina (CCK), peptídeo relacionado a gastrina (GRP), neuropeptídeo Y (NPY), substância P (SP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e serotonina (5-HT) em neurônios entéricos.

O desenvolvimento destes estudos levou à descoberta da co-existência de neuropeptídeos nos mesmos grupos neuronais tanto no SNC quanto no SNE (HÖKFELT *et al.*, 1984; HÖKFELT *et al.*, 1980), abrindo uma nova era de estudos da codificação neuroquímica de neurônios. Em 1980 (SCHULTZBERG *et al.*, 1980) foi descoberta a coexistência de SOM e CCK nos mesmos grupos neuronais, conduzindo a investigações que identificassem a co-existência de outros neuropeptídeos. A variedade de neuropeptídeos nos neurônios entéricos simplesmente reflete a complexidade funcional inerente ao funcionamento do trato gastrintestinal. Julgamos que a revelação do circuito neural e identificação neuroquímica dos neurônios entéricos é um ponto essencial para a compreensão do SNE.

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 aos fatos destes 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 estado físico do tecido que eles inervam, e convertem essa informação para um circuito neuronal integrado, através do qual o estado funcional dos órgãos possa ser modificado. Nos plexos mientérico 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 inflamatórias alteraria as propriedades dos mesmos, promovendo anormalidades quanto a sinalização sensorial e controle dos reflexos entéricos (SHARKEY; MAWE, 2002). A hipótese 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).

Apesar do grande número de estudos, ainda pouco se sabe sobre os processos de instalação e etiopatogênese de grande parte das doenças do trato gastrintestinal devido à grande complexidade deste sistema.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre o SNE de pacientes chagásicos nos últimos anos levaram a sugerir que a dilatação crônica do cólon se dê não só pela destruição de determinados grupos neurais, mas também pela interação do sistema imunológico com todo o trato digestório. Os dados observados apontam que as lesões no SNE decorrentes da infecção chagásica levam o indivíduo a apresentar distúrbios de peristaltismo, falta de coordenação motora, retenção de fezes no reto e cólon sigmoide, hipertrofia muscular e a dilatação, levando ao aparecimento do megacôlon chagásico. Trabalhos anteriores realizados por este grupo demonstraram uma relação direta entre a destruição neuronal observada no mega chagásico com a intensidade do processo inflamatório e a evolução da patologia (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; DA SILVEIRA *et al.*, 2009a; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; DA SILVEIRA *et al.*, 2009b; DA SILVEIRA *et al.*, 2008a)

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

Dados recentes apontam que o receptor 5-HT_{3A} desempenha um importante papel junto ao sistema imune na doença de chagas, podendo funcionar como uma chave para a imuno-modulação encontrada em pacientes não portadores de megacôlon. Assim, para investigar a expressão deste receptor junto ao sistema imune obteve-se um conjunto de amostras de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados. Acredita-se que a análise comparativa da expressão deste receptor e as principais células do sistema imune poderão sugerir como se dão mecanismos referentes à manutenção da fisiologia do trato gastrintestinal diante do processo inflamatório crônico decorrente de uma infecção parasitária generalizada.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Caracterizar a expressão do receptor de serotonina 5-HT_{3A} nos linfócitos do sistema imune e estabelecer relação com a intensidade do processo inflamatório e com o desenvolvimento do megacôlon chagásico

4.2. Objetivos Específicos

1 – Caracterizar o processo de denervação através da expressão de periferina, um marcador panostral no sistema nervoso entérico do cólon de pacientes chagásicos portadores de megacôlon e de indivíduos não infectados;

2– Analisar no sistema nervoso entérico do cólon de pacientes chagásicos e de indivíduos não infectados a expressão do receptor de serotonina 5-HT_{3A};

3 - Caracterizar a expressão e distribuição de linfócitos T CD₄, T CD₈ e B CD₂₀ no cólon de pacientes chagásicos e de indivíduos não infectados;

4 - Estabelecer associações entre a expressão do receptor de serotonina, das classes de linfócitos estudadas e do desenvolvimento do megacôlon chagásico nos grupos de pacientes estudados;

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. P.; MARIN-NETO, J. A.; PAOLA, A. A.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G. M.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A.; ALMEIDA, D. R.; FRAGATA FILHO, A. A.; MOREIRA MDA, C.; XAVIER, S. S.; OLIVEIRA JUNIOR, W. A.; DIAS, J. C.. I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 97, p. 1-48, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2011000600002>
- ANDRADE, S. G. AND ANDRADE, Z. A.. Pathology of prolonged experimental Chagas' disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 10, p. 180-187, 1968.
- ANDRADE, Z. A.. Pathogenesis of Chagas' disease. New aspects. **Arq Bras Cardiol**, v. 38, p. 255-260, 1982.
- 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**, v. 164, p. 1361-1368, 2004.
- AUERBACH, L.. Ueber einen Plexus gangiosus myogastricus. *Jahres-Bericht. Abh. Schlesischen Gesells. Vaterland. Cult.*, v. 39er, p. 103-104, 1862a.
- AUERBACH, L.. Ueber einen **Plexus myentericus**, einen bisher unbekannten **ganglio-nervosen Apparat im Darmkanal der Wirbelthiere**, Verlag von E. Morgenstern, Breslau, 1862b.
- AUERBACH, L.. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darms. **Arch. Pathol. Anat. Physiol.**, v. 30, p. 457-460, 1864.
- BILLROTH, T.. Einige Beobachtungen über das ausgedehnte Vorkommen von Nervenanastomosen im Tractus Intestinalis. **Arch. Anat. Physiol. Leipzig**, p. 148-158, 1858.
- BREHMER, A.. Structure of enteric neurons. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 186, p. 1-91, 2006. DOI: 10.1007/3-540-32874-2_1
- BREHMER, A.; CRONER, R.; DIMMLER, A.; PAPADOPOULOS, T.; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W.. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. **Auton Neurosci**, v. 112, p. 49-59, 2004. DOI: 10.1016/j.autneu.2004.03.005
- BREHMER, A.; STACH, W.; KRAMMER, H. J.; NEUHUBER, W.. Distribution, morphology and projections of nitrergic and non-nitrergic submucosal neurons in the pig small intestine. **Histochem Cell Biol**, v. 109, p. 87-94, 1998.
- 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**, v. 93, p. 189-201, 1998.
- 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**, v. 98, p. 13306-13311, 2001. DOI: 10.1073/pnas.231474098

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W.. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, Suppl 4, iv, p. 15-19; discussion iv26, 2000. Doi: 10.1136/gut.47.suppl_4.iv15

COSTA, M.; BUFFA, R.; FURNESS, J. B.; SOLCIA, E.. Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparations. **Histochemistry**, v. 65, p. 157-165, 1980.

COSTA, M.; FURNESS, J. B.. Neuronal peptides in the intestine. **Br. Med. Bull.**, v. 38, p. 247-252, 1982.

COURA, J. R.. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102 Suppl 1, 113-122, 2007.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000900018>

CROWELL, M. D.. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. **Br J Pharmacol**, v. 141, p. 1285-1293, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705762

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**, v. 134, p. 789-796, 2007a. doi: 10.1017/S0031182007002296.

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. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, p. 2877-2883, 2007b. doi: 10.1007/s10620-006-9680-5.

da Silveira, A. B.; Lemos, E. M.; Adad, S. J.; Correa-Oliveira, R.; Furness, J. B. and D'Avila Reis, D. (2007d). Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Human pathology*, 38, 1256-1264. doi: 10.1016/j.humpath.2007.01.020.

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**, v. 135, p. 1337-1342, 2008a. doi: 10.1017/S0031182008004770.

DA SILVEIRA, A. B.; FREITAS, M. A.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; FURNESS, J. B.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, D.. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, p. 1154-1156, 2008b. Doi: 10.1016/j.trstmh.2008.04.043

DA SILVEIRA, A. B.; CHAVES, A. T.; DE ARAUJO, F. F.; SILVA GOMES, J. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TOSHIO FUJIWARA, R.; RIBEIRO FREITAS, M. A.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; D'AVILA REIS, D.. Expression of caspase-3 in enteric cells is related to development of chagasic megacolon. **Human pathology**, v. 40, p. 605-606, 2009a. doi: 10.1016/j.humpath.2008.12.018.

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. **Human immunology**, v. 70, p. 65-67, 2009b. doi: 10.1016/j.humimm.2008.10.015.

DA SILVEIRA, A. B.; FREITAS, M. A.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; FURNESS, J. B.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, D.. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. **Hum Pathol**, v. 40, p. 244-251, 2009c. doi: 10.1016/j.humpath.2008.04.025.

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**, v. 42, p. 522-532, 2011. doi: 10.1016/j.humpath.2010.06.016.

DIAS, E.. Chagas' disease: an American problem. **Hospital (Rio J)**, v. 55, p. 57-65, 1959.

DIAS, E.; LARANJA, F. S.. Chagas' disease and its control. **Abstr Int Congr Trop Med Malar**, v. 56, p. 91, 1948.

DIAS, J. C.. Chagas' disease. Epidemiology and prevention. **Arq Bras Cardiol**, v. 63, p. 451-455, 1994.

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, p. 130-158, 1899.

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

DUTRA, W. O.; 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 208-218, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900027>

FALCK, B.. Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. **Acta Physiol. Scand.**, v. 197, Suppl. 1-26, 1962.

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**, v. 297, p. 409-410, 1982.

FURNESS, J. B.. Gastroenterology. **I Drugs**, v. 1, p. 623-624, 1998.

FURNESS, J. B.. Types of neurons in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, v. 81, p. 87-96, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00127-2)

FURNESS, J. B.. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. **Auton Neurosci**, v. 125, p. 81-85, 2006a. DOI: 10.1016/j.autneu.2006.01.007

FURNESS, J. B.. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. **Auton Neurosci**, v. 130, p. 1-5, 2006b. DOI: 10.1016/j.autneu.2006.05.003

FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; SMITH, T. K.. The normal structure of gastrointestinal innervation. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 5, Suppl 1, p. 1-9, 1990a.

FURNESS, J. B.; COSTA, M.. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, p. 1-20, 1980.

FURNESS, J. B.; COSTA, M.; ECKENSTEIN, F.. Neurons localized with antibodies against choline acetyltransferase in the enteric nervous system. **Neuroscience Letters**, v. 40, p. 105-109, 1983.

FURNESS, J. B.; COSTA, M.; FRANCO, R.; LLEWELLYN-SMITH, I. J.. Neuronal peptides in the intestine: distribution and possible functions. **Adv Biochem Psychopharmacol**, v. 22, p. 601-617, 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**, v. 31, p. 203-210, 1990b.

FURNESS, J. B.; MORRIS, J. L.; GIBBINS, I. L.; COSTA, M.. Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 29, p. 289-306, 1989.

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**, v. 108, p. 554-563, 1995.

GABELLA, G.. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. **Neuroscience**, v. 6, p. 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**, v. 13, p. 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**, v. 103, p. 439-447, 1992.

GERSHON, D.. Are mega-mergers good medicine for the pharmaceutical industry? **Nature**, v. 405, p. 257-258, 2000. DOI <https://doi.org/10.1038/35012205>

GERSHON, M. D.. The enteric nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 4, p. 227-272, 1981.

GERSHON, M. D.. Serotonergic neurotransmission in the gut. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v. 71, p. 26-41, 1982.

GERSHON, M. D.. Enteric serotonergic neurones ... finally! **J Physiol**, v. 587, p. 507, 2009. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167676

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**, v. 33, p. 185-187, 1991.

GONIAEW, K.. Die Nerven des Nahrungsschlauches. **Arch. Mikr. Anat.**, v. 11, p. 479-496, 1875.

- GRUNDY, D.. 5-HT system in the gut: roles in the regulation of visceral sensitivity and motor functions. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 12, Suppl 1, p. 63-67, 2008.
- GUNN, M.. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. **Journal of Anatomy**, v. 102, p. 223-239, 1968.
- HENLE, J.. **Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen**. Band III., Abt. 2. Nervenlehre., Vieweg und Sohn, Braunschweig, 1871.
- HÖKFELT, T.; ELDE, R.; JOHANSSON, O.; LUFT, R.; ARIMURA, A.. Immunohistochemical evidence for the presence of somatostatin, a powerful inhibitory peptide, in some primary sensory neurons. **Neuroscience Letters**, v. 1, p. 231-235, 1975.
- HOKFELT, T.; JOHANSSON, O.; GOLDSTEIN, M.. Chemical anatomy of the brain. **Science**, v. 225, p. 1326-1334, 1984.
- HOKFELT, T.; JOHANSSON, O.; LJUNGDAHL, A.; LUNDBERG, J. M.; SCHULTZBERG, M.. Peptidergic neurones. **Nature**, v. 284, p. 515-521, 1980.
- 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**, v. 101, p. 416-423, 1991.
- HOYLE, C. H. V.; BURNSTOCK, G.. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. **Journal of Anatomy**, v. 166, p. 7-22, 1989.
- IRWIN, D. A.. The anatomy of Auerbach's plexus. **American Journal of Anatomy**, v. 49, p. 141-166, 1931.
- JABARI, S.; DA SILVEIRA, A. B.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; QUINT, K.; NEUHUBER, W. AND BREHMER, A.. Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon. **Histochemistry and cell biology**, v. 135, p. 47-57, 2011. doi: 10.1007/s00418-010-0774-y.
- JESSEN, K. R.; MIRSKY, R.. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. **Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 2206-2218, 1983.
- KADOWAKI, M.; WANG, X. O.; SHIMATANI, H.; YONEDA, S.; TAKAKI, M.. 5-HT₄ receptor enhances the propulsive power of the peristaltic reflex in the rat distal colon. **Auton Neurosci**, v. 99, p. 62-65, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(02\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(02)00063-2)
- KOBERLE, F.. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, v. 6, p. 63-116, 1968.
- KRAMER, K.; DA SILVEIRA, A. B.; JABARI, S.; KRESSEL, M.; RAAB, M.; BREHMER, A.. Quantitative evaluation of neurons in the mucosal plexus of adult human intestines. **Histochemistry and cell biology**, v. 136, p. 1-9, 2011. doi: 10.1007/s00418-011-0807-1.
- KRAMMER, H. J.; KUHNEL, W.. Immunohistochemistry for intermediate filaments in the enteric nervous system of porcine small intestine. **Ann. Anat.**, v. 174, p. 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.**, v. 298, p. 275-286, 1999.

LEWINSOHN, R.. Carlos Chagas (1879-1934): the discovery of Trypanosoma cruzi and of American trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chagas's disease). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 73, p. 513-523, 1979.

LEWIS, T.. **The blood vessels of the human skin and their responses**, Shaw & Sons Ltd, London, 1927.

LOMAX, A. E. G.; FURNESS, J. B.. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. **Cell and Tissue Research**, v. 302, p. 59-73, 2000. DOI 10.1007/s004410000260

LUNDGREN, O.. Sympathetic input into the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, Suppl 4, p. iv33-35, discussion iv36, 2000. doi: 10.1136/gut.47.suppl_4.iv33

MANNING, B. P.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M.. Effects of PGE₂ in guinea pig colonic myenteric ganglia. **American Journal of Physiology**, v. 283, p. G1388-G1397, 2002. DOI: 10.1152/ajpgi.00141.2002

MCKAY, D. M.; FAIRWEATHER, I.. A role for the enteric nervous system in the response to helminth infections. **Parasitol Today**, v. 13, p. 63-69, 1997.

MCMILLIN, D. L.; RICHARDS, D. G.; MEIN, E. A.; NELSON, C. D.. The abdominal brain and enteric nervous system. **J Altern Complement Med**, v. 5, p. 575-586, 1999. DOI: 10.1089/acm.1999.5.575

MEISSNER, G.. Über die Nerven der Darmwand. **Z. Ration. Med. N. F.**, v. 8, p. 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**, v. 17, p. 129-135, 2001. DOI: 10.1007/s003830000507

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**, v. 440, p. 393-408, 2000. DOI: 10.1007/s004240000299

NASCIMENTO, R. D.; DE SOUZA LISBOA, A.; FUJIWARA, R. T.; DE FREITAS, M. A.; ADAD, S. J.; OLIVEIRA, R. C.; D'AVILA REIS, D.; DA SILVEIRA, A. B.. Characterization of enteroglial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. **Hum Pathol**, v. 41, p. 528-534, 2010. doi: 10.1016/j.humpath.2009.05.018.

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**, v. 16, p. 277-281, 2000. DOI: 10.1007/s003830050744

NORBERG, K. A.. Adrenergic innervation of the intestinal wall studied by fluorescence microscopy. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 3, p. 379-382, 1964.

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**, v. 275, p. G922-G935, 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**, v. 187, p. 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**, v. 14, p. 1180-1187, 1999.

POWLEY, T. L.. Vagal input to the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, Suppl 4, p. iv30-32; discussion iv36, 2000. Doi: 10.1136/gut.47.suppl_4.iv30

REMAK, R.. Neue Beitrage zur Kenntnis vom organischen Nervensystem. **Med. Z. Ver. Heilk. Preuss**, v. 9, p. 7-8, 1840.

REMAK, R.. **Über mikroskopische Ganglien an den Asten des N. vagus in der Wand des Magens bei Wirbeltieren**. **Vers. Ges. Dtsch. Naturf. Aerzte.**, p. 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**, v. 103, p. 99-135, 1958.

RUHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A.. Enteric glia. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16, Suppl 1, p. 44-49, 2004.

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)**, v. 380, p. 293-310, 1986.

SCHABADASCH, A.. Die Nerven des Magens der Katze. **Z. Zellforsch.**, v. 10, p. 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**, v. 129, p. 96-104, 1987.

SCHULTZBERG, M.; HÖKFELT, T.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD J, F.; BROWN, M.; ELDE, R.; GOLDSTEIN, M.; SAID, S.. Distribution of peptide and catecholamine neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, VIP, enkephalins, somatostatin, gastrin, neurotensin and dopamine B-hydroxylase. **Neuroscience**, v. 5, p. 689-744, 1980.

SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M.. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 669-677, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(02\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(02)00215-1)

SIKANDER, A.; RANA, S. V.; PRASAD, K. K.. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. **Clin Chim Acta**, v. 403, p. 47-55, 2009. DOI: 10.1016/j.cca.2009.01.028

SUNDLER, F.; HÅKANSON, R.; LEANDER, S.. Peptidergic nervous systems in the gut. **Clin. Gastroenterol.**, v. 9, p. 517-543, 1980.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M.. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, p. 400-419, 1992.

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**, v. 262, p. 71-78, 2001. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<71::AID-AR1012>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<71::AID-AR1012>3.0.CO;2-A)

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**, v. 260, p. 367-379, 1990.

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**, v. 53, p. 222-228, 2004. doi: 10.1136/gut.2003.012625



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

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

Pesquisador Responsável: Alexandre Barcelos Morais 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.

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.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU



Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP

Parecer ETIC nº 127/08

Interessados: Profa. Dra. Débora d'Ávila Reis e Alexandre Barcelos Morais da Silveira
Departamento de Morfologia – ICB / UFMG

VOTO:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 21 de maio de 2008 o projeto de pesquisa intitulado “*Estudo da relação entre o sistema nervoso entérico e sistema imune em pacientes portadores da forma digestiva da doença de Chagas*”.

Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco

Presidente do COEP

E-MAIL DE ACEITAÇÃO DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA REVSTA
PARASITOLOGY RESEARCH

----- Mensagem encaminhada -----

De: JULIA WALOCHNIK <em@editorialmanager.com>
Data: sex, 25 de jan de 2019 às 10:02
Assunto: Your Submission PARE-D-18-00322R2
Para: Alexandre Barcelos Morais da Silveira <alec@ufu.br>

Dear Dr. da Silveira,

We are pleased to inform you that your manuscript, "5-HT3A SEROTONIN RECEPTOR IN GASTROINTESTINAL TRACT: THE LINK BETWEEN IMMUNE SYSTEM AND ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN THE DIGESTIVE FORM OF CHAGAS' DISEASE", has been accepted for publication in Parasitology Research.

Please remember to quote the manuscript number, PARE-D-18-00322R2, whenever inquiring about your manuscript.

Please note that at a point in the publishing process you will be asked if you wish to publish open access or traditionally. Please be careful in making this selection and note the fees incurred.

With best regards,

Julia Walochnik, Dr.
Editor in Chief

Recipients of this email are registered users within the Editorial

Parasitology Research

5-HT3A SEROTONIN RECEPTOR IN GASTROINTESTINAL TRACT: THE LINK BETWEEN IMMUNE SYSTEM AND ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN THE DIGESTIVE FORM OF CHAGAS' DISEASE

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PARE-D-18-00322R2	
Full Title:	5-HT3A SEROTONIN RECEPTOR IN GASTROINTESTINAL TRACT: THE LINK BETWEEN IMMUNE SYSTEM AND ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN THE DIGESTIVE FORM OF CHAGAS' DISEASE	
Article Type:	Short Communication	
Section/Category:	Immunology and Host-Parasite Interactions	
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (404718/2016-7)	Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira
Abstract:	<p>Chagas' disease is caused by <i>Trypanosoma cruzi</i> and remains one of the most neglected diseases in Latin America. One of its main clinical forms is Chagas' megacolon. Despite being known for more than half a century, his causes still obscure. Recent evidence indicates a close relationship between the immune system and the enteric nervous system in the development of this chagasic etiology. It is believed that the low expression of 5-HT3A serotonin receptor on lymphocytes could be linked to the megacolon's development. To verify this hypothesis, this work characterized the distribution of CD4, CD8 and CD20 lymphocytes and their 5-HT3A receptor expression. The results demonstrated that Chagas' patients without megacolon present higher expression of the 5-HT3A receptor in all analyzed lymphocytes compared with Chagas' patients with megacolon. This data suggest that the high expression of this receptor may lead to immunomodulation and prevent the development of Chagas' megacolon.</p>	
Corresponding Author:	Alexandre Barcelos Morais da Silveira, PhD., M.D. Universidade Federal de Uberlândia BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Uberlândia	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
Order of Authors:	Jefferson Alvim de Oliveira Michelle A. R. Freitas Enio Chaves de Oliveira Samir Jabari Axel Brehmer Alexandre Barcelos Morais da Silveira, PhD., M.D.	
First Author:	Jefferson Alvim de Oliveira	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors Secondary Information:		
Author Comments:	<p>Uberlândia, December 21, 2018. To Parasitology Research Editorial Office</p> <p>Please, find enclosed a copy of a Letter to the Editor entitled "5-HT3A SEROTONIN</p>	

RECEPTOR IN GASTROINTESTINAL TRACT: THE LINK BETWEEN IMMUNE SYSTEM AND ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN THE DIGESTIVE FORM OF CHAGAS' DISEASE" that we wish to submit for publication in Parasitology Research. With this study we wish to contribute for further understanding the pathogenesis of megacolon in Chagas' disease that remains as one of the major public health problems in Latin America.

All authors have contributed significantly to the development, analysis and writing of this study, and have seen and approved the final submitted version. All necessary ethics committee approval was secured for the study reported. The authors do not have commercial or other associations that might pretence a conflict of interest. The manuscript has not been submitted or accepted elsewhere and all solicited modifications were performed since the last submission. We appreciate your consideration in evaluating our work for publication in this Journal. In this review all the suggestions made by the reviewers were promptly met. If further changes are required, we will be at your disposal to execute them.

Yours sincerely,

Alexandre Barcelos Morais da Silveira, Ph.D, M.D.

Anatomy Sector

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade Federal de Uberlândia

**PARE-D-18-00322R1****Comments for the Author:****Reviewer #3:****Do all 15 patients showed similar pattern of megacolon complications?**

Answer: Yes, all 15 patients in chagasic megacolon group presented constipation, dilatation, neuronal loss and intense inflammatory process. This information will be insert in the text.

Table 2- author must identify in the table legend the meaning of the values. Are these values "positive area (or cells?) /square micrometer" ?

Answer: Data was presented positive area in square micrometer. This information will be insert in the table legend.

English must be improved.

Answer: The English was revised and improved in the text.

Formalities in the text are still necessary, please check and substitute "Chagasic patients" for "Chagas patients"; all sentences must written in the passive form, it is written in the abstract section " We believe that the high expression ", these constructions must be avoided. This type of error can be observed throughout the article; a careful check throughout the text is recommended. Please see the following example: wrong- "We found a significant amount of lymphocytes in tissue." correct- "A significant amount of lymphocytes in tissue was found."

Answer: "Chagasic patients" was substituted by for "Chagas patients" in all text. The passive voice was adopted in the text.

[Click here to view linked References](#)

1

Title

2

5-HT_{3A} SEROTONIN RECEPTOR IN GASTROINTESTINAL TRACT: THE LINK BETWEEN IMMUNE
SYSTEM AND ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN THE DIGESTIVE FORM OF CHAGAS' DISEASE

4

5

Running title

6

The role of the serotonin 5-HT_{3A} receptor in the digestive form of Chagas' disease

7

8

Jefferson Alvim de Oliveira¹, Michelle A. R. Freitas², Enio Chaves de Oliveira³, Samir Jabari⁴, Axel
Brehmer⁴, Alexandre Barcelos Morais da Silveira^{1*}

10

11

1 - Human Anatomy Sector, ICBIM, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, Postal Code 38.400-902

12

2 - Parasitology Sector, ICBIM, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, Postal Code 38.400-902

13

3 - Department of Surgery, Medical School, Universidade Federal de Goiás, Brazil, Postal Code 74.605-020

14

4 - Institute of Anatomy I, University of Erlangen–Nuremberg, Krankenhausstr. 9, Erlangen D-91054, Germany

15

16

* Proofs and Correspondence to:

17

Alexandre Barcelos Morais da Silveira, PhD, MD.

18

Neurosciences Laboratory, ICBIM, Campus Umuarama

19

Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

20

Email: alec@ufu.br

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

21 **Abstract**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Chagas' disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and remains one of the most neglected diseases in Latin America. One of its main clinical forms is Chagas' megacolon. Despite being known for more than half a century, his causes still obscure. Recent evidence indicates a close relationship between the immune system and the enteric nervous system in the development of this chagasic etiology. It is believed that the low expression of 5-HT_{3A} serotonin receptor on lymphocytes could be linked to the megacolon's development. To verify this hypothesis, this work characterized the distribution of CD4, CD8 and CD20 lymphocytes and their 5-HT_{3A} receptor expression. The results demonstrated that Chagas' patients without megacolon present higher expression of the 5-HT_{3A} receptor in all analyzed lymphocytes compared with Chagas' patients with megacolon. This data suggest that the high expression of this receptor may lead to immunomodulation and prevent the development of Chagas' megacolon.

Keywords: Chagas' disease; megacolon; enteric nervous system; 5-HT_{3A}; lymphocytes

1
2 **36 Short communication**
3
4
5
6
7
8
9

10 **37**
11
12 **38 Introduction**
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Chagas' disease is caused by the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. The infection is characterized by an acute phase characterized by high parasitemia and a chronic phase where an effective immune response is established. Chronic form of the disease affects the heart and gastrointestinal tract in approximately 30% of infected patients. In the gastrointestinal tract, disorders of enteric innervation lead to the development of intestinal constipation and colon's dilatation, which is known as megacolon (Koberle 1968). When analyzing histological samples of Chagas' patients, while the non-carriers of megacolon behave practically the same as uninfected individuals, samples of patients with Chagas's megacolon present a high degree of inflammation, destruction of neurons and neuronal fibers, fibrosis and enlargement of the lumen (Tafuri 1971). The question remains: why in the same disease it is observed clinical spectra so far apart? The mechanisms that lead from a functional intestine to a dilated and constipated intestine are still far from understood. Recently the role of serotonin and its receptors are being studied in intestinal pathologies with interesting results. Serotonin plays a critical role in enteric neurotransmission, in the initiation and propagation of intrinsic enteric reflexes, and in communication between the intestine and the brain (Johnston et al. 2014). It is believed to be one of the major chemical mediators between the enteric nervous system and the immune system (Walstab et al. 2010). Study Chagas' patients that did not develop megacolon would help to elucidate the mechanisms of intestinal adaptation against an inflammatory and infectious challenge. In addition, it has recently been suggested that serotonin's 5-HT_{3A} receptor would have direct action on the immune system with anti-inflammatory effect of several pathologies. Thus, the objective of this study was to evaluate the expression of serotonin main receptor in the intestine, 5HT_{3A} receptor, and to relate them to the

1 62 presence of CD₄-IR (immunoreactive) T lymphocytes, CD₈-IR T lymphocytes and CD₂₀-IR B
2 63 lymphocytes in the colon of Chagas' patients. Furthermore, we also evaluated the presence of
3 64 fibrosis in our samples with Gomori trichrome staining and neuron expression through the pan-
4 65 neuronal marker, Peripherin.
5
6 66
7
8 67 **Materials and Methods**
9
10 68
11
12 69 Samples of full thickness colon wall were obtained from carriers and non-carriers of
13 70 chagasic megacolon (15 samples in each group) and non-chagasic individuals (15 samples)
14 71 submitted to necropsy or surgical procedures at Universidade Federal de Goiás (Goiânia, Minas
15 72 Gerais, Brazil). Chagas' patients with megacolon presented similar clinical conditions. All non-
16 73 infected patients did not presented any inflammation or gastrointestinal symptoms, and no
17 74 patients received any parasite- specific treatment. Informed consent was obtained from the
18 75 patient or family members prior to tissue procurement, and this work was approved by
19 76 Universidade Federal de Uberlândia Research Ethics Committee (ETIC nº 110/11) according
20 77 Guidelines and Norms for Research Involving Human Beings - Resolution CNS 466/2012 - Brazil.
21
22 78 Tissue samples were collected from the rectosigmoid region and fixed in 4% neutral buffered
23 79 formaldehyde solution. For the immunohistochemical reactions it were used anti- Peripherin
24 80 (Santa Cruz Biotechnology, SC-7604, Germany, 1:100), anti-5HT_{3A} receptor (ACRIS, TA302602,
25 81 Germany, 1:100), anti-CD₄ (ACRIS, UM800010, Germany, 1: 100), anti-CD₂₀ (ACRIS, UM800001,
26 82 Germany, 1:100) and anti-CD₈ (ACRIS, AM05901PU-S, Germany, 1:100). In order to visualize the
27 83 tissue fibrosis process, the samples were submitted to Gomori trichrome staining and the slides
28 84 were performed with sections of 7 µm, deparaffinized using xylene, and rehydrated through
29 85 graded alcohols.
30
31 86 For immunohistochemistry, tissues sections were first incubated in 10% normal donkey
32 87 serum (NDS) plus 1% Triton X-100 for 1h. Incubation with primary antibodies was carried out for
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 88 24hr at 4°C with diluted antiserum containing 10% NDS. Following incubation in primary
2 89 antiserum, preparations were rinsed in PBS (3 × 10 min) and then incubated for 1 hr at room
3 90 temperature with secondary antibodies (Table 1). Further 3 × 10-min washes in PBS were done
4 91 before tissue was mounted in fluorescence mounting medium. Analysis was performed
5 92 considering the specifically labeled area of, at least, 10 neuronal ganglia per patient in both the
6 93 submucosal and the myenteric plexuses. Prior to incubation, they were viewed by using a
7 94 confocal laser scanning microscope (Nikon Eclipse E1000-M, Tokyo, Japan) equipped with a
8 95 confocal system (Nikon Digital Eclipse C1) with three channels (laser configuration: 488 nm
9 96 argon laser, 543 nm helium-neon laser [both from Melles Griot, Carlsbad, Calif., USA], 638 nm
10 97 diode laser [Coherent, Santa Clara, Calif., USA]). A 20x dry objective lens (numerical aperture:
11 98 0.75) was used with the zoom factor set to 2.0 in all scanning sessions. Pinhole and gain were
12 99 adjusted equally in all negative control sessions and values were noted. The images were created
13 100 using three different excitation wave lengths and the figures plates were prepared using the EZ-
14 101 C1 FreeViewer program (Gold Version 3.30 build 647) from Nikon Corporation.

15 102 Sections through ganglia were selected randomly in a meandering fashion until a total
16 103 of 3 mm² were analyzed in each ganglionated plexus. Single optical section images on the same
17 104 focus plane were created in the ganglia by applying 3 different excitation wavelengths (488 nm
18 105 argon laser, 543 nm helium-neon laser and 638 nm diode laser) Pictures were prepared using
19 106 Confocal Assistant 4.02 and CorelDraw 13. For area analysis of reactive co-stimulation
20 107 molecules, the pictures were analyzed individually and merged, and the positive area was
21 108 counted in square micrometer. Statistical analysis was performed by the Anova One-way
22 109 analysis of variance test. Differences were considered statistically significant at P < 0.05.

23 110

24 111

25 112

26 113

114 **Results**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

115
116 Evaluation of colon's innervation was performed by measurement of Peripherin
117 immune-reactive area in our samples. Qualitative and quantitative analysis was executed in non-
118 infected individuals and patients with Chagas' disease. Non-infected individuals presented
119 preserved neuronal ganglia, with regular shaped neuronal bodies and no signal of inflammatory
120 process, while Chagas' patients shown deformed ganglia and increased neuronal bodies. The
121 statistical analyses exhibited a significantly reduced quantity of neurons and neuronal filaments
122 Peripherin immunoreactive area when compared to the non-infected group.

123 Analyses of fibrosis areas in the muscle layers demonstrated that Chagas' patients with
124 megacolon presented a diffuse increase in endomysial and perimysial connective tissue and
125 frequent fibrosis foci. Fibrous connective tissue was rare in the non-infected individuals group
126 and it was represented only by endomysial or perimysial connective tissue. In Chagas' patients
127 without megacolon, the appearance of the connective tissue in the muscle layers was similar to
128 that observed in non-infected individuals. Statistical analyzes demonstrated that fibrous
129 connective tissue area relative to the total examined tissue area was greater in the Chagas'
130 patients with megacolon in relation to Chagas' patients without megacolon and the non-
131 infected individuals. There was no statistically significant difference between non-infected
132 individuals and the Chagas' patients without megacolon. The pattern of all antibodies and
133 coloration used are shown in figure 1.

134 Analysis of the results demonstrated significant differences between the distribution of
135 the classes of lymphocytes analyzed and the distribution of the 5-HT_{3A} receptors in analyzed
136 groups. The distribution of CD4 lymphocytes presented a similar pattern and analogous cells
137 amount in non-infected individuals, Chagas' patients without megacolon and Chagas' patients
138 with megacolon groups. The presence of CD8 and CD20 lymphocytes was significantly higher in
139 Chagas' patients with megacolon group compared to Chagas' patients without megacolon and

140 non-infected individuals groups. The distribution of serotonin 5-HT_{3A} receptor in all analyzed
141 lymphocytes was more pronounced in Chagas' patients without megacolon group than in non-
142 infected individuals and Chagas' patients with megacolon groups (Table 2).

143

144 **Discussion**

145

146 Megacolon is the most common alteration in the digestive tract caused by Chagas'
147 disease. Currently, denervation is accepted as one of the main causes of megacolon
148 development. Neuronal destruction in the acute phase occurs due to parasite concentration in
149 the tissue, but in the chronic phase it is also related to the inflammatory process observed in
150 this phase of Chagas' disease. However, the destruction process and the enteric nervous system
151 response to this inflammatory process are still obscure. Results presented in this study were in
152 agreement with previous studies that characterize the denervation process in Chagas' patients,
153 as well as the presence of fibrosis in the muscular layers of the colon of these patients.

154

154 Besides, previous reports indicated the value to investigate the role of serotonin and its
155 5-HT_{3A} receptor in the immune system of the gastrointestinal tract (Cirillo et al. 2011; Simonin
156 et al. 2012). In recent years, serotonin has been identified as one with the main articulators
157 between the immune system and the enteric nervous system. Its absence has been related to
158 pathological alterations such as intestinal constipation, inflammatory bowel diseases and more
159 severe forms of Chagas' disease (de Freitas et al. 2015; Freitas et al. 2017; Sikander et al. 2009).

160

160 However, the way serotonin acts as a mediator of the inflammatory process is still unclear. In an
161 attempt to elucidate some of these questions, this study aimed to evaluate the presence of the
162 5-HT_{3A} receptor in the main lymphocyte classes of colon samples from patients with Chagas'
163 patients that did not have megacolon. Results presented here could suggest the possibility that
164 serotonin acts in the immune system would be through the 5-HT_{3A} receptor located in
165 lymphocytes, which would lead to their inactivation and thus suppressing the exacerbation of

166 the inflammatory process commonly observed in the Chagas' megacolon. In addition, Chagas'
1
167 patients that do not developed megacolon appear to express a higher amount of these serotonin
2
168 receptors, which, in addition to preserving intestinal motility, could also be one of the causes of
3
169 a lower presence of inflammatory cells in their tissues. From these results, the new direction of
4
170 research on inflammatory bowel diseases could continue with the intention of identify targets
5
171 that will promote homeostasis between the immune systems and the enteric nervous system,
6
172 and among the possibilities, serotonin and its 5-HT_{3A} receptor could be a major candidate to be
7
173 elected as targets for new therapies.
8
174
9
175
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

176 **Acknowledgements**

177 This work was supported by funds from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento
178 Científico e Tecnológico) Grant 404718/2016-7, Brazil.

179

180

181 **References**

182
183 Cirillo C, Vanden Berghe P, Tack J (2011) Role of serotonin in gastrointestinal physiology and
184 pathology. Minerva endocrinologica 36(4):311-24
185 de Freitas MA, de Oliveira EC, de Oliveira FC, Jabari S, Brehmer A, da Silveira AB (2015) Is the
186 increased presence of CD8 T-lymphocytes related to serotonin levels in Chagas disease?
187 Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great
188 Britain and Ireland 17(3):268-9 doi:10.1111/codi.12907

- 189 Freitas MA, Segatto N, Tischler N, de Oliveira EC, Brehmer A, da Silveira AB (2017) Relation
1
2 between mast cells concentration and serotonin expression in chagasic megacolon
3
4 development. *Parasite immunology* 39(3) doi:10.1111/pim.12414
5
6
7 192 Johnston KD, Lu Z, Rudd JA (2014) Looking beyond 5-HT(3) receptors: a review of the wider role
8
9 of serotonin in the pharmacology of nausea and vomiting. *European journal of*
10
11 pharmacology 722:13-25 doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.014
12
13
14 195 Koberle F (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American
15 trypanosomiasis. *Advances in parasitology* 6:63-116
16
17
18 197 Sikander A, Rana SV, Prasad KK (2009) Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable
19 bowel syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 403(1-
20
21 198 2):47-55
22
23
24
25
26 200 Simonin J, et al. (2012) High-affinity fluorescent ligands for the 5-HT(3) receptor. *Bioorganic &*
27
28 201 medicinal chemistry letters 22(2):1151-5 doi:10.1016/j.bmcl.2011.11.097
29
30
31 202 Tafuri WL (1971) Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in
32
33 experimental and human American trypanosomiasis. *Virchows Archiv A: Pathology*
34
35 204 354(2):136-49
36
37
38 205 Walstab J, Rappold G, Niesler B (2010) 5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs.
39
40 206 *Pharmacology & therapeutics* 128(1):146-69 doi:10.1016/j.pharmthera.2010.07.001
41
42
43 207
44
45 208
46
47 209
48
49
50 210
51
52 211
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 212 **Tables**
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15 213

Antibody	Company	Dilution
donkey anti-goat ALEXA 488	Molecular Probes	1:1000µl
donkey anti-mouse ALEXA 555	Molecular Probes	1:1000µl
donkey anti-rabbit ALEXA 647	Molecular Probes	1:1000µl

16
17 214
18
19 215 **Table 1:** Secondary antibodies
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43 216

21
22
23
24 Distribution of CD4, CD8 and CD20 lymphocytes and the 5-HT_{3A} receptor in the colon samples
25 from chagasic patients and non-infected individuals
26

Patients	CD4	5Ht _{3A}	CD8	5Ht _{3A}	CD20	5Ht _{3A}
Non-infected individuals	26 ± 4	102 ± 9	28 ± 3	65 ± 5	33 ± 2	69 ± 5
Chagasic patients without megacolon	30 ± 5	163 ± 12 ^B	32 ± 6	112 ± 9 ^B	35 ± 4	144 ± 10 ^B
Chagasic patients with megacolon	29 ± 5	98 ± 8	64 ± 7 ^A	73 ± 5	70 ± 7 ^A	64 ± 5

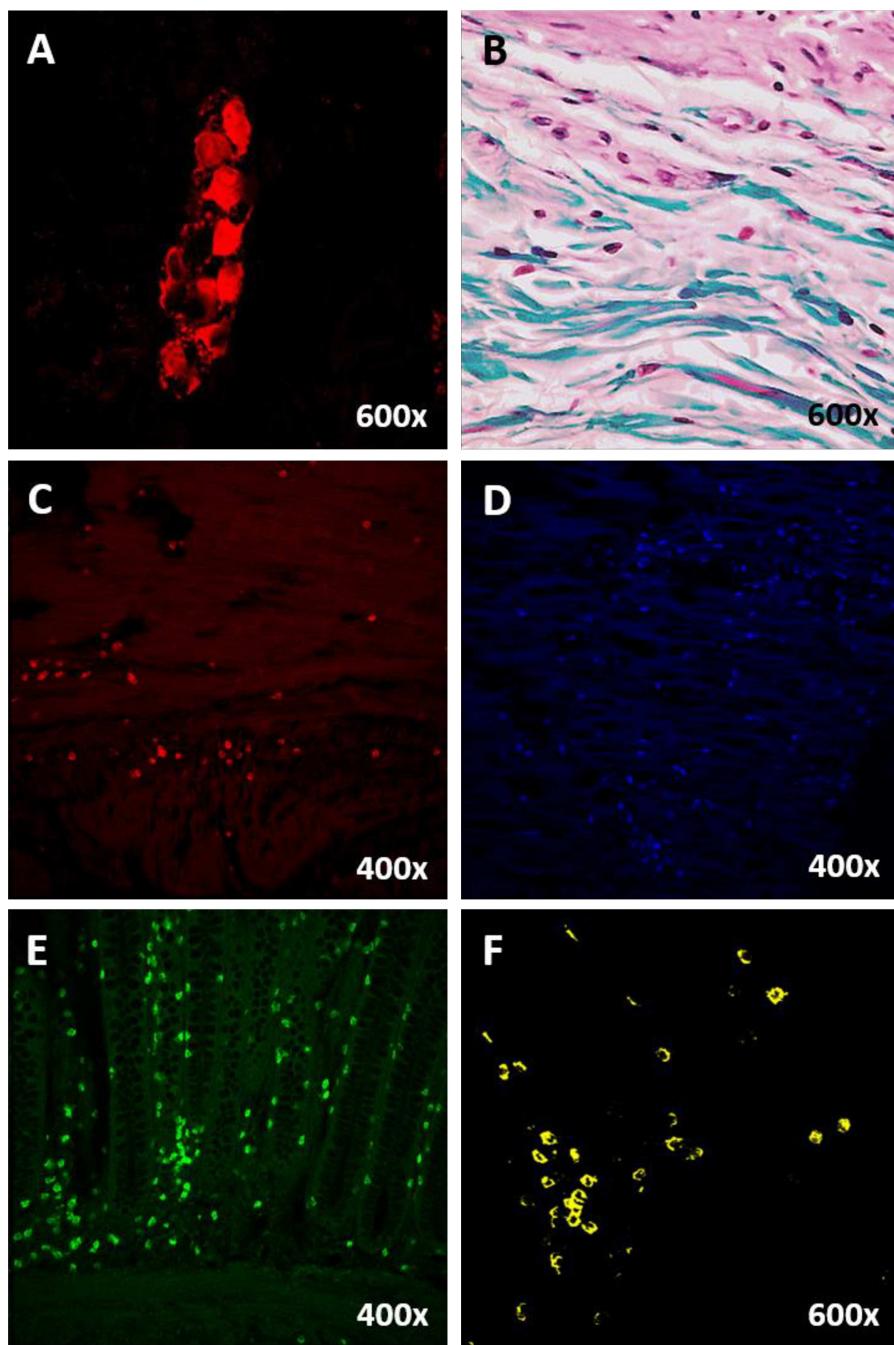
44
45 217
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

45 218 **Table 2:** A - Statistically significant difference between Chagas patients with megacolon and the
46 other groups; B - Statistically significant difference between Chagas patients without megacolon
47 and the other groups; Data presented positive area in square micrometer. All statistical analyzes
48 were performed with using one-way analysis of variance ($p < 0.05$).
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

222 **Figure Legends**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

223
224 **Figure 1:** Pattern of all antibodies and coloration used in this study. (A) Peripherin label showing
225 neuronal ganglia in myenteric plexus. (B) Gomori trichrome demonstrating fibrosis (blue) in
226 inner muscular of colon. (C) Anti-CD4 antibody presenting lymphocytes CD4 distribution (red).
227 (D) Anti-CD8 antibody (blue) and (E) Anti-CD20 antibody (green). (F) Anti-5-HT_{3A} receptor
228 distribution in colon sample.



60
61
62
63
64
65
229

<i>Antibody</i>	<i>Company</i>	<i>Dilution</i>
donkey anti-goat ALEXA 488	Molecular Probes	1:1000µl
donkey anti-mouse ALEXA 555	Molecular Probes	1:1000µl
donkey anti-rabbit ALEXA 647	Molecular Probes	1:1000µl

Distribution of CD4, CD8 and CD20 lymphocytes and the 5-HT _{3A} receptor in the colon samples from chagasic patients and non-infected individuals						
Patients	CD4	5Ht _{3A}	CD8	5Ht _{3A}	CD20	5Ht _{3A}
Non-infected individuals	26 ± 4	102 ± 9	28 ± 3	65 ± 5	33 ± 2	69 ± 5
Chagasic patients without megacolon	30 ± 5	163 ± 12 ^b	32 ± 6	112 ± 9 ^b	35 ± 4	144 ± 10 ^b
Chagasic patients with megacolon	29 ± 5	98 ± 8	64 ± 7 ^A	73 ± 5	70 ± 7 ^A	64 ± 5

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Figure 1.tif](#)