

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

MARCELO ANDRÉ DOMINGUES

**CARACTERIZAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE SEROTONINA E O
PROCESSO REGENERATIVO EM NEURÔNIOS DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE
PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES DE MEGACÓLON**

UBERLÂNDIA

2020

MARCELO ANDRÉ DOMINGUES

**CARACTERIZAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE SEROTONINA E O
PROCESSO REGENERATIVO EM NEURÔNIOS DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE
PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES DE MEGACÓLON**

**Dissertação de mestrado apresentado pelo aluno
Marcelo André Domingues como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre do
Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Uberlândia**

Orientando: Marcelo André Domingues

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barcelos Moraes da Silveira

UBERLÂNDIA

2020.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

D671 2020	<p>Domingues, Marcelo André, 1965- CARACTERIZAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE SEROTONINA E O PROCESSO REGENERATIVO EM NEURÔNIOS DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES DE MEGACÓLON [recurso eletrônico] / Marcelo André Domingues. - 2020.</p> <p>Orientador: ALEXANDRE BARCELOS MORAIS DA SILVEIRA. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.595 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Ciências médicas. I. SILVEIRA, ALEXANDRE BARCELOS MORAIS DA, 1978-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 61</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - copme@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 021/PPCSA				
Data:	13.08.2020	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:00h
Matrícula do Discente:	11812CSD027				
Nome do Discente:	Marcelo André Domingues				
Título do Trabalho:	CARACTERIZAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE SEROTONINA E O PROCESSO REGENERATIVO EM NEURÔNIOS DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES DE MEGACÓLON				
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				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Wendell Sérgio Ferreira Meira (UFTM), Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas (UFU) e Alexandre Barcelos Moraes da Silveira (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Alexandre Barcelos Moraes da Silveira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Sérgio Ferreira Meira, Usuário Externo**, em 13/08/2020, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/08/2020, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barcelos Morais da Silveira, Presidente**, em 13/08/2020, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2194794** e o código CRC **D1B9884C**.

Sumário

RESUMO DO PROJETO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
Doença de Chagas	5
O mega chagásico	7
O Sistema Nervoso Entérico	10
JUSTIFICATIVA	18
OBJETIVO GERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
METODOLOGIA	20
Pacientes	20
Imunohistoquímica	22
Aquisição de imagem dos gânglios	23
Análise estatística	23
RESULTADOS	23
Avaliação da Inervação	24
Análise da expressão de serotonina	26
Análise da expressão de GAP-43	28
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO DO PROJETO

A forma digestiva decorrente da doença de Chagas é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na fase crônica da doença. Pacientes portadores da forma digestiva apresentam uma série de sintomas relacionados à obstrução do órgão. No megacólon, os órgãos exibem grande aumento do lúmen e hipertrofia da camada muscular. Análises histológicas dos órgãos afetados têm demonstrado lesões inflamatórias do sistema nervoso entérico (SNE), associadas com uma grande redução no número de neurônios. Embora o mecanismo de lesão neuronal continue obscuro, a frequente observação de ganglionite e periganglionite em pacientes portadores de mega aponta para a participação de células do sistema imune nesse processo. Indivíduos não portadores de mega também apresentaram processos de desnervação e inflamação, porém menos intensos em relação aos portadores de megacólon. Esses dados abrem uma nova linha de investigação sobre o estudo da patologia do megacólon chagásico. Para a compreensão do desenvolvimento dessa patologia, devemos avaliar não apenas o grau de destruição das diferentes classes neuronais, mas também a taxa de regeneração e as substâncias envolvidas neste processo. Para isso, utilizamos um marcador de regeneração de neurônios e terminações nervosas (GAP-43) associado com um marcador pan-neuronal Periferina (Peripherin) e com marcador de serotonina no intestino em grupos de paciente chagásicos com megacólon, sem megacólon e de indivíduos não infectados. Nossos resultados demonstraram que paciente chagásicos não portadores de megacólon apresentam uma maior expressão de serotonina e de GAP-43 em seus plexos nervosos em comparação aos pacientes portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Esses resultados sugerem que esse processo de plasticidade neuronal ocorre no cólon de pacientes portadores da infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* e pode estar diretamente relacionado à expressão de serotonina pelo SNE, o que seria determinante para o desenvolvimento do megacólon ou pela permanência na fase indeterminada da doença. Assim os dados deste trabalho apontam que o desenvolvimento do megacólon chagásico está intimamente relacionado à capacidade regenerativa de neurônios do sistema nervoso entérico em todo trato gastrointestinal e que essa capacidade regenerativa está ligada à expressão de serotonina intestinal.

Palavras-chave: doença de Chagas; megacólon chagásico; serotonina; regeneração neuronal.

ABSTRACT

The digestive form resulting from Chagas' disease is one of the main causes of morbidity and mortality in the chronic phase of the disease. Patients with the digestive form have a series of symptoms related to organ obstruction. In the megacolon, the organs exhibit a large increase in the lumen and hypertrophy of the muscle layer. Histological analyzes of the affected organs have shown inflammatory lesions of the enteric nervous system (ENS), associated with a large reduction in the number of neurons. Although the mechanism of neuronal injury remains unclear, the frequent observation of ganglionitis and peri-ganglionitis in patients with mega points to the participation of immune cells in this process. Individuals without mega also presented denervation and inflammation processes, however less intense in relation to megacolon carriers. These data open a new line of investigation on the study of the chagasic megacolon pathology. To understand the development of this pathology, we must evaluate not only the degree of destruction of the different neuronal classes, but also the rate of regeneration and the substances involved in this process. For this, we used a marker for regeneration of neurons and nerve endings (GAP-43) associated with a pan-neuronal marker (Peripherin) and with a serotonin marker in the intestine in chagasic patient groups with megacolon, without megacolon and uninfected individuals. Our results demonstrated that chagasic patients without megacolon have a higher expression of serotonin and GAP-43 in their nerve plexuses compared to patients with megacolon and uninfected individuals. These results suggest that this process of neuronal plasticity occurs in the colon of patients with chronic infection by *Trypanosoma cruzi* and may be directly related to the expression of serotonin by SNE, which would be decisive for the development of the megacolon or for the permanence in the indeterminate phase of the disease. Thus, the data in this work indicate that the development of the chagasic megacolon is closely related to the regenerative capacity of neurons of the enteric nervous system in the entire gastrointestinal tract and that this regenerative capacity is linked to the expression of intestinal serotonin.

Keywords: Chagas disease; chagasic megacolon; serotonin; neuronal regeneration.

INTRODUÇÃO

Doença de Chagas

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

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

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

Dentre as formas de transmissão da doença de Chagas, destacamos a via vetorial, a via placentária e a via transfusional, Em 2019, segundo fontes do Ministério da Saúde, no Brasil, a doença é transmitida principalmente pelo contato do ser humano com o ciclo silvestre do inseto, como picadas que acontecem nas zonas de mata e a transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados. Quando a infecção se dá a partir da picada do inseto transmissor, a mesma ocorre através de fezes contaminadas. Após o ato de sugar o sangue, o que ocorre na maioria das vezes durante a noite, o inseto elimina fezes contaminadas com a forma tripomastigota metacíclica próximo ao local da picada. Os parasitos conseguem 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 parasito tem acesso a vasos linfáticos e sanguíneos, indo parasitar uma variedade de células em outros órgãos. Dentro das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, reproduzem-se e dão origem a novas formas tripomastigotas, as quais retornam à circulação sistêmica, reiniciando o ciclo (Brener, 1982; Koberle, 1968).

Pacientes portadores da doença de Chagas podem apresentar formas clínicas distintas. A forma aguda representa na realidade uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*. As formas amastigotas são encontradas difusamente em células do organismo, incluindo macrófagos, células gliais, células adiposas, células endoteliais, fibras musculares lisa, esquelética e cardíaca, fibroblastos, células de Schwann e neurônios. O sinal de Romaña, ou chagoma de inoculação, aparece 10 a 15 dias após a inoculação e a sua duração de 30 a 60 dias sugere uma reação de hipersensibilidade mediada por células. Portadores da forma aguda da doença podem vir a falecer de miocardite, de meningoencefalite ou de complicações, como broncopneumonia. Em crianças, até cinco anos de vida, os sintomas da infecção aguda são mais severos do que aqueles observados em adultos. Ambos os sexos são igualmente susceptíveis à infecção (Dias, 2002; Koberle, 1970).

Na fase crônica, os indivíduos podem apresentar sintomas resultantes do comprometimento do sistema digestivo e/ou cardíaco, ou podem ainda persistir na forma assintomática da doença, também denominada de forma indeterminada. Esta representa um dos aspectos mais enigmáticos sobre a doença de Chagas, uma vez que pode haver um intervalo de 20 até 30 anos entre a fase aguda e a fase crônica sintomática. Alguns indivíduos chegam a falecer com 70 a 80 anos sem nunca apresentar qualquer sintoma decorrente da infecção. (Andrade, 1999; Dias, 2001; Prata, 2001). A forma crônica cardíaca, pela sua gravidade e frequência, é uma das formas mais bem estudadas da doença de Chagas, caracterizando-se por produzir insuficiência cardíaca, transtornos do ritmo e da condução, fenômenos tromboembólicos e morte súbita. Pacientes portadores desta forma clínica apresentam miocardite

usualmente intensa e difusa, sendo acompanhados de cardiomegalia, quadros de trombose intracardíaca, lesões vasculares e fibrose (De Rezende & Rassi, 1958; Marin Neto et al., 1980; Rassi et al., 2000).

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

O mega chagásico

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

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

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

O megacólon se caracteriza como dilatação intestinal associada a um infiltrado inflamatório. Este infiltrado é constituído principalmente por linfócitos T CD3, linfócitos B CD20, e ainda, células *natural killers* (NK), macrófagos, mastócitos e linfócitos T citotóxicos (Corbett *et al.*, 2001; da Silveira *et al.*, 2007a; Reis *et al.*, 1993).

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

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

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

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, com importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias e sensíveis a agentes quimiotáticos como produtos de clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos. Estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos atraídos por quimiocinas, como a IL-8, e são ativados por diversos estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos (IC), quimiocinas e citocinas (Cruvinel Wde *et al.*, 2010).

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

Os monócitos constituem 3% a 8 % dos leucócitos circulantes e, no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, dão origem a macrófagos e células dendríticas mielóides. Os macrófagos são fagócitos eficientes, engolfando patógenos e debris celulares. Ao contrário dos neutrófilos, os

macrófagos podem permanecer no tecido por meses a anos. Além de seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC, estimulando, assim, a resposta mediada por linfócitos T (Cruvinel Wde *et al.*, 2010). Os macrófagos são células que podem associar-se a sítios inflamatórios, promovendo a exacerbação do processo. Eles secretam várias citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6, as quais têm a capacidade de ativar processos de citotoxicidade mediados por células do sistema imune. Além disso, os macrófagos por si podem lesar parasitas ou células do próprio hospedeiro, devido a sua capacidade de produzir, quando ativados, substâncias citotóxicas, como óxido nítrico e radicais livres (Daryani *et al.*, 2003).

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

Segundo Tafuri, (Tafuri *et al.*, 1971) é lícito admitir a ocorrência de uma lesão progressiva nos plexos que se agrava de acordo com o desenvolvimento do mega. Considerando a estase de conteúdo fecal um dos fatores mais importantes para a ocorrência do megacólon, podemos compreender que ao ocorrer acúmulo de conteúdo fecal no lúmen do órgão, há compressão da mucosa e conseqüente dilatação o órgão. As alterações decorrentes da compressão fazem com que a mucosa sofra um processo de isquemia, favorecendo a difusão do processo inflamatório pelos plexos nervosos e camadas musculares. As células musculares também são atingidas em conseqüência ao maior esforço de contração devido à maior resistência do meio, ocorrendo com o tempo hipertrofia. Como o plexo submucoso está em íntima relação com as células musculares é fácil compreender como o processo inflamatório pode agravar o processo de destruição neuronal (da Silveira *et al.* (2007-c).

À microscopia ótica de luz observam-se: 1) infiltrados inflamatórios crônicos, focais e difusos na muscular da mucosa, na submucosa e nas camadas musculares; 2) lesões do sistema nervoso entérico, especialmente do plexo mientérico, periganglionite e ganglionite focais ou difusas com intensos fenômenos regressivos dos neurônios chegando à destruição completa dos gânglios nervosos do plexo mientérico, com consecutiva fibrose; 3) ulcerações e inflamação crônica da mucosa, focal ou difusa em casos mais avançados, podendo atingir a submucosa; 4) fibrose intersticial intermuscular, focal ou difusa, em decorrência da miosite, da periganglionite e da ganglionite (Campos & Tafuri, 1973; Tafuri, 1970; Tafuri, 1987; Tafuri & Brener, 1967). Alterações ultra-estruturais do plexo mientérico consistem em lesões focais de todos os componentes dos gânglios: neurônios, células de Schwann e fibras nervosas.

Por isso, é comum, no mesmo gânglio, a existência de neurônios, às vezes, profundamente lesados ao lado de outros morfológicamente íntegros. Em casos mais graves, a lesão pode ser difusa e o gânglio acaba por ser substituído por tecido conjuntivo fibroso denso (Tafuri, 1971; Tafuri *et al.*, 1971).

Nas últimas décadas, estudos indicaram que, além da ocorrência de processos inflamatórios, as lesões na doença de Chagas são dependentes da presença de DNA do *T. cruzi* e do próprio parasita, mesmo que em pequena quantidade e demonstraram existir uma estreita correlação entre a presença de antígenos do parasita e a intensidade do infiltrado inflamatório (Almeida *et al.*, 1984; Higuchi Mde *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996a). Atualmente é aceito que o processo inflamatório é o principal responsável pela destruição dos componentes do sistema nervoso entérico (Corbett *et al.*, 2001; da Silveira *et al.*, 2007a; Reis *et al.*, 1993).

O Sistema Nervoso Entérico

O trato gastrointestinal 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 gastrointestinal 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 gastrointestinal 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; McMillin *et al.*, 1999; Powley, 2000a).

O sistema nervoso parassimpático atua no trato gastrointestinal 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 gastrointestinal. Os estímulos vagais utilizam acetilcolina como neurotransmissor, sendo esta responsável por estimular a peristalse e aumentar o aporte sanguíneo intestinal (Powley, 2000b).

Uma considerável quantidade de tecido nervoso, que consiste o SNE, está inserida na parede do trato gastrointestinal. O SNE apresenta neurônios e células de suporte (células da glia) 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 gastrointestinal, do epitélio secretor, dos vasos sanguíneos, do sistema biliar e do pâncreas.

As primeiras descrições dos plexos entéricos e seus gânglios nervosos foram realizadas por Georg Meissner (Meissner, 1857), Theodor Billroth (Billroth, 1858) e Leopold Auerbach (Auerbach, 1862). Robert Remak (Remak, 1837) e Remak, 1838) 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. Destacamos as brilhantes descrições de Meissner e Auerbach que, utilizando técnicas hoje consideradas rudimentares, elucidaram a organização geral dos plexos entéricos. Não nos surpreendemos que, após mais de cem anos da realização destes trabalhos, os mesmos continuem servindo como base para estudos sobre o trato gastrointestinal.

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 gastrointestinal. 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). 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 inervação 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 e Billroth, 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 (Imagem 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 a forma e natureza química encontrados nestes gânglios diferem entre as espécies (Scheuermann et al., 1987; Timmermans et al., 1990). Como não se sabe ao certo a quem se deve 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 provem inervação à camada muscular interna, e algumas vezes, para a muscular externa (Furness et al., 1990; Porter et al., 1999; Sanders & Smith, 1986). O plexo submucoso interno possui poucos neurônios que inervam as camadas musculares, mas possui muitos que inervam a mucosa (Porter et al., 1999).

Embora os plexos nervosos sejam descritos como entidades separadas, eles são de fato unidos por numerosos feixes nervosos. Auerbach (Auerbach, 1864) observou conexões entre a inervação extrínseca (nervo vago e mesentérico) e o plexo mientérico, e observou, também, conexões entre os plexos mientérico e submucoso. Drasch (Drasch, 1881) confirmou a conexão entre os plexos mientérico e submucoso, reconhecendo que as fibras do plexo submucoso realizavam a inervação a mucosa. 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 gástrico, do plexo submucoso, da camada muscular própria e lâmina própria (Krammer et al., 1993). Desta forma, esse marcador é utilizado para avaliação destes componentes do SNE em patologias que afligem o trato gastrointestinal, 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).

Décadas atrás, com o advento da microscopia eletrônica, os neurofilamentos (NFs), até então chamadas neurofibrilas (Smith & Guerin, 1950) passaram a ser conhecidos como membros de filamentos intermediários (IFs), interconectados com filamentos de actina e outros elementos fibrosos do citoesqueleto, para estabelecer uma rede regionalmente especializada que sofre renovação local excepcionalmente lenta, servem como uma plataforma de encaixe para organizar outras organelas e proteínas (Yuan et al, 2017).

A periferina (Pheriferin) é uma proteína IF tipo IV, expressa mais cedo no desenvolvimento do que os neurofilamentos triplos de proteínas (NFTPs) com cadeias leves, médias e pesadas. A periferina é um marcador de inclusão neuronal (Zhao et al., 2015) e vem sendo utilizada amplamente para análise morfométrica em estudos imuno-histoquímicos (Kramer et al, 2011; Jabari et al, 2012; Moreira et al, 2013).

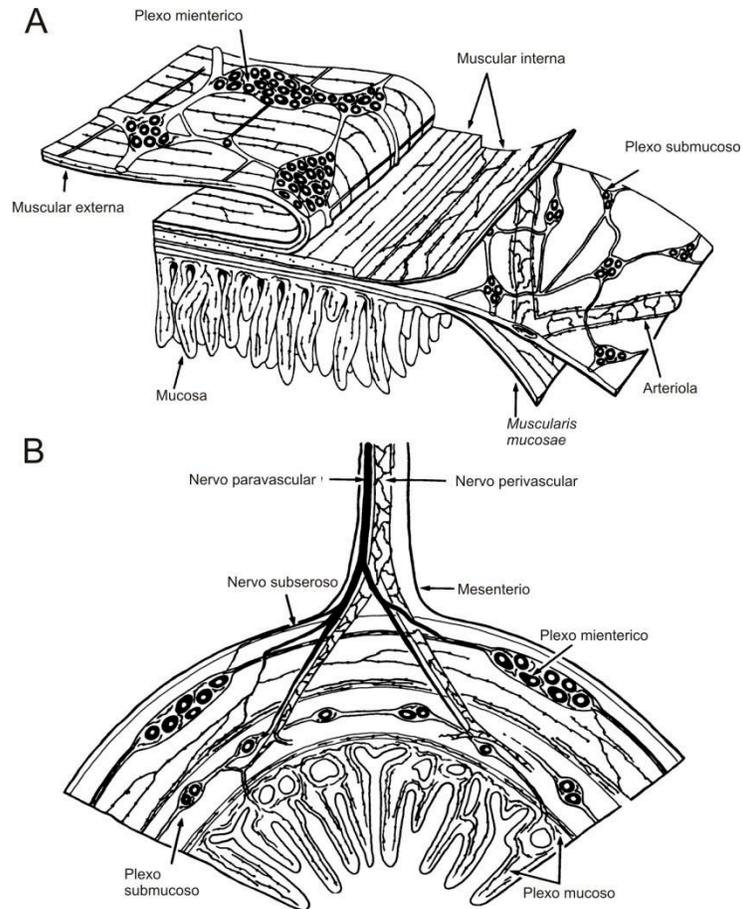


Imagem 1: Esquema do SNE observado em camadas (A) e em seção transversal (B). Existem dois plexos nervosos formados por gânglios; o plexo mientérico e o plexo submucoso, além das fibras nervosas que inervam as camadas musculares, a mucosa e as arteríolas intramurais. A inervação extrínseca tem acesso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

A regeneração neuronal demonstra se tratar de uma estratégia adaptativa de plasticidade neuronal (Lichtman, 1987). Várias linhas de investigação ajudaram a esclarecer o papel do GAP-43 (FI, B-50 ou neuromodulina) na regulação do estado de crescimento dos terminais dos axônios (Benowitz et al. 1997; Huang et al., 2015). GAP-43 é uma fosfoproteína presente em cones de crescimento neuronal e no terminal pré-sináptico, conhecidas como áreas de alta plasticidade (Strittmatter et al, 1981). A expressão da proteína é restrita ao sistema nervoso e é maior na primeira semana após o nascimento. A regulação da expressão do gene B-50 ocorre tanto no nível transcricional quanto pós-transcricional por mecanismos desconhecidos (Biewenga et al, 2007). A falha em expressar GAP-43 in vitro afeta o ciclo de regulação

celular e a diferenciação de precursores neuronais e estimula a apoptose neuronal (Mani et al. 2001). O GAP-43, expresso em precursores multipotentes, é necessário para o desenvolvimento celular apropriado, e a sua ausência afeta os astrócitos, bem como a diferenciação neuronal (Shen et al, 2004).

Em relação à plasticidade neuronal no sistema neural entérico, GAP-43 não mostrou qualquer positividade do corpo celular ganglionar dentro dos segmentos aganglionares; no entanto, segmentos aganglionares da lâmina própria foram positivos para coloração de fibra nervosa (Grynspan et al, 2012). Da Silveira (Da Silveira et al., 2008), avaliando a regeneração neuronal com o marcador GAP-43 nos plexos neuronais do cólon de pacientes chagásicos com e sem megacólon e de indivíduos não infectados, evidenciou intensa regeneração neuronal nos pacientes chagásicos sem mega.

Por suas ações efetivas nas atividades neuronais, as neurotrofinas são indicadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas dos sistemas nervoso central e periférico. Estratégias de administração desses fatores têm sido testadas experimentalmente, e a compreensão detalhada de suas ações no desenvolvimento, manutenção e regeneração de neurônios é essencial para validar seu uso como agente terapêutico (Terenghi, 1999; Whitworth et al., 1995). As alterações sofridas pela integração neuroimune tem sido alvo de pesquisas em diversas patologias que atingem o trato gastrointestinal. Na doença de Chagas, acreditamos que o estudo do sistema nervoso entérico, bem como sua associação com o processo inflamatório poderá fornecer subsídios para compreensão de alterações neuroimunes que possam estar de alguma forma envolvidas no desenvolvimento do mega.

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

No núcleo da rafe, principalmente na parte dorsal da medula espinhal e no hipotálamo, pode ocorrer a secreção de serotonina por diversos neurônios. 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 diarreia 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 urgência fecal (Grundy, 2008).

Receptores 5HT4 são mediadores de diversas respostas do trato gastrointestinal. 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 a redução da velocidade do trânsito, redução da secreção intestinal, aumento da complacência do cólon e influencia diretamente a intensidade de processos inflamatórios no trato gastrointestinal 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 receptação após serem liberados, ocasionando desta forma uma redução no processo inflamatório ocasionado pela constipação intestinal (Gershon, 2009).

JUSTIFICATIVA

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

Nossos estudos mais recentes têm como foco a relação entre a capacidade do SNE de reagir a agressões inflamatórias e as substâncias envolvidas nesse processo. Dentre eles, a expressão de serotonina nos chamou a atenção por estar diretamente ligada à intensidade do processo inflamatório dos pacientes chagásicos e pela apresentação clínica nestes. Assim nosso intuito nesse projeto foi verificar se havia relação com a expressão da serotonina com a capacidade regenerativa de nossos pacientes, o que de certa forma poderia justificar o quadro clínico e histopatológicos dos mesmos. Acreditamos que ao desvendarmos certos aspectos ligados ao estabelecimento e desenvolvimento do megacólon chagásico estaremos contribuindo não só para a aplicação de novas metodologias terapêuticas na doença de Chagas, mas sim em um amplo espectro de doenças que afligem o sistema digestivo, como doença de Chron, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável e doença de Hirschsprung.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar nos plexos do sistema nervoso entérico a expressão de serotonina nos corpos neuronais e sua relação com o marcador de regeneração GAP-43.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Avaliar através de imuno-histoquímica a expressão do marcador pan-neuronal Peripherin, o grau de desnervação nos plexos submucoso e mientérico em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados.

2 – Caracterizar a expressão de serotonina nos plexos submucoso e mientérico em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados.

3 – Caracterizar a expressão de GAP-43 nos plexos submucoso e mientérico em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados.

4 – Estabelecer associações entre a destruição neuronal, a expressão de serotonina e a capacidade regenerativa dos neurônios dos plexos nervosos do cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados.

METODOLOGIA

Pacientes

Nesse trabalho utilizamos amostras de tecidos de pacientes chagásicos portadores de megacólon e de indivíduos controle, coletados por cirurgia ou necropsia no Hospital Escola da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, pelo Dr. Ênio Oliveira, na década de 80 do século passado . Foi obtido consentimento prévio de todos os indivíduos, pais ou responsáveis para a inclusão de suas amostras cirúrgicas no trabalho de pesquisa. A utilização destas amostras com a finalidade de pesquisa científica foi previamente aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG), da Universidade de Erlangen-Nuremberg (Alemanha) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

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

GRUPOS ANALISADOS

<i>Casos estudados</i>	<i>Número</i>	<i>Média de Idade</i>
Indivíduos controle	10	56 ± 22 anos
Pacientes chagásicos não portadores de megacólon	15	53 ± 10 anos
Pacientes chagásicos portadores de megacólon	15	55 ± 11 anos

Tabela 1: Dados dos Pacientes

As amostras de tecidos foram transportadas em soro fisiológico sobre o gelo (pH 7,3) para o laboratório. Após sua chegada (1-6 h após a ressecção), as amostras são lavadas em solução Krebs, à temperatura ambiente e transferida para o meio de Dulbecco Eagle modificado (DME/F12-Ham, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, E.U.A.) contendo 10 mg/ml antibióticos/antimicóticos (Sigma), 50 lg/ml de gentamicina (Sigma), 2,5 lg/ml de anfotericina B (Sigma), 10% soro fetal bovino (Sigma), 4 1M nicardipina e 2,1 mg / ml NaHCO₃, selados em um compartimento com 95 % O₂ e 5% de CO₂ a 37 °C por 1-2 h. Posteriormente, os tecidos foram incubados por mais 2-5 h, no mesmo meio com 100 IM de colchicina adicionadas para aumentar a imunoreatividade do corpo neuronal. Para a fixação, as amostras foram clipadas na base de uma placa de Petri forradas de Sylgard, e transferidas para solução de formalina 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) à temperatura ambiente por 2-3 h. Após várias lavagens em 0,05 M Tris salina tamponada (TBS, pH 7,4), a camada muscular e plexos nervosos das amostras serão preparadas para a técnica de wholemounts. A presença da doença foi confirmada através de exames clínicos e laboratoriais (da Silveira *et al.*, 2005b).

Imuno-histoquímica

As amostras foram pré-incubadas por 2 h em TBS 0,05 M (pH 7,4) com 1% de albumina sérica bovina (BSA), 0,5% Triton X-100, 0,05% thimerosal e 5% de soro de cabra. Depois de um enxágue em TBS por 10 min, foram incubadas em uma solução contendo BSA, Triton X-100, thimerosal e os anticorpos primários por 72h (4°C). Depois de uma noite, as wholemounts foram lavadas em TBS a 4°C e em seguida os anticorpos secundários foram adicionados na mesma solução da mesma forma que os anticorpos primários (4h, temperatura ambiente), seguido por um banho em TBS (overnight; 4°C). Para reduzir a autofluorescência induzida por lipofuscina, as wholemounts foram incubadas em tampão de acetato de amônio (pH 5,0) contendo 1 mM CuSO₄ de 60 - 90 min seguido de um curto enxágue em H₂O destilada (Brehmer *et al.*, 2004). Posteriormente, as amostras foram montadas em TBS-glicerol (1:1, pH 8,6). Incubações das amostras em soluções sem os anticorpos primários (controles negativos) foram realizadas para o controle da reação.

Para a realização desses estudos, foi utilizado como marcadores: Anti-Peripherin como marcador neuronal primário; anti-Serotonina como marcador primário da expressão de serotonina; Anti-Gap43 como marcador de regeneração neuronal (tabela 2).

Anticorpo	Fonte	Código	Diluição
Anti-Periferina	INVITROGEN	A-21272	1:1000
Anti-Gap-43	SIGMA	G8043	1:500
Anti-Serotonina	Alomone Labs	19091	1:50

Tabela 2: Anticorpos primários

Para a análise morfométrica das áreas imunorreativas foram utilizados os anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 – espectro de cor vermelha para a Anti-Periferina; Alexa flúor 594 – espectro de cor verde para Anti-Gap-43; Alexa Fluor 647 – espectro de cor azul para a anti-Serotonina (tabela 3).

Anticorpo	Código / Fonte	Diluição
-----------	----------------	----------

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

Tabela 3: Anticorpos secundários

Aquisição de imagem dos gânglios

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

Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico Anova-One way, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos de pacientes. O nível de significância definido foi de $p < 0.05$ e todas as análises foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prim 3.0 (San Diego, CA). Foram calculadas a distribuição de frequências de todas as variáveis e as medidas de tendência central utilizando diversos parâmetros: média, mediana, percentis, desvio padrão. As associações entre a variável dependente e as independentes foram testadas através de técnicas de regressão bivariadas e multivariadas (regressão linear simples, múltipla ou regressão logística, segundo seja a característica da variável). Foram aceitos erros aleatórios ao nível de $p=0.05$ para o de tipo I e $p=0.2$ para o erro tipo II.

RESULTADOS

Avaliação da Inervação

A análise das amostras de pacientes não infectados pela doença de Chagas marcadas com Peripherin evidenciou gânglios neuronais preservados, com corpos neuronais de formato regular e sem processo inflamatório. A quantificação da área imunoreativa demonstrou que pacientes portadores de megacólon chagásico apresentam uma significativa diminuição na área imunorreativa enquanto pacientes chagásicos sem megacólon apresentaram uma área imunorreativa semelhante aos indivíduos não infectados (Figura 1 e gráfico 1).

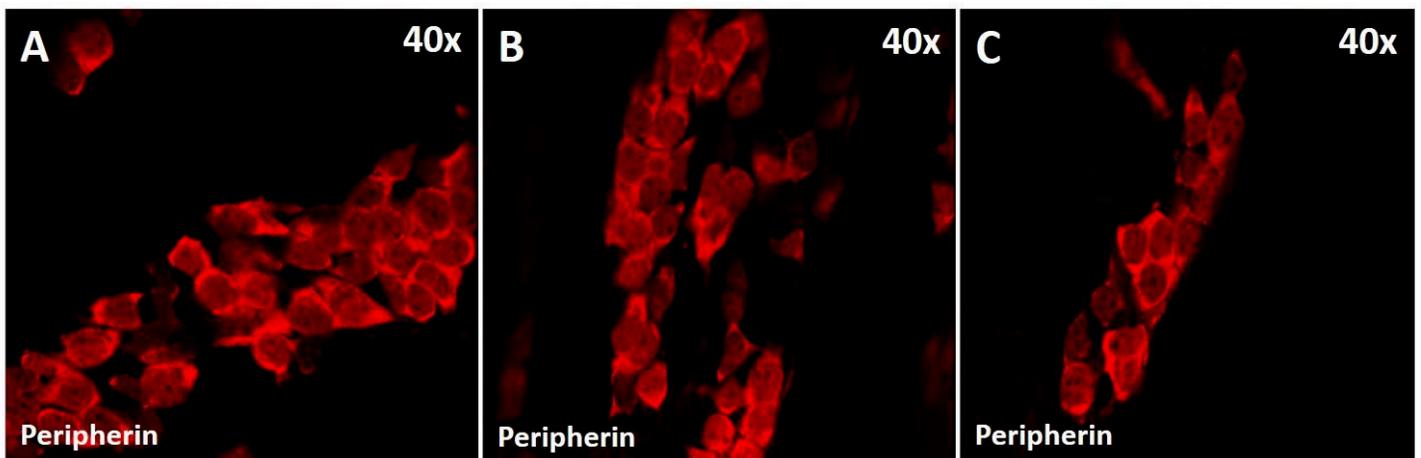


Figura 1: Marcação de Peripherin pela técnica de imunofluorescência. Indivíduos não infectados (A) apresentaram gânglios neuronais preservados com numerosos neurônios. Pacientes chagásicos não portadores de megacólon (B) demonstram neurônios e área imunorreativa similar aos indivíduos não infectados. Pacientes chagásicos portadores de megacólon (C) apresentaram significativa diminuição no número de neurônios nos gânglios neurais e na área imunorreativa de Periferina.

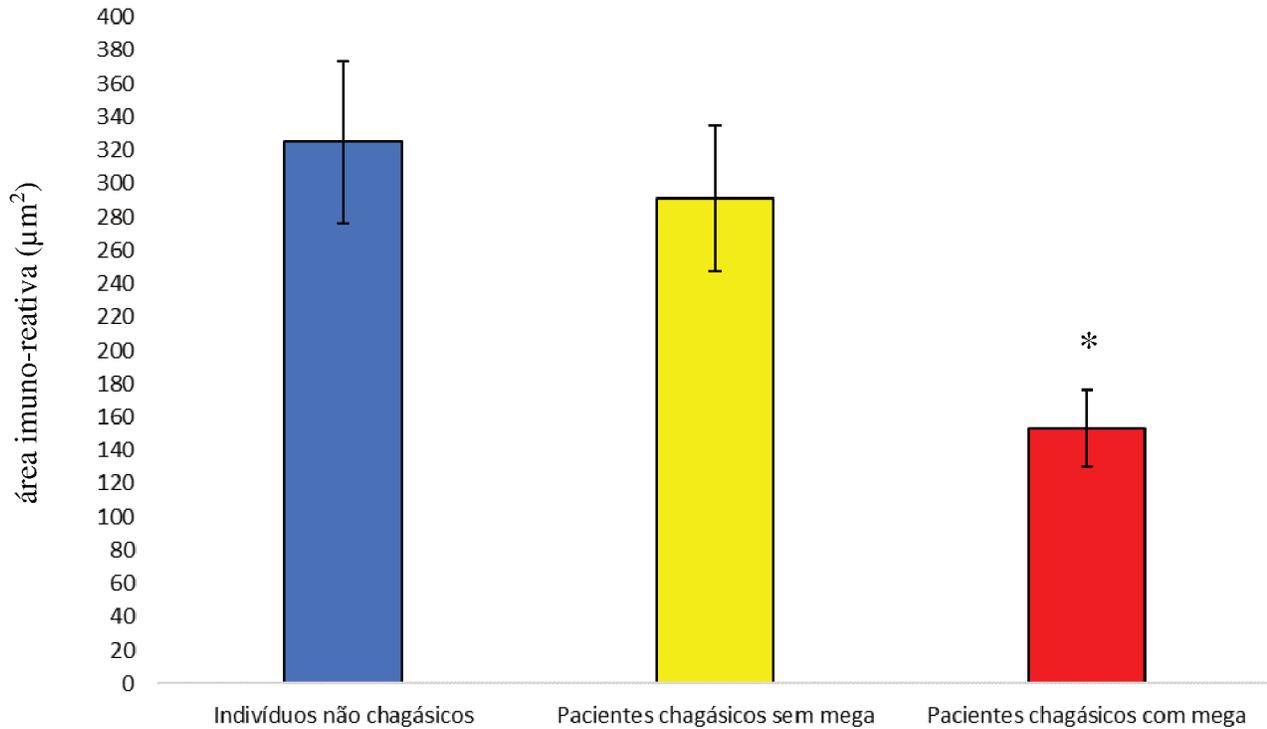


Gráfico 1: Análise morfométrica de neurônios do cólon marcados com Periferina imunoreativa. Indivíduos não infectados em cinza e indivíduos chagásicos com megacólon em branco. Os valores são expressos como média das áreas imunorreativas \pm Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significantes entre o grupo chagásico e o grupo não infectado. Foi analisada área total de 1066 μm^2 para todas as amostras ($p < 0.05$).

Análise da expressão de serotonina

Neste trabalho, foi estudada a expressão de serotonina nas amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. A análise dos resultados revelou que a expressão de serotonina está aumentada em pacientes chagásicos não portadores de megacólon quando comparados com indivíduos não infectados e quando comparado com o grupo de pacientes chagásicos portadores de megacólon (Gráfico 2). Além disso, observamos que os pacientes chagásicos portadores de megacólon apresentam uma intensa diminuição da expressão de serotonina quando comparado com os dois outros grupos de pacientes em todas as regiões analisadas, principalmente na região da mucosa intestinal, local este onde a maior parte da serotonina intestinal é produzida por células neuroendócrinas, e tem como destino, o lume intestinal (Figura 2).

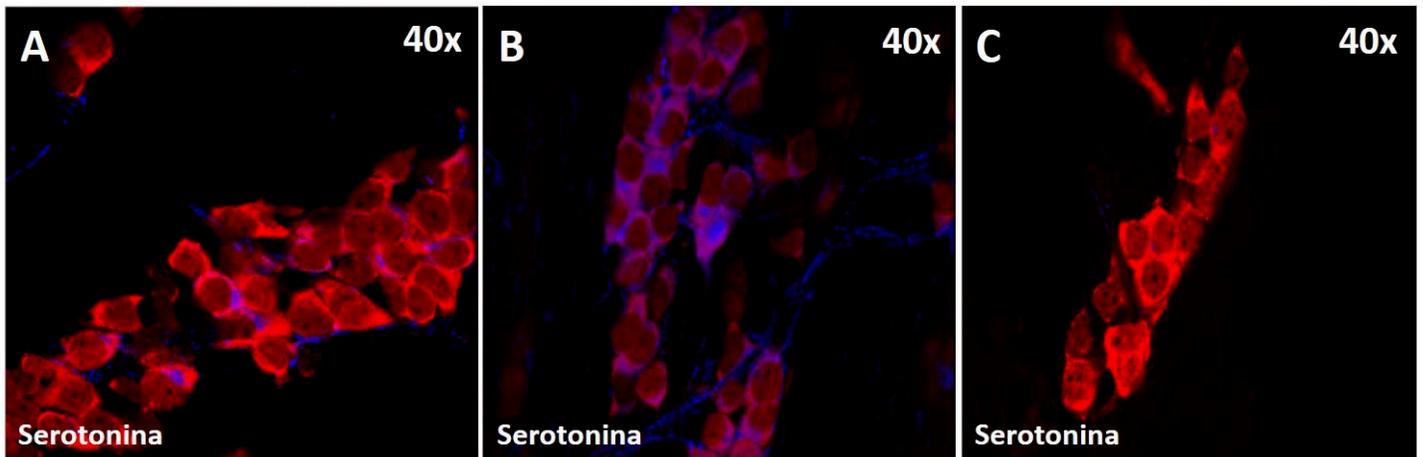


Figura 2: Marcação de Serotonina (azul) e Peripherin (vermelho) pela técnica de imunofluorescência. Indivíduos não infectados (A) apresentaram gânglios neuronais com quantidade moderada de serotonina próximo aos corpos neuronais. Pacientes chagásicos não portadores de megacólon (B) demonstram neurônios envoltos de grande quantidade de serotonina em relação aos outros grupos analisados. Pacientes chagásicos portadores de megacólon (C) apresentam significativa diminuição de serotonina em relação aos outros grupos estudados.

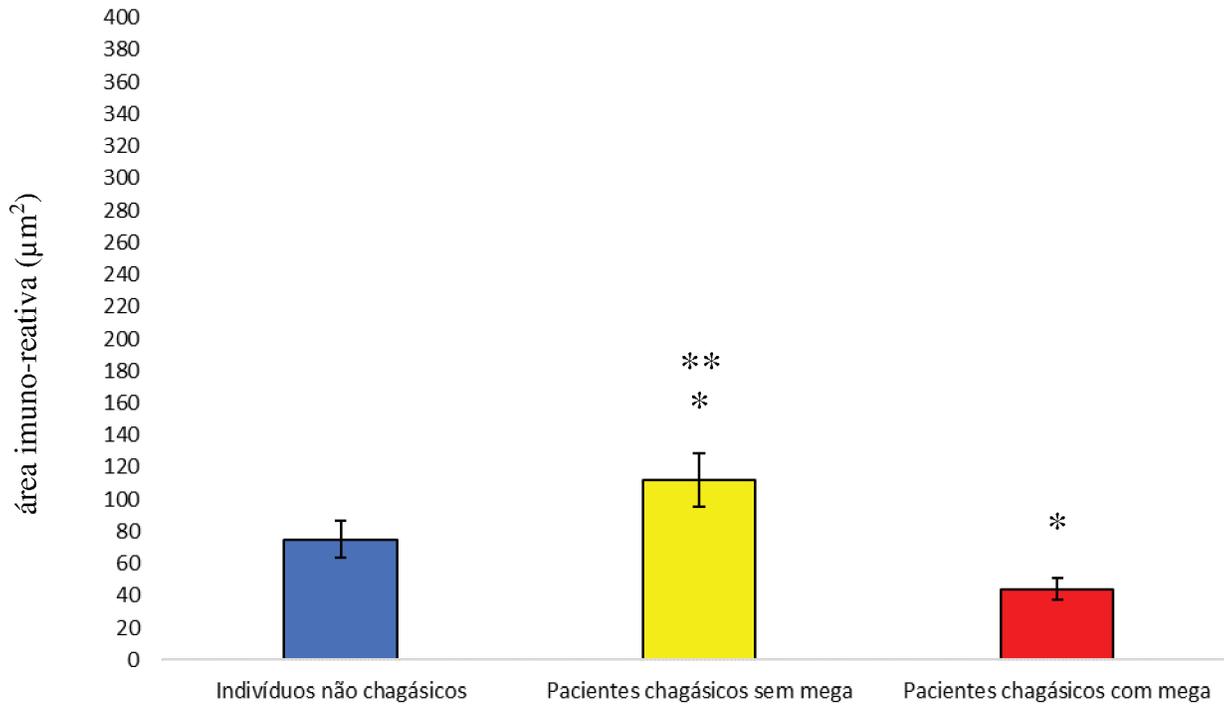


Gráfico 2: Análise morfométrica da área imunorreativa de Serotonina nas amostras de cólon. Os valores são expressos como média das áreas imunoreativas + Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significantes entre este grupo e o grupo não infectado. ** Diferenças estatisticamente significantes entre este grupo e o grupo de pacientes chagásicos portadores de megacólon. Foi analisada área total de 1066 µm² para todas as amostras ($p < 0.05$).

Análise da expressão de GAP-43

A expressão de GAP-43, proteína envolvida no processo de regeneração neuronal, apresentou padrão de distribuição semelhante ao da serotonina em nossas amostras de cólon. A análise dos resultados apontou que a expressão de GAP-43 está aumentada em pacientes chagásicos não portadores de megacólon quando comparados com indivíduos não infectados e principalmente quando comparado com o grupo de pacientes chagásicos portadores de megacólon (Figura 3). Os dados apontam um grande aumento de GAP-43 no grupo de pacientes chagásicos não portadores de megacólon em relação aos outros grupos, sugerindo um aumento da regeneração de corpos e terminais nervosos nesse grupo. Já os pacientes chagásicos portadores de megacólon apresentam pequena expressão do marcador GAP-43 nos seus plexos nervosos, refletindo uma baixa capacidade regenerativa dos pacientes deste grupo (Gráfico 3).

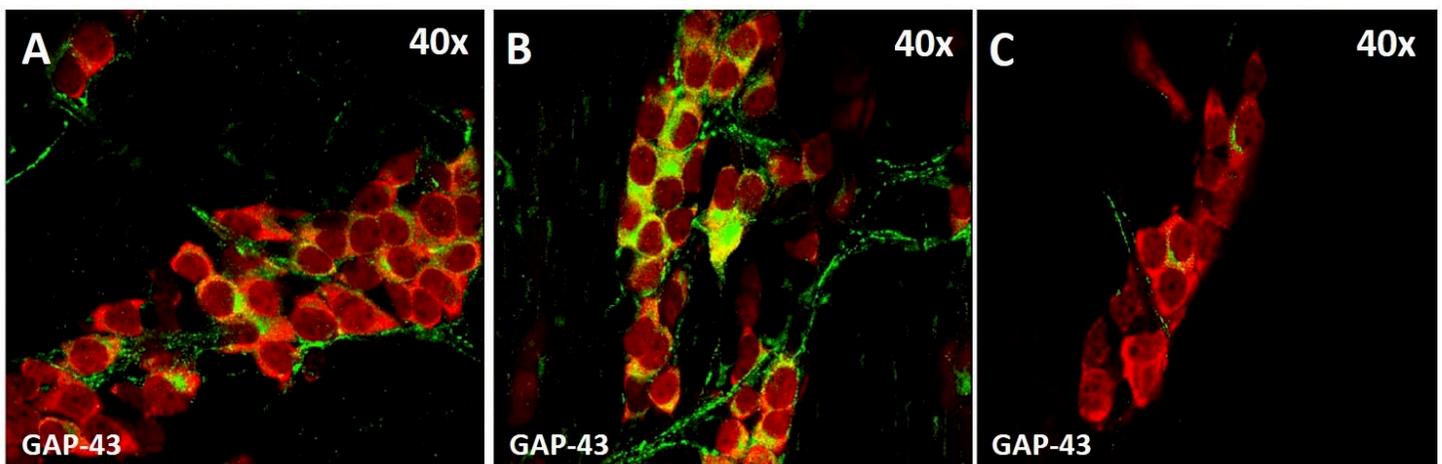


Figura 3: Marcação de GAP-43 (verde) e Peripherin (vermelho) pela técnica de imunofluorescência. Indivíduos não infectados (A) apresentaram gânglios neuronais envoltos de GAP-43, que pode ser observado também em prolongamentos axonais (seta). Pacientes chagásicos não portadores de megacólon (B) demonstram neurônios e prolongamentos neuronais expressando significativa quantidade de GAP-43 quando comparado aos outros grupos. Pacientes chagásicos portadores de megacólon (C) apresentam significativa diminuição tanto de corpos neuronais quanto da expressão de GAP-43 em relação aos outros grupos estudados.

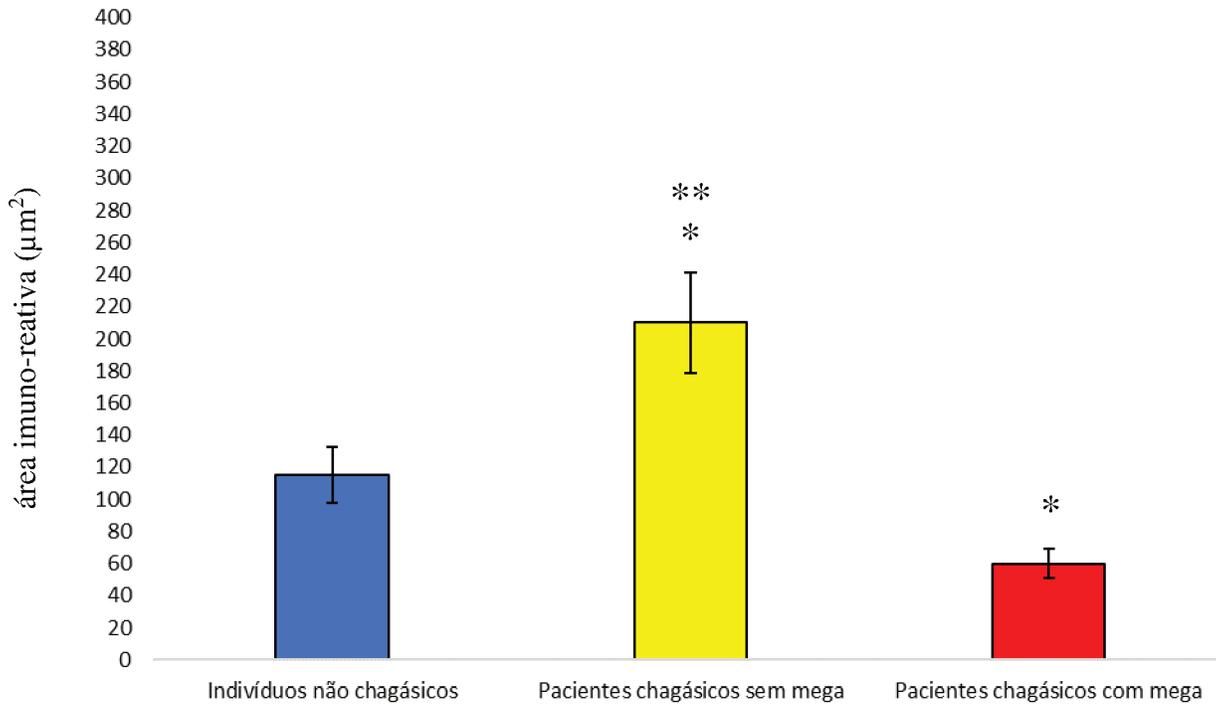


Gráfico 3: Análise morfométrica da área imunorreativa de GAP-43 nas amostras de cólon. Os valores são expressos como média das áreas imunorreativas + Desvio Padrão. * Diferenças estatisticamente significantes entre este grupo e o grupo não infectado. *** Diferenças estatisticamente significantes entre este grupo e o grupo de pacientes chagásicos portadores de megacólon. Foi analisada área total de 1066 µm² para todas as amostras (p < 0.05).

DISCUSSÃO

O megaesôfago e o megacólon são as alterações comuns no trato digestório de pacientes portadores da doença de Chagas (Koeberle, 1963). Atualmente, o processo de deservação dos plexos nervosos do trato gastrointestinal é aceito como a causa primordial para o desenvolvimento do megacólon chagásico (da Silveira *et al.*, 2007b; Koberle, 1970). A destruição neuronal na doença de Chagas na fase aguda ocorre pela grande concentração do parasito no tecido, porém, na fase crônica está também relacionada ao processo inflamatório envolvido nesta doença (da Silveira *et al.*, 2005a; da Silveira *et al.*, 2007c). A interrelação entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico é muito importante para a compreensão das patologias intestinais, podendo ser definitivo para determinação de manifestações clínicas e para o desenvolvimento de processos inflamatórios no intestino (Sato *et al.*, 2008).

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

Alguns trabalhos comprovaram a destruição neuronal no plexo mientérico de pacientes chagásicos e demonstraram uma relação com o processo inflamatório em porções do trato gastrintestinal (da Silveira *et al.*, 2007a; da Silveira *et al.*, 2005a; da Silveira *et al.*, 2007c). Posteriormente evidenciou-se que esta destruição neuronal poderia ser seletiva, ou seja, algumas das diferentes classes de neurônios seriam preferencialmente destruídas (da Silveira *et al.*, 2007b). Surge então o questionamento de qual a relação entre a expressão de serotonina e o processo regenerativo

dos neurônios do Sistema Nervoso Entérico em grupos de pacientes chagásicos e de indivíduos não infectados pela doença de Chagas.

Assim, este estudo, no intuito de esclarecer os processos que circundam a destruição do sistema nervoso entérico nos pacientes chagásicos, avaliou a regeneração neuronal e a relação desse processo com a expressão de serotonina em pacientes chagásicos.

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

Além disto, foi observado que pacientes chagásicos não portadores de megacólon parecem apresentar uma melhor capacidade de defesa contra a infecção pelo *T. cruzi*. Fazemos essa observação por vários motivos: É um grupo de paciente que segundo estudos anteriores apresenta uma melhor modulação do processo inflamatório presente no cólon em relação aos pacientes portadores de megacólon e apresentando um perfil imune muito semelhante a indivíduos não infectados (da Silveira *et al.*, 2007a; da Silveira *et al.*, 2009; da Silveira *et al.*, 2007c). Pacientes chagásicos sem megacólon são capazes de manter a concentração de parasitas nos tecidos a níveis mínimos ou mesmo indetectáveis no trato gastrointestinal (Vago *et al.*, 1996a; Vago *et al.*, 1996b; Vago *et al.*, 2003). Em vários estudos, esse grupo de pacientes apresentou além da ausência de alterações clínicas, uma maior expressão de serotonina e seus receptores (de Freitas *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2019; Kannen *et al.*, 2018).

No sistema nervoso autônomo, especialmente no sistema nervoso entérico, GAP-43 é fortemente expresso nos gânglios mientéricos e submucoso em indivíduos de todas as idades, dando assim provas da capacidade do sistema nervoso entérico em se adaptar às mudanças que ocorrem ao longo da vida (Giaroni *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 1992). Os resultados desse presente trabalho mostram que a maior expressão de serotonina vem acompanhada de uma maior capacidade regenerativa desses pacientes, sendo essa mostrada pela elevada expressão de GAP-43 no grupo de pacientes chagásicos não portadores de megacólon. Esse dado poderia explicar o motivo pelo qual esses pacientes se mantêm clinicamente sem alterações.

Estudos prévios que avaliaram as alterações do sistema nervoso entérico de pacientes chagásicos portadores e não portadores de mega, demonstraram que pacientes chagásicos sem o megacólon apresentaram mínimas alterações nos componentes neuronais em relação aos outros grupos estudados (da Silveira *et al.*, 2005a; da Silveira *et al.*, 2007b; da Silveira *et al.*, 2008).

Ademais, esse grupo de pacientes apresentou uma maior taxa de expressão de neurotrofinas (dados ainda não publicados) em seus plexos nervosos, o que poderia ser um dos fatores que representaria um ambiente favorável para a regeneração neuronal, melhor funcionamento dos gânglios nervosos e conseqüentemente manutenção do funcionamento do trato gastrointestinal (Oliveira *et al.*, 2017).

Os resultados desse trabalho corroboram com observações clínicas que indicam a perda da capacidade de relaxamento das camadas musculares do cólon em pacientes chagásicos que desenvolvem o megacólon. Esta perda produz alterações na motilidade do cólon levando ao acúmulo de fezes, intensificação do processo inflamatório devido a destruição e células comprimidas e pela falta de

irrigação sanguínea adequada, o que conseqüentemente leva à dilatação do órgão. Assim, nossos resultados explicariam as causas dos sintomas mais comuns no megacólon chagásico, como a incoordenação do segmento reto-sigmóide, hiperatividade de estímulos colinérgicos e acalasia do esfíncter anal interno (de Rezende, 1979).

A complementação destes resultados virá de trabalhos posteriores que tenham como objetivo a caracterização dos efeitos e das células produtoras de neurotrofinas, o que permitirá conhecer as condições exatas que promovem o processo de regeneração neuronal. Além disto, acreditamos que estes dados possam ajudar na compreensão e prevenção não somente da forma digestiva da doença de Chagas, mas também de outras patologias que atingem o trato gastrointestinal.

CONCLUSÃO

Após a análise morfométrica das áreas imunorreativas para Peripherin, Serotonina e Gap-43, os dados encontrados atestam que:

- 1) Pacientes chagásicos sem megacólon apresentaram o sistema nervoso entérico estruturalmente e funcionalmente semelhante a indivíduos não infectados.
- 2) A expressão de serotonina e de GAP-43 é expressivamente maior no grupo de pacientes chagásicos não portadores de megacólon em relação aos outros pacientes.
- 3) Pacientes chagásicos portadores de megacólon apresentam uma importante diminuição de neurônios nos plexos neurais do cólon.
- 4) Pacientes portadores de megacólon chagásico demonstram diminuição da expressão de serotonina e de GAP-43 nos plexos do sistema nervoso entérico.

Esses resultados estatisticamente significantes caracterizam a relação entre a expressão de serotonina e o processo regenerativo em neurônios do sistema nervoso entérico em pacientes portadores de megacólon.

O aumento da área imunorreativa de serotonina e de GAP-43 em pacientes chagásicos não portadores de megacólon, e conseqüente aumento no processo regenerativo, evidencia a tentativa do organismo em compensar a perda neuronal e ainda demonstra a íntima relação entre o aumento da expressão de serotonina e a tentativa de proteção do sistema nervoso entérico diante da infecção pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento do mega chagásico. Assim esses dados sugerem que fármacos que induzam o aumento da biodisponibilidade de serotonina no cólon chagásico, poderia induzir o aumento da expressão de GAP-43 e reduzir a destruição dos neurônios entéricos e/ou aumentar sua capacidade de regeneração, retardando ou evitando a instalação do megacólon chagásico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adad, S. J., Cancado, C. G., Etchebehere, R. M., Teixeira, V. P., Gomes, U. A., Chapadeiro, E. and Lopes, E. R.** (2001). Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch*, **438**, 254-258.
- Almeida, H. O., Teixeira, V. P., Gobbi, H., Rocha, A. and Brandao, M. C.** (1984). [Inflammation associated with cardiac muscle cells parasitized by *Trypanosoma cruzi*, in chronic Chagas' disease patients]. *Arq Bras Cardiol*, **42**, 183-186.
- Andrade, S. G., & Andrade, Z. A.** (1966). Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach. (Estudo experimental em camundongos) [Chagas' disease and neuron changes in Auerbach's plexus. (Experimental study in mice)]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **8**(5), 219-224.
- Andrade, Z. A., & Andrade, S. G.** (1969). Estudo imunocitoquímico da doença de chagas experimental [Immunochemical study of experimental Chagas' disease]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **11**(1), 44-47.
- Arantes, R. M., Marche, H. H., Bahia, M. T., Cunha, F. Q., Rossi, M. A., & Silva, J. S.** (2004). Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *The American journal of pathology*, **164**(4), 1361-1368. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63222-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63222-1)
- Auerbach L** (1862) Ueber einen Plexus myentericus, einen bisher unbekanntem ganglio-nervo'sen Apparat im Darmkanal der Wirbelthiere. Morgenstern, Breslau, pp 1-13
- Auerbach L** (1864). Fernere vorläufige Mitteilung auber den Nervenapparat des Darmes. Archiv fur pathologische anatomie und physiologie und fur klinische medizine, **30**, p. 457-460
- Benowitz, L. I., & Routtenberg, A.** (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in neurosciences*, **20**(2), 84-91. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(96\)10072-2](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(96)10072-2)
- Billroth T** (1858). Einige Beobachtungen u'ber das ausgedehnte Vorkommen von Nerven Anastomosen im Tractus intestinalis. Arch Anat Physiol (Leipzig):148-158
- Biewenga, J. E., Schrama, L. H., & Gispen, W. H.** (1996). Presynaptic phosphoprotein B-50/GAP-43 in neuronal and synaptic plasticity. *Acta biochimica Polonica*, **43**(2), 327-338.
- Brehmer, A., Blaser, B., Seitz, G., Schrod, F. and Neuhuber, W.** (2004). Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. *Histochem Cell Biol*, **121**, 13-20.
- Brener Z.** (1982). Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bulletin of the World Health Organization*, **60**(4), 463-473.
- Campos, J. V. and Tafuri, W. L.** (1973). Chagas enteropathy. *Gut*, **14**, 910-919.
- Chagas, C.** (1916). Processos patogênicos da tripanosomíase americana. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **8**, 5-37.
- Corbett, C. E., Ribeiro, U., Jr., Prianti, M. G., Habr-Gama, A., Okumura, M. and Gama-Rodrigues, J.** (2001). Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum*, **44**, 993-998.
- Costa, P. C., Fortes, F. S., Machado, A. B., Almeida, N. A., Olivares, E. L., Cabral, P. R., Pedrosa, R. C., Goldenberg, R. C., Campos-De-Carvalho, A. C., & Masuda, M. O.** (2000). Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, **33**(4), 439-446. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2000000400010>

- Crowell M. D.** (2004). Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *British journal of pharmacology*, *141*(8), 1285–1293. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705762>
- Cruvinel Wde, M., Mesquita, D., Jr., Araujo, J. A., Catelan, T. T., de Souza, A. W., da Silva, N. P. and Andrade, L. E.** (2010). Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol*, *50*, 434-461.
- da Silveira, A. B., Arantes, R. M., Vago, A. R., Lemos, E. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R. and D'Avila Reis, D.** (2005a). Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology*, *131*, 627-634.
- da Silveira, A. B. M., Arantes, R. M. E., Vago, A. R., Lemos, E. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R. and D'Avila Reis, D.** (2005b). Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology*, *131*, 627-634.
- da Silveira, A. B., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R., Furness, J. B. and D'Avila Reis, D.** (2007a). Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology*, *134*, 789-796.
- da Silveira, A. B., D'Avila Reis, D., de Oliveira, E. C., Neto, S. G., Luquetti, A. O., Poole, D., Correa-Oliveira, R. and Furness, J. B.** (2007b). Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Dig Dis Sci*, *52*, 2877-2883.
- da Silveira, A. B., Lemos, E. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R., Furness, J. B. and D'Avila Reis, D.** (2007c). Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol*, *38*, 1256-1264.
- da Silveira, A. B., Freitas, M. A., de Oliveira, E. C., Neto, S. G., Luquetti, A. O., Furness, J. B., Correa-Oliveira, R. and d'Avila Reis, D.** (2008). Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology*, *135*, 1337-1342.
- 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. and Correa-Oliveira, R.** (2009). Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol*, *70*, 65-67.
- Daryani, A., Hosseini, A. Z. and Dalimi, A.** (2003). Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Veterinary parasitology*, *113*, 123-134.
- de Freitas, M. A., de Oliveira, E. C., de Oliveira, F. C., Jabari, S., Brehmer, A. and da Silveira, A. B.** (2015). Is the increased presence of CD8 T-lymphocytes related to serotonin levels in Chagas disease? *Colorectal Dis*, *17*, 268-269. doi: 10.1111/codi.12907.
- de Oliveira, J. A., Freitas, M. A. R., de Oliveira, E. C., Jabari, S., Brehmer, A. and da Silveira, A. B. M.** (2019). 5-HT_{3A} serotonin receptor in the gastrointestinal tract: the link between immune system and enteric nervous system in the digestive form of Chagas disease. *Parasitol Res*, *118*, 1325-1329. doi: 10.1007/s00436-019-06241-w.
- de Rezende, J.M. & Rassi, A.** (1958). Comprometimento do esôfago na moléstia de Chagas; megaesôfago e cardiopatia [Involvement of the esophagus in Chagas' disease; megaesophagus & cardiopathy]. *Hospital (Rio de Janeiro, Brazil)*, *53*(1), 1–15.
- de Rezende, J. M.** (1979). [Chagas disease of the digestive tract (author's transl)]. *Rev Med Chil*, *107*, 71-72.
- Dias, J. C.** (1996). Tropical diseases and the gender approach. *Bull Pan Am Health Organ*, *30*, 242-260.

- Dias, J. C.** (2011). Os primórdios do controle da doença de Chagas (em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento) [The beginning of Chagas disease control (homage to Dr. Emmanuel Dias, the pioneer of Chagas disease control, in the year of his birth centenary)]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *44 Suppl 2*, 12–18. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822011000800003>
- Dutra, W. O., Menezes, C. A., Villani, F. N., da Costa, G. C., da Silveira, A. B., Reis, D. and Gollob, K. J.** (2009). Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104 Suppl 1**, 208-218.
- Drash, O.** (1881). Beitrage zur Kenntinis des feineren Baues des Dunndarmes, insbesondere Auber die nerven desselben. Sitz Ber Akad Wiss, 82, p. 168-198 *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104 Suppl 1**, 208-218.
- Furness, J. B., Bornstein, J. C., & Smith, T. K.** (1990). The normal structure of gastrointestinal innervation. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *5 Suppl 1*, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1990.tb01777.x>
- Gabella G.** (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience*, *6*(3), 425–436. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90135-4).
- Gabella, G., & Trigg, P.** (1984). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *Journal of neurocytology*, *13*(1),49–71. <https://doi.org/10.1007/BF01148318>
- Gershon, M. D.** (1981). Properties and development of peripheral serotonergic neurons. *Journal de physiologie*, *77*(2-3), 257–265.
- Gershon, M. D.** (1982). Serotonergic neurotransmission in the gut. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, *71*, 26–41.
- Gershon M. D.** (2000). 5-HT (serotonin) physiology and related drugs. *Current opinion in gastroenterology*, *16*(2), 113–120. <https://doi.org/10.1097/00001574-200003000-00004>
- Gershon M. D.** (2009). Enteric serotonergic neurones ... finally!. *The Journal of physiology*, *587*(3), 507. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.167676>
- Giaroni, C., De Ponti, F., Cosentino, M., Lecchini, S. and Frigo, G.** (1999). Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology*, **117**, 1438-1458.
- Grundy D.** (2008). 5-HT system in the gut: roles in the regulation of visceral sensitivity and motor functions. *European review for medical and pharmacological sciences*, *12 Suppl 1*, 63–67.
- Gomes, Y. M.** (1997). PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. *Applied biochemistry and biotechnology*, **66**, 107-119.
- Goniaew, K.** (1875). Die nerven des nahrungsschlauches. *Archiv fur Mikroskopische Anatomie*, v. 11, p. 479-496.
- Grundy D.** (2008). 5-HT system in the gut: roles in the regulation of visceral sensitivity and motor functions. *European review for medical and pharmacological sciences*, *12 Suppl 1*, 63–67.
- Grynspan, D., Giassi, A. C., Cadonic, R., Bettolli, M., Schock, S. C., Perozzo, A., & Staines, W. A.** (2012). Growth-associated Protein-43 (GAP-43) Expression In Ganglionic and Aganglionic Colon. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, Advance online publication. <https://doi.org/10.2350/12-06-1213-OA.1>
- Gunn, M.** (1968). Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *Journal of anatomy*, *102*(Pt 2), 223–239.

- Henle, J.** (1871). Handbuch der systematischen anatomie des menschen. Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn, v. 2. Braunschweig.
- Hoyle, C. H., & Burnstock, G.** (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *Journal of anatomy*, *166*, 7–22.
- Higuchi Mde, L., Gutierrez, P. S., Aiello, V. D., Palomino, S., Bocchi, E., Kalil, J., Bellotti, G. and Pileggi, F.** (1993). Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, *423*, 157-160.
- Hoyle CH, Burnstock G.** Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat.* 1989;166:7-22.
- Jabari, S., da Silveira, A. B., de Oliveira, E. C., Neto, S. G., Quint, K., Neuhuber, W., & Brehmer, A.** (2012). Selective survival of calretinin- and vasoactive-intestinal-peptide-containing nerve elements in human chagasic submucosa and mucosa. *Cell and tissue research*, *349*(2), 473–481. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1406-8>
- Kadowaki, M., Wang, X. O., Shimatani, H., Yoneda, S., & Takaki, M.** (2002). 5-HT4 receptor enhances the propulsive power of the peristaltic reflex in the rat distal colon. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, *99*(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/s1566-0702\(02\)00063-2](https://doi.org/10.1016/s1566-0702(02)00063-2)
- Kannen, V., Sakita, J. Y., Carneiro, Z. A., Bader, M., Alenina, N., Teixeira, R. R., de Oliveira, E. C., Brunaldi, M. O., Gasparotto, B., Sartori, D. C., Fernandes, C. R., Silva, J. S., Andrade, M. V., Silva, W. A., Jr., Uyemura, S. A. and Garcia, S. B.** (2018). Mast Cells and Serotonin Synthesis Modulate Chagas Disease in the Colon: Clinical and Experimental Evidence. *Dig Dis Sci*, *63*, 1473-1484. doi: 10.1007/s10620-018-5015-6.
- Köberle F.** (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Advances in parasitology*, *6*, 63–116. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60472-8](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60472-8)
- Koberle, F.** (1970). The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. *Bull World Health Organ*, *42*, 739-743.
- Koeberle, F.** (1963). Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas Disease. *Gut*, *4*, 399-405.
- Krammer, H. J., Karahan, S. T., Rumpel, E., Klinger, M., & Kühnel, W.** (1993). Immunohistochemical visualization of the enteric nervous system using antibodies against protein gene product (PGP) 9.5. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, *175*(4), 321–325. [https://doi.org/10.1016/s0940-9602\(11\)80029-4](https://doi.org/10.1016/s0940-9602(11)80029-4)
- Kramer, K., da Silveira, A. B., Jabari, S., Kressel, M., Raab, M., & Brehmer, A.** (2011). Quantitative evaluation of neurons in the mucosal plexus of adult human intestines. *Histochemistry and cell biology*, *136*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0807-1>
- Kulkarni-Narla, A., Beitz, A. J., & Brown, D. R.** (1999). Catecholaminergic, cholinergic and peptidergic innervation of gut-associated lymphoid tissue in porcine jejunum and ileum. *Cell and tissue research*, *298*(2), 275–286. <https://doi.org/10.1007/s004419900096>
- Mani, S., Shen, Y., Schaefer, J., & Meiri, K. F.** (2001). Failure to express GAP-43 during neurogenesis affects cell cycle regulation and differentiation of neural precursors and stimulates apoptosis of neurons. *Molecular and cellular neurosciences*, *17*(1), 54–66. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0931>
- Marin Neto, J. A., Gallo, L., Jr, Manco, J. C., Rassi, A., & Amorim, D. S.** (1980). Mechanisms of tachycardia on standing: studies in normal individuals and in chronic Chagas' heart patients. *Cardiovascular research*, *14*(9), 541–550. <https://doi.org/10.1093/cvr/14.9.541>
- MacQueen, G., Marshall, J., Perdue, M., Siegel, S. and Bienenstock, J.** (1989). Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science*, *243*, 83-85.

- McMillin, D. L., Richards, D. G., Mein, E. A., & Nelson, C. D.** (1999). The abdominal brain and enteric nervous system. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, *5*(6), 575–586. <https://doi.org/10.1089/acm.1999.5.575>
- McKay, D. M., Bienenstock, J. and Perdue, M. H.** (1993). Inhibition of antigen-induced secretion in the rat jejunum by interferon alpha/beta. *Reg Immunol*, *5*, 53-59.
- McKay, D. M. and Perdue, M. H.** (1993). Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. Cells and mediators (1). *Dig Dis Sci*, *38*, 1377-1387.
- Meissner G** (1857). Ueber die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F* *8*:364–366
- Meyrat, B. J., Lesbros, Y., & Laurini, R. N.** (2001). Assessment of the colon innervation with serial biopsies above the aganglionic zone before the pull-through procedure in Hirschsprung's disease. *Pediatric surgery international*, *17*(2-3), 129–135. <https://doi.org/10.1007/s003830000507>
- Molina, H. A. and Kierszenbaum, F.** (1987). A study of human myocardial tissue in Chagas' disease: distribution and frequency of inflammatory cell types. *Int J Parasitol*, *17*, 1297-1305.
- Molina, H. A. and Kierszenbaum, F.** (1988a). Immunohistochemical detection of deposits of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil peroxidase in the myocardium of patients with Chagas' disease. *Immunology*, *64*, 725-731.
- Molina, H. A. and Kierszenbaum, F.** (1988b). Kinetics of development of inflammatory lesions in myocardial and skeletal muscle in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol*, *74*, 370-374.
- Molina, H. A. and Kierszenbaum, F.** (1989a). Eosinophil activation in acute and chronic chagasic myocardial lesions and deposition of toxic eosinophil granule proteins on heart myofibers. *J Parasitol*, *75*, 129-133.
- Molina, H. A. and Kierszenbaum, F.** (1989b). Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. *Immunology*, *66*, 289-295.
- Moreira, M. D., Brehmer, A., de Oliveira, E. C., Neto, S. G., Luquetti, A. O., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., de Freitas, M. A., & da Silveira, A. B.** (2013). Regenerative process evaluation of neuronal subclasses in chagasic patients with megacolon. *Human immunology*, *74*(2), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.012>
- Nemeth, L., & Puri, P.** (2000). The innervation of human bowel mucosa and its alterations in Hirschsprung's disease using a whole-mount preparation technique. *Pediatric surgery international*, *16*(4), 277–281. <https://doi.org/10.1007/s003830050744>
- Oliveira, N. K., Ferreira, R. N., Lopes, S. D. N., Chiari, E., Camargos, E. and Martinelli, P. M.** (2017). Cardiac autonomic denervation and expression of neurotrophins (NGF and BDNF) and their receptors during experimental Chagas disease. *Growth Factors*, *35*, 161-170. doi: 10.1080/08977194.2017.1395420.
- Porter, A. J., Wattchow, D. A., Brookes, S. J., & Costa, M.** (1999). Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *14*(12), 1180–1187. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.1999.02026.x>
- Powley T. L.** (2000a). Vagal circuitry mediating cephalic-phase responses to food. *Appetite*, *34*(2), 184–188. <https://doi.org/10.1006/appe.1999.0279>
- Powley T. L.** (2000b). Vagal input to the enteric nervous system. *Gut*, *47 Suppl 4*(Suppl 4), iv30–iv36. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv30
- Prata A.** (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infectious diseases*, *1*(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)

- Reis, D. D., Jones, E. M., Tostes, S., Jr., Lopes, E. R., Gazzinelli, G., Colley, D. G. and McCurley, T. L.** (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*, **48**, 637-644.
- Remak R (1837)**: Weitere mikroskopische Beobachtungen über die Primitivfasern des Nervensystems der Wirbelthiere. *Froriep's Notizen* 3: 36–41.
- Remak R (1838)**: Observationes anatomicae et microscopicae de Systematis nervosi structura. Berolini, Sumtibus et formis Reimerianis.
- Richardson K. C.** (1958). Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *The American journal of anatomy*, *103*(1), 99–135. <https://doi.org/10.1002/aja.1001030105>.
- Sanders, K. M., & Smith, T. K.** (1986). Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. *The Journal of physiology*, *380*, 293–310. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016286>.
- Sato, H., Leo, N., Katakai, Y., Takano, J., Akari, H., Nakamura, S. and Une, Y.** (2008). Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *minasense* in the peripheral blood of small neotropical primates after a quarantine period. *J Parasitol*, **94**, 1128–1138.
- Scheuermann, D. W., Stach, W., & Timmermans, J. P.** (1987). Topography, architecture and structure of the plexus submucosus externus (Schabadasch) of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. *Acta anatomica*, *129*(2), 105–115. <https://doi.org/10.1159/000146384>
- Sikander, A., Rana, S. V., & Prasad, K. K.** (2009). Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *403*(1-2), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.01.028>
- Shen, Y., Mani, S., & Meiri, K. F.** (2004). Failure to express GAP-43 leads to disruption of a multipotent precursor and inhibits astrocyte differentiation. *Molecular and cellular neurosciences*, *26*(3), 390–405. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.03.004>
- Stewart, H. J., Cowen, T., Curtis, R., Wilkin, G. P., Mirsky, R. and Jessen, K. R.** (1992). GAP-43 immunoreactivity is widespread in the autonomic neurons and sensory neurons of the rat. *Neuroscience*, **47**, 673-684.
- Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Vartanian, T., Sudo, Y., Zuber, M. X., & Fishman, M. C.** (1991). Growth cone transduction: Go and GAP-43. *Journal of cell science. Supplement*, *15*, 27–33. https://doi.org/10.1242/jcs.1991.supplement_15.
- Tafuri, W. L.** (1970). Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. *Am J Trop Med Hyg*, **19**, 405-417.
- Tafuri, W. L.** (1971). Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*, **354**, 136-149.
- Tafuri, W. L.** (1987). [Pathogenesis of Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **29**, 194-199.
- Tafuri, W. L. and Brener, Z.** (1967). [Injuries of Meissner and Auerback plexus of albino mice intestines in the chronic phase of experimental trypanosomiasis cruzi]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **9**, 149-154.
- Tafuri, W. L., Maria, T. A. and Lopes, E. R.** (1971). [Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **13**, 76-91.

- Terenghi G.** (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *Journal of anatomy*, 194 (Pt 1)(Pt 1), 1–14. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19410001.x>
- Timmermans, J. P., Scheuermann, D. W., Stach, W., Adriaensen, D., & De Groodt-Lasseel, M. H.** (1990). Distinct distribution of CGRP-, enkephalin-, galanin-, neuromedin U-, neuropeptide Y-, somatostatin-, substance P-, VIP- and serotonin-containing neurons in the two submucosal ganglionic neural networks of the porcine small intestine. *Cell and tissue research*, 260(2), 367–379. <https://doi.org/10.1007/BF00318639>
- Timmermans, J. P., Markwald, R. R., & Litke, L. L.** (2001). Introduction to the special issue "the enteric nervous system and its targets". *The Anatomical record*, 262(1), I. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<::AID-AR1029>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<::AID-AR1029>3.0.CO;2-Z)
- Vago, A. R., Macedo, A. M., Adad, S. J., Reis, D. D. and Correa-Oliveira, R.** (1996a). PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 348, 891-892.
- Vago, A. R., Macedo, A. M., Oliveira, R. P., Andrade, L. O., Chiari, E., Galvao, L. M., Reis, D., Pereira, M. E., Simpson, A. J., Tostes, S. and Pena, S. D.** (1996b). Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*, 149, 2153-2159.
- Vago, A. R., Silva, D. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R. and d'Avila Reis, D.** (2003). Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97, 308-309.
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A.** (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(4), a018309. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018309>
- Whitworth, I. H., Brown, R. A., Doré, C., Green, C. J., & Terenghi, G.** (1995). Orientated mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair. *Journal of hand surgery (Edinburgh, Scotland)*, 20(4), 429–436. [https://doi.org/10.1016/s0266-7681\(05\)80148-2](https://doi.org/10.1016/s0266-7681(05)80148-2)
- Zhao, J., & Liem, R. K.** (2016). α -Internexin and Peripherin: Expression, Assembly, Functions, and Roles in Disease. *Methods in enzymology*, 568, 477–507. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.09.012>