

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO
POLIPEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E SUBSTÂNCIA P
NA PATOLOGIA DO MEGAESÔFAGO INDUZIDO PELA
INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi***

Rodolfo Duarte Nascimento

**Belo Horizonte
2013**

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO
POLIPEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E SUBSTÂNCIA P
NA PATOLOGIA DO MEGAESÔFAGO INDUZIDO PELA
INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi***

Rodolfo Duarte Nascimento

**Tese apresentada à Pós-Graduação de
Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção
do Título de Doutor.**

Orientadora: Dra Débora d'Ávila Reis

**ICB – UFMG
Belo Horizonte
2013**

Este trabalho foi parcialmente desenvolvido no laboratório do Sistema Linfóide e da Regeneração e no Laboratório Prof^a Conceição Machado do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

COLABORADORES:

Dra. Sheila Jorge Adad¹

1. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais

ÓRGÃOS FINANCIADORES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pesquisa em Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã que sempre estiveram ao meu lado me ensinando os caminhos da paciência. Agradeço pela força e dedicação para que este sonho ultrapasse os caminhos da imaginação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e pelos ensinamentos, pela coragem e pelo equilíbrio para enfrentar todos os obstáculos dessa caminhada.

À Dra. Débora pela recepção no laboratório, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Alexandre Barcelos, pelo ajuda e pelos ensinamentos.

À Patrícia Martins pela amizade, pela ajuda e pelos conselhos.

Aos amigos Luana, Andrei e André Lisboa pela amizade, companhia e conselhos.

À minha namorada Jacqueline pela paciência, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela companhia e pelos conselhos.

Às professoras Cláudia e Valéria e aos amigos Thiago e Daniel por disponibilizarem o laboratório nos momentos mais difíceis.

Aos amigos e professores da Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do ICB, pela convivência, pelas conversas e pela amizade.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale à pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém...”

Renato Russo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
1. Doença de chagas.....	17
2. Breve revisão sobre a fisiologia do trato gastrointestinal.....	21
2.1 Interações neuroimunes nas doenças inflamatórias intestinais.....	24
3. VIP e substância P.....	25
3.1 VIP e substância P nas doenças do trato gastrointestinal.....	29
JUSTIFICATIVA.....	33
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. Indivíduos.....	36
2. Coleta e preparação das amostras.....	37
3. Histologia.....	38
4. Imunohistoquímica.....	38
5. Controle negativo.....	39
6. Análise morfométrica.....	39
7. Contagem de eosinófilos.....	40
8. Análise estatística.....	40
RESULTADOS.....	41
1. VIP e substância P.....	41
1.1 Análise qualitativa.....	41
1.2 Análises semi-quantitativas.....	42
1.2.1 Filetes nervosos.....	42
1.2.2 Eosinófilos.....	44
1.2.3 Células epiteliais.....	46
2. Receptores VPAC2 e NK1.....	47
2.1 Análise qualitativa.....	47
2.2 Análises semi-quantitativas.....	48
2.2.1 Células epiteliais.....	48

3. Estudo do grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago.....	48
3.1 Análises de correlação.....	48
ILUSTRAÇÕES.....	51
RESUMO DOS RESULTADOS.....	69
DISCUSSÃO.....	70
CONCLUSÃO.....	78
PERSPECTIVAS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO 1.....	98
ANEXO 2.....	100

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Grupo de estudo.....	37
--------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR na lâmina própria, muscular da mucosa e nas camadas musculares, interna e externa do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....43

Gráfico 2: Densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria, muscular da mucosa e nas camadas musculares, interna e externa do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....44

Gráfico 3: Número de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na lâmina própria, muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....45

Gráfico 4: Porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria, muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....46

Gráfico 5: Densidade de células epiteliais VIP-IR e substância P-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....47

Gráfico 6: Densidade de células epiteliais VPAC2-IR e NK1-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....48

Gráfico 7: Análises de correlação no grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago.....50

LISTA DE PRANCHAS

- Prancha 1: Controle negativo da secção do tecido epitelial, da lâmina própria, muscular da mucosa e da camada muscular interna do esôfago.....51
- Prancha 2: Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos PGP 9.5-IR na lâmina própria, muscular da mucosa e na muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....53
- Prancha 3: Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....55
- Prancha 4: Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados e infectados com e sem megaesôfago.....57
- Prancha 5: Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na lâmina própria, na camada muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago.....59
- Prancha 6: Perfil imunohistoquímico de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria, na camada muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago.....61
- Prancha 7: Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VIP-IR e substância P-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com e sem megaesôfago.....63
- Prancha 8: Perfil imunohistoquímico de estruturas imunorreativas à VPAC2 e NK1 no esôfago de indivíduos infectados e não infectados.....65
- Prancha 9: Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VPAC2-IR e NK1-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com e sem megaesôfago.....67

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP** – tri-fosfato de adenosina
BSA – albumina de soro bovino
cAMP - adenosina 5'-monofosfato cíclico
DAB - diaminobenzidina
ECP – proteína catiônica eosinofílica
EDN - neurotoxina derivada de eosinófilos
EPO - peroxidase eosinofílica
GALT – tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
GDNF – fator neurotrófico derivado da glia
GFAP – proteína acídica fibrilar da glia
GPCR – receptor acoplado à proteína G
IBD – doença do intestino irritável
IBS – síndrome do intestino irritável
Ig - imunoglobulina
IL – interleucina
IFN - interferon
IR - imunorreativo
IPANs – neurônios aferentes primários intrínsecos
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
NF- κ β – fator nuclear kappa beta
NK – receptor neuroquinina
NO – óxido nítrico
PBS – solução salina tamponada
PCR – reação em cadeia da polimerase
PGP 9.5 – produto gênico da proteína 9.5
SNA – sistema nervoso autônomo
SNC – sistema nervoso central
SNE – sistema nervoso entérico
SNP – sistema nervoso periférico
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TGF- β – fator transformador de crescimento beta

TIA-1 – antígeno intracelular de célula T-1

TNF – fator de necrose tumoral

Trato GI – trato gastrointestinal

VIP – polipeptídeo intestinal vasoativo

VPAC – receptor de VIP e PACAP

RESUMO

O megaesôfago chagásico é umas das principais alterações clínicas da forma digestiva da doença de Chagas. Dentre as principais características desta patologia, podemos citar alargamento da parede do esôfago, perda da peristalse e dificuldade de deglutição dos alimentos. O processo inflamatório é considerado como um importante fator responsável pelas lesões no Sistema Nervoso Entérico. Essas lesões iniciadas ainda na fase aguda da doença podem persistir até a fase crônica e resultar no desenvolvimento do mega. Estudos têm demonstrado que alterações no perfil de neuropeptídeos, tais como o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e substância P são capazes de promover alterações na barreira epitelial, distúrbios motores e induzir o processo inflamatório em várias patologias que acometem o trato gastrointestinal (GI). O presente trabalho teve como objetivo avaliar evidências de participação de VIP e substância P na patologia do megaesôfago induzido pela infecção por *Trypanosoma cruzi*. Além disso, propomos investigar possíveis interações entre as estruturas do esôfago através da imunorreatividade de seus receptores VPAC2 e NK1. Os resultados qualitativos demonstram imunorreatividade a VIP e substância P em filetes nervosos, eosinófilos e células epiteliais do esôfago de indivíduos infectados com e sem megaesôfago e indivíduos não infectados. Além disso, foram demonstradas células epiteliais, vasos sanguíneos, células mononucleares imunorreativas (IR) à VPAC2 e NK1, e imunorreatividade apenas a VPAC2 em células polimorfonucleares, células musculares lisas e células enterogliais do esôfago de todos os indivíduos analisados. As análises semi-quantitativas revelaram que os indivíduos infectados com megaesôfago apresentam diminuição na densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e aumento na densidade relativa de filetes nervosos substância P-IR; aumento na porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR; diminuição na densidade de células epiteliais VIP-IR, substância P-IR, VPAC2-IR e NK1-IR. Além disso, foi observada correlação positiva entre a densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e a densidade de filetes nervosos PGP-9.5-IR e uma correlação negativa entre as marcações de eosinófilos, VIP e substância P e o número de neurônios. Diante desses dados ousamos sugerir que alterações no perfil de VIP e substância P devem contribuir para a patologia do megaesôfago chagásico, através da sua interferência no processo inflamatório e na homeostase da barreira epitelial da mucosa.

PALAVRAS CHAVE: megaesôfago chagásico, sistema nervoso entérico, barreira epitelial da mucosa, células inflamatórias, VIP, substância P.

ABSTRACT

The chagasic megaesophagus is one of the major clinical changes in digestive form of Chagas disease. Among the main characteristics of this condition, we can mention enlargement of the esophagus wall, loss of peristalsis and difficulty in swallowing food. The inflammatory process is considered as an important factor responsible for injuries in the Enteric Nervous System. These lesions started in the acute phase of the infection, and it may persist into the chronic phase, which can lead the development of mega. Studies have shown that changes in the profile of neuropeptides, such as vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and substance P are capable of promoting changes in epithelial barrier, motor disorders and induce inflammation in several diseases affecting the gastrointestinal tract (GI). This study aimed to look for evidences of VIP and substance P involvements in the pathology of *Trypanosoma cruzi*-induced megaesophagus. It was demonstrated immunoreactivity to VIP and substance P in nerve fibers, eosinophils and epithelial cells of the esophagus in individuals infected with and without megaesophagus and in uninfected individuals. Furthermore, it was shown epithelial cells, blood vessels, and mononuclear cells immunostained with VPAC2 and NK1, the receptors for VIP and substance P, respectively. Besides, VPAC2 immunoreactivity was also observed on polymorphonuclear cells, smooth muscle cells and enterogial cells, in all groups examined. The semi-quantitative analyzes revealed decreased in the relative density of VIP-IR nerve fibers and increased in the relative density of substance P-IR fibers, in patients with megaesophagus; increase in the percentage of eosinophils VIP-IR and substance P-IR and decrease in the density epithelial cells immunostained with VIP, substance P-IR, VPAC2-IR and NK1-IR. It was further demonstrated that, in individuals infected without megaesophagus, there are positive correlations between innervation and the relative density of VIP-IR nerve fibers, and also between the percentages of eosinophils immunostaing for VIP and substance P and the number of neurons. Given these data we dare suggest that changes in the profile of VIP and substance P should contribute to the pathology of chagasic megaesophagus, through its interference in inflammation and homeostasis of the mucosal epithelial barrier.

KEY WORDS: chagasic megaesophagus, enteric nervous system, mucosal epithelial barrier, inflammatory cells, VIP, substance P.

INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo parasito intracelular *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). É considerada uma doença endêmica rural e assumiu grande importância nos centros urbanos, devido ao processo de migração do campo para a cidade (DIAS *et al.*, 2002; AGUILAR *et al.*, 2007). A doença instalou-se como zoonose devido à interferência do homem nos reservatórios naturais e conseqüentemente resultaram em desequilíbrios ecológicos que levaram os insetos vetores hematófagos, “os barbeiros”, a se adaptarem ao domicílio humano. Assim, o sangue de animais domésticos e do próprio homem passou a ser fonte de alimento para estes vetores hematófagos (DIAS 2006b; COURA 2007). Atualmente, cerca de 16 milhões de pessoas ainda estão infectadas com o parasito e 75 a 90 milhões de pessoas ainda estão expostas à infecção na América Latina (SCHMUNIS AND YADON 2010).

A transmissão da doença de Chagas se dá principalmente pelo inseto vetor, o barbeiro, o qual deposita suas fezes contaminadas com as formas infectantes do parasito no local da picada. Nas áreas endêmicas também são comuns outras formas de transmissão como a transmissão transfusional, transmissão por via oral, transmissão congênita, e em menor freqüência, a transmissão por transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (COURA AND VIÑAS 2010; SILVEIRA AND PIMENTA JUNIOR 2011).

O ciclo do parasito inicia-se quando o inseto vetor suga o sangue de um indivíduo contaminado com as formas tripomastigotas. No intestino médio do inseto, esses parasitos transformam-se na forma epimastigota, multiplicam-se e migram para o intestino posterior do vetor, diferenciando-se aí na forma contaminante tripomastigota. Geralmente durante a noite, ao picar novo indivíduo, o inseto contaminado deposita suas fezes com as formas tripomastigotas próximo ao local da picada. Após penetrarem pelas mucosas ou por uma área lesada, os parasitos têm acesso à circulação linfática e sangüínea, indo invadir diversos tipos celulares. Uma vez dentro das células do hospedeiro, os parasitos transformam-se em amastigotas e após diversos ciclos de multiplicação, dão origem a numerosas formas tripomastigotas. As células quando rompidas liberam os parasitos nos tecidos adjacentes e na circulação. O ciclo se

completa quando um inseto pica a pessoa infectada e adquire as formas tripomastigotas circulantes (BRENER 1982; KOBERLE 1968).

No homem, a fase aguda da infecção caracteriza-se pelo alto nível de parasitos no sangue e nos tecidos. Essa fase é marcada por destruição celular e infecção de diversos tipos celulares, como macrófagos, células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas e células gliais (DA MATA *et al.*, 2000; DIAS 2006a). Após um período de incubação de 7 a 14 dias, observa-se o aparecimento dos sintomas, que são mais freqüentes em crianças do que em adultos. Os sinais mais comuns são: lesão inflamatória no local da picada, hepatoesplenomegalia, náusea, vômito, diarreia, tosse e anorexia. Alguns indivíduos chagásicos morrem nessa fase devido a complicações associadas com miocardite ou meningoencefalite (KOBERLE 1968).

A transição da fase aguda para a fase crônica é acompanhada por significativa redução dos níveis do parasito no sangue e nos tecidos, devido a uma mobilização da resposta imunológica do indivíduo. Nesta fase, a maioria dos indivíduos infectados permanece sob a forma indeterminada, ou seja, totalmente assintomáticos, com eletrocardiografia e radiografia do coração, esôfago e cólon normais, vindo a falecer por outras causas. Após um intervalo de 10 a 20 anos, alguns pacientes podem evoluir para a forma crônica sintomática da infecção com comprometimento cardíaco, digestivo ou cardio-digestivo e, mais raramente, sintomas neurológicos (KOBERLE 1961).

A cardiopatia chagásica crônica é uma das formas clínicas mais estudadas da doença de Chagas. O diagnóstico baseia-se na sorologia positiva para a infecção pelo *T. cruzi*, acompanhada de evidências clínicas, eletrocardiográficas e radiológicas de acometimento cardíaco. Os sintomas estão relacionados principalmente com distúrbios da condução e do ritmo cardíacos, insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos e arritmias graves. Nos estágios mais avançados dessa forma, os pacientes apresentam um aumento acentuado do coração e microscopicamente observa-se um infiltrado inflamatório focal ou difuso, fibrose intersticial, degeneração de células miocárdicas e degeneração autonômica (MACHADO *et al.*, 2000; RASSI *et al.*, 2007; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

O comprometimento do trato digestivo na doença de Chagas ocorre com freqüência variável, conforme a região endêmica estudada, e pode apresentar-se ou não associado à cardiomiopatia chagásica. Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas do Brasil demonstram que 8-10% dos pacientes crônicos possuem a forma digestiva da

doença (DIAS *et al.*, 2002). No Brasil, os casos da forma digestiva da doença de Chagas englobam principalmente a região central do país, compreendendo parte dos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Bahia e sul do Piauí (DE REZENDE 1984).

Na forma digestiva da doença de Chagas, as alterações mais comuns e expressivas ocorrem no esôfago e no cólon, que podem evoluir para o megaesôfago ou megacólon, respectivamente. Outras manifestações digestivas podem ser raramente apresentadas na fase crônica da infecção, tal como megaduodeno, megajejuno e megafleo (OLIVEIRA *et al.*, 1998; MENEGHELLI 2004).

O diagnóstico para a forma digestiva da doença de Chagas é feito através de exames clínicos e exames radiológicos, por meio da ingestão de contraste para avaliação da motilidade e da dilatação do órgão (MENEGHELLI 2004). As alterações no esôfago variam desde o mais leve distúrbio motor até os grandes dolicomegaesôfagos. De acordo com RESENDE *e cols.* (1960), o megaesôfago pode ser classificado radiologicamente em quatro grupos: 1) esôfagos de calibre aparentemente normal ao exame radiológico, com trânsito lento e pequena retenção de contraste; 2) esôfagos com pequeno e moderado aumento de calibre e apreciável retenção de contraste; 3) esôfagos com grande aumento de calibre, hipotonia, atividade motora reduzida e grande retenção de contraste e 4) dolicomegaesôfagos – esôfagos com grande capacidade de retenção, atônico e alongado.

Os sintomas mais comuns apresentados por pacientes portadores de megaesôfago são disfagia, regurgitação e perda de peso (KOBBERLE 1968). A disfagia é a manifestação mais freqüente da doença, tendo sido descrita pelo próprio Carlos Chagas, em 1916. O paciente sofre dificuldades para deglutir alimentos sólidos, necessitando de líquido para permitir a sua propagação, porém na fase mais avançada da doença, observa-se também nesses pacientes uma dificuldade para deglutir alimentos líquidos (CHAGAS 1916).

As alterações motoras no megaesôfago estão presentes ao longo de todo o órgão, sendo mais intensas nos 2/3 distais do órgão, constituído de musculatura lisa. Alterações na resposta do esfíncter inferior do esôfago à deglutição foram identificadas, quer como incapacidade do esfíncter relaxar-se, parcial ou totalmente (acalasia), quer pela abertura antecipada ou retardada, em relação à onda peristáltica (KOBBERLE 1968). Como consequência das perturbações motoras, o transporte de alimento no esôfago torna-se lento e irregular, causando estagnação e dilatação do órgão que, por sua vez, conduz à

hipertrofia do músculo, dificultando ainda mais a passagem do conteúdo (KOBBERLE 1963; MARTINS CAMPOS AND TAFURI 1973).

Os dados da literatura não deixam dúvidas quanto ao papel das lesões de neurônios do sistema nervoso entérico (SNE) no desenvolvimento das desordens anatômicas e funcionais associadas ao megaesôfago chagásico. KOBBERLE (1968), ao analisar o esôfago e o cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago e megacólon demonstrou que os pacientes portadores de mega apresentaram diminuição na contagem neuronal. Segundo o autor, para o desenvolvimento dos megas, o esôfago e o cólon deveriam sofrer 95% e 55% de desnervação, respectivamente. Além disso, TAFURI *et cols.* (1971) demonstraram que os neurônios da parede do esôfago e do cólon de pacientes chagásicos com a forma digestiva podem apresentar-se hipertrofiados e/ou com sinais de degeneração.

As alterações microscópicas que são comumente observadas no esôfago de pacientes chagásicos portadores de mega consistem de ganglionite, periganglionite, neurite, perineurite e intensos fenômenos degenerativos dos neurônios chegando à destruição completa dos gânglios mioentéricos com consecutiva fibrose (TAFURI *et al.*, 1971). Os infiltrados inflamatórios presentes na túnica muscular esofágica desses pacientes são compostos de 72-93% de linfócitos T CD3⁺, de 6-29% de macrófagos CD68⁺ e 1-4% de linfócitos B CD20⁺. Cerca de 1-35% das células do infiltrado inflamatório nas camadas musculares expressam antígeno intracelular de célula T-1 (TIA-1), uma proteína encontrada em linfócitos T citotóxicos e células *natural killer*, conhecida por induzir apoptose em células infectadas e células cancerígenas (D'ÁVILA REIS *et al.*, 2001). Em pacientes portadores de megaesôfago, células do sistema imune com potencial citotóxico são observadas também nos plexos nervosos da parede do órgão. Nessa região observam-se linfócitos TIA-1, células *natural killer*, eosinófilos, mastócitos e macrófagos (DA SILVEIRA *et al.*, 2005).

Através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), DA SILVEIRA *et cols.* (2005) detectaram o kDNA do *T. cruzi* em amostras de tecidos de esôfago de pacientes chagásicos portadores de megaesôfago em 100% dos casos analisados. Além disso, o kDNA do parasito, bem como inflamação discreta, foram observados também em alguns indivíduos infectados sem megaesôfago e com órgão de calibre dentro da faixa de normalidade (VAGO *et al.*, 1996). Análises estatísticas demonstraram uma correlação positiva entre intensidade do processo inflamatório, presença do parasito e

grau de desnervação, sugerindo que as lesões teciduais observadas na forma digestiva da doença de Chagas sejam pelo menos em parte, consequência de mecanismos imune citotóxicos, dependentes da presença do *T. cruzi* (DA SILVEIRA *et al.*, 2005).

Estudos posteriores demonstraram que pacientes chagásicos não portadores de megaesôfago podem também apresentar baixa contagem neuronal, sem qualquer sintoma da doença digestiva (ADAD *et al.*, 1991; DA SILVEIRA *et al.*, 2005). Através da utilização de um marcador pan-neuronal, o produto gênico da proteína 9.5 (PGP 9.5), autores demonstraram diminuição significativa na densidade de filetes nervosos PGP 9.5 imunorreativo (IR) nas camadas musculares do esôfago de pacientes chagásicos com megaesôfago (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Logo, os autores sugeriram que a contagem neuronal por si só nem sempre se relaciona com desenvolvimento do megaesôfago chagásico, sendo necessário avaliar também a inervação nas camadas musculares.

2. *Breve revisão sobre a fisiologia do trato gastrointestinal*

O trato gastrointestinal (GI) é um sistema responsável pela digestão, absorção de nutrientes, secreção e reabsorção de fluidos. Estas funções dependem da atividade contrátil da musculatura lisa para misturar e propagar o conteúdo intestinal em condições fisiologicamente normais. Ambas as funções, são reguladas primariamente pelo SNE, localizado na própria parede do órgão, estendendo desde a musculatura lisa do esôfago até o ânus. Em circunstâncias normais, a função do trato GI é regulada pela combinação de influências intrínsecas e extrínsecas. As influências intrínsecas são conduzidas por neurônios situados em dois grandes plexos, o mioentérico e o submucoso, enquanto que as influências extrínsecas são representadas pelas subdivisões, simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo (SNA). Entretanto, uma característica única do SNE é que ele pode regular as funções do trato GI na ausência do SNA (FURNESS AND COSTA 1980; WOOD *et al.*, 1999).

O plexo mioentérico ou plexo de Auerbach está situado entre as duas camadas da muscular própria. Nesse plexo, encontram-se a grande maioria dos corpos neuronais do SNE, com predomínio de neurônios motores, os quais estendem projeções de feixes nervosos para as camadas musculares, interna e externa. Além disso, outros neurônios presente nesse plexo emitem projeções para as outras camadas do trato GI, como mucosa e submucosa (GABELLA 1972; WOOD *et al.*, 1999).

O plexo submucoso ou plexo de Meissner está situado na camada submucosa, sendo formado de gânglios interconectados por feixes nervosos que inervam principalmente a mucosa, vasos sanguíneos e glândulas. O plexo submucoso é formado por camadas que são identificadas como interna (ou plexo de Meissner) adjacente à muscular da mucosa e, externa (ou plexo de Henle) próxima à muscular interna. Em alguns casos uma camada intermediária, pode ser identificada entre as camadas interna e externa. Esse plexo é mais desenvolvido nos intestinos (HOYLE AND BURNSTOCK 1989; TIMMERMANS *et al.*, 2001).

Os circuitos neurais entéricos são compostos de neurônios organizados em gânglios conectados por feixes interganglionares. No SNE o número de neurônios é cerca de 100 milhões, sendo que a distribuição destes e a codificação neuroquímica dos mesmos variam em diferentes locais do trato GI. Funcionalmente, estes neurônios podem ser classificados em neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs) ou neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores que agem sobre diferentes células efetoras, incluindo músculo liso, vasos sanguíneos locais, glândulas e epitélio (COSTA *et al.*, 2000).

Os IPANs ou neurônios sensoriais são responsáveis por detectar as condições dentro do trato GI e transmiti-las para um circuito neural integrado. Na presença de um estímulo químico ou mecânico, os IPANs respondem modificando o estado funcional do órgão, levando a alterações reflexas na atividade contrátil, no transporte de fluido através da mucosa e no fluxo sanguíneo local. Os IPANs estão localizados em ambos os plexos, mioentérico e submucoso e emitem projeções principalmente para a mucosa. Além disso, realizam sinapse com outros IPANs, interneurônios e neurônios motores excitatórios e inibitórios. Seus transmissores são acetilcolina e taquicininas (neuroquinina A, neuroquinina B e substância P) (FURNESS *et al.*, 2004; FURNESS 2006).

Os interneurônios também estão presentes em ambos os plexos, mioentérico e submucoso e fazem sinapse com outros interneurônios, neurônios motores e IPANs. Os neurotransmissores excitatórios utilizados pelos interneurônios são acetilcolina e taquicininas (neuroquinina A, neuroquinina B e substância P), enquanto que os inibitórios são óxido nítrico (NO) e polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (KUNZE AND FURNESS 1999; BORNSTEIN *et al.*, 2004).

Os neurônios motores são subdivididos em três grupos, os motores musculares, os secretomotores e os vasomotores. Os neurônios motores musculares inervam ambas as camadas musculares do trato GI. Eles podem ser divididos em dois grupos, os excitatórios e os inibitórios. Os neurônios excitatórios utilizam acetilcolina e taquicininas (neuroquinina A, neuroquinina B e substância P) como neurotransmissores, enquanto os neurônios inibitórios utilizam outros neurotransmissores como, NO, VIP e tri-fosfato de adenosina (ATP). Os secretomotores e os vasomotores inervam principalmente a mucosa e estão relacionados com o controle da secreção de fluidos e eletrólitos, e do fluxo sanguíneo (HANSEN 2003a; WOOD 2007).

O epitélio do trato GI é um dos tecidos mais dinâmicos no organismo adulto. Sua renovação é bastante rápida e envolve diversos processos celulares, tais como, proliferação, diferenciação e eliminação que pode ocorrer por apoptose ou esfoliação (VAN DER FLIER AND CLEVERS 2009). Além de separar o conteúdo do lúmen das estruturas internas do corpo, a integridade da barreira epitelial também é fundamental para defesa contra a invasão de patógenos. No entanto, as mucosas são também responsáveis pela absorção de nutrientes e secreção de fluidos, o que exige uma barreira seletivamente permeável (MAGALHÃES *et al.*, 2007; TURNER 2009). A queda dessa barreira epitelial permite a invasão de antígenos, e conseqüentemente, a ativação de células do sistema imune, como observado na doença de Crohn (FRIES *et al.*, 2005). Embora o SNE desencadeie efeitos sobre a permeabilidade intestinal, a secreção dos neuropeptídeos VIP (NEUNLIST *et al.*, 2003b; TOUMI *et al.*, 2003; CONLIN *et al.*, 2009) e substância P na mucosa (KOON *et al.*, 2007; TURNER *et al.*, 2007), têm sido apontada por estar envolvida no controle da proliferação e na organização das células epiteliais. Outros mediadores como o fator transformador de crescimento-beta (TGF- β), produzido pelas células epiteliais (CAO *et al.*, 2009) e pelas células enterogliais (NEUNLIST *et al.*, 2007), também exerce efeitos sobre o epitélio de mucosa, inibindo a proliferação celular e induzindo a apoptose. Além disso, as células enterogliais, também tem desempenhado efeitos sobre o reestabelecimento da barreira epitelial, através da liberação de outros mediadores, como s-nitrosoglutamina (SAVIDGE *et al.*, 2007) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (ZHANG *et al.*, 2010).

Logo, o balanço entre neuropeptídeos e mediadores na mucosa do trato GI comparece como fator importante na manutenção da barreira epitelial e também da homeostase do sistema imune de mucosa. Entretanto, um desequilíbrio nesse

microambiente pode favorecer reações imunológicas e conduzir a quebra da tolerância imune (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2011).

O sistema imunológico do trato GI é referido como tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT) e desempenha várias funções como defesa contra patógenos e manutenção deste microambiente. Anatomicamente e funcionalmente, o GALT é composto de células imunes, principalmente linfócitos T e B, dispersos no epitélio e na lâmina própria, e também organizado em estruturas, como os nódulos linfóides mesentéricos, placas de Peyer e folículos linfóides isolados (MACDONALD 2003). Além dos linfócitos T e B, são encontrados na mucosa do trato GI, grande quantidade de imunoglobulinas (Ig) A, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e eosinófilos (SPAHN AND KUCHARZIK 2004; LÓPEZ 2007). Nesse microambiente, as células imunes comunicam com neurônios e outros componentes celulares do trato GI através de diversos mediadores, dentre eles várias citocinas pró e antiinflamatórias, como interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (MARINI *et al.*, 2003; MANNON *et al.*, 2004; OHMAN *et al.*, 2009; FU *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012) e neuropeptídeos, VIP (SMALLEY *et al.*, 2009) e substância P (KOON AND POTHOUKAKIS 2006).

2.1 Interações neuroimunes nas doenças inflamatórias intestinais

Estudos sobre SNE e células imunes têm chamado atenção para o papel dos neuropeptídeos e seus receptores na indução, manutenção e exacerbação da resposta inflamatória nas doenças que acometem o trato GI como a doença do intestino irritável (IBD), caracterizadas principalmente pela doença de Crohn e colite ulcerativa, e a síndrome do intestino irritável (IBS) (HOFFMAN 2012; CIESIELCZYK AND THOR 2013). Os neuropeptídeos são considerados mediadores chave na comunicação entre neurônios, e entre neurônios e células efectoras, como músculo liso, glândulas, células epiteliais, vasos sanguíneos e células imunes (FURNESS 2012). Em resposta às infecções, toxinas ou traumas, os neuropeptídeos são liberados por terminações nervosas presentes na mucosa e em outras partes da parede do trato GI, a fim de modular a função das células efectoras, incluindo vasodilatação, aumento da secreção de fluidos, contração da musculatura lisa e promovendo o recrutamento de leucócitos, bem

como a desgranulação de mastócitos (KOON AND POTHOUKAKIS 2006; DELGADO E GANEA 2008; SMALLEY *et al.*, 2009; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2013). Por outro lado, as células imunes são capazes de liberar mediadores inflamatórios capazes de alterar as propriedades dos neurônios entéricos, como comportamento eletrofisiológico e composição neuroquímica (SCHEMANN AND NEUNLIST 2004; LOMAX *et al.*, 2006). Além disso, as células imunes podem também produzir neuropeptídeos em resposta a sinais antigênicos ou inflamatórios, e esses neuropeptídeos podem agir de uma maneira autócrina/parácrina através de receptores específicos expressos nas células imunes, neurônios e outros compartimentos celulares (GONZALEZ-REY AND DELGADO 2007; LÜHDER *et al.*, 2009). Logo, essa interação bidirecional entre SNE e sistema imune é fundamental para manter o equilíbrio homeostático do microambiente do trato GI. Assim, qualquer alteração em um desses sistemas pode promover um desequilíbrio interno, e conseqüentemente, resultar no desenvolvimento de desordens inflamatórias e autoimunes.

3. *VIP e substância P*

VIP é um peptídeo de 28 aminoácidos e se encontra amplamente distribuído nos sistemas nervoso, endócrino e imune, sendo reconhecido como importante molécula sinalizadora na comunicação neuro-imune (GOMARIZ *et al.*, 2001; GRONEBERG *et al.*, 2006). Em função da sua ampla distribuição nos Sistemas Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP), VIP pode agir como neurotransmissor em muitos tecidos (GOZES AND FURMAN 2003). Além disso, VIP desempenha importante papel na modulação do sistema imune, agindo como um potente fator antiinflamatório (DELGADO *et al.*, 2002; GONZALEZ-REY *et al.*, 2007).

VIP desempenha suas funções através da interação com receptores de membrana, VPAC1 e VPAC2, expressos sobre diversos tipos celulares (SMALLEY *et al.*, 2009). Esses receptores estão acoplados à proteína G (GPCRs) e apresentam a mesma afinidade pelo neuropeptídeo. A interação entre VIP e seus receptores está envolvida com aumento citoplasmático de adenosina 5'-monofosfato cíclico (cAMP), adenilato ciclase e fosfolipase C, a qual pode desencadear uma cascata de efeitos inibitórios sobre uma variedade de fatores de transcrição envolvidos na expressão gênica de citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores co-estimulatórios, incluindo

NF- κ B e MAPK. Após o uso, os receptores VPAC são internalizados e reciclados para membrana (LABURTHE *et al.*, 2007; COUVINEAU AND LABURTHE 2012).

O receptor VPAC1 é amplamente distribuído no SNC, sendo muito abundante no córtex e no hipocampo (USDIN *et al.*, 1994). No SNP, esse receptor é encontrado no fígado, pulmão, intestino, glândula mamária e próstata (REUBI *et al.*, 2000; SCHULZ *et al.*, 2004; GARCIA-FERNADEZ *et al.*, 2005). O receptor VPAC2 é encontrado principalmente no tálamo e no núcleo supraquiasmático e em baixos níveis no hipocampo, tronco encefálico, cordão espinhal e gânglios da raiz dorsal (USDIN *et al.*, 1994; SHEWARD *et al.*, 1995; CAGAMPANG *et al.*, 1998). Nos tecidos periféricos, VPAC2 pode ser encontrado principalmente no músculo liso dos sistemas reprodutor, gastrointestinal e cardiovascular, e nas glândulas mamárias (REUBI *et al.*, 2000; 2004 SCHULZ *et al.*, 2004; GARCIA-FERNADEZ *et al.*, 2005).

No trato GI, VIP é amplamente expresso por neurônios entéricos e é considerado como um dos principais neurotransmissores inibitórios. Seus efeitos são mediados através do receptor VPAC2, expresso amplamente nas camadas musculares lisas dos órgãos (ROBBERECHT *et al.*, 1998; VANNESTE *et al.*, 2004). Na mucosa, VIP é encontrado em neurônios secretomotores e vasomotores, os quais desempenham efeitos sobre o epitélio e os vasos sanguíneos, respectivamente, promovendo a secreção de fluidos e vasodilatação (HANSEN 2003b; FURNES *et al.*, 2004). A ação de VIP sobre os vasos sanguíneos é mediada principalmente por VPAC2 (REUBI 2000). Além disso, estudo tem demonstrado que os vasos sanguíneos são imunorreativos a VIP, mas não há evidências de que células endoteliais são fonte desse neuropeptídeo (KOVSCA JANJATOVIC *et al.*, 2012). Em função da proximidade entre as células epiteliais e filetes nervosos VIP-IR na mucosa, estudos tem sugerido que VIP está envolvido na integridade da barreira epitelial *in vivo* e *in vitro*, promovendo diminuição da permeabilidade intestinal e aumento na expressão de proteínas que compõem a zônula de oclusão nas células epiteliais (NEUNLIST *et al.*, 2003b; CONLIN *et al.*, 2009). Além disso, VIP também está envolvido no controle da proliferação e organização das células epiteliais intestinais (TOUMI *et al.*, 2003). Outros estudos também tem demonstrado *in vivo* e *in vitro* o papel anti-proliferativo de VIP sobre as células epiteliais cancerígenas do fígado (ABSOOD *et al.*, 2008) e dos rins (VACAS *et al.*, 2012). Estudos em humanos têm demonstrado imunorreatividade para VIP e a expressão do seu mRNA (TODOROVIC *et al.*, 1996; JÖNSSON *et al.*, 2012) além da

imunorreatividade à seus receptores VPAC1 em células epiteliais e VPAC2 em células neuroendócrinas (REUBI *et al.*, 2000; HARMAR *et al.*, 2004; SCHULZ *et al.*, 2004) da mucosa dos órgãos do trato GI, sugerindo uma regulação autócrina.

Além dos neurônios entéricos e células epiteliais, VIP também pode ser produzido por mastócitos (CUTZ *et al.*, 1978; WERSHIL *et al.*, 1993), neutrófilos (O'DORISIO *et al.*, 1980; LYGREN *et al.*, 1984), eosinófilos (METWALI *et al.*, 1994) e linfócitos T (VASSILIOU *et al.*, 2001). Essas células também podem ser moduladas por VIP através da interação com os receptores VPAC. VPAC1 pode ser expresso constitutivamente nas células T, B, macrófagos (YUKAWA *et al.*, 2007), neutrófilos (HARFI *et al.*, 2004) e eosinófilos (DUNZENDORFER *et al.*, 1998), enquanto VPAC2 é expresso constitutivamente em mastócitos (KULKA *et al.*, 2008) e pode ser induzido em células ativadas como em linfócitos T (LARA-MARQUEZ *et al.*, 2001), plasmócitos (WANG *et al.*, 2007) e monócitos (DEWIT *et al.*, 1998).

A modulação das células imunes por meio do neuropeptídeo VIP tem sido bastante discutida na literatura. Estudos *in vitro* têm demonstrado que VIP exibe uma potente atividade antiinflamatória por diminuir a produção de citocinas IL-6 e TNF- α por monócitos (KOJIMA *et al.*, 2005); diminuir a produção de quimiocinas e mediadores inflamatórios (prostaglandinas e óxido nítrico) por macrófagos, células dendríticas e micróglia (DELGADO AND GANEA 2001; GONZALEZ-REY AND DELGADO 2008; CHORNY AND DELGADO 2008); aumentar a síntese de IL-10 em macrófagos (DELGADO *et al.*, 1999a); diminuir a síntese de IL-16 em eosinófilos e consequentemente, inibir a quimiotaxia de linfócitos (DUNZENDORFER *et al.*, 2003); inibir a citotoxicidade dependente de anticorpo em neutrófilos (PALERMO *et al.*, 1996); induzir a produção de CCL22 (quimicina que induz a migração de células Th2) e inibir a produção de CXCL10 (quimicina que induz a migração de células Th1) em células dendríticas (DELGADO *et al.*, 2004); diminuir a expressão de receptores tipo Toll em células sinoviais (GUTIÉRREZ-CAÑAS *et al.*, 2006; ARRANZ *et al.*, 2008), macrófagos, células dendríticas e linfócitos (GOMARIZ *et al.*, 2005); e induzir a expressão de FoxP3 em células T reguladoras (POZO *et al.*, 2009; ANDERSON AND GONZALEZ-REY 2010).

Substância P é um neuropeptídeo de 11 aminoácidos pertencente à família das taquicininas. Esse neuropeptídeo encontra-se localizado no SNC e nos tecidos periféricos, incluindo todo o trato GI. Dentre suas funções, substância P tem se

destacado como neurotransmissor e neuromodulador, desempenhando um papel pró-inflamatório (SEVERINE *et al.*, 2002; O'CONNOR *et al.*, 2004; NICOLETTI *et al.*, 2012).

Os efeitos de substância P são mediados por três diferentes receptores acoplados à proteína G (GPCRs), chamados de neuroquinina (NK)-1, 2 e 3 (SEVERINE *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004). Substância P se liga com alta afinidade ao receptor NK-1 e com baixa afinidade aos receptores NK-2 e NK-3 (MAGGI 1995). A ligação do neuropeptídeo ao seu receptor de alta afinidade NK-1, ativa a fosforilação de proteínas quinase C δ , a qual ativa o sistema NF- κ B, conduzindo ao aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias (KOON AND POTHOUKAKIS 2006).

No SNC, o receptor NK1 é expresso em neurônios e células da glia (LAZARCZYK *et al.*, 2007). Nos órgãos periféricos, NK1 pode ser encontrado em células do tecido ósseo (GOTO AND TANAKA 2002); trato GI (LECCI *et al.*, 2006); trato reprodutor masculino (RAVINA *et al.*, 2007) e feminino (PENNEFATHER *et al.*, 2004); sistema cardiovascular (WALSH AND MCWILLIAMS 2006) e sistema imune (ZHANG *et al.*, 2006).

No trato GI, substância P é encontrada principalmente nos neurônios motores excitatórios e nos neurônios sensoriais. Os neurônios motores excitatórios são responsáveis por induzir a contração da musculatura lisa do trato GI através da interação com os receptores NK1 e principalmente com NK2, ambos expressos nas camadas musculares lisas (WOOD 2007; SHIMIZU *et al.*, 2008). Os neurônios sensoriais ou IPANS exercem seus efeitos sobre o epitélio e vasos sanguíneos através dos receptores NK1. Estudos *in vitro* têm demonstrado que substância P é capaz de induzir a proliferação, migração (GOODE *et al.*, 2003; TURNER *et al.*, 2007) e a expressão de fatores antiapoptóticos e angiogênicos nas células epiteliais do cólon (KOON *et al.*, 2007; 2008). GOODE *et al.* (2003) demonstraram *in vitro* que a expressão de NK1 é aumentada em células epiteliais quando as mesmas são tratadas com citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β . Logo, a expressão de NK1 em células epiteliais do cólon de indivíduos controle, poderia refletir o perfil de citocinas do microambiente da mucosa (GOODE *et al.*, 2003). Quanto aos vasos sanguíneos, estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que substância P estimula a angiogênese, induzindo a síntese de óxido nítrico e a proliferação das células endoteliais através de NK1 (ZICHE *et al.*, 1994; SEEGERS *et al.*, 2003). Além dos neurônios entéricos, estudo tem

demonstrado imunorreatividade para substância P em células epiteliais e vasos sanguíneos do trato GI de indivíduos controle (MAZUMDAR AND DAS 1992). Não há evidências se essas estruturas poderiam ser fonte desse neuropeptídeo ou se isso estaria relacionado com uma possível captação.

Além dos neurônios entéricos, as células do sistema imune também são capazes de produzir substância P e expressar seus receptores. Logo, essas células também são capazes de promover uma regulação autócrina e também de exercer influência sobre outras estruturas do trato GI, principalmente sobre o SNE. Dentre as células imunes produtoras de substância P podemos citar, os macrófagos, linfócitos (LAI *et al.*, 1998; 2002) e eosinófilos (METWALI *et al.*, 1994). Já a expressão de NK1 pode ser observada em linfócitos T (COOK *et al.*, 1994; MCCORMACK *et al.*, 1996), linfócitos B (STANISZ *et al.*, 1987), macrófagos (HO *et al.*, 1997), neutrófilos (WOZNIAK *et al.*, 1993), mastócitos (SHANAHAN *et al.*, 1985) e células *natural killer* (LIGHVANI *et al.*, 2005). Há evidências de que os eosinófilos também expressam o receptor NK1, uma vez que os efeitos sobre a quimiotaxia foram inibidos *in vitro* através de antagonistas para NK1 (EL-SHAZLY *et al.*, 1996). Além disso, RENZI *e cols.* (2000) demonstraram a expressão de NK2 em eosinófilos.

A ação pró-inflamatória de substância P pode ser determinada pela capacidade de estimular, a síntese de IFN- γ e (WEINSTOCK *et al.*, 2003; BLUM *et al.*, 2003) MIP-1 β em linfócitos T (GUO *et al.*, 2002); TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 em linfócitos T, macrófagos e neutrófilos (DELGADO *et al.*, 2003); desgranulação de mastócitos (LI *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013); migração e desgranulação de eosinófilos (EL-SHAZLY *et al.*, 1997); migração e citotoxicidade de células *natural killer* (FEISTRITZER *et al.*, 2003; FU *et al.*, 2011).

3.1 VIP e substância P nas doenças do trato gastrointestinal

O desequilíbrio neuroquímico no trato GI tem sido alvo de muitos estudos e por isso, tem sido apontado como fator determinante e/ou mantenedor das alterações fisiológicas e imunológicas (SMALLEY *et al.*, 2009; BEN-HORIN AND CHOWERS 2008). Estudos têm demonstrado que pacientes com colite ulcerativa apresentaram redução dos níveis de VIP na mucosa do cólon (RENZI *et al.*, 1998; JONSSON *et al.*, 2007). JONSSON *e cols.* (2012) demonstraram baixa imunorreatividade para VIP e seu

receptor VPAC1 nas células epiteliais do cólon de pacientes com colite ulcerativa. KAMINSKA *et cols.* (2007) demonstraram diminuição de filetes nervosos VIP-IR na mucosa do cólon de crianças portadoras de colite ulcerativa. Em pacientes com acalásia idiopática foram observadas diminuição de filetes nervosos VIP-IR nas camadas musculares, interna e externa do esôfago (WATTCHOW AND COSTA 1996). Outros trabalhos também têm demonstrado diminuição de neurônios VIP-IR no plexo mioentérico de pacientes com megacólon chagásico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c), acalásia idiopática (VILLANACCI *et al.*, 2010) e colite ulcerativa (KAMINSKA *et al.*, 2006). Nesses casos, a queda da inervação VIPérgica mostra-se associada à distúrbios peristálticos e a intenso processo inflamatório. Confirmando esse papel, trabalho desenvolvido em animais VIP-*knockout* (KO) tem demonstrado alterações anatômicas e fisiológicas no trato GI (LELIEVRE *et al.*, 2007). Em modelo de colite experimental, camundongos VPAC1-KO e VPAC2-KO desenvolveram alterações clínicas e histológicas relacionadas à doença e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Segundo os autores, as alterações foram mais significativas nos animais VPAC2-KO (YADAV *et al.*, 2011).

Curiosamente, autores têm demonstrado variações dos níveis de VIP no cólon e no sangue de pacientes com colite ulcerativa em diferentes graus da doença. TODOROVIC *et cols.* (1996) demonstraram diminuição da concentração de VIP no sangue e no cólon de pacientes com a doença em estágio brando. Por outro lado, os pacientes em estágio moderado ou severo apresentaram aumento dos níveis de VIP no plasma e nos tecidos. Além disso, foi observado aumento da imunorreatividade para VIP na camada epitelial do cólon desses pacientes e nas células inflamatórias da lâmina própria. METWALI *et cols.* (1994) demonstraram aumento de eosinófilos VIP-IR na mucosa do cólon de pacientes com doença de Crohn.

Trabalhos também têm demonstrado forte associação entre o baixo nível de VIP em doenças autoimunes, como artrite reumatóide (JUARRANZ *et al.*, 2008), lúpus e tireoidite autoimune (BANGALE *et al.*, 2003). Baseado nessas informações, VIP tem se destacado como um importante agente terapêutico, proporcionando melhoras clínicas e redução do processo inflamatório em modelos experimentais de doença de Crohn (ABAD *et al.*, 2003), pancreatite (KOJIMA *et al.*, 2005) e artrite reumatóide (DELGADO *et al.*, 2008).

Devido à ação pró-inflamatória, muitos estudos têm sugerido a participação de substância P e do seu receptor NK1 no desenvolvimento de doenças inflamatórias no trato GI. Estudos imunohistoquímicos revelaram aumento da expressão de substância P nas células epiteliais do cólon de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (MAZUMDAR AND DAS 1992). Também foram observados aumento de filetes nervosos substância P-IR na mucosa de pacientes com diverticulite (SIMPSON *et al.*, 2009) e aumento de eosinófilos substância P-IR na mucosa do cólon de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (METWALI *et al.*, 1994). Além disso, foram observados aumento na taxa de neurônios substância P-IR no plexo mioentérico do cólon de pacientes com diverticulite (SIMPSON *et al.*, 2009), colite ulcerativa (NEUNLIST *et al.*, 2003a) e megacólon chagásico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c). Níveis elevados de substância P foram observados no soro de pacientes com pancreatite crônica (MASCETTA *et al.*, 2012), colite ulcerativa e doença de Crohn (TAVANO *et al.*, 2012). Reforçando o papel de substância P no desenvolvimento de doenças inflamatórias no trato GI, estudos em modelo experimental de colite demonstraram que animais substância P-KO foram mais resistentes ao desenvolvimento da patologia e apresentaram níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias do que os animais controle (ENGEL *et al.*, 2011b; 2012a; 2012b).

A expressão do receptor NK1 também tem sido bastante discutida na literatura e apresenta resultados controversos. RENZI *e cols.* (2000) demonstraram por imunohistoquímica aumento da imunorreatividade à NK1 nas células epiteliais e endoteliais de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn. GOODE *e cols.* (2000) demonstraram aumento significativo dos níveis de mRNA do receptor NK1 na mucosa do cólon de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn. Através da técnica de imunohistoquímica, os autores também demonstraram aumento de células mononucleares NK1-IR na lâmina própria desses pacientes. Curiosamente, foi observado aumento significativo na imunorreatividade para NK1 nos neurônios do plexo mioentérico apenas de pacientes com doença de Crohn. Por outro lado, foi observada diminuição da imunorreatividade para NK1 no epitélio do cólon de ambos os pacientes. Outros trabalhos também demonstraram diminuição da expressão de mRNA de NK1 na mucosa do cólon de pacientes com IBS (CHANG *et al.*, 2012). No megacólon chagásico, os autores demonstraram diminuição na expressão de NK1 na porção dilatada do cólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2008).

O papel terapêutico de antagonistas de NK1 tem proporcionado melhoras em várias doenças inflamatórias. Estudos desenvolvidos em modelo de animais com colite demonstraram que o tratamento com o antagonista do receptor NK1, CJ-12255, reduziu a inflamação e formação de fibrose no cólon desses animais (KOON *et al.*, 2010). Além disso, esse tratamento diminuiu a expressão de fatores pró-angiogênicos e a expressão de mediadores inflamatórios nos colonócitos (KOON *et al.*, 2006; 2008; 2011). Em modelo de artrite reumatóide, os autores demonstraram que injeções sistêmicas do antagonista do receptor NK1, WIN 51708, inibiram significativamente o inchaço nas articulações dos animais submetidos ao experimento (MAKINO *et al.*, 2012). Adicionalmente, esse mesmo antagonista proporcionou diminuição da hiperalgesia no tornozelo de animais com artrite reumatóide e diminuição de danos histológicos na cartilagem (UEMATSU *et al.*, 2011).

Na doença de Chagas, DA SILVEIRA *e cols.* (2007c) realizaram estudos de caracterização do perfil neuroquímico no megacólon chagásico, e observaram que neurônios produtores de VIP são preferencialmente destruídos. Por outro lado, a taxa de neurônios substância P-IR foi significativamente maior nesses pacientes e mostrou-se associado a intenso processo inflamatório (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; 2007b). Diante desses dados, nosso grupo propôs expandir este estudo para o megaesôfago chagásico, a fim de tentar investigar se o desequilíbrio entre o perfil de VIP e substância P também estão envolvidos no desenvolvimento dessa patologia.

JUSTIFICATIVA

A etiologia das desordens que acometem o trato GI tem sido amplamente discutida na literatura e interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos parecem estar envolvidos nesses processos (BOUMA AND STROBER 2003; PALLONE *et al.*, 2003). Muitas investigações e observações sugerem que o evento inicial das doenças inflamatórias intestinais é causado por um distúrbio na rede neural e imunológica (SVENTORAITYTE *et al.*, 2008; FURNESS 2008). A comunicação entre o sistema neuroimunoendócrino no trato GI é desempenhada por diversos mediadores, tais como os neuropeptídeos VIP e substância P. Ambos são produzidos principalmente por neurônios e células imunes e seus efeitos podem desencadear diversas respostas sobre o SNE, células do sistema imune e outras células efetoras (KOON AND POTHOUKAKIS 2006; GONZALEZ-REY *et al.*, 2007).

Na forma digestiva da doença de Chagas, o processo inflamatório comparece como um importante fator responsável pelas lesões no SNE (ADAD *et al.*, 1991; DA SILVEIRA *et al.*, 2005). Essas lesões, iniciadas ainda na fase aguda da doença, podem persistir até a fase crônica e resultar em distúrbios peristálticos e no desenvolvimento dos megas (KOBBERLE 1968). Inicialmente, nosso grupo demonstrou a presença do kDNA do parasito no tecido de pacientes chagásicos com e sem megasôfago, associado às células inflamatórias com potencial citotóxico (D'ÁVILA REIS *et al.* 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005). A demonstração do kDNA do parasito em pacientes sem inflamação tecidual e sem megasôfago sugeriu que apenas a presença do parasito no tecido não justificava mais a manutenção ou re-ativação do processo inflamatório na fase crônica.

Assim, DA SILVEIRA *e cols.* (2007c) demonstraram alterações no perfil neuroquímico de pacientes chagásicos com megacólon, com diminuição na taxa de neurônios VIP-IR e aumento na taxa de neurônios substância P-IR no plexo mioentérico, associado a intenso processo inflamatório (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; 2007b). Diante desse cenário, nós levantamos a hipótese de que “o desequilíbrio no perfil de VIP e substância P poderia resultar no re-estabelecimento e/ou manutenção do processo inflamatório e conseqüentemente, promoverem o desenvolvimento do megasôfago chagásico”.

No projeto atual, aqui apresentado, nos propusemos expandir essas investigações não apenas para o SNE, mas também para células inflamatórias e outras estruturas do esôfago de indivíduos infectados. Além disso, análises dos receptores de VIP e substância P, poderiam nos dar evidências da interação entre SNE, células imunes e outras células efectoras. Devido à impossibilidade de se traçar um estudo longitudinal em pacientes chagásicos, introduzimos o grupo de indivíduos infectados não portadores de megaesôfago, como estratégia para se avaliar a evolução do processo patológico.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar evidências de participação de VIP e substância P na patologia do megaesôfago induzido pela infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

Avaliar na porção inferior do esôfago de indivíduos infectados com *T. cruzi* e indivíduos não infectados os seguintes parâmetros abaixo:

a) A distribuição da imunoreatividade à VIP, substância P e aos seus receptores VPAC2 e NK1.

1. A densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR.
2. A porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR.
3. A densidade de células epiteliais VIP-IR e substância P-IR.
4. A densidade de células epiteliais VPAC2-IR e NK1-IR.

b) Possíveis correlações entre os parâmetros abaixo no grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago com diferentes graus de desnervação:

1. Número de neurônios e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR.
2. Densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR e as densidades relativas de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR.
3. Porcentagens de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR e número de neurônios.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Indivíduos*

Nesse trabalho utilizamos tecidos de esôfago de 6 indivíduos infectados com megaesôfago chagásico, 6 indivíduos infectados sem megaesôfago chagásico e como controle, 6 indivíduos não infectados, coletados por cirurgia ou necropsia no Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro pela Dra. Sheila Jorge Adad. Foi obtido consentimento prévio de todos os indivíduos, pais ou responsáveis para a inclusão dos mesmos no trabalho de pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, número 0313.0.203.000-10 (anexo 1).

O diagnóstico para infecção chagásica foi baseado na positividade das seguintes reações: Elisa, hemaglutinação e imunofluorescência indireta para o *T. cruzi*. Todos os pacientes deixaram a área endêmica há mais de 20 anos antes do procedimento de coleta e nunca receberam qualquer tratamento específico contra o parasito. Os mesmos viveram em Uberaba, Minas Gerais onde a transmissão natural foi interrompida por mais de 30 anos e nunca receberam transfusão sanguínea.

Os indivíduos não infectados apresentaram sorologia negativa para a doença de Chagas. Estes também viveram no estado de Minas Gerais e apresentavam idade média de 62 ± 20 anos, diâmetro médio do esôfago de $1,4 \pm 0,1$ cm, número de neurônios no plexo mioentérico variando de 343 a 436 e média da densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares, interna de $279,00 \pm 64,49 \mu\text{m}^2$ e externa de $355,20 \pm 42,87 \mu\text{m}^2$. Os pacientes chagásicos sem megaesôfago apresentavam idade média de 55 ± 11 anos, diâmetro médio do esôfago de $1,4 \pm 0,2$ cm, número de neurônios variando de 20 a 330 e média da densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares, interna de $231,00 \pm 54,44 \mu\text{m}^2$ e externa de $302,20 \pm 62,18$. Pacientes chagásicos com megaesôfago apresentavam idade média de 52 ± 9 anos, diâmetro médio do esôfago de $3,3 \pm 0,8$ cm, ausência de neurônios no plexo mioentérico em 5 dos 6 pacientes estudados, e apenas 1 paciente com 70 neurônios e média da densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares, interna de $19,67 \pm 3,26 \mu\text{m}^2$ e externa de $23,33 \pm 5,85 \mu\text{m}^2$. O diagnóstico do megaesôfago foi estabelecido através de dados clínicos relatando obstrução do esôfago e dilatação vista através de estudos radiológicos. A densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares,

interna e externa do esôfago de cada indivíduo foi previamente analisada por NASCIMENTO *et cols.* (2010). Detalhes sobre os pacientes estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Grupo de estudo					
	Idade	Diâmetro do esôfago	Sexo	Número de neurônios no plexo mioentérico*	Densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares interna / externa (μm^2)**
Indivíduos não infectados					
E2	76	1,6	M	343	287 / 332
E5	54	1,4	M	352	229 / 320
E17	79	1,6	M	343	196 / 318
HE12-94	34	1,5	M	436	372 / 430
HE83-93	85	1,2	M	-	328 / 376
HE93-93	47	1,3	M	-	262 / 355
Indivíduos infectados sem megaesôfago					
E3	49	1,1	F	330	325 / 367
E9	47	1,3	F	196	243 / 340
E14	70	1,7	M	315	250 / 360
E4	61	1,6	M	40	176 / 276
E7	66	1,4	M	20	195 / 217
E15	40	1,2	M	88	197 / 253
Indivíduos infectados com megaesôfago					
E12	57	2,7	M	0	16 / 20
HE30-00	52	4,5	M	0	20 / 24
HE46-01	43	3,0	F	70	24 / 33
HE71-00	67	2,9	M	0	17 / 21
HE45-93	53	4,1	M	0	18 / 16
ML10-86	43	2,6	M	0	23 / 26

*número de neurônios por 490 μm do anel do esôfago.
 **analisado por NASCIMENTO *et cols.* (2010).
 - contagem não realizada por não se ter uma representação ideal dos plexos durante os cortes.

2. Coleta e preparação das amostras

As amostras de esôfago de cada indivíduo foram coletadas da região inferior do esôfago à 5 cm da cárdia. Os tecidos foram fixados em solução de formaldeído 4%

tamponado com tampão fosfato e incluídos em parafina. Os anéis de esôfago foram cortados serialmente com espessura de 7 µm e submetidos a estudos histológicos e imunohistoquímicos.

3. *Histologia*

As secções de 7 µm foram desparafinizadas em três banhos de xilol (xilol I, xilol II, xilol III) de 20 minutos cada e hidratadas em sucessivos banhos de álcool (álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 90%, álcool 80% e álcool 70%) por 10 minutos cada banho. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, desidratadas em banhos sucessivos de álcool (álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto II e álcool absoluto I), diafanizadas (xilol I, xilol II, xilol III) e montadas com lamínulas e Entellan (Merck).

4. *Imunohistoquímica*

A retirada da parafina das lâminas foi realizada com três banhos de xilol (xilol I, xilol II, xilol III) de 20 minutos cada. Em seguida as lâminas foram hidratadas em sucessivos banhos de álcool (álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 90%, álcool 80% e álcool 70%), por 10 minutos cada banho. Do álcool o tecido foi direto para a solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 – 7,4, por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com tampão citrato (pH 6.0) no microondas por 10 minutos para a reativação antigênica. Após a fervura, as lâminas foram mantidas imersas no tampão citrato até atingirem a temperatura ambiente.

A atividade da peroxidase endógena foi inibida por incubação dos cortes com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 4% + 0,05M de azida sódica em PBS por 30 min. O bloqueio de ligação inespecífica foi obtido com uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 2% em PBS por 30 minutos.

Foram utilizados os seguintes anticorpos (exceto para o controle negativo) policlonais primários: marcador pan-neuronal, anti-PGP 9.5 (DAKO, CA, USA, Code Z5116, anti-rabbit), anti-VIP (ABCAM, Cambridge, MA, USA, Code ab22736, anti-rabbit), anti-VPAC2 (ABCAM, Cambridge, MA, USA, Code ab28624, anti-rabbit), anti-NK1 (NOVUS BIOLOGICALS, Littleton, CO, USA, Code NB300-119, anti-

rabbit) e um anticorpo monoclonal, anti-substância P (ABCAM, Cambridge, MA, USA, Code ab14184, anti-mouse). Os anticorpos foram apropriadamente diluídos em PBS-BSA (anti-PGP 9.5, 1:50; anti-VIP, 1:200; anti-substância P, 1:200; anti-VPAC2, 1:250; anti-NK1, 1:100) e adicionados às lâminas (150 µl / lâmina) para incubação *overnight* a 4°C.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o conjugado biotina (anti-mouse / anti-rabbit; DAKO) por 1 hora. Depois de lavadas em PBS, as lâminas foram incubadas com estreptoavidina-peroxidase (DAKO) por 1 hora. Antes de prosseguir para a revelação, as lâminas foram lavadas novamente com PBS. Em seguida, foi realizada a incubação com a solução de diaminobenzidina (DAB) e 0,5% de H₂O₂ (30v) em PBS por 10 minutos. Finalmente as lâminas foram lavadas com PBS e contra-coradas com hematoxilina de Gill (Sigma). As mesmas passaram pelo processo de desidratação (álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto II e álcool absoluto I) e diafanização (xilol I, xilol II, xilol III) sendo montadas com lamínulas e Entellan (Merck).

5. *Controle negativo*

Para o controle negativo, as lâminas foram submetidas à técnica de imunohistoquímica e não foram incubadas com o anticorpo primário, logo, permaneceram em PBS e posteriormente continuaram o processo (Figs. 1A, 1B e 1C).

6. *Análise morfométrica*

As imagens das secções de tecidos submetidos à imunohistoquímica com o anti-PGP 9.5, anti-VIP, anti-substância P, anti-VPAC2 e anti-NK1 foram digitalizadas e processadas em sistema de análise de imagem, o Q Capture pro, em 20 campos de cada lâmina por paciente utilizando a objetiva de 40x (área total analisada $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ / indivíduo). Em seguida as imagens foram analisadas pelo programa Image J.

Para cada anticorpo foram capturadas imagens das seguintes regiões do esôfago; para o anti-PGP: lâmina própria e muscular da mucosa; para o anti-VIP e anti-substância P: epitélio, lâmina própria, muscular da mucosa e camadas musculares, interna e externa; anti-VPAC2 e anti-NK1: epitélio.

Os valores absolutos de inervação variam muito de indivíduo para indivíduo, e fatores como a idade, podem estar relacionados com alterações estruturais no SNE (HANSEN 2003a; PHILLIPS AND POWLEY 2007). Assim, a partir da densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR da lâmina própria, muscular da mucosa e das camadas musculares, interna e externa foram calculadas as densidades relativas: densidade de filetes nervosos VIP-IR ou substância P-IR / densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR x 100. Para a análise da densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR ou substância P-IR nas camadas musculares, interna e externa, foram utilizados os dados de PGP 9.5 previamente analisados por NASCIMENTO *et cols.* (2010).

7. *Contagem de eosinófilos*

A contagem total dos eosinófilos foi realizada em 50 campos da lâmina própria, da camada muscular interna e do plexo mioentérico, utilizando a objetiva de 100x. A partir dessa contagem foram calculadas as porcentagens: número total de eosinófilos VIP-IR ou substância P-IR / número total de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina x 100.

8. *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada no programa Prism 5 através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Comparação Múltipla de Dunn's para as diferenças na resposta entre diferentes grupos relacionados aos dados não-paramétricos. A correlação entre os parâmetros estudados foi avaliada através do coeficiente de correlação de Spearman. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e foram consideradas diferenças estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. *VIP e substância P*

1.1 *Análise qualitativa*

Foram observados em todas as amostras filetes nervosos PGP 9.5-IR distribuídos na lâmina própria e muscular da mucosa (Figs. 2A, 2B e 2C), e nas camadas musculares, interna (Figs. 2D, 2E e 2F) e externa. Na lâmina própria dos indivíduos não infectados e infectados sem megaesôfago, os filetes nervosos PGP 9.5-IR localizaram no tecido conjuntivo, próximo à base do epitélio e às paredes dos vasos sanguíneos. Na muscular da mucosa e nas camadas musculares, interna e externa, esses filetes nervosos foram observados distribuídos entre as fibras musculares lisas.

Os filetes nervosos VIP-IR (Figs. 3A, 3B, 3C, 4A, 4B e 4C) e substância P-IR (Figs. 3D, 3E, 3F, 4D, 4E e 4F), mostraram-se também distribuídos na lâmina própria, muscular da mucosa e nas camadas musculares, interna e externa. Nos indivíduos não infectados e nos infectados sem megaesôfago, foram observados filetes nervosos VIP-IR próximo ao epitélio e aos vasos sanguíneos e filetes nervosos substância P-IR distribuídos na lâmina própria e próximos ao epitélio da mucosa. Nas camadas musculares analisadas, esses filetes nervosos mostraram-se distribuídos entre as fibras musculares.

Alguns eosinófilos apresentaram-se imunorreativos a VIP ou a substância P. Em cortes consecutivos os eosinófilos foram corados com hematoxilina e eosina e sua caracterização morfológica foi determinada pelo citoplasma eosinofílico e núcleo bilobulado. Eles foram encontrados dispersos na lâmina própria (Figs. 5A, 5B e 5C) na camada muscular interna (Figs. 5D, 5E e 5F) e no plexo mioentérico (Figs. 5G, 5H e 5I) do esôfago de todos os grupos estudados. Nos indivíduos infectados com megaesôfago, os eosinófilos foram vistos associados a foco inflamatório composto de células mononucleares em todas as regiões analisadas, fato não observado nos outros grupos. Não foram observados eosinófilos próximo a neurônios no plexo mioentérico. Dos 6 indivíduos infectados sem megaesôfago, foi observado em um deles, o paciente E4, foco de eosinófilos localizados principalmente no plexo mioentérico.

Eosinófilos imunoreativos a VIP ou a substância P foram observados na lâmina própria, na camada muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de todos os

indivíduos. Nos indivíduos infectados com megaesôfago, os eosinófilos também foram vistos em foco inflamatório na lâmina própria e no plexo mioentérico em degeneração, enquanto que na camada muscular interna essas células foram vistas mais isoladas entre as fibras musculares e não necessariamente associadas à inflamação (Figs. 6A, 6B, 6C, 6D, 6E e 6F). Nos indivíduos não infectados e nos infectados sem megaesôfago, os eosinófilos VIP-IR e substância P-IR foram vistos isolados e longe de foco inflamatório.

Além dos filetes nervosos e eosinófilos, foram encontradas células epiteliais VIP-IR e substância P-IR em todas as amostras analisadas. As células do epitélio do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados sem megaesôfago apresentaram forte marcação no citoplasma. As células epiteliais VIP-IR foram observadas em todas as camadas do epitélio, mas se destacando principalmente nas camadas do terço médio e superior (Figs. 7A e 7B). Já nos indivíduos infectados com megaesôfago a imunorreatividade à VIP foi mais fraca quando comparada aos outros grupos. A marcação foi observada apenas em determinadas regiões do citoplasma de algumas células do epitélio, localizadas nas camadas do terço médio e superior (Fig. 7C).

Para substância P, a imunorreatividade também foi intensa em todas as camadas do epitélio do esôfago dos indivíduos não infectados, predominando nas células da camada basal, do terço médio e da borda do epitélio (Fig. 7D). Nos indivíduos infectados sem megaesôfago, a marcação também foi intensa e mais presente no citoplasma das células epiteliais do terço médio e superior (Fig. 7E). Por outro lado, a imunorreatividade no epitélio do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago foi mais fraca quando comparada aos outros grupos e predominou na região basal (Fig. 7F).

1.2 Análises semi-quantitativas

1.2.1 Filetes nervosos

A análise de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR foi expressa como densidade relativa e o cálculo foi realizado com base nos valores absolutos da densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR de cada indivíduo. Foi demonstrado diminuição significativa na densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR na lâmina própria, na muscular da mucosa e nas camadas musculares, interna e externa do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $14,50 \pm 5,75$; muscular da mucosa: $24,67 \pm 8,33$; muscular interna: $19,67 \pm 3,26$; muscular externa: $23,33 \pm 5,85$),

comparado aos indivíduos não infectados (lâmina própria: $137,80 \pm 38,29$; muscular da mucosa: $167,30 \pm 79,36$; muscular interna: $279,00 \pm 64,49$; muscular externa: $355,20 \pm 42,87$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $95,00 \pm 36,92$; muscular da mucosa: $143,70 \pm 65,95$; muscular interna: $231,00 \pm 54,44$; muscular externa: $302,20 \pm 62,18$) (Gráfico 1).

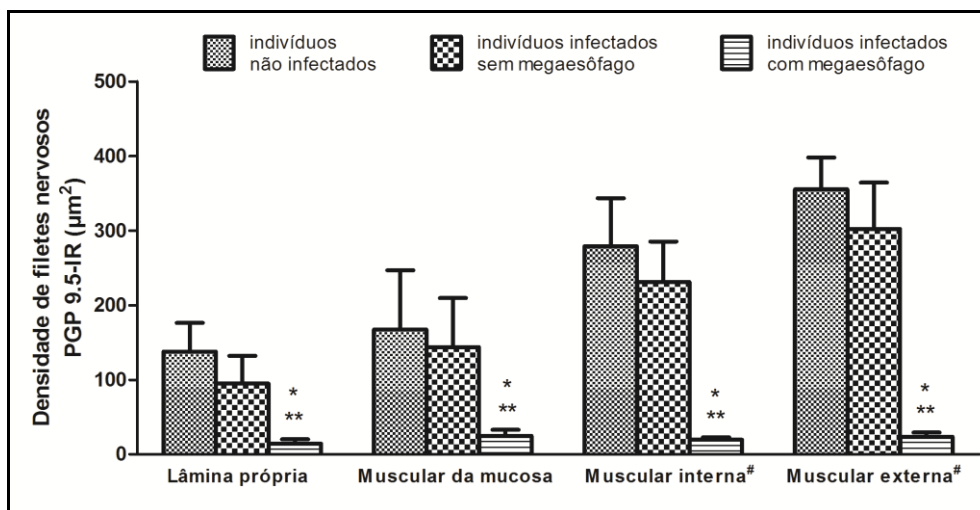


Gráfico 1. Densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR na lâmina própria, muscular da mucosa e nas camadas musculares interna[#] e externa[#] do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos não infectados ($p \leq 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago ($p \leq 0,05$). Área total analisada de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ por indivíduo. (#) análise realizada previamente por NASCIMENTO e cols. (2010).

Na lâmina própria e na muscular da mucosa a densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR apresentou diminuição significativa em indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $24,03 \pm 4,64$; muscular da mucosa: $19,32 \pm 3,86$) quando comparado aos indivíduos não infectados (lâmina própria: $39,98 \pm 8,10$; muscular da mucosa: $34,90 \pm 5,62$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $37,31 \pm 5,64$; muscular da mucosa: $31,12 \pm 5,92$) (Gráfico 2).

Além disso, foi revelado aumento significativo na densidade relativa de filetes nervosos substância P-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $20,19 \pm 1,82$; muscular da mucosa: $19,00 \pm 1,26$) comparado aos indivíduos não infectados (lâmina própria: $5,59 \pm 3,33$; muscular da mucosa: $5,99 \pm 2,97$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $8,33 \pm 5,04$; muscular da mucosa: $7,48 \pm 4,56$) (Gráfico 2).

Nas camadas musculares, interna e externa a densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR diminuiu significativamente nos indivíduos infectados com

megaesôfago (muscular interna: $28,92 \pm 8,21$; muscular externa: $18,46 \pm 2,50$) comparado apenas aos indivíduos não infectados (muscular interna: $67,75 \pm 12,46$; muscular externa: $34,07 \pm 8,60$). Não foi observada diferença significativa entre os indivíduos infectados sem megaesôfago (muscular interna: $50,39 \pm 21,62$; muscular externa: $26,58 \pm 7,67$) e os outros dois grupos analisados. Por outro lado, a densidade relativa de filetes nervosos substância P-IR foi significativamente aumentada nas camadas musculares dos indivíduos infectados com megaesôfago (muscular interna: $8,18 \pm 1,21$; muscular externa: $2,78 \pm 0,64$) quando comparado aos indivíduos não infectados (muscular interna: $1,19 \pm 0,25$; muscular externa: $1,20 \pm 0,32$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (muscular interna: $1,49 \pm 0,28$; muscular externa: $1,24 \pm 0,64$) (Gráfico 2).

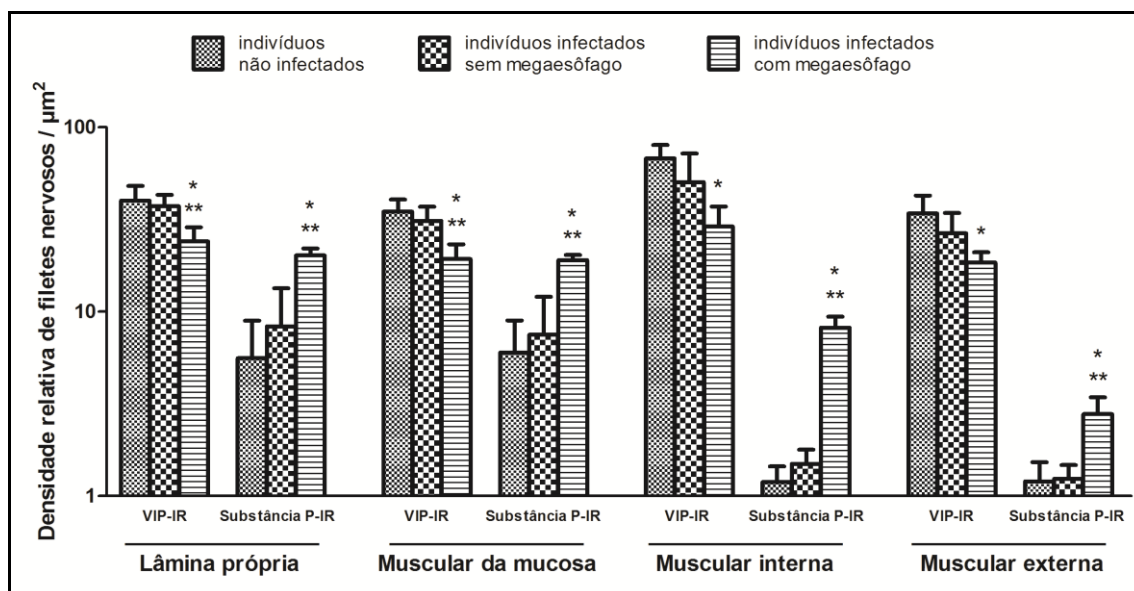


Gráfico 2. Densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria, muscular da mucosa e nas camadas musculares, interna e externa do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos não infectados ($p \leq 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago ($p \leq 0,05$). Área total analisada de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ por indivíduo.

1.2.2 Eosinófilos

A análise estatística confirmou aumento significativo no número de eosinófilos na lâmina própria, na muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $102,00 \pm 44,44$; muscular interna: $18,33 \pm 2,73$; plexo mioentérico: $33,17 \pm 12,25$) comparado aos indivíduos não infectados (lâmina própria: $17,67 \pm 9,37$; muscular interna: $3,50 \pm 2,07$; plexo mioentérico: $4,00 \pm$

2,19) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $20,00 \pm 11,71$; muscular interna: $6,00 \pm 4,51$; plexo mioentérico: $10,33 \pm 8,09$) (Gráfico 3).

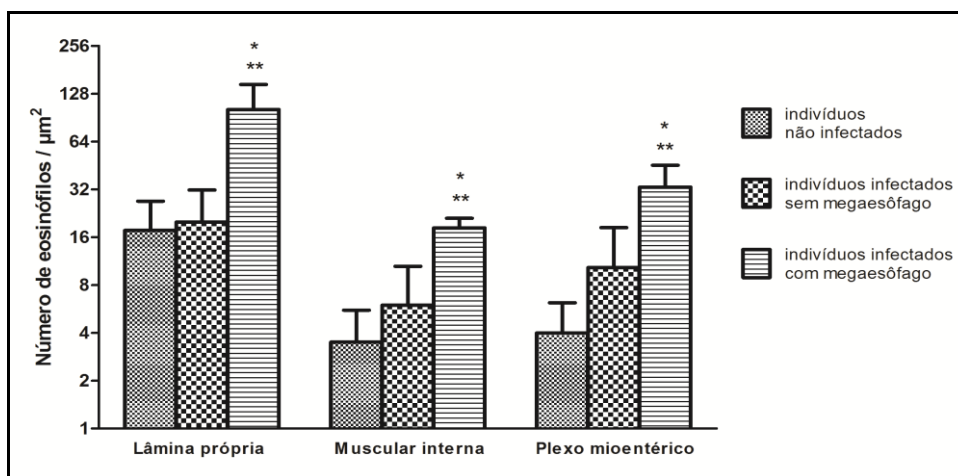


Gráfico 3. Número de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na lâmina própria, muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos não infectados ($p \leq 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago ($p \leq 0,05$). Contagem realizada em 50 campos na objetiva de 100x.

Os dados de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR foram expressos como porcentagem. Esse cálculo foi realizado com base no número total de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina. Assim, foi demonstrado aumento significativo na porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (VIP-IR: $24,14 \pm 5,58$; substância P: $58,16 \pm 5,38$) comparado aos indivíduos não infectados (VIP-IR: $15,53 \pm 4,38$; substância P: $13,44 \pm 6,96$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (VIP-IR: $15,98 \pm 2,96$; substância P: $16,57 \pm 3,97$). Na camada muscular interna, os indivíduos infectados com megaesôfago (VIP-IR: $33,52 \pm 5,65$; substância P-IR: $39,95 \pm 1,31$) também apresentaram aumento significativo na porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR comparado aos indivíduos não infectados (VIP-IR: $15,83 \pm 13,49$; substância P-IR: $15,83 \pm 13,49$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (VIP-IR: $15,79 \pm 7,97$; substância P-IR: $19,76 \pm 11,51$). No plexo mioentérico, o aumento significativo de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR foi observado apenas entre o grupo de indivíduos infectados com megaesôfago (VIP-IR: $41,58 \pm 3,43$; substância P-IR: $53,86 \pm 4,07$) e o grupo de indivíduos não infectados (VIP-IR: $15,56 \pm 13,11$; substância P-IR: $12,78 \pm 9,98$). Não houve diferença significativa entre o grupo de indivíduos infectados sem

megaesôfago (VIP-IR: $28,46 \pm 22,09$; substância P-IR: $30,11 \pm 23,59$) e os outros dois grupos (Gráfico 4).

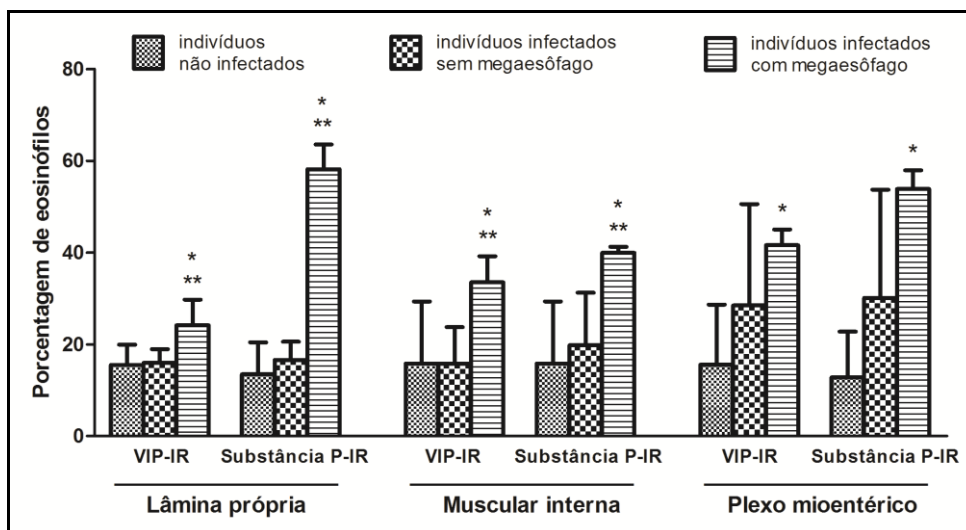


Gráfico 4. Percentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria, muscular interna e plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos não infectados ($p \leq 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago ($p \leq 0,05$). Contagem realizada em 50 campos na objetiva de 100x. Cálculo da percentagem: número total de eosinófilos VIP-IR ou substância P-IR / número total de eosinófilos HE x 100.

1.2.3 Células epiteliais

De acordo com a análise morfométrica, os indivíduos infectados com megaesôfago (VIP-IR: $1267,00 \pm 1075,00$; substância P-IR: $952,80 \pm 877,30$) apresentaram diminuição significativa na densidade de células epiteliais VIP-IR e substância P-IR quando comparados aos indivíduos não infectados (VIP-IR: $17947,00 \pm 3308,00$; substância P-IR: $13768,00 \pm 3972,00$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (VIP-IR: $16333,00 \pm 4995,00$; substância P-IR: $9649,00 \pm 3835,00$) (Gráfico 5).

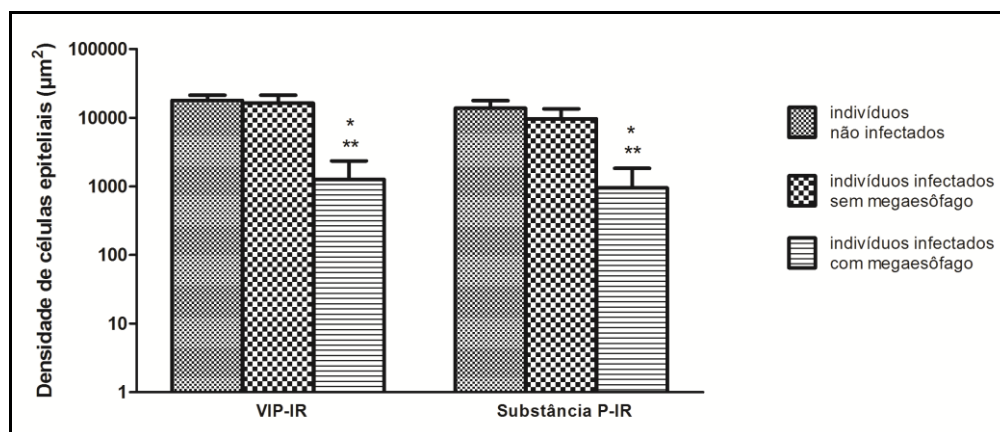


Gráfico 5. Densidade de células epiteliais VIP-IR e substância P-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos não infectados ($p \leq 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago ($p \leq 0,05$). Área total analisada de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ por indivíduo.

2. Receptores VPAC2 e NK1

2.1 Análise qualitativa

A imunorreatividade de VPAC2 foi observada na mucosa, nas camadas musculares, interna e externa e no plexo mioentérico do esôfago de todos os indivíduos analisados. Na mucosa VPAC2 se destacou no epitélio (Fig. 8A) e em algumas estruturas da lâmina própria, como, em células mononucleares (Fig. 8B) e polimorfonucleares (Fig. 8C) e na parede dos vasos sanguíneos (Fig. 8D). Nas camadas musculares a imunorreatividade à VPAC2 foi observada ao redor dos núcleos alongados das células musculares lisas (Fig. 8E). No plexo mioentérico também foram observadas células enterogliais VPAC2-IR (Fig. 8F). Já a imunorreatividade de NK1 foi observada apenas em regiões da mucosa, como no epitélio (Fig. 8G), e nas células mononucleares (Fig. 8H) e na parede dos vasos sanguíneos (Fig. 8I) da lâmina própria.

Com relação às células epiteliais VPAC2-IR, foi observada marcação em todas as camadas do epitélio dos indivíduos não infectados e nos infectados sem megaesôfago (Figs. 9A e 9B). Nos tecidos dos indivíduos infectados com megaesôfago, a marcação predominou-se no citoplasma das células epiteliais do terço médio e superior (Fig. 9C). No epitélio dos indivíduos não infectados e infectados sem megaesôfago, a imunorreatividade de NK1 foi presente no citoplasma de algumas células situadas no terço médio e superior, enquanto que nos indivíduos infectados com megaesôfago a marcação predominou na borda das células (Figs. 9D, 9E e 9F).

2.2 Análises semi-quantitativas

2.2.1 Células epiteliais

Estatisticamente foi demonstrada diminuição significativa da densidade de células epiteliais VPAC2-IR e NK1-IR nos indivíduos infectados com megaesôfago (VPAC2: $7758,00 \pm 5101,00$; NK1-IR: $132,50 \pm 79,86$) comparado aos indivíduos não infectados (VPAC2-IR: $22474,00 \pm 3618,00$; NK1-IR: $1873,00 \pm 690,80$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (VPAC2-IR: $22158,00 \pm 4588,00$; NK1-IR: $1439,00 \pm 593,00$) (Gráfico 6).

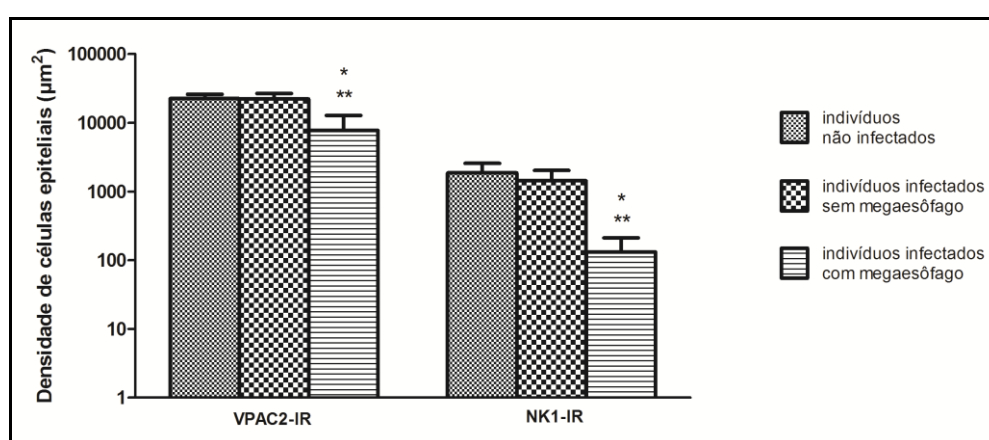


Gráfico 6. Densidade de células epiteliais VPAC2-IR e NK1-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com e sem megaesôfago. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos não infectados ($p \leq 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago ($p \leq 0,05$). Área total analisada de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ por indivíduo.

3. Estudo do grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago

3.1 Análises de correlação

Devido ao grau variável de inervação no grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago e com o objetivo de validar o uso de PGP 9.5, foi demonstrado estatisticamente que o número de neurônios do plexo mioentérico apresenta correlação positiva com a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares (muscular interna: $r = 0,9429$ e $p = 0,0167$; muscular externa: $r = 1,000$ e $p = 0,0028$).

Análises envolvendo outros parâmetros também foram realizadas nesse grupo. Assim foi demonstrada que, a densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR apresentou correlação positiva com a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares (muscular interna: $r = 0,8857$ e $p = 0,0333$; muscular externa: $r = 0,9429$ e $p =$

0,0167). Por outro lado, não houve correlação entre a densidade relativa de filetes nervosos substância P-IR e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares (muscular interna: $r = -0,1429$ e $p = 0,8028$; muscular externa: $r = -0,7714$ e $p = 0,1028$). A porcentagem de eosinófilos VIP-IR apresentou correlação negativa com o número de neurônios no plexo mioentérico ($r = -0,9856$ e $p = 0,0028$) e a porcentagem de eosinófilos substância P-IR também apresentou correlação negativa com o número de neurônios no plexo mioentérico ($r = -0,9856$ e $p = 0,0028$) (Gráfico 7).

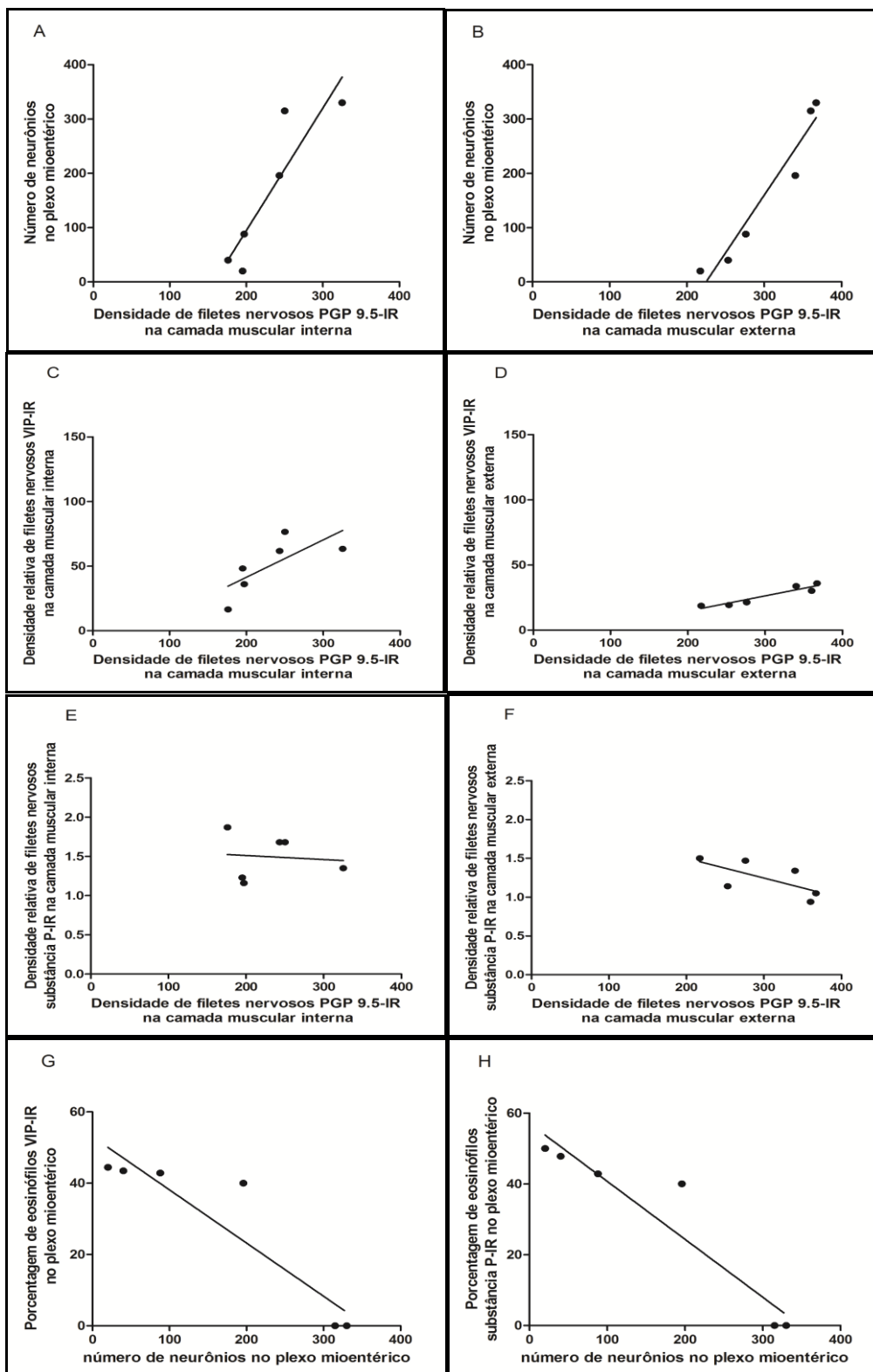


Gráfico 7. Análises de correlação no grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago: A e B - número de neurônios no plexo mioentérico e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares interna e externa; C e D - densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares interna e externa; E e F - densidade relativa de filetes nervosos substância P-IR e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares interna e externa; G e H - porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR e número de neurônios no plexo mioentérico.

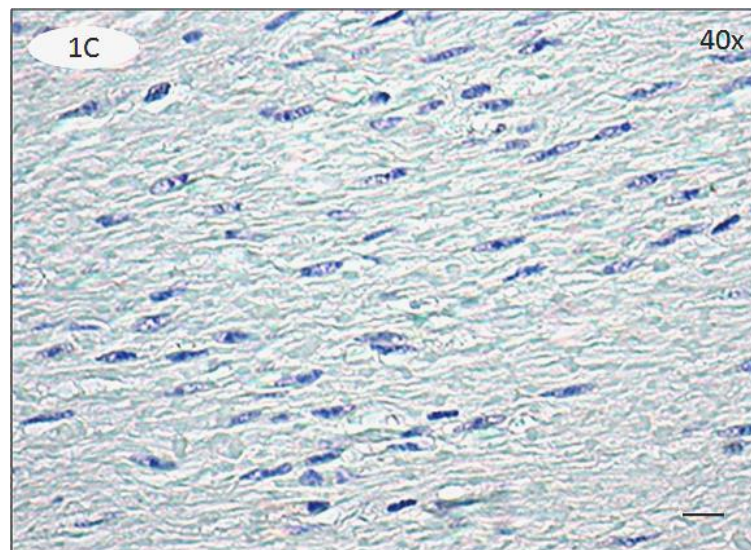
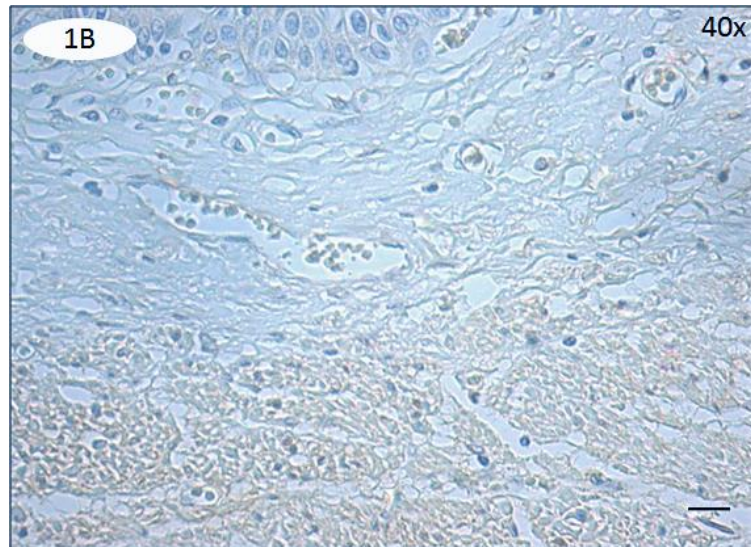
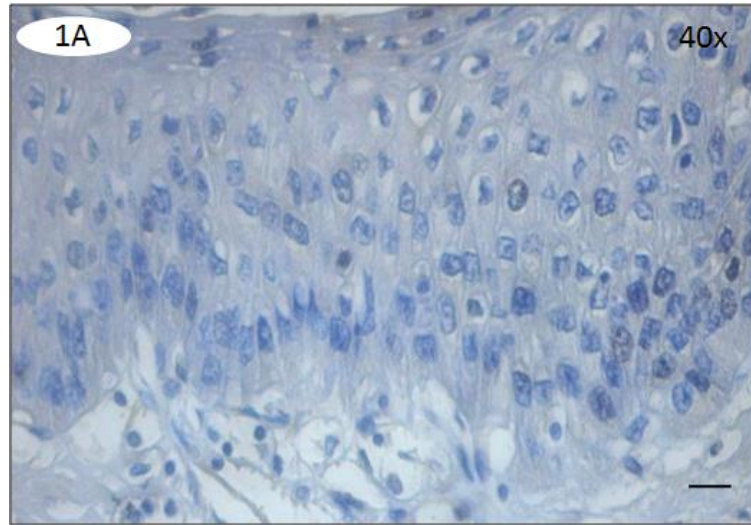
ILUSTRAÇÕES

PRANCHA 1

Figura 1A. Secção do tecido epitelial de revestimento do esôfago submetido à reação de imunoperoxidase sem o anticorpo primário e contra-coradas com hematoxilina (controle negativo). Aumento original de 40x.

Figura 1B. Secção da lâmina própria e da muscular da mucosa do esôfago submetidas à reação de imunoperoxidase sem o anticorpo primário e contra-coradas com hematoxilina (controle negativo). Aumento original de 40x.

Figura 1C. Secção da camada muscular interna do esôfago submetida à reação de imunoperoxidase sem o anticorpo primário e contra-corada com hematoxilina (controle negativo). Aumento original de 40x.



PRANCHA 2

Figura 2A. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos PGP 9.5-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

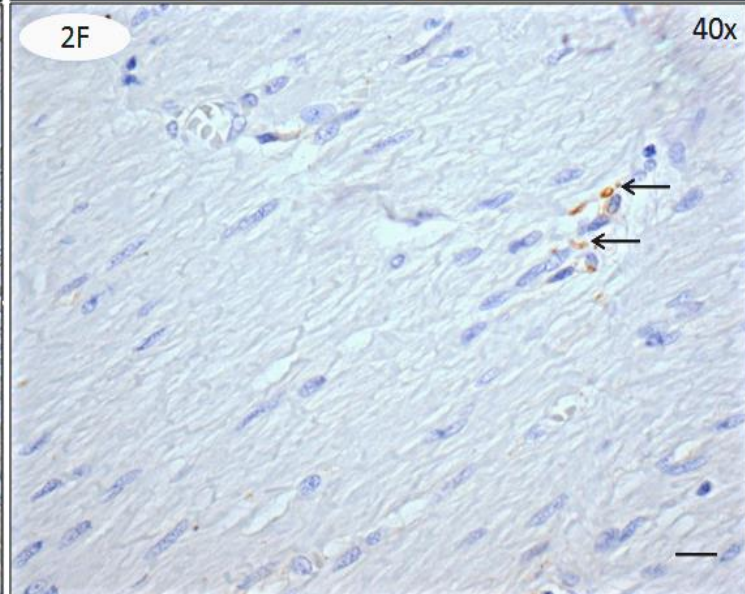
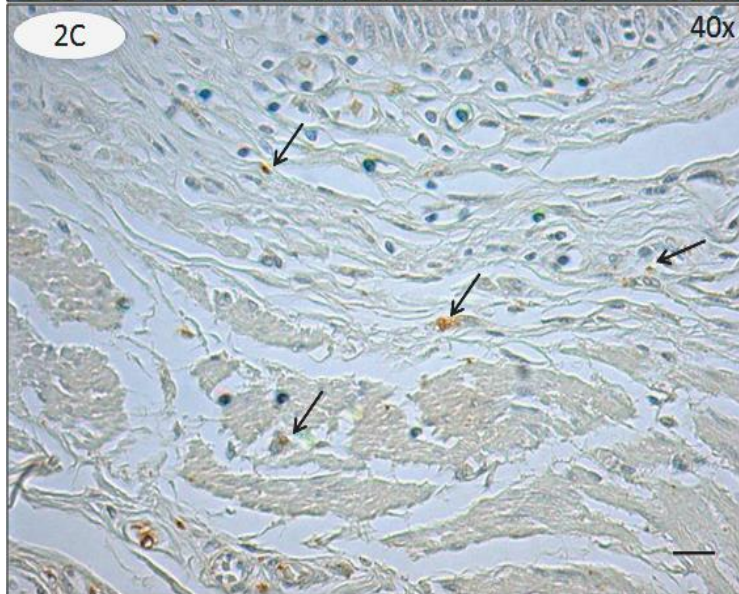
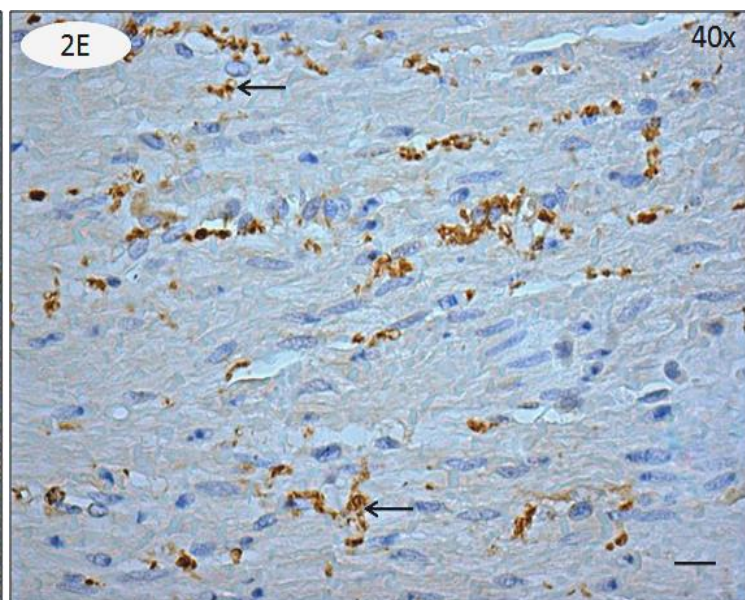
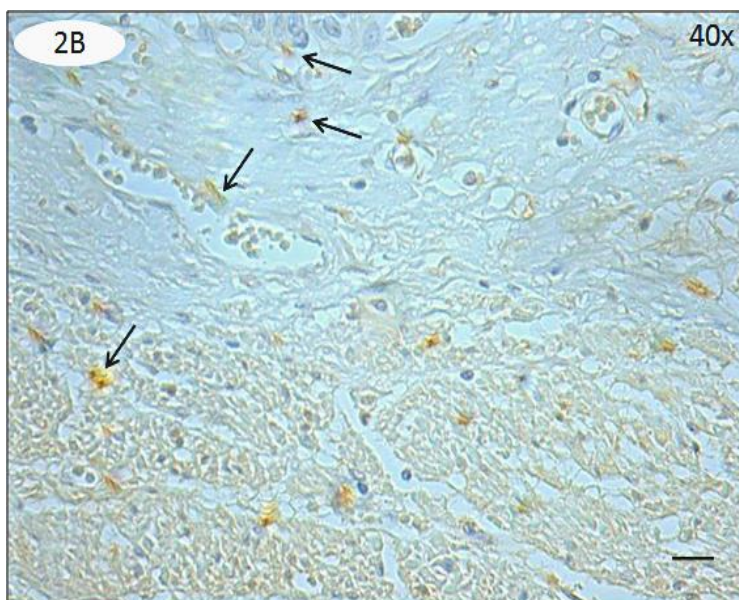
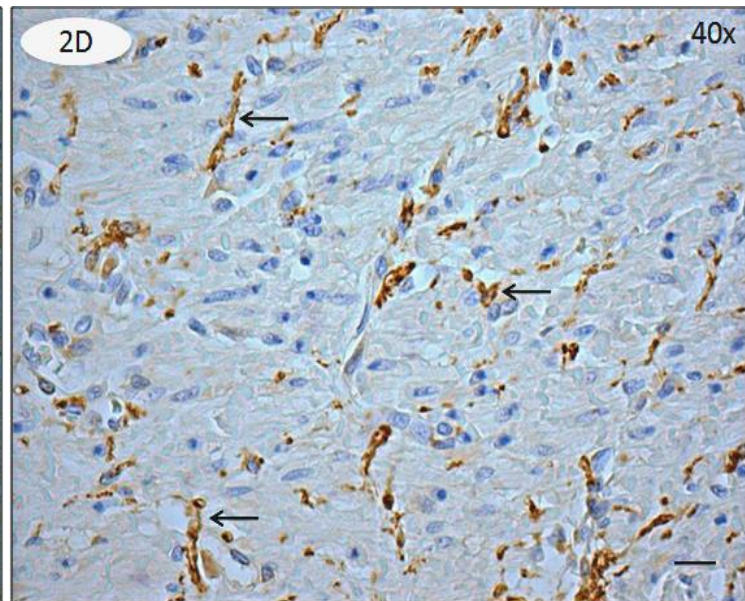
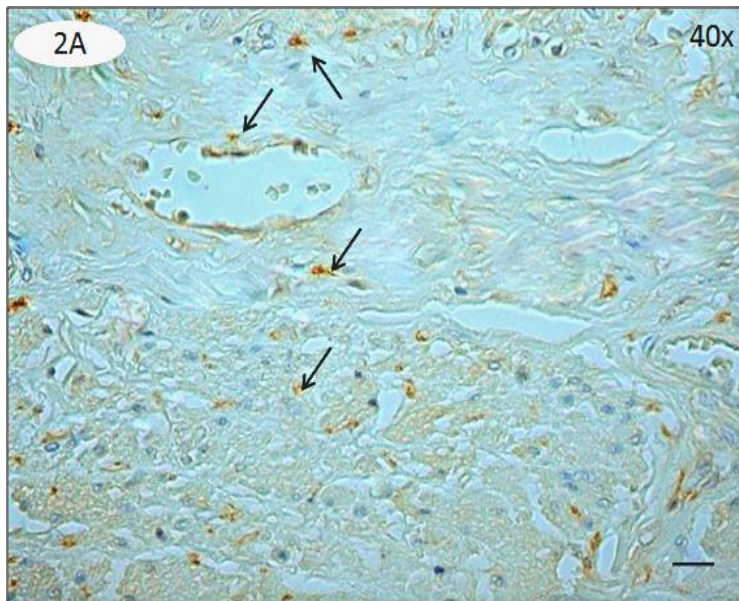
Figura 2B. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos PGP 9.5-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 2C. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos PGP 9.5-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 2D. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 2E. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 2F. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.



PRANCHA 3

Figura 3A. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

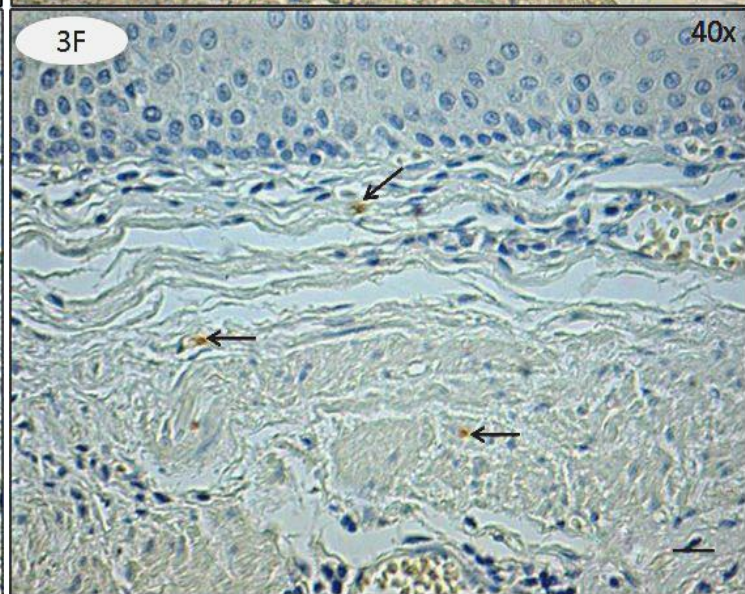
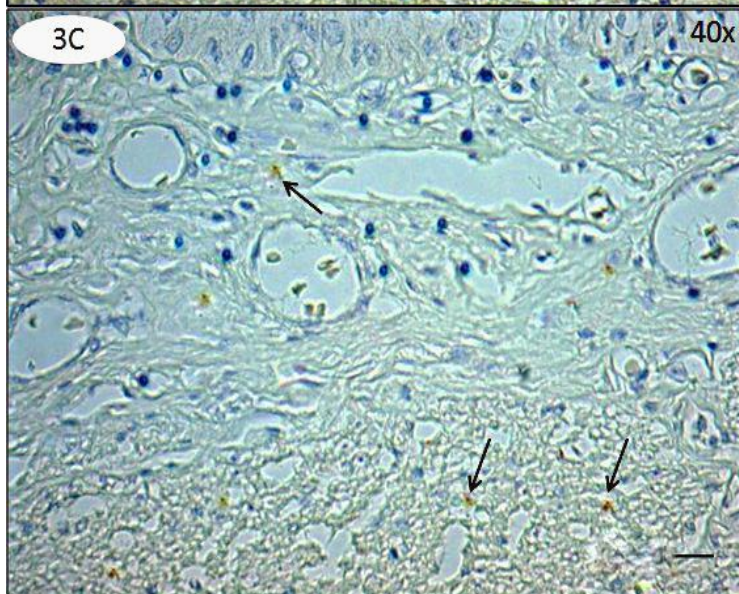
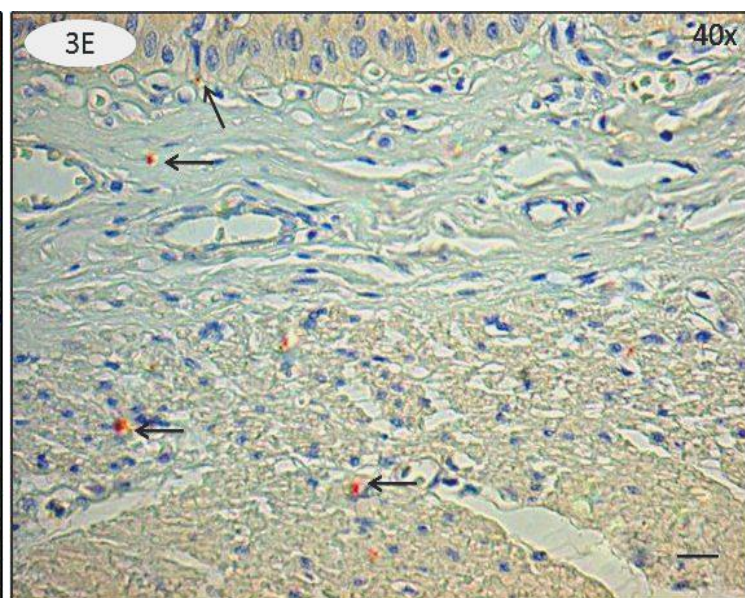
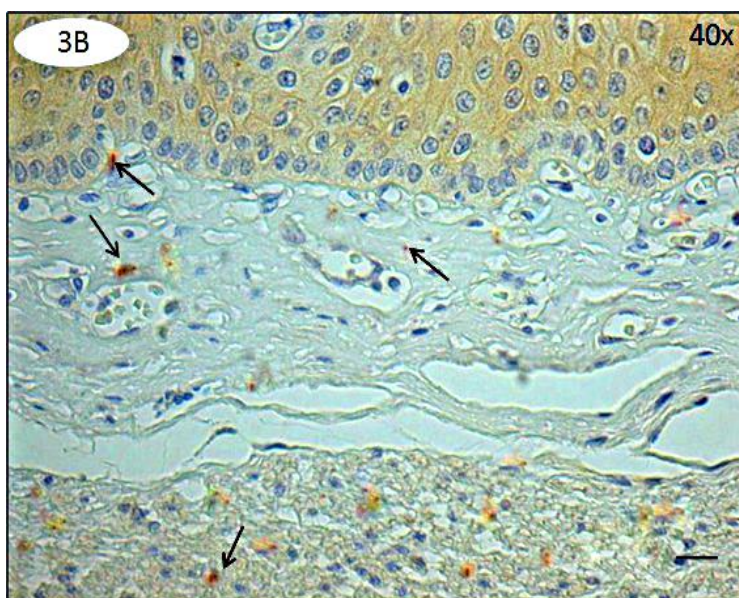
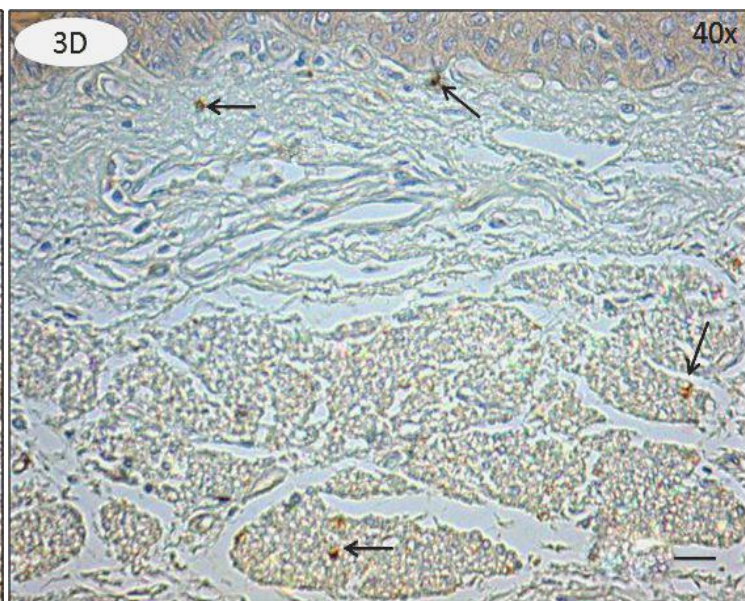
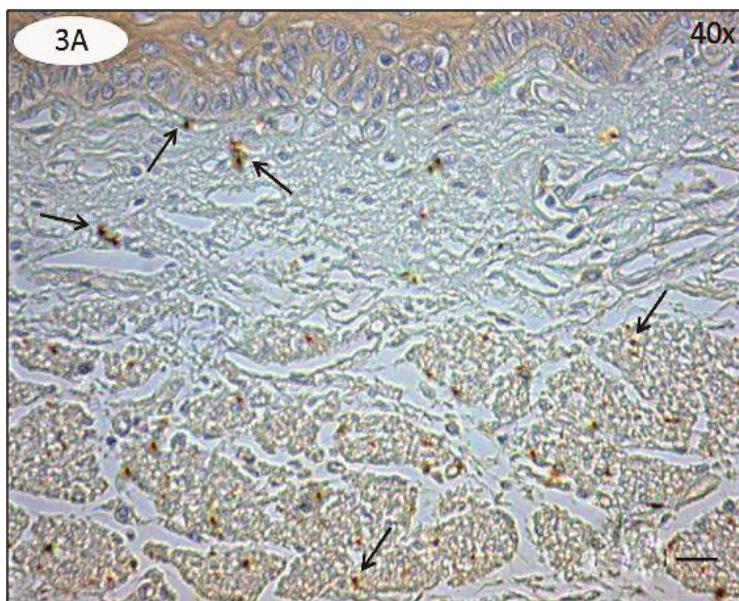
Figura 3B. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. original de 40x.

Figura 3C. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 3D. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos substância P-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 3E. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos substância P-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 3F. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos substância P-IR na lâmina própria e na muscular da mucosa do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.



PRANCHA 4

Figura 4A. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados. Núcleos contra-corados com hematoxilina (setas). Aumento original de 40x.

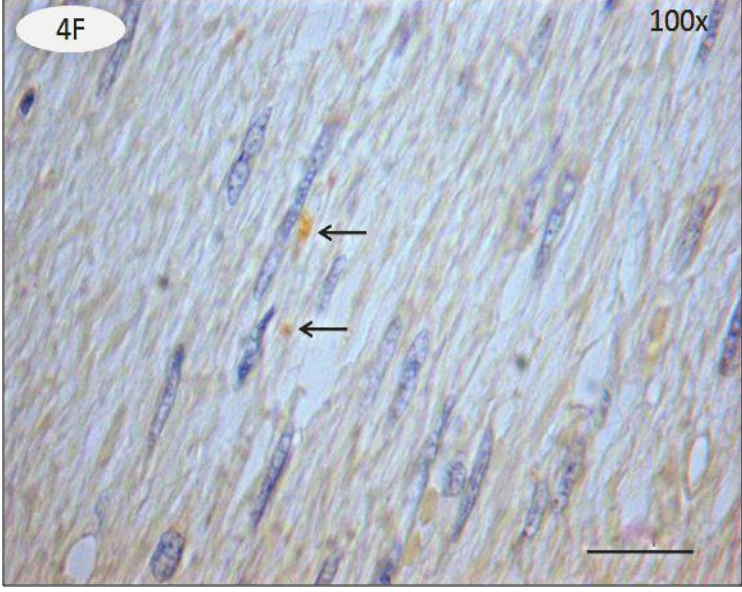
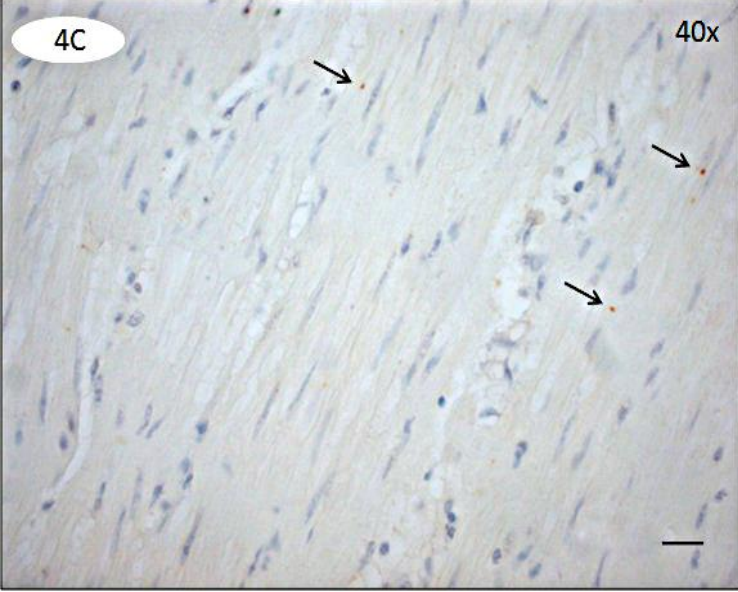
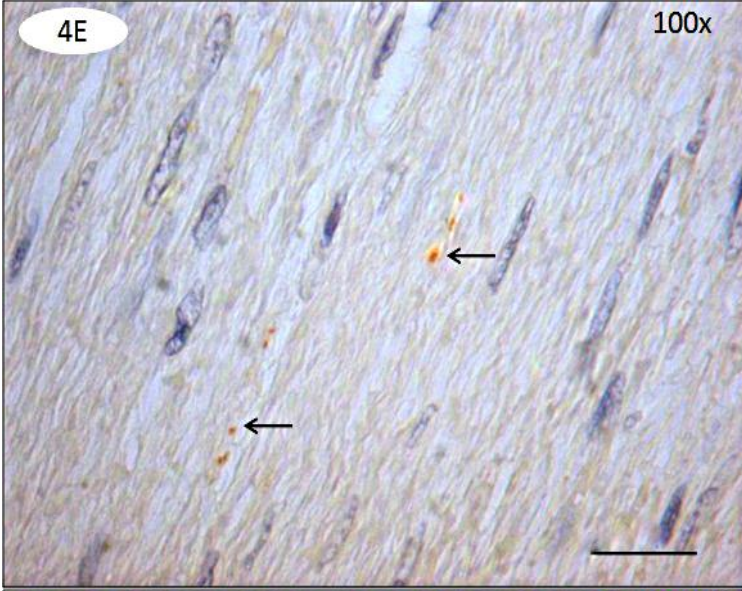
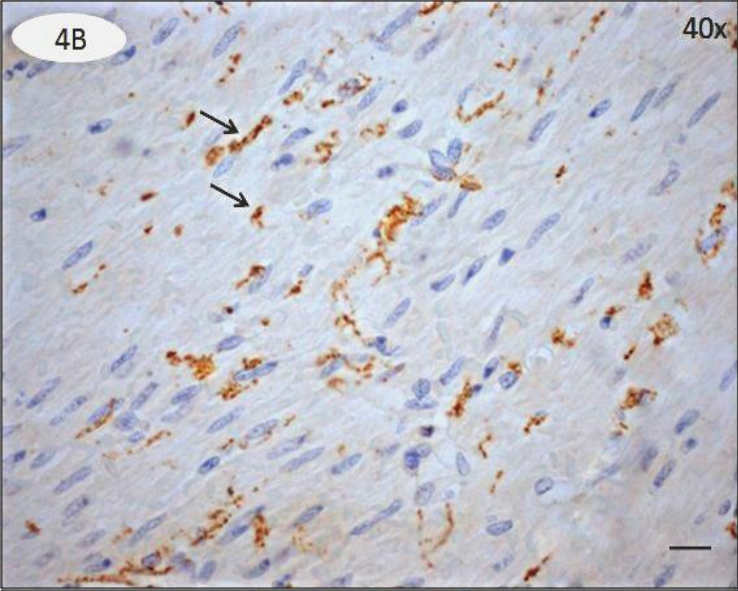
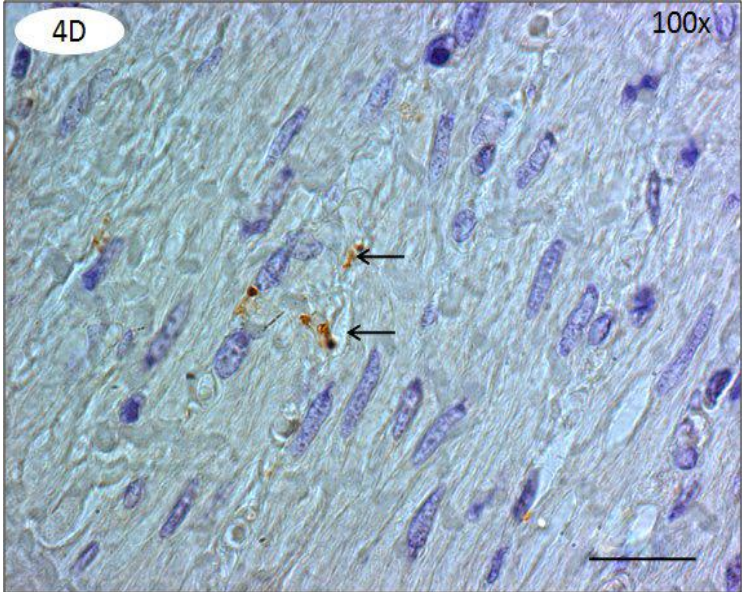
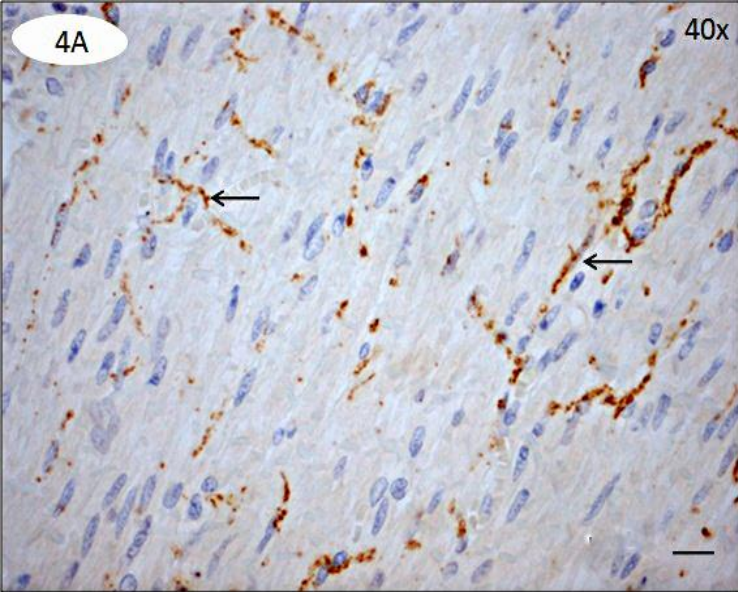
Figura 4B. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 4C. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos VIP-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 4D. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos substância P-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 4E. Perfil imunohistoquímico de filetes nervosos substância P-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 4F. Perfil imunohistoquímico filetes nervosos substância P-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.



PRANCHA 5

Figura 5A. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na lâmina própria do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Aumento original de 40x.

Figura 5B. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Aumento original de 40x.

Figura 5C. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Aumento original de 40x.

Figura 5D. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na camada muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Aumento original de 40x.

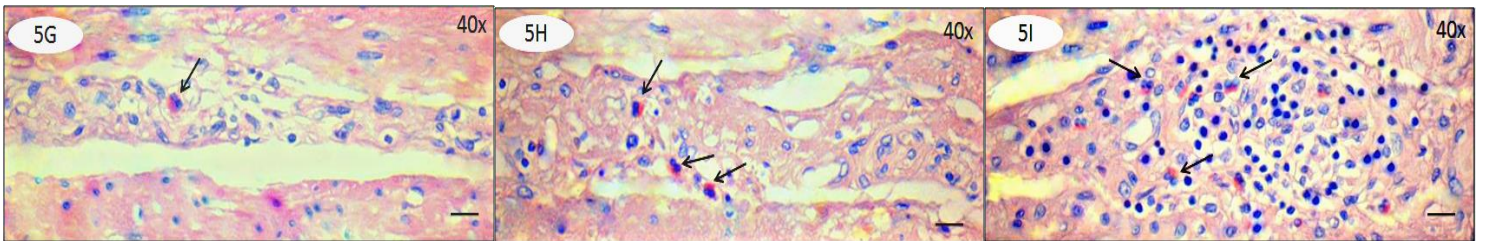
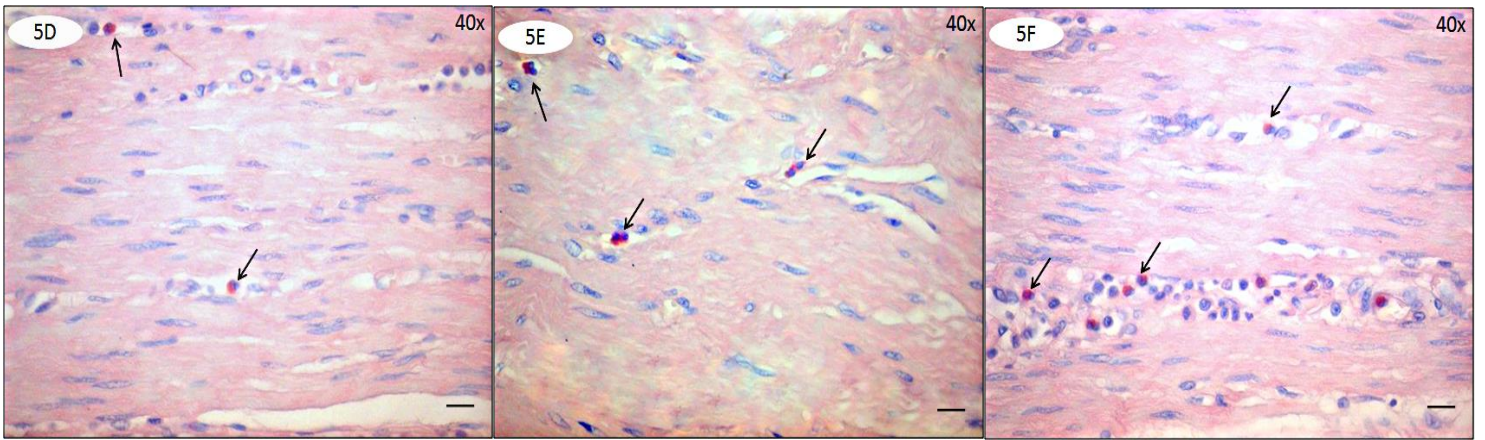
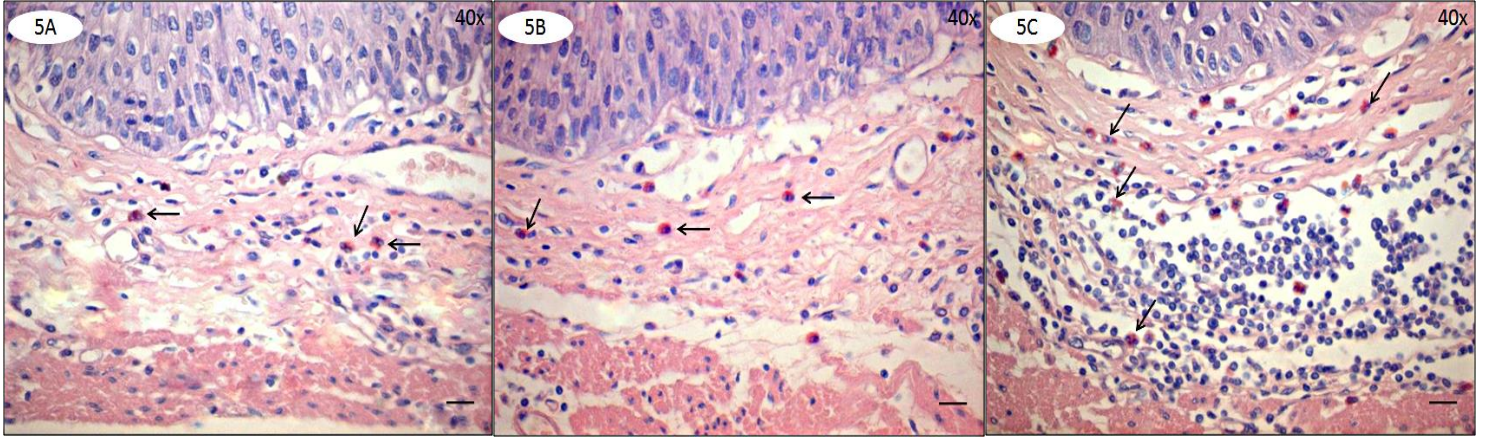
Figura 5E. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Aumento original de 40x.

Figura 5F. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Aumento original de 40x.

Figura 5G. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Aumento original de 40x.

Figura 5H. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Aumento original de 40x.

Figura 5I. Distribuição de eosinófilos corados com hematoxilina e eosina no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Aumento original de 40x.



PRANCHA 6

Figura 6A. Perfil imunohistoquímico de eosinófilos VIP-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

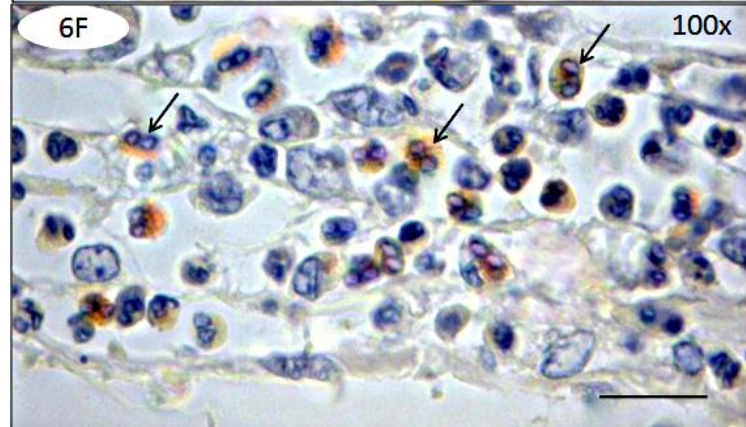
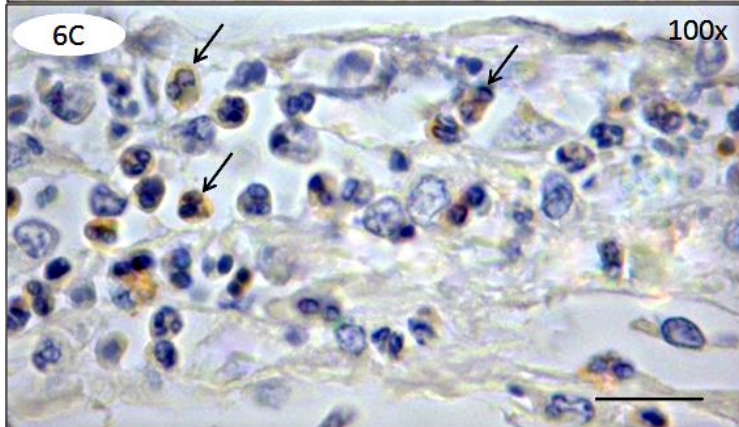
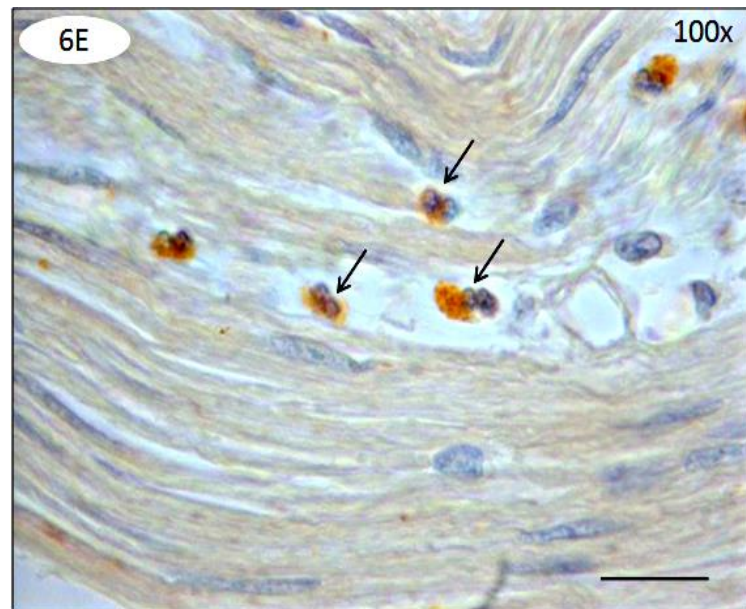
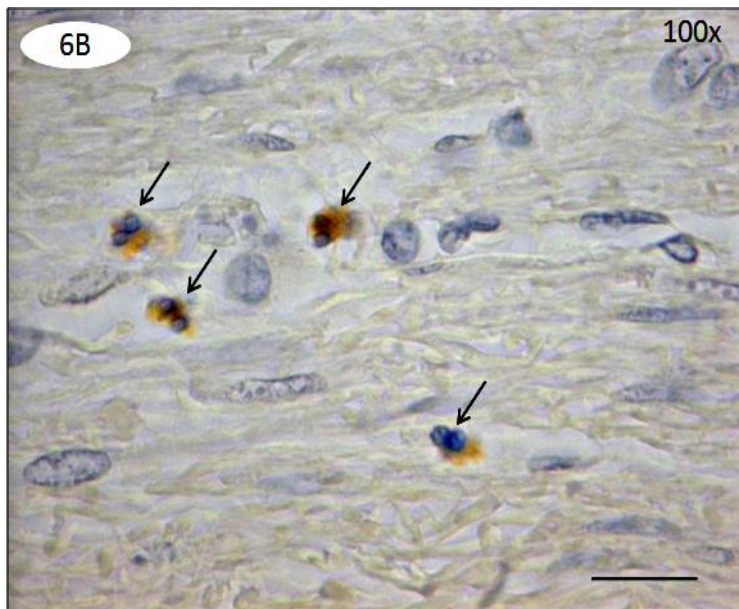
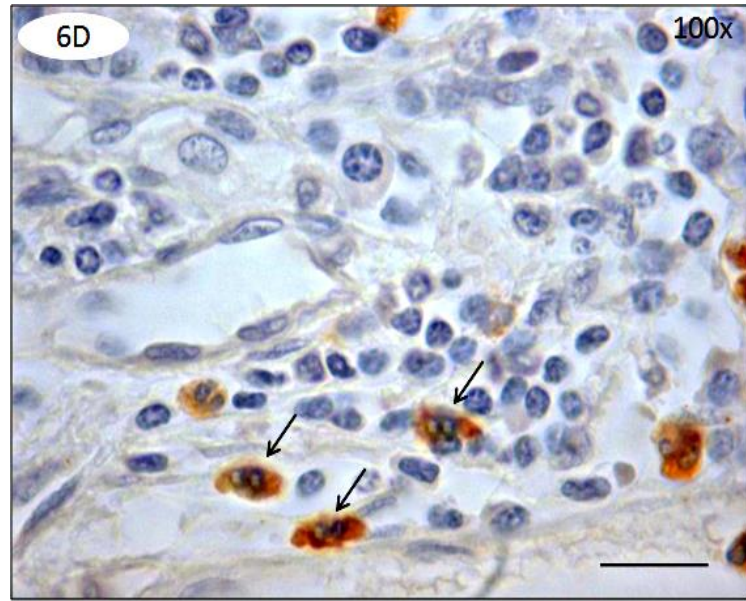
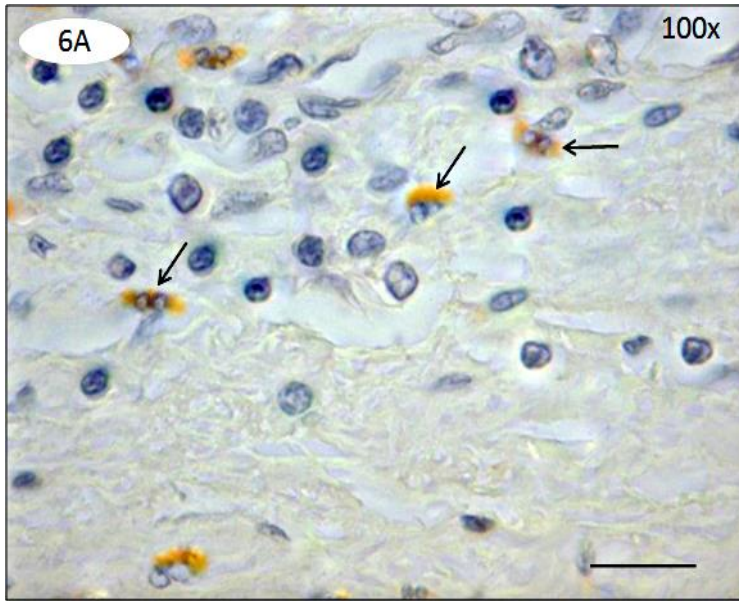
Figura 6B. Perfil imunohistoquímico de eosinófilos VIP-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 6C. Perfil imunohistoquímico de eosinófilos VIP-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 6D. Perfil imunohistoquímico de eosinófilos substância P-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 6E. Perfil imunohistoquímico de eosinófilos substância P-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 6F. Perfil imunohistoquímico de eosinófilos substância P-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.



PRANCHA 7

Figura 7A. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VIP-IR no esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

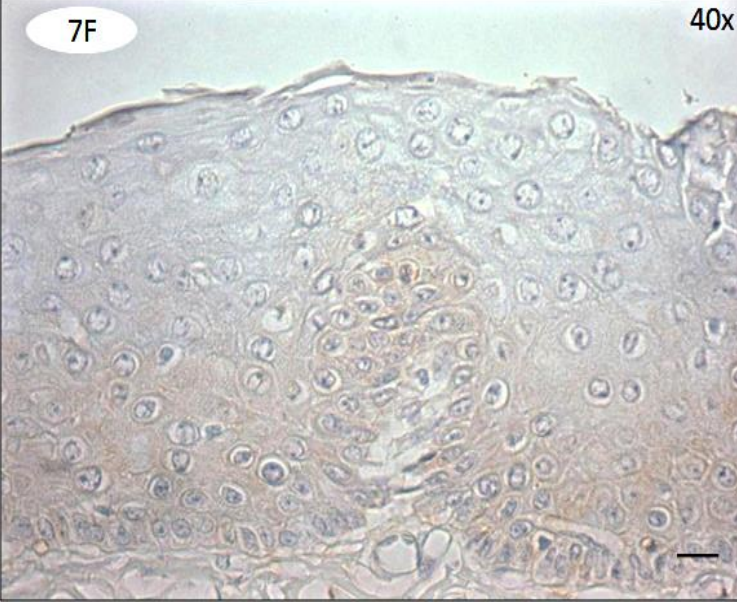
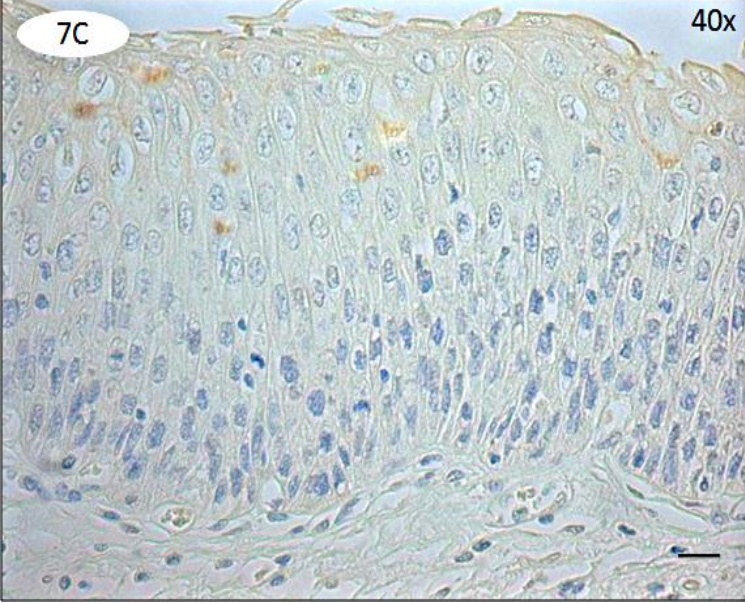
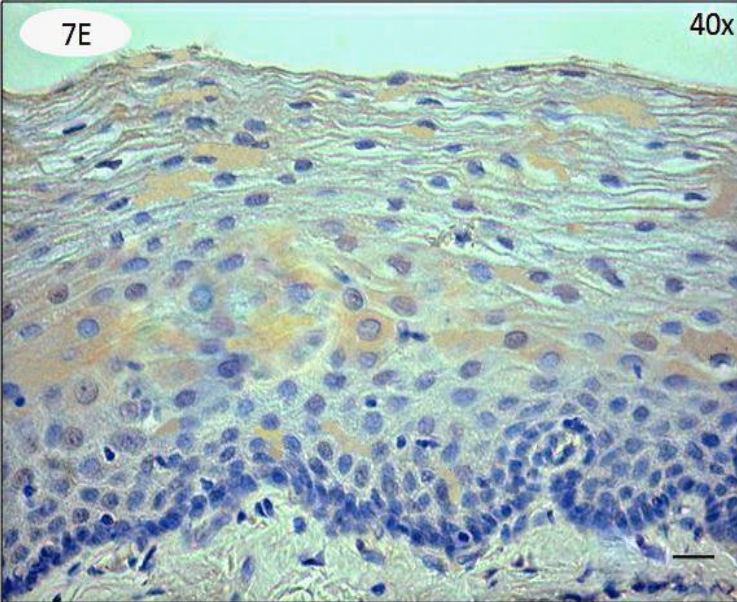
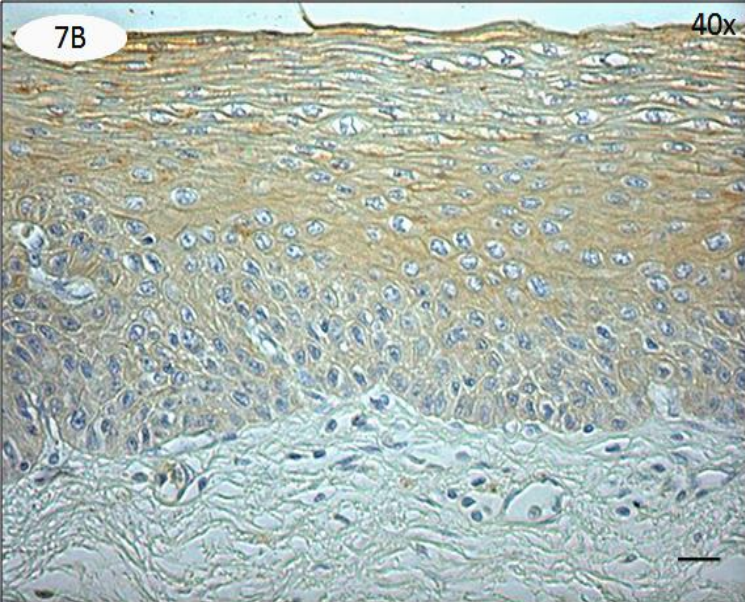
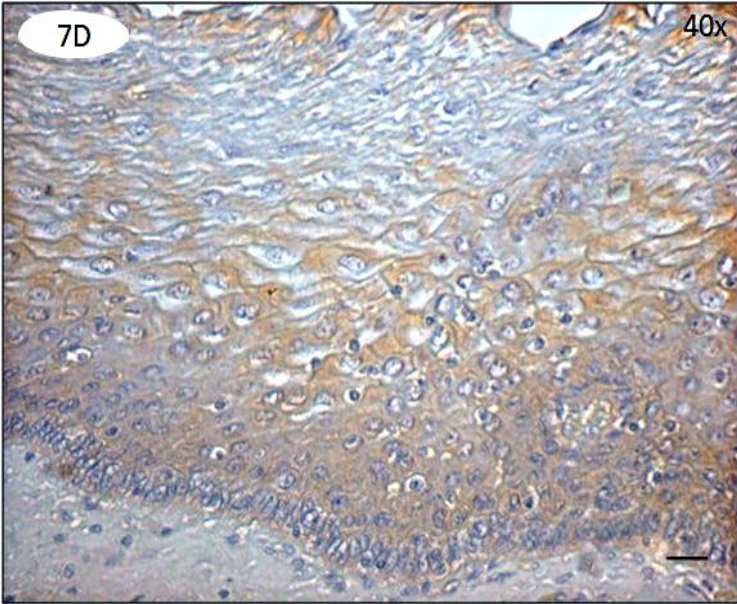
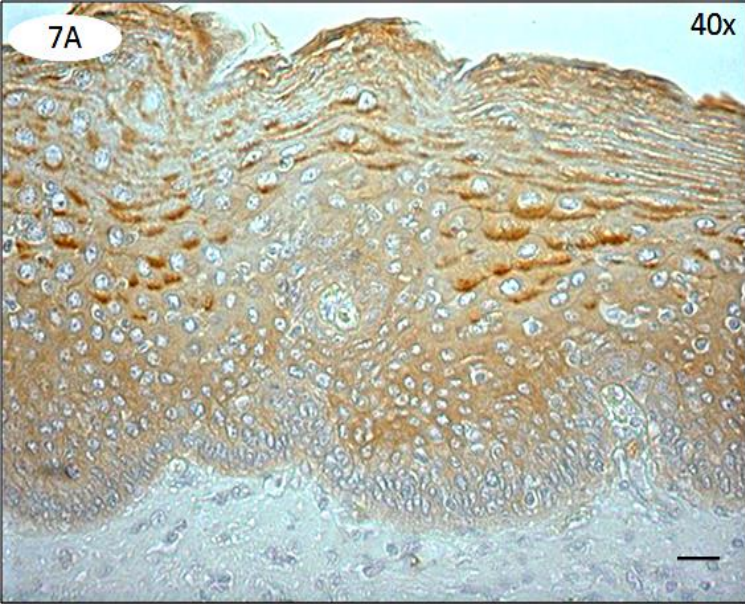
Figura 7B. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VIP-IR no esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 7C. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VIP-IR no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 7D. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais substância P-IR no esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 7E. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais substância P-IR no esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 7F. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais substância P-IR no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.



PRANCHA 8

Figura 8A. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VPAC2-IR no esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 8B. Perfil imunohistoquímico de células inflamatórias mononucleares VPAC2-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 8C. Perfil imunohistoquímico de células inflamatórias polimorfonucleares VPAC2-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 8D. Perfil imunohistoquímico de vasos sanguíneos VPAC2-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

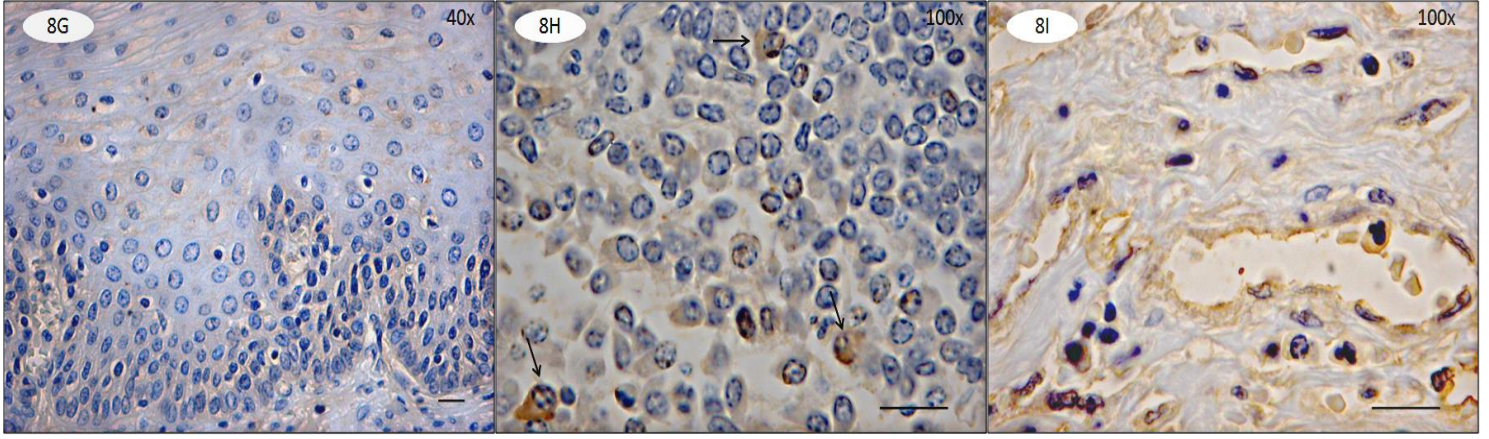
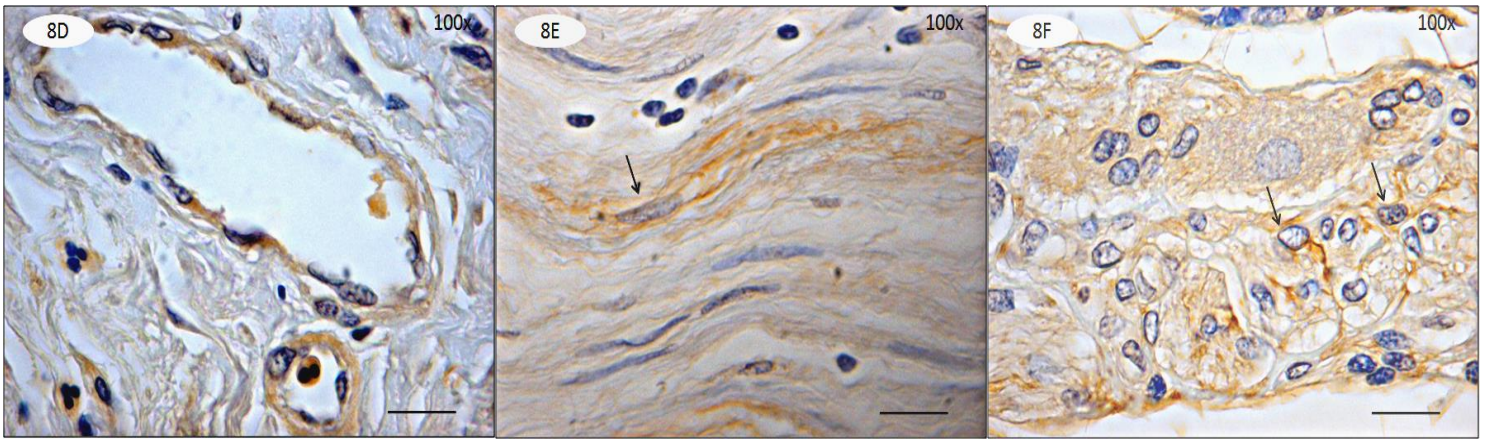
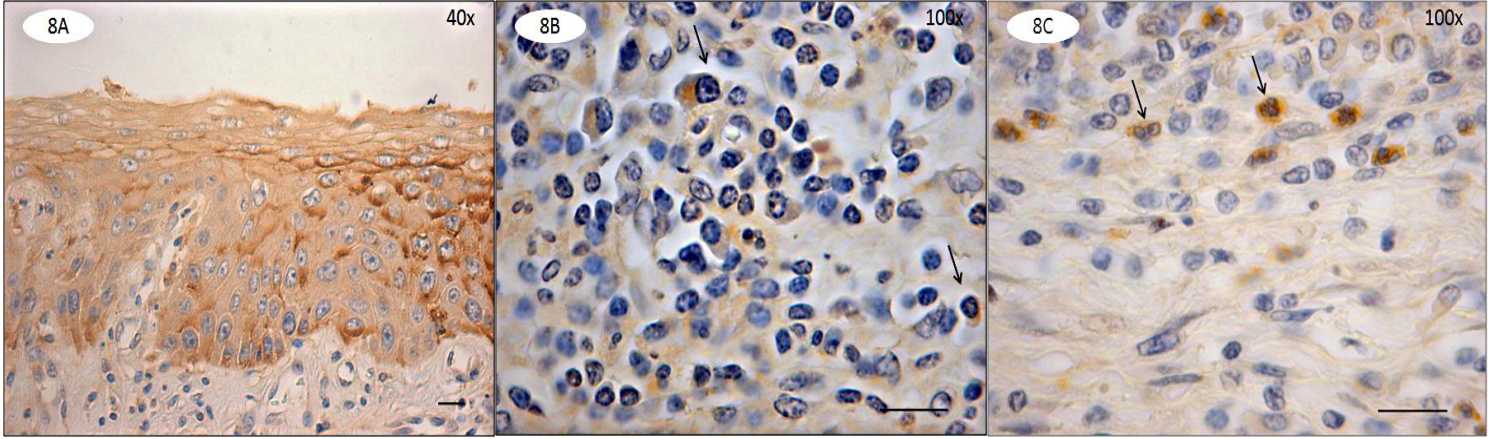
Figura 8E. Perfil imunohistoquímico de células musculares lisas VPAC2-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 8F. Perfil imunohistoquímico de células enterogliais VPAC2-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 8G. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais NK1-IR no esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 8H. Perfil imunohistoquímico de células inflamatórias mononucleares NK1-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.

Figura 8I. Perfil imunohistoquímico de vasos sanguíneos NK1-IR na lâmina própria do esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 100x.



PRANCHA 9

Figura 9A. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VPAC2-IR no esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

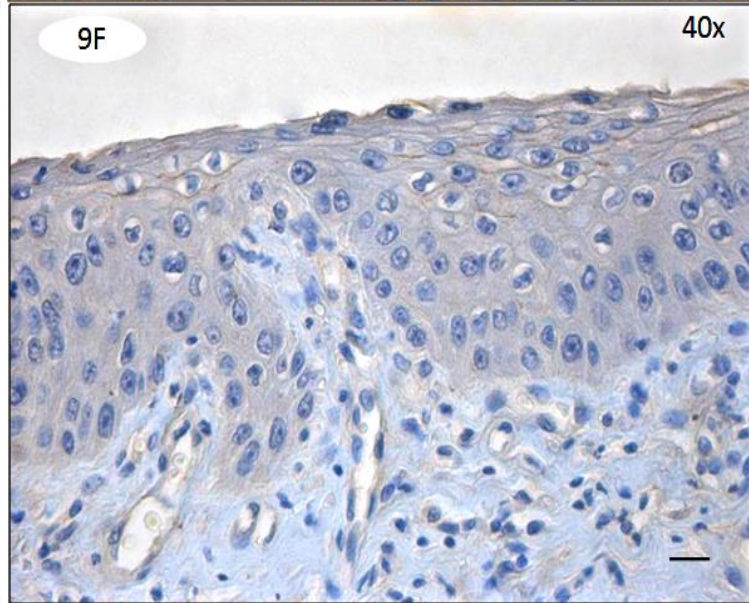
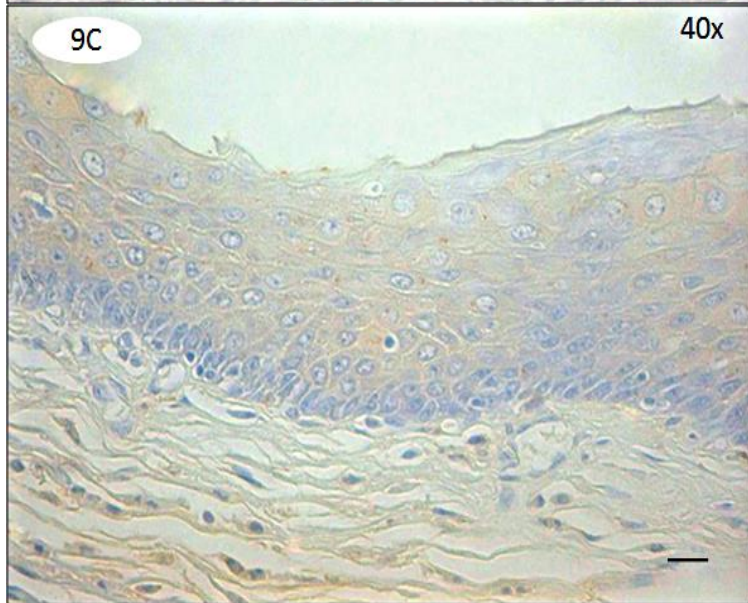
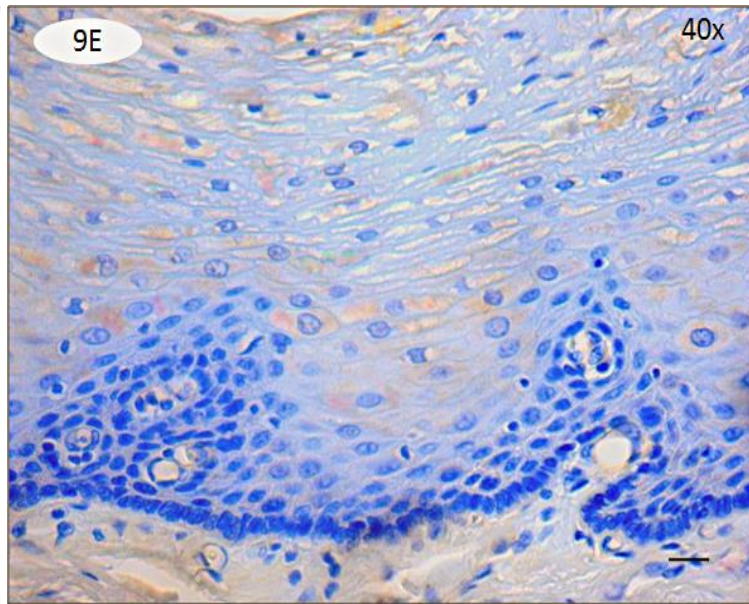
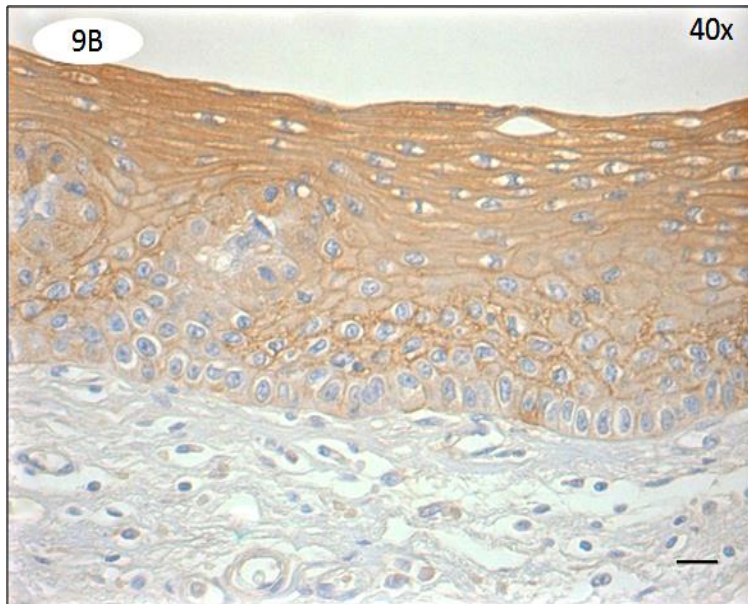
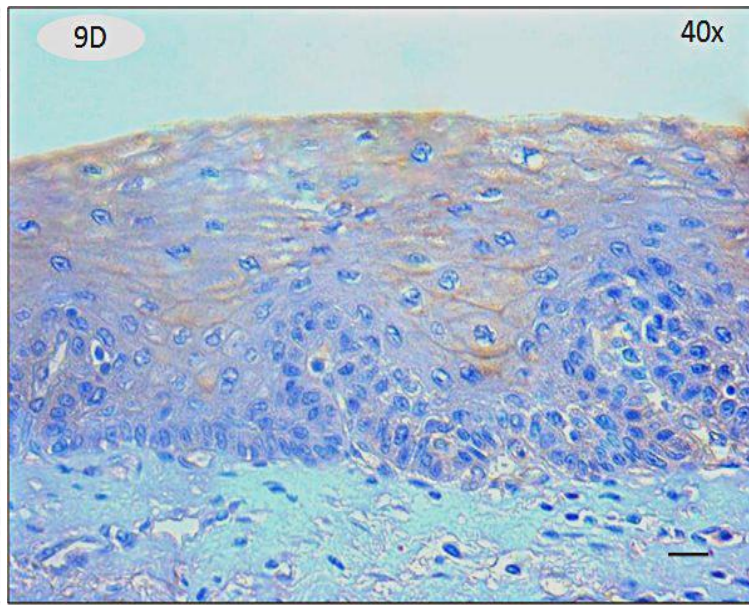
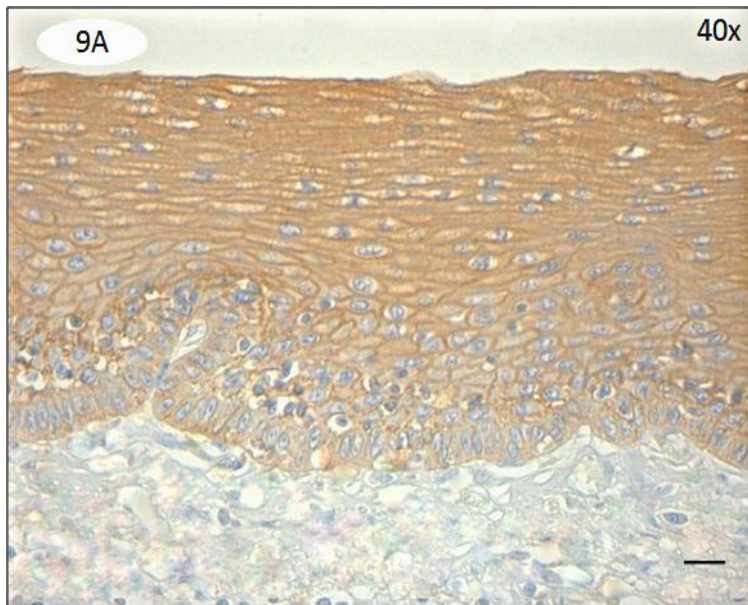
Figura 9B. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VPAC2-IR no esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 9C. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais VPAC2-IR no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 9D. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais NK1-IR no esôfago de indivíduos não infectados (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 9E. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais NK1-IR no esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.

Figura 9F. Perfil imunohistoquímico de células epiteliais NK1-IR no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (setas). Núcleos contra-corados com hematoxilina. Aumento original de 40x.



RESUMO DOS RESULTADOS

Apresentamos a seguir o resumo dos resultados, considerando que todos são inéditos:

A. Os indivíduos infectados com megaesôfago apresentaram:

1. Diminuição na densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e aumento na densidade relativa de filetes nervosos substância P-IR, na lâmina própria, muscular da mucosa e nas camadas musculares, interna e externa;
2. Aumento na porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria, muscular interna e no plexo mioentérico;
3. Diminuição na densidade de células epiteliais VIP-IR, substância P-IR, VPAC2-IR e NK1-IR;

B. Os indivíduos infectados sem megaesôfago apresentaram:

1. Correlação positiva entre a densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas camadas musculares, interna e externa;
2. Correlação negativa entre as porcentagens de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR e o número de neurônios no plexo mioentérico;

DISCUSSÃO

A relação entre SNE e sistema imune é mediada por uma rede complexa de células que estão em constante comunicação para desenvolver uma variedade de respostas coordenadas a um determinado antígeno. Assim o sistema imune informa ao SNE quando uma resposta inflamatória para uma infecção está ocorrendo e o SNE responde a esta informação alterando o estado do órgão. Diversos mediadores como citocinas, hormônios e neuropeptídeos participam dessa comunicação. Dentre os neuropeptídeos, VIP e substância P, produzidos principalmente por neurônios (HANSEN 2003a; WOOD 2007) e células imunes (LYGREN *et al.*, 1984; WERSHIL *et al.*, 1993; METWALI *et al.*, 1994), têm chamado a atenção por estarem envolvidos em várias desordens do trato GI, como na acalasia idiopática (WATTCHOW AND COSTA 1996; VILLANACCI *et al.*, 2010), megacólon chagásico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c), colite ulcerativa (NEUNLIST *et al.*, 2003a; KAMINSKA *et al.*, 2006; 2007) e diverticulite (SIMPSON *et al.*, 2009). Na forma digestiva da doença de Chagas, mais especificamente no esôfago, o estudo desses neuropeptídeos se torna relevante uma vez que a sua patologia nos parece estar associada não apenas à permanência do parasito no tecido durante a fase crônica, como ousou se considerar por alguns (DA SILVEIRA *et al.*, 2005), mas também a distúrbios de mecanismos locais imunomodulatórios (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c). Além disso, a fisiologia do esôfago é totalmente dependente da ação desses neuromediadores, como será discutido, oportunamente, ao longo deste texto.

Inicialmente, demonstramos a presença de filetes nervosos, eosinófilos e células epiteliais VIP-IR e substância P-IR em todas as amostras analisadas. Os filetes nervosos foram observados na lâmina própria, muscular da mucosa e nas camadas musculares do esôfago de indivíduos não infectados e infectados com e sem megaesôfago. Essas informações corroboram com dados da literatura, confirmando a presença de filetes nervosos VIP-IR e substância P-IR nessas camadas do esôfago de indivíduos saudáveis (FERRI *et al.*, 1984; WATTCHOW *et al.*, 1987; NEWTON *et al.*, 1999).

Outra observação importante e também confirmada por WATTCHOW *e cols.* (1987), é que a inervação VIPérgica é abundante no esôfago de indivíduos saudáveis quando comparada à escassez de filetes nervosos substância P-IR. O predomínio de filetes nervosos VIP-IR poderia estar relacionado à fisiologia do órgão, pelo fato de que o esôfago

apresenta a função de conduzir o alimento até estômago, necessitando mais de uma inervação inibidora capaz de proporcionar o relaxamento da musculatura lisa e do esfíncter inferior, como descrito na literatura (BIANCANI *et al.*, 1984; BEHAR *et al.*, 1989), do que uma inervação excitatória a qual desempenharia um efeito oposto (LEANDER *et al.*, 1982). Interessantemente, um dos dados inéditos desse trabalho foi a detecção da reatividade ao receptor de VIP, denominado de VPAC2, nas camadas musculares lisas. VPAC2 tem sido considerado por muitos como o principal receptor envolvido nas funções inibitórias de VIP sobre o trato GI (ROBBERECHT *et al.*, 1998; VANNESTE *et al.*, 2004; KATO *et al.*, 2012).

Na lâmina própria, os filetes nervosos VIP-IR foram encontrados próximos aos vasos sanguíneos e à base do epitélio da mucosa. Segundo dados da literatura, esses filetes nervosos são projeções de neurônios vasomotores e secretomotores que, quando estimulados, são capazes de promover vasodilatação e secreção de fluidos e eletrólitos, respectivamente (FURNESS 2000; DICKSON AND FINLAYSON 2009). Interessantemente, tanto células endoteliais como células epiteliais da mucosa do esôfago apresentaram reatividade à VPAC2. Ousamos aqui sugerir que, no esôfago aqui analisados, a expressão de VPAC2 nas células endoteliais revela evidências da ação de VIP no controle do fluxo sanguíneo (STOJIC *et al.*, 2007; ROGANOVIC *et al.*, 2010) e sobre a angiogênese (YANG *et al.*, 2009; 2013). A reatividade a VPAC2 nas células epiteliais poderia ilustrar a ação moduladora de VIP para a formação da barreira epitelial, induzindo a expressão de proteínas de junção de oclusão e controlando a proliferação celular (TOUMI *et al.*, 2003; NEUNLIST *et al.*, 2003b; CONLIN *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a reatividade de VPAC2 nas células epiteliais do esôfago é um dado inédito, uma vez que vários estudos têm demonstrado apenas a reatividade de VPAC1 nas células epiteliais dos órgãos do trato GI (REUBI *et al.*, 2000; HARMAR *et al.*, 2004; SCHULZ *et al.*, 2004).

Com relação aos filetes nervosos substância P-IR, observamos que eles se localizam principalmente na base do epitélio da mucosa. Eles fazem parte da inervação sensorial e respondem às alterações químicas, mecânicas e de temperatura no lúmen dos órgãos do trato GI e promovem reflexos intrínsecos que influenciam na motilidade, secreção e fluxo sanguíneo (COSTA *et al.*, 2000; FURNESS *et al.*, 2004). Interessantemente, encontramos células endoteliais e células epiteliais reativas à NK1, receptor de substância P. Por meio de NK1, substância P medeia vários efeitos sobre os

vasos sanguíneos como vasodilatação (PEDERSEN *et al.*, 2000; MECHICHE *et al.*, 2003), angiogênese e quimiotaxia de leucócitos (ZICHE *et al.*, 1990; 1991; KOHARA *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* também têm sugerido que substância P está envolvida no controle da barreira epitelial do trato GI, induzindo a proliferação e migração das células epiteliais via NK1 (GOODE *et al.*, 2003; TURNER *et al.*, 2007).

Nas análises semi-quantitativas nós demonstramos que os indivíduos infectados com megaesôfago apresentaram redução na densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e aumento na densidade relativa de filetes nervosos substância P-IR na lâmina própria, na muscular da mucosa e nas camadas musculares do esôfago. Esses dados corroboram com os de DA SILVEIRA *e cols.* (2007c) ao observarem diminuição na taxa de neurônios VIP-IR e aumento na taxa de neurônios substância P-IR no plexo mioentérico do cólon de pacientes com megacolon chagásico. Adicionalmente, alterações no perfil da inervação de VIP e substância P também têm sido observadas em várias desordens do trato GI como na acalasia idiopática (WATTCHOW AND COSTA 1996; VILLANACCI *et al.*, 2010), colite ulcerativa (NEUNLIST *et al.*, 2003a; KAMINSKA *et al.*, 2006; 2007) e diverticulite (SIMPSON *et al.*, 2009). Em todas essas patologias citadas, além das alterações no SNE também foram observadas alterações motoras e intenso processo inflamatório. Na doença do refluxo gastroesofágico, NEWTON *e cols.* (1999) observaram aumento na proporção de filetes nervosos VIP-IR na base do epitélio da mucosa do esôfago desses pacientes, sugerindo uma possível participação de VIP na manutenção da barreira epitelial em resposta ao ambiente ácido. Nenhuma alteração na proporção de filetes nervosos substância P-IR foi observada pelos autores. Baseado em todas essas informações, nós acreditamos que no megaesôfago chagásico a queda da densidade relativa da inervação VIPérgica e o aumento da imunorreatividade a substância P, poderia comprometer a homeostase da barreira epitelial do esôfago e conseqüentemente, favorecerem a entrada de antígenos e a exacerbação do processo inflamatório na mucosa. Além do mais, aumentaria as chances de um possível desenvolvimento de câncer esofágico em pacientes com megaesôfago chagásico, como relatado na literatura (ZUCOLOTO AND DE REZENDE 1990; HENRY *et al.*, 2007). Nas camadas musculares, as alterações no perfil da inervação poderia ser um dos fatores responsáveis pelos distúrbios peristálticos e pela dificuldade de relaxamento do esfíncter inferior do esôfago, comumente observado nesses pacientes.

As alterações observadas nas densidades de filetes nervosos imunorreativos a VIP e substância P podem ainda ser discutidas à luz da neuroimunologia, ou seja, das

potencialidades desses neuromediadores interferirem na homeostase do tecido linfóide local e na promoção e exacerbação de processos inflamatórios. Evidências de interação entre VIP e células inflamatórias foram reveladas neste estudo através da demonstração da imunorreatividade à VPAC2 em células mononucleares presentes no esôfago. Além disso, de forma inédita, demonstramos imunoreatividade a VPAC2 em eosinófilos e neutrófilos, principalmente no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago. Na literatura, a expressão de VPAC2 tem sido considerada por muitos como um receptor induzido e não constitutivo como VPAC1. Logo, a expressão de VPAC2 tem sido demonstrada em células ativadas como em linfócitos T (LARA-MARQUEZ *et al.*, 2001), plasmócitos (WANG *et al.*, 2007) e monócitos (DEWIT *et al.*, 1998). A interação VIP/VPAC2 está relacionada com a diminuição na capacidade proliferativa e na síntese de citocinas IFN- γ , IL-6, IL-5 e IL-10 em linfócitos T (WANG *et al.*, 2007); diminuição na síntese de imunoglobulinas por plasmócitos (WANG *et al.*, 2007); e diminuição na síntese de TNF e IL-12 em monócitos (DEWIT *et al.*, 1998).

Adicionalmente, nas secções de indivíduos infectados com megaesôfago foram encontradas células inflamatórias mononucleares imunorreativas à NK1. De acordo com dados da literatura, a sinalização substância P/NK1 pode desencadear alguns efeitos em células inflamatórias como induzir a síntese de IFN- γ em linfócitos T (BLUM *et al.*, 2003); aumentar a síntese de imunoglobulinas em plasmócitos (PASCUAL *et al.*, 1991), bem como induzir a síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 em macrófagos (DELGADO *et al.*, 2003). Nesse contexto, sugerimos que a diminuição relativa da inervação VIPérgica e o aumento relativo da inervação mediada por substância P, como também tem sido observado no megacólon chagásico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c), poderia ser um fator determinante para a indução e manutenção do processo inflamatório presente em pacientes com megaesôfago chagásico (D'ÁVILA REIS *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005). Logo, nossos dados reforçam a idéia de que um desequilíbrio no SNE poderia comparecer como um fator desencadeante do processo inflamatório na forma digestiva da doença de Chagas, porém os mecanismos responsáveis pela destruição seletiva de VIP ainda precisam ser investigados.

A hipótese aqui levantada, do papel neuroimunomodulador da inervação VIPérgica na doença de Chagas, é reforçado pelas análises de correlação de dados obtidos a partir do estudo do grupo de indivíduos infectados, não portadores de megaesôfago. A partir da análise da imunorreatividade de PGP 9.5, marcador pan-neuronal, foi observado que

aqueles pacientes mais desnervados apresentaram os menores valores para densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR nas camadas musculares. Esse dado é interessante, pois, de acordo com DA SILVEIRA *et cols.* (2005) pacientes chagásicos sem megaloesôfago com baixa contagem neuronal já apresentam focos inflamatórios, de constituição semelhante àqueles presentes em pacientes chagásicos com megaloesôfago, diferenciando apenas na sua intensidade. Logo, sugerimos que a queda de VIP nesses pacientes poderia ser um dos fatores indutores do processo inflamatório.

Outro componente que se mostrou imunorreativo à VPAC2 foram as células enterogliais. Essas células assemelham-se aos astrócitos do SNC e em condições inflamatórias tornam-se reativas aumentando a expressão de uma proteína do citoesqueleto, o GFAP (ENG *et al.*, 2000; VON BOYEN *et al.*, 2004). A expressão dessa proteína tem sido relatada como um mecanismo de defesa aos neurônios durante lesões teciduais (BUSH *et al.*, 1998). NISHIMOTO *et cols.* (2011) demonstraram *in vivo* e *in vitro* que os astrócitos GFAP-IR de animais que sofreram lesões cerebrais expressam VPAC2 e quando estimulados com VIP aumentam a expressão de receptores de glutamato. Ainda segundo os autores a sinalização VIP/VPAC2 induz astrocitose reativa e desempenha um papel fundamental contra a excitotoxicidade em desordens neurológicas. Em trabalho anterior demonstramos aumento na densidade de células enterogliais GFAP-IR em pacientes chagásicos sem megaloesôfago e diminuição na densidade dessas células em pacientes chagásicos com megaloesôfago (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Nesse contexto, a queda de VIP observada nos indivíduos infectados com megaloesôfago chagásico poderia ser mais um dos fatores responsáveis pela morte neuronal na fase crônica da doença, uma vez que nesses indivíduos já não se observa mais reatividade nas células enterogliais. Futuras análises da reatividade de VPAC2 nessas células poderiam ser realizadas para nos dar mais informações sobre as possíveis causas da morte neuronal que comumente ocorrem nesses pacientes.

Além das alterações na inervação, os indivíduos infectados com megaloesôfago, apresentaram aumento na porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria, camada muscular interna e no plexo mioentérico. Interessantemente, no plexo mioentérico de indivíduos infectados sem megaloesôfago, foi observado que aqueles indivíduos mais desnervados apresentaram as maiores porcentagens para eosinófilos VIP-IR e substância P-IR. Trabalhos têm sugerido que estas células do sangue periférico e da mucosa do cólon de indivíduos saudáveis e de indivíduos portadores de colite ulcerativa e

doença de Crohn têm a capacidade de sintetizar, estocar e liberar grandes quantidades de VIP e substância P, uma vez que foram detectados a imunorreatividade e o mRNA desses neuropeptídeos (ALIAKBARI *et al.*, 1987; METWALI *et al.*, 1994). Nesse contexto, sugerimos que elas também poderiam ser fonte de ambos os neuropeptídeos no esôfago, além dos neurônios entéricos. Porém, os mecanismos responsáveis por induzir a síntese de VIP e substância P ainda são desconhecidos. Contudo, a síntese desses neuropeptídeos pelos eosinófilos poderia ilustrar um mecanismo de controle da homeostase do microambiente do esôfago em condições normais e também em condições inflamatórias.

Em estudo realizado por METWALI *e cols.* (1994) foi observado aumento de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR na lâmina própria do cólon de pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa, respectivamente. Estudos *in vitro* têm demonstrado que tanto VIP quanto substância P podem exercer efeitos autócrinos sobre os eosinófilos. Dessa forma trabalhos têm demonstrado que substância P induz a desgranulação de eosinófilos com aumento na liberação de proteínas citotóxicas como peroxidase eosinofílica (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (KROEGEL *et al.*, 1990; EL SHAZLY *et al.*, 1997; 1999). Além disso, estudos têm demonstrado que VIP e substância P também induzem quimiotaxia de eosinófilos (NUMAO AND AGRAWAL 1992; DUNZENDORFER *et al.*, 1998) e diminuem a síntese de IL-16 pelos mesmos e conseqüentemente, reduzem a quimiotaxia de linfócitos (DUNZENDORFER *et al.*, 2003). Há evidências de que a quimiotaxia de eosinófilos por VIP e substância P é mediada pelos receptores VPAC1 (DUNZENDORFER *et al.*, 1998) e NK1 (EL-SHAZLY *et al.*, 1996). Nesses estudos não foram avaliados a expressão para tais receptores, mas os efeitos da quimiotaxia foram inibidos pelo tratamento com antagonistas. Por outro lado, RENZI *e cols.* (2000) demonstraram a expressão de NK2 em eosinófilos. No nosso trabalho não foi demonstrado imunorreatividade à NK1 e, como dito anteriormente encontramos eosinófilos VPAC2-IR. Nesse contexto, as alterações no perfil da inervação de VIP e substância P poderiam induzir a migração e a ativação de eosinófilos no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago e naqueles indivíduos infectados sem megaesôfago mais desnervados e conseqüentemente, induzirem morte neuronal através de mecanismos citotóxicos. Além disso, os eosinófilos poderiam produzir VIP e substância P e atuarem de forma autócrina para modular o processo inflamatório.

Outro dado inédito apresentado nesse trabalho diz respeito às células epiteliais VIP-IR e substância P-IR no esôfago. Esse dado nos faz sugerir que, além dos neurônios e

eosinófilos, essas células poderiam ser fonte de neuropeptídeos no esôfago e assim, seriam aptas a promover uma regulação autócrina para favorecer a formação da barreira epitelial, uma vez que demonstramos anteriormente a reatividade aos receptores VPAC2 e NK1. Reforçando essa idéia, estudos têm sugerido que as células epiteliais do cólon poderiam ser fonte de VIP, uma vez que os autores demonstraram imunorreatividade para VIP e a expressão do seu mRNA (TODOROVIC *et al.*, 1996; JÖNSSON *et al.*, 2012). Por outro lado, MAZUMDAR E DAS (1992) demonstraram imunorreatividade para substância P nas células epiteliais do cólon de indivíduos saudáveis e de pacientes com colite ulcerativa e doença Crohn. No epitélio do esôfago de pacientes chagásicos com megaesôfago, demonstramos diminuição na densidade de VIP e substância P e seus respectivos receptores, VPAC2 e NK1. Em pacientes portadores de colite ulcerativa, autores demonstraram tanto diminuição (MAZUMDAR AND DAS 1992; JÖNSSON *et al.*, 2012), quanto aumento (TODOROVIC *et al.*, 1996) na imunorreatividade para VIP nas células epiteliais do cólon. Para substância P, MAZUMDAR E DAS (1992) demonstraram aumento na imunorreatividade no epitélio do cólon de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn. Em outro trabalho, RENZI *e cols.* (2000) demonstraram aumento na densidade de células epiteliais NK1-IR no cólon de pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Crohn. A diminuição na imunorreatividade de ambos os neuropeptídeos no epitélio do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago chagásico poderia estar relacionado com uma possível falha na síntese ou na captação de ambos os neuropeptídeos e conseqüentemente, poderia influenciar nas propriedades da barreira epitelial. Por outro lado, a baixa imunorreatividade dos receptores VPAC2 e NK1, poderiam estar relacionados ao perfil de citocinas locais.

Finalmente, sugerimos que VIP e substância P desempenha importante papel no controle da homeostase do esôfago através da interação com seus receptores. Entretanto, um desequilíbrio entre esses dois neuropeptídeos poderia promover alterações na formação da barreira epitelial da mucosa e no SNE e conseqüentemente, induzirem inflamação e alterações motoras no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago chagásico. Ao ressaltar a importância da destruição seletiva da inervação VIPérgica na quebra da tolerância imunológica na forma digestiva da doença de Chagas, não descartamos, de forma alguma, a importância da permanência do kDNA do parasito nos tecidos de indivíduos infectados com *T. cruzi*, para o processo inflamatório da fase crônica, como postulado por vários autores (JONES *et al.*, 1993; VAGO *et al.*, 1996; DA SILVEIRA *et*

al., 2005). Acreditamos também que respostas autoimunes contra o hospedeiro (DUTRA *et al.*, 2000; CUNHA-NETO *et al.*, 2006), possam também contribuir para a manutenção e exacerbação do processo inflamatório na fase crônica da doença induzida pelo *T. cruzi*.

Consideramos de extrema importância a realização de estudos futuros em pacientes assintomáticos e sintomáticos para a forma digestiva da doença, em que se avaliem os níveis plasmáticos, tanto de VIP e de substância P, como de citocinas antiinflamatórias e próinflamatórias. Consideramos de grande relevância a continuidade dos estudos do grupo de indivíduos infectados sem megaesôfago, por ser este um grupo heterogêneo, bastante informativo, podendo nos trazer evidências importantes sobre alterações que precedem o megaesôfago chagásico.

CONCLUSÃO

Concluimos que as alterações no perfil de VIP e substância P no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago poderiam comprometer a homeostase da barreira epitelial da mucosa, promover distúrbios peristálticos e induzir e/ou manter o processo inflamatório. Essa hipótese pode ser reforçada por evidências da interação desses neuropeptídeos e seus respectivos receptores em células inflamatórias e células efectoras. Além disso, aqueles indivíduos infectados sem megaesôfago mais desnervados já apresentam alterações no perfil desses neuropeptídeos, com queda na densidade relativa de filetes nervosos VIP-IR e aumento na porcentagem de eosinófilos VIP-IR e substância P-IR. Assim, a queda da inervação VIPérgica poderia ser um dos fatores responsáveis pelo processo inflamatório comumente presente nesses pacientes, porém os mecanismos da destruição seletiva ainda são desconhecidos.

PERSPECTIVAS

1. Avaliar a imunorreatividade de células enterogliais para VPAC2;
2. Avaliar a imunorreatividade de células T reguladoras para FOXP3.
3. Avaliar a imunorreatividade de proteínas de junção nas células epiteliais.
4. Caracterizar as células inflamatórias que expressam VPAC2 e NK1.
5. Avaliar possíveis evidências de angiogênese através da expressão de Fator 8, VPAC2 e NK1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz RP (2003) Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124:961-71.

Absood A, Hu B, Bassily N, Colletti L (2008) VIP inhibits human HepG2 cell proliferation in vitro. *Regul Pept* 146: 285-92.

Adad SJ, Andrade DC, Lopes ER, Chapadeiro E (1991) [Pathological anatomy of chagasic megaesophagus]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33:443-50.

Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JC, Junqueira AC, Coura JR (2007) Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1:47-56.

Aliakbari J, Screedharan SP, Turck CW, Goetzl EJ (1987) Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1440-5.

Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martín JD, Candenias ML (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem* 11:2045-81.

Anderson P, Gonzalez-Rey (2010) Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple levels. *Mol Cell Biol* 30:2537-51.

Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C, Gomariz RP (2008) VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mol Immunol* 45:3065-73.

Bangale Y, Karle S, Planque S, Zhou YX, Taguchi H, Nishiyama Y, Li L, Kalaga R, Paul S (2003) VIPase autoantibodies in Fas-defective mice and patients with autoimmune disease. *FASEB J* 17:628-35.

Behar J, Guenard V, Walsh JH, Biancani P (1989) VIP and acetylcholine: neurotransmitters in esophageal circular smooth muscle. *Am J Physiol* 257:G380-5.

Ben-Horin S, Chowers Y (2008) Neuroimmunology of the gut: physiology, pathology, and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 8:490-5.

Biancani P, Walsh JH, Behar J (1984) Vasoactive intestinal polypeptide. A neurotransmitter for lower esophageal sphincter relaxation. *J Clin Invest* 73:963-7.

Blum AM, Metwali A, Elliott DE, Weinstock JV (2003) T cell substance P receptor governs antigen-elicited IFN-gamma production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G197-204.

- Bornstein JC, Costa M, Grider JR (2004) Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:34-38.
- Bouma G, Strober W (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3:521-33.
- Brener Z (1982) Recent developments in the Field of Chagas' disease. *Bull World Health Organ* 60:463-73.
- Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1998) Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93:189-201.
- Cagampang FR, Sheward WJ, Harmar AJ, Piggins HD, Coen CW (1998) Circadian changes in the expression of vasoactive intestinal peptide 2 receptor mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Mol Brain Res* 54:108-12.
- Cao Y, Liu X, Zhang W, Deng X, Zhang H, Liu Y, Chen L, Thompson EA, Townsend CM Jr, Ko TC (2009) TGF-beta repression of Id2 induces apoptosis in gut epithelial cells. *Oncogene* 28:1089-98.
- Chagas C (1916) Processos patogênicos da tripanosomíase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 8:5-37.
- Chandrasekharan B, Nezami BG, Srinivasan S (2013) Emerging neuropeptide targets in inflammation - NPY and VIP. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304:G949-57.
- Chang L, Adeyemo M, Karagiannides I, Videlock EJ, Bowe C, Shih W, Presson AP, Yuan PQ, Cortina G, Gong H, Singh S, Licudine A, Mayer M, Tache Y, Pothoulakis C, Mayer EA (2012) Serum and colonic mucosal immune markers in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 107:262-72.
- Chen J, Zhang Y, Deng Z (2012) Imbalanced shift of cytokine expression between T helper 1 and T helper 2 (Th1/Th2) in intestinal mucosa of patients with post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol* 20:12:91.
- Chorny A, Delgado M (2008) Neuropeptides rescue mice from lethal sepsis by down-regulating secretion of the late-acting inflammatory mediator high mobility group box 1. *Am J Pathol* 172:1297-307.
- Ciesielczyk K, Thor PJ (2013) Neural control disturbances of the gastrointestinal tract and visceral pain in inflammatory bowel diseases. *Postepy Hig Med Dosw* 67:304-14.
- Conlin VS, Wu X, Nguyen C, Dai C, Vallance BA, Buchan AM, Boyer L, Jacobson K (2009) Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:G735-50.

- Cook GA, Elliott D, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV (1994) Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni express an authentic substance P (NK-1) receptor. *J Immunol* 152:1830-5.
- Costa M, Brookes SJ, Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 Suppl 4, iv15-19; discussion iv26.
- Coura JR (2007) Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1:113-122.
- Coura JR, Viñas PA (2010) Chagas' disease: a new worldwide challenge. *Nature* 456: s6-7.
- Couvineau A, Laburthe M (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol* 166:42-50.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM (2006) Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 39:41-54.
- Cutz E, Chan W, Track NS, Goth A, Said SI (1978) Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators. *Nature* 275:661-2.
- d'Avila Reis D, Lemos EM, Silva GC, Adad SJ, McCurley T, Correa-Oliveira R, Machado CR (2001) Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:177-78.
- Da Mata JR, Camargos MR, Chiari E, Machado CR (2000) Trypanosoma cruzi infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull* 53:153-62.
- da Silveira AB, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, 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* 134:789-96.
- da Silveira AB, Arantes RM, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Avila Reis D (2005) Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 131:627-34.
- da Silveira AB, D'Avila Reis D, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Poole D, Correa-Oliveira R, Furness JB (2007c) Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Dig Dis Sci* 52:2877-83.
- da Silveira AB, Freitas MA, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB, Correa-Oliveira R, Reis Dd (2008) Substance P and NK1 receptor expression in the enteric

nervous system is related to the development of chagasic megacolon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:1154-6.

da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D (2007b) Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol* 38:1256-64.

de Rezende JM (1984) The digestive tract in Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79:97-106.

Delgado AV, McManus AT, Chambers JP (2003) Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37:355-61.

Delgado M, Ganea D (2001) Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol* 167:966-75.

Delgado M, Ganea D (2008) Anti-inflammatory neuropeptides: a new class of endogenous immunoregulatory agents. *Brain Behav Immun* 22:1146-51.

Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D (2004) VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. *FASEB J* 18:1453-5.

Delgado M, Jonakait GM, Ganea D (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 39:148-61.

Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D (1999a) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 162:1707-16.

Delgado M, Robledo G, Rueda B, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Caro M, Orozco G, Gonzalez-Rey E, Martin J (2008) Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum* 58:1010-9.

Dewit D, Gourlet P, Amraoui Z, Vertongen P, Willems F, Robberecht P, Goldman M (1998) The vasoactive intestinal peptide analogue RO25-1553 inhibits the production of TNF and IL-12 by LPS-activated monocytes. *Immunol Lett* 60:57-60.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ (2002) The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:603-12.

Dias JC (2006a) [Notes about of Trypanosoma cruzi and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:370-5.

- Dias JC (2006b) Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica* 22:2020-21.
- Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function (2009) *Pharmacol Ther* 121:294-316.
- Dunzendorfer S, Meierhofer C, Wiedermann CJ (1998) Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol* 64:828-34.
- Dunzendorfer S, Feistritz C, Enrich B, Wiedermann CJ (2003) Neuropeptide-induced inhibition of IL-16 release from eosinophils. *Neuroimmunomodulation* 10:217-23.
- Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, Pereira ME, Coffman RL, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra JF (2000) Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol* 51:91-7.
- El-Shazly A, Ishikawa T (1999) Novel co-operation between eotaxin and substance-P in inducing eosinophil-derived neurotoxin release. *Mediators Inflamm* 8:177-9.
- El-Shazly AE, Masuyama K, Eura M, Ishikawa T (1996) Immunoregulatory effect of substance P in human eosinophil migratory function. *Immunol Invest* 25:191-201.
- El-Shazly AE, Masuyama K, Ishikawa T (1997) Mechanisms involved in activation of human eosinophil exocytosis by substance P: an in vitro model of sensory neuroimmunomodulation. *Immunol Invest* 26:615-29.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25:1439-51.
- Engel MA, Khalil M, Siklosi N, Mueller-Tribbensee SM, Neuhuber WL, Neurath MF, Becker C, Reeh PW (2012a) Opposite effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in oxazolone colitis. *Dig Liver Dis* 44:24-9.
- Engel MA, Khalil M, Mueller-Tribbensee SM, Becker C, Neuhuber WL, Neurath MF, Reeh PW (2012b) The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons. *J Gastroenterol* 47:256-65.
- Engel MA, Leffler A, Niedermirtl F, Babes A, Zimmermann K, Filipović MR, Izydorczyk I, Eberhardt M, Kichko TI, Mueller-Tribbensee SM, Khalil M, Siklosi N, Nau C, Ivanović-Burmazović I, Neuhuber WL, Becker C, Neurath MF, Reeh PW (2011b) TRPA1 and substance P mediate colitis in mice. *Gastroenterology* 141:1346-58.
- Feistritz C, Clausen J, Sturn DH, Djanani A, Gunsilius E, Wiedermann CJ, Kähler CM (2003) Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul Pept* 116:119-26.

- Ferri GL, Botti P, Biliotti G, Rebecchi L, Bloom SR, Tonelli L, Labò G, Polak JM (1984) VIP-, substance P- and met-enkephalin-immunoreactive innervation of the human gastroduodenal mucosa and Brunner's glands. *Gut* 25:948-52.
- Fries W, Renda MC, Lo Presti MA, Raso A, Orlando A, Oliva L, Giofré MR, Maggio A, Mattaliano A, Macaluso A, Cottone M (2005) Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol* 100:2730-6.
- Fu Y, Tong JJ, Pan Q, Wang WF, Zou KF, Qian W, Hou XH (2009) [Phenotypic analysis of Th cells in colon and peripheral blood in patients with irritable bowel syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 89:2120-3.
- Fu WX, Qin B, Zhou AP, Yu QY, Huang QJ, Liang ZF (2011) Regulation of NK92-M1 cell cytotoxicity by substance P. *Scand J Immunol* 74:107-13.
- Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system (2000) *J Auton Nerv Syst* 81:87-96.
- Furness JB (2006) Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Auton Neurosci* 30:81-85.
- Furness JB (2008) The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil* 20 Suppl 1:32-8.
- Furness JB (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:286-94.
- Furness JB, Costa M (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5:1-20.
- Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N (2004) Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 72:143-64.
- Gabella G (1972) Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat* 111:69-97.
- García-Fernández MO, Collado B, Bodega G, Cortés J, Ruíz-Villaespesa A, Carmena MJ, Prieto JC (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecol Endocrinol* 20:327-33.
- Gomariz RP, Arranz A, Abad C, Torroba M, Martinez C, Rosignoli F, Garcia-Gómez M, Leceta J, Juarranz Y (2005) Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. *J Leukoc Biol* 78:491-502.

Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J, Delgado M (2001) Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des* 7:89-111.

Gonzalez-Rey E, Delgado M (2007) Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders? *Trends Pharmacol Sci* 28:482-91.

Gonzalez-Rey E, Delgado M (2008) Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia and dendritic cells. *Brain Behav Immun* 22:35-41.

Gonzalez-Rey E, Varela N, Chorny A, Delgado M (2007) Therapeutical approaches of vasoactive intestinal peptide as a pleiotropic immunomodulator. *Curr Pharm Des* 13: 1113-39.

Goode T, O'Connell J, Anton P, Wong H, Reeve J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F (2000) Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localization. *Gut* 47:387-96.

Goode T, O'Connor T, Hopkins A, Moriarty D, O'Sullivan GC, Collins JK, O'Donoghue D, Baird AW, O'Connell J, Shanahan F (2003) Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. *J Cell Physiol* 197:30-41.

Goto T, Tanaka T (2002) Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microsc Res Tech* 58:91-7.

Gozes I, Furman S (2003) VIP and drug design. *Curr Pharm Des* 9:483-94.

Groneberg DA, Rabe KF, Fischer A (2006) Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *Eur J Pharmacol* 533:182-94.

Guo CJ, Lai JP, Luo HM, Douglas SD, Ho WZ (2002) Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1 β expression in human T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 131:160-7.

Gutiérrez-Canãs I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martinez C, Galindo M, Payá M, Gomariz RP, Pablos JL (2006) VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 45:527-32.

Hansen MB (2003a) The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* 92, 105-113.

Hansen MB (2003b) The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* 92:249-57.

Harfi I, D'Hondt S, Corazza F, Sariban E (2004) Regulation of human polymorphonuclear leukocytes functions by the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide after activation of MAPKs. *J Immunol* 173: 4154-63.

Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Gugger M, Reubi JC (2004) Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 145:1203-10.

Henry MA, Lerco MM, Oliveira WK (2007) [Esophageal cancer in patient with chagasic megaesophagus]. *Arq Gastroenterol* 44:151-5.

Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD (1997) Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 159:5654-60.

Hoffman JM. Irritable bowel syndrome: is the colonic mucosa to blame? (2012) *Neurogastroenterol Motil* 24:1051-3.

Hoyle CH, Burnstock G (1989) Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat* 166:7-22.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL (1993) Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48:348-57.

Jönsson M, Norrgård O, Forsgren S (2012) Epithelial expression of vasoactive intestinal peptide in ulcerative colitis: down-regulation in markedly inflamed colon. *Dig Dis Sci* 57:303-10.

Jönsson M, Norrgård O, Hansson M, Forsgren S (2007) Decrease in binding for the neuropeptide VIP in response to marked inflammation of the mucosa in ulcerative colitis. *Ann N Y Acad Sci* 1107:280-9.

Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL, Gomariz RP (2008) Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 58:1086-95.

Kamińska B, Landowski P, Gonkowski S, Majewski M, Renke J, Korzon M (2006) [Changes in the number of neuroprotective transmitter containing mucosal nerve fibres in children with ulcerative colitis]. *Med Wieku Rozwoj* 10:483-91.

Kamińska B, Landowski P, Gonkowski S, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Majewski M, Dobosz M, Ismail H, Korzon M (2007) [Analysis of enteral nervous system in children with drug resistant ulcerative colitis]. *Med Wieku Rozwoj* 11:117-22.

Kato E, Yamane S, Nomura R, Matsumoto K, Tashima K, Horie S, Saito T, Fujino H, Murayama T (2012) Dysfunction of neurogenic VIP mediate relaxation in mouse distal colon with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Pharmacol Res* 65:204-12.

Köberle F (1961) [Pathology and pathological anatomy of Chagas' disease.] *Bol Oficina Sanit Panam* 51:404-28.

Köberle F (1963) Enteromegaly and cardiomegaly in Chagas disease. *Gut* 4:399-405.

Köberle F (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6:63-116.

Kohara H, Tajima S, Yamamoto M, Tabata Y (2010) Angiogenesis induced by controlled release of neuropeptide substance P. *Biomaterials* 31:8617-25.

Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, Kawabe K, Coy DH, Jensen RT, Nawata H (2005) VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas* 30:62-70.

Koon HW, Pothoulakis C (2006) Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann N Y Acad Sci* 1088:23-40.

Koon HW, Shih DQ, Hing TC, Chen J, Ho S, Zhao D, Targan SR, Pothoulakis C (2011) Substance P induces CCN1 expression via histone deacetylase activity in human colonic epithelial cells. *Am J Pathol* 179:2315-26.

Koon HW, Shih D, Karagiannides I, Zhao D, Fazelbhoy Z, Hing T, Xu H, Lu B, Gerard N, Pothoulakis C (2010) Substance P modulates colitis-associated fibrosis. *Am J Pathol* 177:2300-9.

Koon HW, Zhao D, Xu H, Bowe C, Moss A, Moyer MP, Pothoulakis C (2008) Substance P-mediated expression of the pro-angiogenic factor CCN1 modulates the course of colitis. *Am J Pathol* 173:400-10.

Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Moyer MP, Pothoulakis C (2007) Substance P mediates antiapoptotic responses in human colonocytes by Akt activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2013-8.

Kovsca Janjatovic A, Valpotic H, Kevzic D, Lackovic G, Gregorovic G, Sladoljev S, Mrsic G, Popovic M, Valpotic I (2012) Secretion of immunomodulating neuropeptides (VIP, SP) and nitric oxide synthase in porcine small intestine during postnatal development. *Eur J Histochem* 56:e30.

Kroegel C, Giembycz MA, Barnes PJ (1990) Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin, and FMET-Leu-Phe. *J Immunol* 145:2581-7.

Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP (2008) Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* 123:398-410.

- Kunze WA, Furness JB (1999) The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 61:117-42.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V (2007) Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28:1631-9.
- Lai JP, Douglas SD, Ho WZ (1998) Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol* 86:80-6.
- Lai JP, Douglas SD, Shaheen F, Pleasure DE, Ho WZ (2002) Quantification of substance p mRNA in human immune cells by real-time reverse transcriptase PCR assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:138-43.
- Lara-Marquez M, O'Dorisio M, O'Dorisio T, Shah M, Karacay B (2001) Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells. *J Immunol* 166:2522-30.
- Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski A (2007) Substance P and its receptors -- a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-review). *Folia Neuropathol* 45:99-107.
- Leander S, Brodin E, Håkanson R, Sundler F, Uddman R (1982) Neuronal substance P in the esophagus. Distribution and effects on motor activity. *Acta Physiol Scand* 115:427-35.
- Lecci A, Capriati A, Altamura M, Maggi CA (2006) Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. *Auton Neurosci* 126-127:232-49.
- Lelievre V, Favrais G, Abad C, Adle-Biassette H, Lu Y, Germano PM, Cheung-Lau G, Pisegna JR, Gressens P, Lawson G, Waschek JA (2007) Gastrointestinal dysfunction in mice with a targeted mutation in the gene encoding vasoactive intestinal polypeptide: a model for the study of intestinal ileus and Hirschsprung's disease. *Peptides* 28:1688-99.
- Li WW, Guo TZ, Liang DY, Sun Y, Kingery WS, Clark JD (2012) Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology* 116:882-95.
- Lighvani S, Huang X, Trivedi PP, Swanborg RH, Hazlett LD (2005) Substance P regulates natural killer cell interferon-gamma production and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Eur J Immunol* 35:1567-75.
- Liu B, Tonkonogy SL, Sartor RB (2011) Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice. *Gastroenterology* 141:653-62, 662.e1-4.

- Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA (2006) Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci* 126-127:250-7.
- López MC (2007) Fluorescence microscopy and flow cytometric analysis of Peyer's patches and intestinal immune cells. *Curr Protoc Toxicol* 18:18.13.
- Lühder F, Lee DH, Gold R, Stegbauer J, Linker RA (2009) Small but powerful: short peptide hormones and their role in autoimmune inflammation. *J Neuroimmunol* 217:1-7.
- Lygren I, Revhaug A, Burhol PG, Giercksky KE, Jenssen TG (1984) Vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin in leucocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 44:347-51.
- MacDonald TT (2003) The mucosal immune system. *Parasite Immunol* 25:235-46.
- Machado CR, Camargos ER, Guerra LB, Moreira MC (2000) Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. *Hum Pathol* 31:3-10.
- Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE (2007) The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 19:106-15.
- Maggi CA (1995) The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* 26:911-44.
- Makino A, Sakai A, Ito H, Suzuki H (2012) Involvement of Tachykinins and NK-1 Receptor in the Joint Inflammation with Collagen Type II-Specific Monoclonal Antibody-Induced Arthritis in Mice. *J Nihon Med Sch* 79:129-38.
- Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease (2004) *N Engl J Med* 351:2069-79.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115:1109-23.
- Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Hoang SB, Ross WG, Pizarro TT, Cominelli F (2003) TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8366-71.
- Martins Campos VJ, Tafuri WL (1973) Chagas Enteropathy. *Gut* 14: 910-19.
- Mascetta G, di Mola FF, Tavano F, Selvaggi F, Giese N, Bassi C, Büchler MW, Friess H, di Sebastiano P (2012) Substance P and neprilysin in chronic pancreatitis. *Eur Surg Res* 48:131-8.

- Mazumdar S, Das KM (1992) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 87:176-81.
- McCormack RJ, Hart RP, Ganea D (1996) Expression of NK-1 receptor mRNA in murine T lymphocytes. *Neuroimmunomodulation* 3:35-46.
- Mechiche H, Koroglu A, Candenas L, Pinto FM, Birembaut P, Bardou M, Elaerts J, Devillier P (2003) Neurokinins induce relaxation of human pulmonary vessels through stimulation of endothelial NK1 receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:343-55.
- Meneghelli UG (2004) Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop* 37:252-60.
- Metwali A, Blum AM, Ferraris L, Klein JS, Fiocchi C, Weinstock JV (1994) Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Neuroimmunol* 52:69-78.
- Nascimento RD, de Souza Lisboa A, Fujiwara RT, de Freitas MA, Adad SJ, Oliveira RC, d'Avila Reis D, da Silveira AB (2010) Characterization of enteroglia cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. *Hum Pathol* 41:528-34.
- Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP (2007) Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G231-41.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP (2003a) Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52:84-90.
- Neunlist M, Toumi F, Oreshkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A (2003b) Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G1028-36.
- Newton M, Kamm MA, Soediono PO, Milner P, Burnham WR, Burnstock G (1999) Oesophageal epithelial innervation in health and reflux oesophagitis. *Gut* 44:317-22.
- Nicoletti M, Neri G, Maccauro G, Tripodi D, Varvara G, Saggini A, Potalivo G, Castellani ML, Fulcheri M, Rosati M, Toniato E, Caraffa A, Antinolfi P, Cerulli G, Pandolfi F, Galzio R, Conti P, Theoharides TC (2012) Impact of neuropeptide substance P an inflammatory compound on arachidonic acid compound generation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 25:849-57.

- Nishimoto M, Miyakawa H, Wada K, Furuta A (2011) Activation of the VIP/VPAC2 system induces reactive astrogliosis associated with increased expression of glutamate transporters. *Brain Res* 1383:43-53.
- Numao T, Agrawal DK (1992) Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. *J Immunol* 149:3309-15.
- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F (2004) The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201:167-80.
- O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Cataland S, Balcerzak SP (1980) Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 96:666-72.
- Ohman L, Isaksson S, Lindmark AC, Posserud I, Stotzer PO, Strid H, Sjövall H, Simrén M (2009) T-cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 104:1205-12.
- Oliveira RB, Trocon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG (1998) Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am J Gastroenterol* 44:407-10.
- Palermo MS, Vermeulen ME, Giordano MN (1996) Human antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by interferon gamma-activated neutrophils is impaired by vasoactive intestinal peptide. *J Neuroimmunol* 69:123-8.
- Pallone F, Blanco Gdel V, Vavassori P, Monteleone I, Fina D, Monteleone G (2003) Genetic and pathogenetic insights into inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 5:487-92.
- Pascual DW, Xu-Amano JC, Kiyono H, McGhee JR, Bost KL (1991) Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J Immunol* 146:2130-6.
- Pedersen KE, Buckner CK, Meeker SN, Udem BJ (2000) Pharmacological examination of the neurokinin-1 receptor mediating relaxation of human intralobar pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 292:319-25.
- Pennefather JN, Patak E, Pinto FM, Candenias ML (2004) Mammalian tachykinins and uterine smooth muscle: the challenge escalates. *Eur J Pharmacol* 500:15-26.
- Pozo D, Anderson P, Gonzalez-Rey E (2009) Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *J Immunol* 183:4346-59.
- Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG (2007) Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation* 115:1101-8.

Ravina CG, Seda M, Pinto FM, Orea A, Fernández-Sánchez M, Pintado CO, Candenas ML (2007) A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod* 22:1617-25.

Renzi D, Mantellini P, Calabrò A, Panerai C, Amorosi A, Paladini I, Salvadori G, Garcea MR, Surrenti C (1998) Substance P and vasoactive intestinal polypeptide but not calcitonin gene-related peptide concentrations are reduced in patients with moderate and severe ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30:62-70.

Renzi D, Pellegrini B, Tonelli F, Surrenti C, Calabrò A (2000) Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. *Am J Pathol* 157:1511-22.

Reubi JC (2000) In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 921:1-25.

Reubi JC, Körner M, Waser B, Mazzucchelli L, Guillou L (2004) High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:803-10.

Reubi JC, Läderach U, Waser B, Gebbers JO, Robberecht P, Laissue JA (2000) Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res* 60:3105-12.

Rezende JM, Lauer KM (1960) Aspectos clínicos e radiológicos da aperistálsis no esôfago. *Rev Bras Gastroenterol* 12:247-62.

Robberecht P, De Neef P, Lefebvre RA (1998) Influence of selective VIP receptor agonists in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 359:77-80.

Roganović J, Radenković M, Stojić D (2010) ACh- and VIP-induced vasorelaxation in rabbit facial artery after carotid artery occlusion. *Arch Oral Biol* 55:333-42.

Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV (2007) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132:1344-58.

Schemann M, Neunlist M (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:55-9.

Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115:14-21.

Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Höllt V, Schulz S (2004) Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2 and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res* 10:8235-42.

- Seegers HC, Hood BL, Cruwys SC, Walsh DA (2003) Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 306:8-12.
- Severini C, Improta G, Falconieri-Erspermer G, Salvadori S, Erspermer V (2002) The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 54:285-322.
- Shanahan F, Denburg JA, Fox J, Bienenstock J, Befus D (1985) Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol* 135:1331-7.
- Sheward WJ, Lutz EM, Harmar AJ (1995) The distribution of vasoactive intestinal peptide 2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. *Neuroscience* 67:409-18.
- Shimizu Y, Matsuyama H, Shiina T, Takewaki T, Furness JB (2008) Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci* 65:295-311.
- Silveira AC, Pimenta Junior F (2011) [Institutional insertion of Chagas' disease control]. *Rev Soc Bras Med Trop* 44:19-24.
- Simpson J, Sundler F, Humes DJ, Jenkins D, Scholefield JH, Spiller RC (2009) Post inflammatory damage to the enteric nervous system in diverticular disease and its relationship to symptoms. *Neurogastroenterol Motil* 21:847-e58.
- Smalley SG, Barrow PA, Foster N (2009) Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 157:225-34.
- Souza-Moreira L, Campos-Salinas J, Caro M, Gonzalez-Rey E (2011) Neuropeptides as pleiotropic modulators of the immune response. *Neuroendocrinology* 94:89-100.
- Spahn TW, Kucharzik T (2004) Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 53:456-65.
- Stanisz AM, Scicchitano R, Dazin P, Bienenstock J, Payan DG (1987) Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B cells. *J Immunol* 139:749-54.
- Stojić D, Pesić S, Radenković M, Popović-Roganović J, Pesić Z, Grbović L (2007) Responses of the human submandibular artery to ACh and VIP. *J Dent Res* 86:565-70.
- Sventoraityte J, Zvirbliene A, Kiudelis G, Zalinkevicius R, Zvirbliene A, Praskevicius A, Kupcinskis L, Tamosiūnas V (2008) Immune system alterations in patients with inflammatory bowel disease during remission. *Medicina (Kaunas)* 44:27-33.

Tafari WL, Maria TA, Lopes ER (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.

Tavano F, di Mola FF, Latiano A, Palmieri O, Bossa F, Valvano MR, Latiano T, Annese V, Andriulli A, di Sebastiano P (2012) Neuroimmune interactions in patients with inflammatory bowel diseases: disease activity and clinical behavior based on Substance P serum levels. *J Crohns Colitis* 6:563-70.

Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D (2001) Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec* 1:71-78.

Todorovic V, Janic B, Koko V, Nikolic JA, Ratkovic M, Laposavic G, Jankovic T, Knezevic-Usaj S, Milicevic Z (1996) Colonic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in ulcerative colitis--a radioimmunoassay and immunohistochemical study. *Hepatogastroenterology* 43:483-8.

Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisie CL, Galmiche JP, Jarry A (2003) Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 15:239-42.

Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:799-809.

Turner DJ, Martin PC, Rao JN, Greenspon J, Zou T, Bass BL, Wang JY, Strauch ED (2007) Substance P regulates migration in rat intestinal epithelial cells. *Ann Surg* 245:408-14.

Uematsu T, Sakai A, Ito H, Suzuki H (2011) Intra-articular administration of tachykinin NK1 receptor antagonists reduces hyperalgesia and cartilage destruction in the inflammatory joint in rats with adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 668:163-8.

Usdin TB, Bonner TI, Mezey E (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135:2662-80.

Vacas E, Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Schally AV, Prieto JC, Carmena MJ (2012) Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits human renal cell carcinoma proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1823:1676-85.

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R (1996) PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 28:891-92.

Van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71:241-60.

- Vanneste G, Robberecht P, Lefebvre RA (2004) Inhibitory pathways in the circular muscle of rat jejunum. *Br J Pharmacol* 143:107-18.
- Vassiliou E, Jiang X, Delgado M, Ganea D (2001) TH2 lymphocytes secrete functional VIP upon antigen stimulation. *Arch Physiol Biochem* 109:365-8.
- Villanacci V, Annese V, Cuttitta A, Fisogni S, Scaramuzzi G, De Santo E, Corazzi N, Bassotti G (2010) An immunohistochemical study of the myenteric plexus in idiopathic achalasia. *J Clin Gastroenterol* 44:407-10.
- Von Boyen GBT, Steinkamp M, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G, Kirsch J (2004) Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53:222-28.
- Walsh DA, McWilliams D (2006) Tachykinins and the cardiovascular system. *Curr Drug Targets* 7:1031-42.
- Wang Y, Mei Y, Bao S, Xu L (2007) Vasoactive intestinal polypeptide enhances oral tolerance by regulating both cellular and humoral immune responses. *Clin Exp Immunol* 148:178-87.
- Wattchow DA, Costa M (1996) Distribution of peptide-containing nerve fibres in achalasia of the oesophagus. *J Gastroenterol Hepatol* 11:478-85.
- Wattchow DA, Furness JB, Costa M, O'Brien PE, Peacock M (1987) Distributions of neuropeptides in the human esophagus. *Gastroenterology* 93:1363-71.
- Weinstock JV, Blum A, Metwali A, Elliott D, Arsenescu R (2003) IL-18 and IL-12 signal through the NF-kappa B pathway to induce NK-1R expression on T cells. *J Immunol* 170:5003-7.
- Wershil BK, Turck CW, Sreedharan SP, Yang J, An S, Galli SJ, Goetzl EJ (1993) Variants of vasoactive intestinal peptide in mouse mast cells and rat basophilic leukemia cells. *Cell Immunol* 151:369-78.
- Wood JD (2007) Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 7:1313-32.
- Wood JD, Alpers DH, Andrews PL (1999) Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45 Suppl 2:II6-III6.
- Wozniak A, Betts WH, McLennan G, Scicchitano R (1993) Activation of human neutrophils by tachykinins: effect on formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine- and platelet-activating factor-stimulated superoxide anion production and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 78:629-34.

- Yadav M, Huang MC, Goetzl EJ (2011) VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis. *Cell Immunol* 267:124-32.
- Yang J, Shi QD, Song TB, Feng GF, Zang WJ, Zong CH, Chang L (2013) Vasoactive intestinal peptide increases VEGF expression to promote proliferation of brain vascular endothelial cells the cAMP/PKA pathway after ischemic insult in vitro. *Peptides* 42:105-11.
- Yang J, Zong CH, Zhao ZH, Hu XD, Shi QD, Xiao XL, Liu Y (2009) Vasoactive intestinal peptide in rats with focal cerebral ischemia enhances angiogenesis. *Neuroscience* 161:413-21.
- Yukawa T, Oshitani N, Yamagami H, Watanabe K, Higuchi K, Arakawa T (2007) Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptor 1 expression in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 20:161-7.
- Zhang Y, Berger A, Milne CD, Paige CJ (2006) Tachykinins in the immune system. *Curr Drug Targets* 7:1011-20.
- Zhang DK, He FQ, Li TK, Pang XH, Cui de J, Xie Q, Huang XL, Gan HT (2010) Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* 222:213-22.
- Zhao P, Dong L, Luo JY, Guan HT, Ma H, Wang XQ (2013) Possible role of mast cells and neuropeptides in the recovery process of dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Chin Med Sci J* 28:28-33.
- Ziche M, Morbidelli L, Geppetti P, Maggi CA, Dolaro P (1991) Substance P induces migration of capillary endothelial cells: a novel NK-1 selective receptor mediated activity. *Life Sci* 48:PL7-11.
- Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F (1994) Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 94:2036-44.
- Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA (1990) Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* 40:264-78.
- Zucoloto S, de Rezende JM (1990) Mucosal alterations in human chronic chagasic esophagopathy. *Digestion* 47:138-42.

ANEXO 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0313.0.203.000-10

**Interessado(a): Profa. Débora d'Avila Reis
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 03 de agosto de 2012, o relatório parcial do projeto de pesquisa intitulado **"Imunopatologia da forma clínica digestiva da doença de Chagas: avaliação da correlação entre fenótipo de células enterogliais, o processo de desnervação e a densidade de células inflamatórias no esôfago de pacientes chagásicas, portadores e não portadores de megaesôfago"**.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. T. Marques Amaral", is written over a faint circular stamp.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO 2

**Original contribution**

An imbalance between substance P and vasoactive intestinal polypeptide might contribute to the immunopathology of megaesophagus after *Trypanosoma cruzi* infection[☆]

Rodolfo Duarte Nascimento^a, Patrícia Rocha Martins^a,
 André de Souza Lisboa^a, Sheila Jorge Adad^b,
 Alexandre Barcelos Morais da Silveira PhD^c, Débora d'Ávila Reis PhD^{a,*}

^aDepartment of Morphology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil

^bDiscipline of Special Pathology, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

^cHuman Anatomy Sector, ICBIM, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

Received 18 March 2012; revised 22 May 2012; accepted 23 May 2012

Keywords:

Chagas megaesophagus;
 Denervation;
 Vasoactive intestinal
 peptide;
 Substance P

Summary Megaesophagus is one of the major causes of morbidity in chronic Chagas disease, and extensive denervation, associated with an inflammatory process, is recognized as the key factor for alterations in motility and disease development. Here, we analyzed esophagus samples from necropsied, infected individuals—6 cases with megaesophagus and 6 cases without megaesophagus—for the relative areas of expression of 2 neuromediators, substance P and vasoactive intestinal peptide, which are known to activate or inhibit, respectively, local immune cells. Samples from 6 noninfected individuals were used as controls. Esophageal sections were immunohistochemically stained for protein gene product 9.5, vasoactive intestinal peptide, and substance P, and the relative areas of expression of the latter 2 were calculated. Morphometric analyses revealed increased substance P and decreased vasoactive intestinal peptide relative areas in esophageal sections from patients with megaesophagus. Furthermore, in the group of patients without megaesophagus, the loss of vasoactive intestinal peptide positively correlated with the denervation process. We suggest that an imbalance between vasoactive intestinal peptide and substance P production results in the reestablishment and maintenance of the inflammatory process, leading to denervation and, consequently, promoting the development of megaesophagus.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease is a parasitic infection that is caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi* and affects millions of people on the American continents [1]. Infection leads to an acute phase characterized by high numbers of parasites in both the bloodstream and tissues. The transition from the acute to chronic phase is accompanied by a marked decrease in

[☆] Financial support: This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

* Corresponding author.

E-mail address: debsdavila@gmail.com (D. d'Á. Reis).

parasitemia and parasite load in the tissues owing to the mounting of a relatively effective immune response. Although most individuals in the chronic phase remain in a silent, asymptomatic clinical form of Chagas disease, a large percentage of these individuals develop severe clinical forms, with cardiac and/or digestive alterations, that eventually lead to death [2].

Megaesophagus is one of the major causes of morbidity in the digestive clinical form of chronic Chagas disease. Pathologically, the esophagus exhibits striking luminal enlargement and muscular hypertrophy. Denervation, characterized by a prominent reduction in the number of neurons, has been considered the hallmark of the chronic digestive disease [3,4]. The destruction of neurons in the digestive system leads to peristaltic disturbances, with loss of motility, muscular hypertrophy, and luminal enlargement of the organ. The frequent occurrence of ganglionitis and periganglionitis in patients developing megaesophagus indicates the participation of immune system cells in disease pathology [5]. Fibrosis and inflammatory infiltrates, composed mainly of CD3⁺ CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ TIA1⁺ cytotoxic lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes, CD57⁺ natural killer cells, and CD68⁺ macrophage-like cells are associated with lesions of muscle cells and the intramural nervous system [6].

In the acute stage of a *T. cruzi* infection, the inflammatory response plays an essential role in the resistance to infection; however, in the chronic phase, its intensity and duration have to be strictly controlled to reestablish immune homeostasis and avoid autoimmune reactions and extensive tissue damage. Many studies have demonstrated that inflammatory responses in the gut tend to be self-controlled by anti-inflammatory mediators such as transforming growth factor β and interleukin (IL)-10, secreted by the host's immune system during the ongoing process in the gut [7,8]. In addition, studies have shown that multiple mechanisms including the actions of hormones and neuromediators act together to ensure the reestablishment of immune homeostasis and the maintenance of tolerance [9–11]. In Chagas disease, the identification of endogenous factors that regulate gut inflammation will contribute to the understanding of the chronic immunopathology of megaesophagus and megacolon.

In this report, the density of neuronal fibers producing substance P (SP) or vasoactive intestinal polypeptide (VIP) was analyzed on sections of the esophagus from individuals infected with *T. cruzi* and from serologically negative controls. VIP is one of the main inhibitory noncholinergic, nonadrenergic neurotransmitters in the gastrointestinal tract that exerts inhibitory effects on most immune cells [12,13]. SP, in contrast, is released from excitatory neurons and stimulates gut inflammation by interacting, directly or indirectly, with the neurokinin-1R expressed on nerves, epithelial cells, and immune cells such as mast cells, macrophages, and T cells [14,15]. In the present study, the profile of SP and VIP was analyzed in patients with and without megaesophagus, and the data obtained were discussed on the immunopathology of digestive Chagas disease.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissue samples

Esophagus tissue samples were obtained from 6 patients with Chagas disease with megaesophagus, 6 patients with Chagas without megaesophagus, and 6 noninfected individuals submitted to necropsy or surgery procedures at Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Uberaba, Minas Gerais, Brazil). Esophageal sections from the patients had been previously analyzed for the area occupied by protein gene product (PGP) 9.5 nerve fibers (Table 1) [16]. Research consent was obtained from family members before tissue procurement, and this work was approved by the Federal University of Minas Gerais' Research Ethics Committee, No. 0313.0.203.000-10.

Serological tests indicative of Chagas disease (enzyme-linked immunosorbent assay, hemagglutination, and immunofluorescent tests) were positive in all patients studied. All patients had left the endemic area for more than 20 years before the collection procedure, and they had never received any parasite-specific treatments. These patients had previously lived in Uberaba, Minas Gerais, Brazil, where the natural transmission was interrupted more than 30 years ago, and they had never received a blood transfusion.

The noninfected group was composed of individuals with a negative serological test result specific for Chagas disease. These individuals were also from the state of Minas Gerais

Table 1 Study group

	Age (y)	Diameter of the esophagus (cm)	Sex	Area of PGP 9.5-IR nerve fibers (μm^2)
Noninfected individuals				
E2	76	1.6	M	287
E5	54	1.4	M	229
E17	79	1.6	M	196
HE12-94	34	1.5	M	372
HE83-93	85	1.2	M	328
HE93-93	47	1.3	M	262
Infected individuals without megaesophagus				
E3	49	1.1	F	325
E9	47	1.3	F	243
E14	70	1.7	M	250
E4	61	1.6	M	176
E7	66	1.4	M	195
E15	40	1.2	M	197
Infected individuals with megaesophagus				
E12	57	2.7	M	16
HE30-00	52	4.5	M	20
HE46-01	43	3.0	F	24
HE71-00	67	2.9	M	17
HE45-93	53	4.1	M	18
ML10-86	43	2.6	M	23

Abbreviations: M, male; F, female.

and had an average age of 62 ± 20 years and an average esophagus diameter of 1.4 ± 0.1 cm. Patients with Chagas disease without megaesophagus had a mean age of 55 ± 11 years and a mean esophagus diameter of 1.4 ± 0.2 cm. Patients with Chagas disease with megaesophagus had a mean age of 52 ± 9 years and a mean esophagus diameter of 3.3 ± 0.8 cm. The diagnosis of megaesophagus was established from clinical data reporting esophagus obstruction and dilatation as observed by radiologic studies. The patients' characteristics are presented in Table 1.

Tissue samples were collected from the lower esophagus within 5 cm of the cardia (part of the stomach attached to the esophagus). The tissue was processed in 4% neutral-buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin for immunohistochemical studies. After fixation in formaldehyde and embedding in paraffin, the esophagus rings were cut into serial 7- μ m sections and subjected to immunohistochemical studies.

2.2. Counting of neurons

After fixation in formaldehyde and embedding in paraffin, the esophagus rings were cut into serial 7- μ m sections, and every seventh section was selected to avoid duplicate counting of ganglion cells. Ten sections were obtained from each block, which had a total thickness of 490 μ m. Hematoxylin and eosin-stained sections were then analyzed for the number of neurons.

2.3. Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical analysis was performed on samples from all of the infected and noninfected individuals (Table 1). Seven-micrometer-thick, paraffin-embedded sections were deparaffinized with xylene and then dehydrated in a graded alcohol series. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation with 4% hydrogen peroxide and 0.05 M of sodium azide for 30 minutes. The slides were then incubated with 2% normal swine serum (Sigma, St Louis, MO) in phosphate-buffered saline for 30 minutes and, subsequently, with polyclonal antibodies specific to the pan-neuronal marker PGP 9.5 (Dako; Carpinteria, CA, USA; code Z5116, 1:50) and VIP (Abcam, Cambridge, MA; code ab22736, 1:200) and a monoclonal antibody specific to SP (Abcam; code ab14184, 1:200), followed by a second incubation with peroxidase-conjugated rabbit antimouse antibodies (Dako) for 60 minutes. Peroxidase activity was determined by incubation with 3-3'-diaminobenzidine (Sigma) and hydrogen peroxide for 10 minutes. Slides were counterstained with Gill hematoxylin (Sigma), dehydrated in a graded alcohol series, and mounted in synthetic-mounting media.

2.4. Morphometric analyses

Morphometric analyses of immune-stained areas were performed using an image analysis system (Kontron KS300

version 2.0; Kontron, Port Coquitlam, Canada) on 20 randomly selected fields (total area of $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) of the inner muscle layer for a single slide per patient. The relative areas were calculated as follows: VIP-immunoreactive (IR) or SP-IR area/PGP 9.5-IR area $\times 100$.

2.5. Statistics

Analysis of variance was performed using the Kruskal-Wallis test and Dunn multiple comparison posttest for differences in the responses between different groups related to nonparametric data. Data were expressed as mean \pm SD. A correlation analysis was performed using the Spearman nonparametric test. Differences were considered statistically significant at $P < .05$.

3. Results

3.1. Counting of neurons in the myenteric plexus

Assessment of innervation was performed by counting of neurons (Table 2) and by analyzing the density of PGP 9.5-IR nerve fibers (Fig. 1A-C). The number of neurons in 490- μ m sections of the esophageal ring ranged from 0 to 70 neurons in individuals infected with megaesophagus and from 343 to 436 in noninfected individuals. Infected individuals without megaesophagus presented extremely

Table 2 Neuronal counting in the esophagus of patients with Chagas disease and noninfected individuals

	Neuronal counting ^a
Noninfected individuals	
E2	343
E5	352
E17	343
HE12-94	436
HE83-93	ND
HE93-93	ND
Infected individuals without megaesophagus	
E3	330
E9	196
E14	315
E4	40
E7	20
E15	88
Infected individuals with megaesophagus	
E12	0
HE30-00	0
HE46-01	70
HE71-00	0
HE45-93	0
ML10-86	0

Abbreviation: ND, not done.

^a Number of neurons per 490 μ m of the esophagus ring.

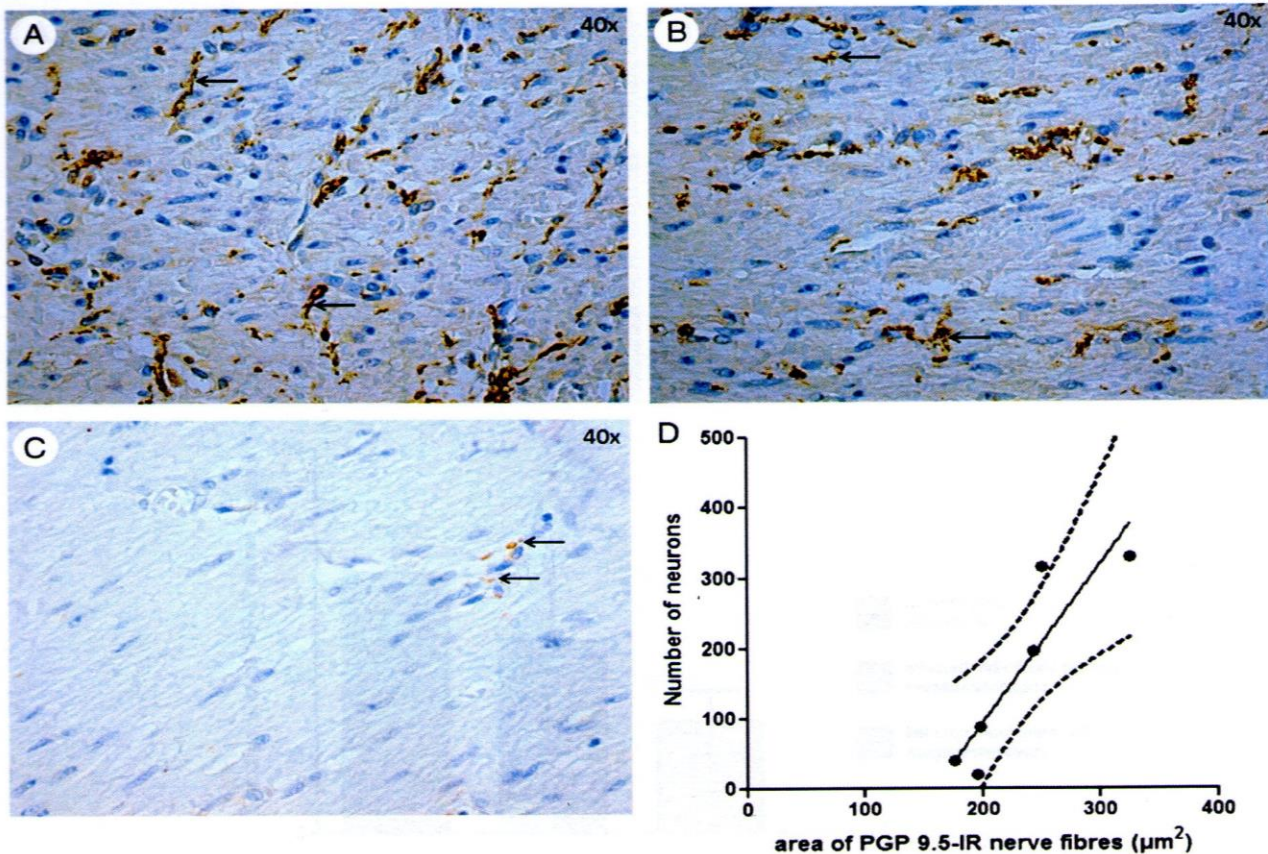


Fig. 1 Immunohistochemical profile of PGP 9.5-IR nerve fibers in the inner muscle layer of the esophagus from infected and noninfected individuals. A, The PGP 9.5-IR nerve fibers are indicated by arrows in the noninfected individuals. B, The data reveal a similar distribution of PGP 9.5-IR nerve fibers in the infected individuals without megaesophagus compared with noninfected individuals (arrows). C, Infected individuals with megaesophagus demonstrated decreased PGP 9.5-IR nerve fibers when compared with the other 2 groups (arrows; original magnification $\times 40$). D, The number of neurons positively correlates with the area of PGP 9.5-IR nerve fibers in the infected individuals without megaesophagus ($r = 0.9429$ and $P = .0167$).

heterogeneous neuronal counts, ranging from 20 to 330 neurons per 490- μm section of the esophageal ring.

As previously described by Nascimento et al [16], morphometric analysis of stained sections revealed a significant reduction in the PGP 9.5-IR area (19.67 ± 3.27) in patients with Chagas disease with megaesophagus when compared with noninfected individuals (279 ± 64.49) and patients with Chagas disease without megaesophagus (231 ± 54.44), but no significant difference was observed between patients without megaesophagus and noninfected individuals. The absolute values of PGP 9.5 were used for calculating the relative areas of nerve fibers IR for either SP or VIP.

Correlation analyses revealed that in patients without megaesophagus that presented variable degrees of innervation, the number of neurons positively correlated with the PGP 9.5-IR area ($r = 0.9429$ and $P = .0167$; Fig. 1D). No significant correlation was observed between the number of

neurons and PGP 9.5-IR area in patients with megaesophagus ($r = 0.6547$ and $P = .1750$) or in the control group ($r = 0.6325$ and $P = .4167$).

3.2. Distribution and relative areas of SP and VIP in the human esophagus

In the smooth muscle of the inner muscle layer and beneath the epithelium of the esophagus from serologically negative controls, abundant nerve fibers containing VIP were observed (Fig. 2A). In addition, VIP was also detected in eosinophils, mainly, in sections from noninfected individuals (Fig. 2B). Morphometric analyses of tissue sections submitted for immunohistochemistry revealed that patients with megaesophagus have a decreased relative area of VIP-IR nerve fibers when compared with controls (Fig. 2C).

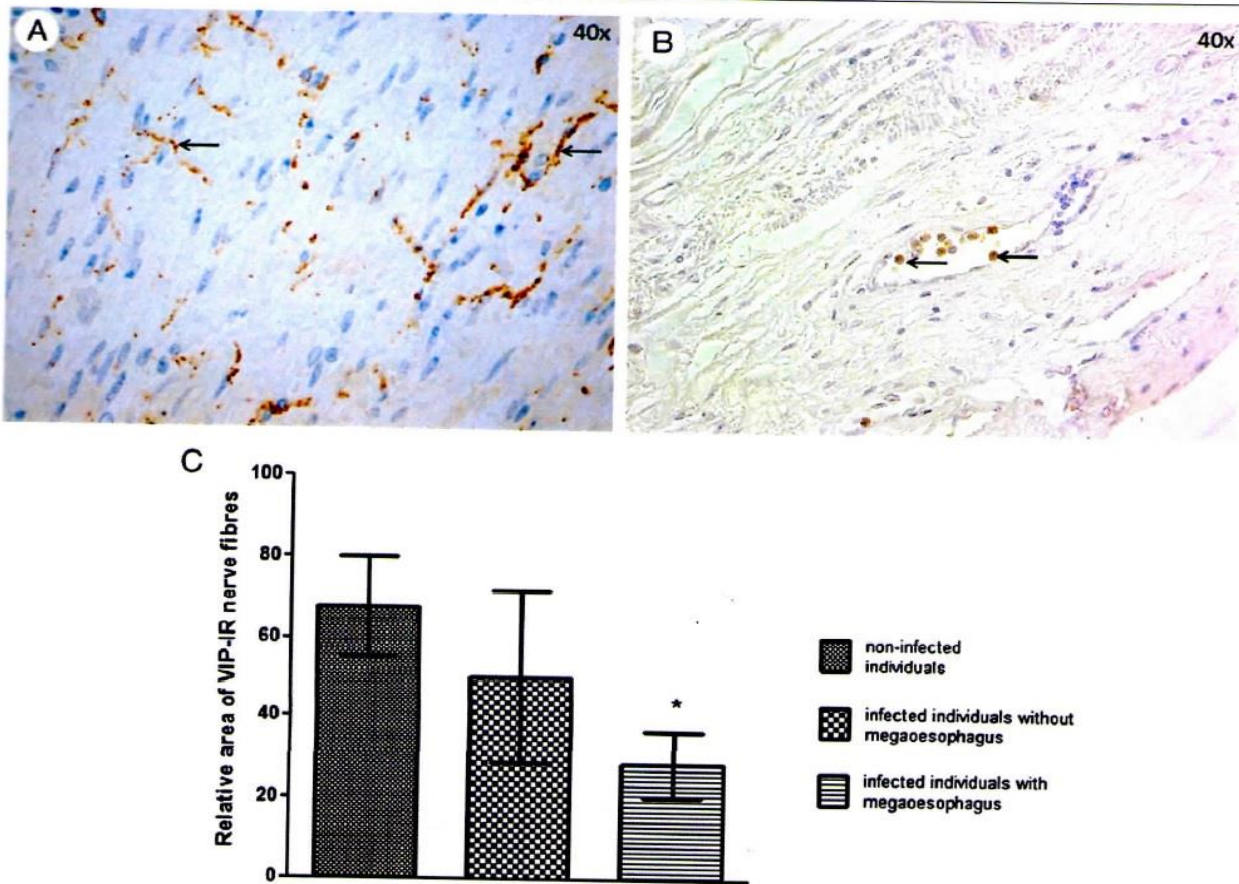


Fig. 2 The arrows show the distribution of VIP-IR nerve fibers in the inner muscle layer of the esophagus from noninfected individuals (original magnification $\times 40$) (A) and VIP-IR eosinophils in a section of esophagus from noninfected individuals (original magnification $\times 40$) (B). Relative area of VIP-IR nerve fibers in the inner muscle layer of the esophagus from infected individuals with and without megaesophagus and from noninfected individuals. The values are expressed as mean \pm SD. *Statistically significant differences between this group and the noninfected individuals. C, Total area of $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ for all patients was analyzed ($P < .05$).

In contrast to the high density of VIP-IR nerve fibers, SP-IR neuronal bundles were scarce in the inner muscle layer (Fig. 3A). SP-IR eosinophils were observed on esophagus sections from controls, infected individuals without megaesophagus, and, mainly, in samples from individuals with megaesophagus (Fig. 3B). Morphometric analyses of SP-IR nerve fibers revealed an increased relative area positive for SP in patients with megaesophagus when compared with noninfected controls or to infected individuals without megaesophagus (Fig. 3C).

Given the abundant heterogeneity in the group of patients without megaesophagus, with 3 of them presenting moderate denervation, we determined whether a correlation existed between the PGP 9.5 area and VIP or SP relative areas. Interestingly, statistical analyses revealed that in this group of patients, the relative area of the VIP-IR nerve fibers positively correlated with the area of PGP 9.5-IR nerve fibers ($r = 0.8857$ and $P = .0333$; Fig. 4A). Correlation analyses in the infected individuals with megaesophagus ($r = -0.7714$ and $P = .1028$) and in noninfected individuals ($r =$

-0.0285 and $P = 1.000$), however, did not show any significant correlation between the previously mentioned parameters. No significant correlation was observed between the area of PGP 9.5-IR nerve fibers and the relative area of SP-IR nerve fibers in the infected individuals without megaesophagus ($r = -0.1429$ and $P = .8028$; Fig. 4B), infected individuals with megaesophagus ($r = 0.0857$ and $P = .9194$), and noninfected individuals ($r = 0.6000$ and $P = .2417$).

4. Discussion

The mechanism by which *T. cruzi* infection induces neuronal lesions is unknown, but several lines of evidence support a role for the immune system [3,17]. In the acute phase of infection, the parasite is normally observed in the organs associated with intense inflammation. Lately, the reestablishment of immune homeostasis upon resolution of

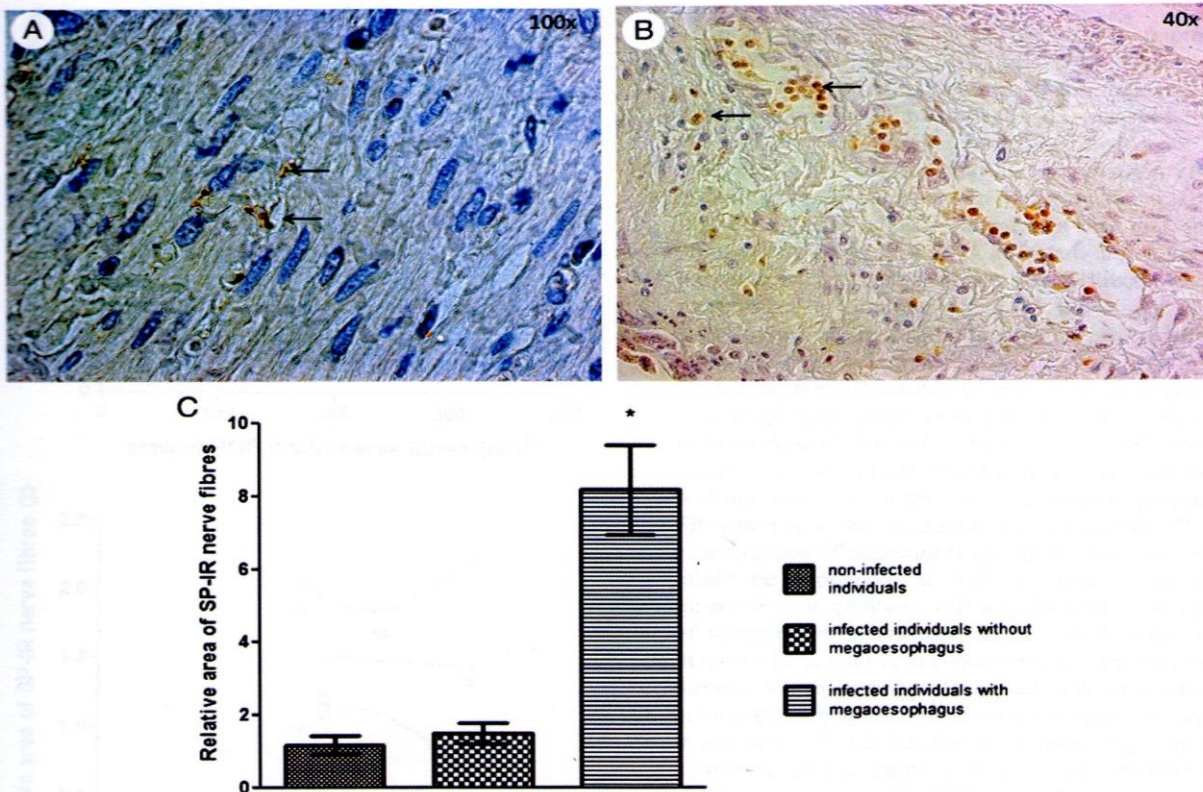


Fig. 3 The arrows show the scarce distribution of SP-IR nerve fibers in the inner muscle layer of the esophagus from noninfected individuals (original magnification $\times 100$) (A) and SP-IR eosinophils in a section of esophagus from infected individuals with megaesophagus (original magnification $\times 40$) (B). Relative area of SP-IR nerve fibers in the muscle layer of esophagus from infected individuals with and without megaesophagus and from noninfected individuals. The values are expressed as mean \pm SD. *Statistically significant differences between this group and the other 2 groups. C, Total area of $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ for all patients was analyzed ($P < .05$).

inflammation is essential to limit the persistence of exacerbated inflammatory conditions. We believe that, in addition to the persistence of the parasite in the tissues [5], the loss of local immune tolerance is one of the mechanisms involved in the reactivation and/or exacerbation of the chronic inflammatory process and subsequent neuronal lesions. Among the multiple substances that act together to ensure the reestablishment of immune homeostasis in gut inflammation, VIP and SP should be considered. In this study, VIP-IR nerve fibers were abundantly observed in the esophagus of noninfected individuals, whereas SP-IR nerve fibers were moderate/sparse in this tissue, confirming other morphologic studies on human esophageal samples [18,19] and providing support for the participation of those neuropeptides in the pathology of megaesophagus.

Neuronal counting in patients without megaesophagus positively correlated with the PGP 9.5-IR area and validated the analysis of PGP 9.5-IR nerve fibers as a methodology for following the denervation process associated with Chagas disease. In this study, PGP 9.5

absolute values were applied in the relative area calculations of the 2 other neuromediators: VIP and SP. First, we demonstrated that in esophageal sections from *T. cruzi*-infected individuals with megaesophagus, the VIP-IR areas were dramatically decreased. Other studies have demonstrated that, in addition to the traditional immunosuppressive cytokines, such as IL-10, IL-13, and transforming growth factor $\beta 1$, a number of neuroendocrine mediators such as VIP also play an essential role in resolving inflammation and maintaining tolerance in the gastrointestinal tract [9,20]. Therefore, in *T. cruzi*-infected patients, the selective destruction of VIP-producing neurons could contribute to the disruption of the local immune tolerance, thus favoring the establishment and maintenance of the inflammatory process. Compared with infected individuals without digestive disease, patients with megaesophagus normally present a more intense inflammatory process, which is revealed not only by an increased number of leucocytes but also by the significant presence of potentially cytotoxic cells [5,6].

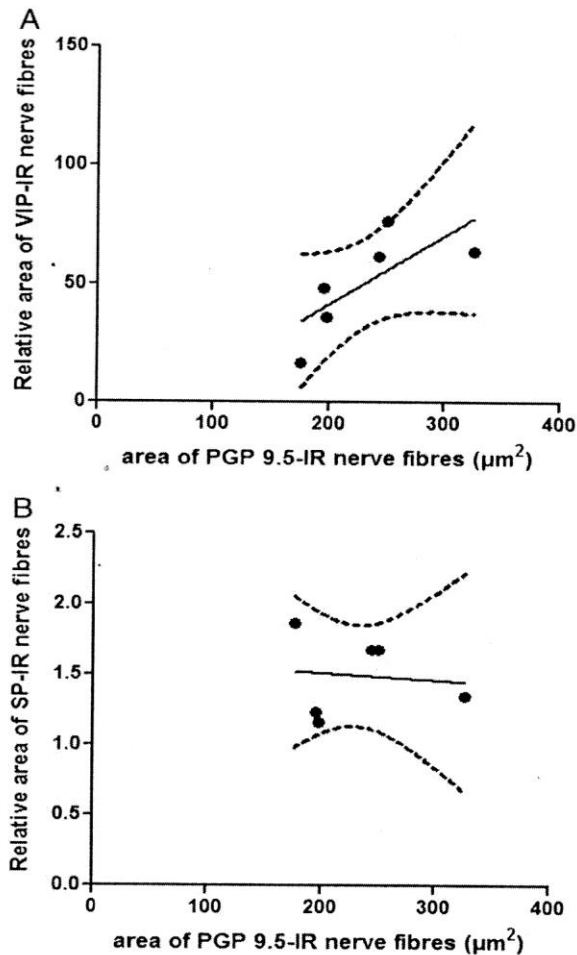


Fig. 4 A, Relative area of VIP-IR nerve fibers positively correlates with the area of PGP 9.5-IR nerve fibers in infected individuals without megaesophagus ($r = 0.8857$ and $P = .0333$). B, No significant correlation was observed between the relative area of SP-IR nerve fibers and area of PGP 9.5-IR nerve fibers in the infected individuals without megaesophagus ($r = -0.1429$ and $P = .8028$).

The mechanism by which VIP could contribute to gut immune homeostasis has been debated in the literature. VIP is involved in the generation of tolerogenic dendritic cells [21] and in the induction of antigen-specific Treg cells [22]. Previous analysis of colon sections from patients with Chagas disease revealed an increased concentration of Foxp3(+) regulatory cells in individuals without megacolon when compared with those with megacolon [23], which suggests that Treg cells maintain the immune homeostasis in the gut of *T. cruzi*-infected individuals. Further analyses of the esophagus of *T. cruzi*-infected patients may be useful to investigate whether any correlation exists between VIP production and the presence of tolerogenic dendritic cells and Treg lymphocytes.

In contrast to VIP, which exerts immunomodulatory effects on most immune cells [24], SP has been identified as an important proinflammatory agent that promotes the recruitment of inflammatory cells to tissues [14,15]. During the past 20 years, SP has been identified as an important mediator in the development and progression of intestinal inflammation. In patients with megaesophagus, SP-IR nerve fibers occupied a higher relative area than that observed in noninfected controls and in infected individuals without megaesophagus. Increased SP may indirectly promote the recruitment of immune cells to the organ [5,6], thus contributing to the development of neuronal lesions upon chronic *T. cruzi* infection.

Among the inflammatory cells observed in patients with megaesophagus, some exuberant foci of eosinophils were immunostained for SP. Whether the SP observed in eosinophils was produced, stored, or both by those cells was not addressed in this study. However, considering that SP stimulates the migration of eosinophils [25,26], the accumulation of eosinophils in patients with megaesophagus might be explained, at least in part, by increased SP innervation. In addition, VIP was detected in the eosinophils of noninfected individuals, as previously reported in the literature [27], but not in eosinophils of patients with Chagas disease. VIP in eosinophils is used to control inflammation homeostatically within the intestinal microenvironment [20]. In addition, VIP inhibits the chemotaxis of lymphocytes and monocytes into immune compartments [28] where eosinophils have migrated [27]. Based on these findings, eosinophils serve as an important modulator of the inflammatory process in *T. cruzi*-infected individuals. This hypothesis would be supported by the finding of VIP-IR eosinophils in patients without megaesophagus, but they were not detected in those 6 cases analyzed. In conclusion, many more studies are needed to investigate the role of eosinophils in the immunopathology of megaesophagus in *T. cruzi*-infected patients.

Finally, we speculate that the imbalance between VIP and SP production could result in the reestablishment and maintenance of the inflammatory process, leading to denervation and, consequently, promoting the development of megaesophagus. This hypothesis was tested by correlation analyses of data from patients without megaesophagus, which revealed that the PGP 9.5 density positively correlated with the VIP relative areas.

PGP 9.5 density could serve as a marker of pathological progression in the distinct developmental stages of the disease. In vivo studies have indicated that VIP has enormous therapeutic potential in the treatment of some other inflammatory diseases [20,29]. Given the inhibitory effects of VIP on the function of immune cells [30], the potential of VIP as an anti-inflammatory drug is also significant in chronic Chagas disease. However, this idea should be carefully analyzed. The parasite is still detected in the blood and tissues of patients with chronic Chagas disease, and a putative treatment with VIP may reactivate the latent infection.

References

- [1] Dias JC. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica* 2006;22:2020-1.
- [2] Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 2001;1:92-100.
- [3] Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968;6:63-116.
- [4] Adad SJ, Andrade DC, Lopes ER, Chapadeiro E. Pathological anatomy of chagasic megaesophagus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991;33:443-50.
- [5] da Silveira AB, Arantes RM, Vago AR, et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 2005;131:627-34.
- [6] d'Avila Reis D, Lemos EM, Silva GC, et al. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:177-8.
- [7] Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006;212:114-30.
- [8] Delgado M, Ganea D. Anti-inflammatory neuropeptides: a new class of endogenous immunoregulatory agents. *Brain Behav Immun* 2008;22:1146-51.
- [9] Wang Y, Mei Y, Bao S, Xu L. Vasoactive intestinal polypeptide enhances oral tolerance by regulating both cellular and humoral immune responses. *Clin Exp Immunol* 2007;148:178-87.
- [10] Khan WI, Ghia JE. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol* 2010;161:19-27.
- [11] Souza-Moreira L, Campos-Salinas J, Caro M, Gonzales-Rey E. Neuropeptides as pleiotropic modulations of the immune response. *Neuroendocrinology* 2011;94:89-100.
- [12] Smalley SG, Barrow PA, Foster N. Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 2009;157:225-34.
- [13] Gonzalez-Rey E, Varela N, Chorny A, Delgado M. Therapeutical approaches of vasoactive intestinal peptide as a pleiotropic immunomodulator. *Curr Pharm Des* 2007;13:1113-39.
- [14] Koon HW, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:23-40.
- [15] Engel MA, Becker C, Reeh PW, Neurath MF. Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1030-3.
- [16] Nascimento RD, de Souza Lisboa A, Fujiwara RT, et al. Characterization of enteroglial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. *HUM PATHOL* 2010;41:528-34.
- [17] Koberle F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. *Bull World Health Organ* 1970;42:739-43.
- [18] Aggestrup S, Uddman R, Jesen SL. Regulatory peptides in lower esophageal sphincter of pig and man. *Dig Dis Sci* 1986;31:1350-7.
- [19] Wattchow DA, Furness JB, Costa M, O'Brien PE, Peacock M. Distributions of neuropeptides in the human esophagus. *Gastroenterology* 1987;93:1363-71.
- [20] Abad C, Martinez C, Juarranz MG, et al. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124:961-71.
- [21] Delgado M, Reduta A, Sharma V, Ganea D. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:1122-30.
- [22] Pozo D, Anderson P, Gonzalez-Rey E. Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *J Immunol* 2009;183:4346-59.
- [23] da Silveira AB, de Araújo FF, Freitas MA, et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol* 2009;70:65-7.
- [24] Anderson P, Gonzalez-Rey E. Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple levels. *Mol Cell Biol* 2010;30:2537-51.
- [25] Saban MR, Saban R, Bjorling D, Haak-Frendscho M. Involvement of leukotrienes, TNF-alpha and the LFA-1/ICAM-1 interaction in substance P-induced granulocyte infiltration. *J Leukoc Biol* 1997;61:445-51.
- [26] Dunzendorfer S, Meierhofer C, Wiedermann CJ. Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol* 1998;64:828-34.
- [27] Metwali A, Blum AM, Ferraris L, Klein JS, Fiocchi C, Weinstock JV. Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Neuroimmunol* 1994;52:69-78.
- [28] Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 2002;39:148-61.
- [29] Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB J* 2003;17:1922-4.
- [30] Gutiérrez-Canás I, Juarranz I, Santiago B, et al. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology* 2006;45:527-32.