

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Curso de Pós-Graduação em  
Biologia Celular

Ana Luiza Cassin Duz

Estudo do megacólon chagásico em modelo  
murino com ênfase nas alterações  
morfológicas da parede intestinal

Belo Horizonte

2009

Ana Luiza Cassin Duz

Estudo do megacólon chagásico em modelo murino com ênfase nas alterações morfológicas da parede intestinal

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Rosa Maria Esteves Arantes

Belo Horizonte

2009

Esta dissertação foi desenvolvida no  
Laboratório de Neuro-Imuno  
Patologia Experimental (NIPE) do  
Departamento de Patologia Geral do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
sob orientação da  
Prof<sup>a</sup>. Rosa Maria Esteves Arantes,  
com o auxílio financeiro da  
CNPq, FAPEMIG e CAPES.

À minha mãe, a quem dedico todas as  
minhas realizações, pelo exemplo de  
dedicação e amor. Muito obrigada!

## AGRADECIMENTOS

À minha família, meus irmãos e sobrinhas fofas pelas grandes alegrias.

À Profª Rosa pela orientação, disponibilidade e por ter acreditado no meu potencial.

Às Profªs Maria Terezinha Bahia e Vanja Veloso pela colaboração na infecção e manutenção dos animais.

À Profª Tarcília Aparecida da Silva pela padronização e auxílio na realização das técnicas de imuno-histoquímica para subtipos de células inflamatórias.

Às Profªs Angela Lana e Natasha Almeida e o técnico Danilo Bastos pela assessoria de estatística

Aos colegas do NIPE, especialmente Flávia, Silvia, Camilinha, Camila, Carol, Marta e Maria pela amizade, momentos alegres, apoio, caronas e inestimável ajuda. Muito obrigada por tudo! Sem vocês não sei se conseguiria!

Às técnicas Mirna, Vânia, Jaqueline e Olinda, sempre dispostas a ajudar, pela realização dos trabalhos técnicos.

À secretária Sibebe pela disponibilidade e simpatia.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biologia Celular pelos ensinamentos.

As Doce Venenosas que fizeram de Minas minha casa, em especial a grande amiga Ana Nery pela convivência.

Aos amigos que sempre apoiaram e torceram por mim.

A todos que direta ou indiretamente participaram deste projeto.

## RESUMO

O estudo da doença de Chagas experimental é um modelo de potencial importância para o entendimento da patogênese do megaesôfago e do megacólon. Vários modelos de infecção crônica em camundongos são baseados na coleta de material histopatológico no curso inicial da fase crônica. Todavia, neste estudo foram avaliados animais infectados na fase aguda e com 15 meses de infecção a fim de investigar os aspectos da plasticidade da musculatura intestinal lisa e inervação entérica. Para tanto, foram avaliadas alterações histopatológicas da parede intestinal e do sistema nervoso entérico de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. No 11º dia pós-infecção um subgrupo foi sacrificado (fase aguda) e o outro subgrupo foi tratado com Benzonidazol e sacrificado após 15 meses (fase crônica). Camundongos de idade pareada foram usados como controle. Os cólons foram analisados qualitativa e quantitativamente na técnica morfométrica e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste estatístico computacional ANOVA. Na fase aguda todos os animais infectados apresentaram infiltrado inflamatório relacionado ao intenso e difuso parasitismo da camada submucosa, que se apresentava significativamente espessada em relação ao controle. As fibras musculares apresentavam intensa degeneração e as alterações inflamatórias correlacionaram-se com o aumento de fibra reticular associada à necrose das fibras musculares, especialmente na região distal do cólon. Vários neurônios e células da glia dos plexos de Meissner e Auerbach apresentaram-se preservados, todavia houve diminuição significativa da densidade da inervação intermuscular. Na fase crônica o parasitismo apresentou-se insignificante e espessamento das camadas do cólon, hipertrofia das fibras musculares, migração de mastócitos para a camada muscular, bem como deposição de tecido colágeno, indicativo de reparação por fibrose de áreas lesadas durante a fase aguda, foram observados. A arquitetura dos plexos de Meissner e Auerbach apresentou-se focalmente afetada e foi observada diminuição da inervação intermuscular. O camundongo Swiss reproduziu várias alterações histopatológicas características do megacólon humano, sendo um modelo interessante para se estudar a patogênese da doença de Chagas crônica.

Palavras-chave: Doença de Chagas, cólon, sistema nervoso entérico, histopatologia

## ABSTRACT

Experimental models of Chagas' disease may contribute to better understanding of megasophagus and megacolon's pathogenesis. Current mice models of chronic infection are based in histological data obtained early in the course of the disease. Here, we studied the acute and chronic long term infected and post-treated mice (15 months) in order to investigate histopathological aspects of intestinal smooth muscle and enteric nerves plasticity. A group of Swiss mice was infected with 50.000 trypomastigotes of Y strain of *T. cruzi*. At 11<sup>th</sup> day post-infection a sub-group was sacrificed (acute phase) and other sub-group was treated with Benznidazol and sacrificed 15 months after infection (chronic phase). Aged-paired non-infected mice were used as control. The entire length of colons was sampled by a swiss-roll technique and used for histopathology and morphometric analysis and statistical analysis was performed by ANOVA. In acute phase all animals presented inflammatory lesions related to intense and diffuse parasitism of muscular and submucosa, which were enlarged when compared to controls. Intense degenerative, inflammatory changes and increased reticular fiber quantification suggest inflammatory-induced necrosis of muscle cells, especially in the distal colon. Many neurons and glial cells of Meissner and Auerbach plexus were preserved along with affected areas. Parasitism was insignificant in chronic phase, but increased thickness of colon wall, diffuse individual muscle cell hypertrophy, as well as increased collagen deposition were detected and indicate fibrosis repairing earlier damaged areas. Mast cell count was significantly increased in muscular layers. Meissner and Auerbach plexus architecture were focally affected, and a significant decrease of intramuscular nerve bundle density were detected. Our mice model is a valuable model for studying the pathogenesis of chronic Chagas' disease specially based on the similarity with the human megacolon histopathology.

Word-case: Chagas' Disease, colonic, enteric nervous system, histopathology

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Delineamento experimental	<b>33</b>
<b>FIGURA 2</b> Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (A e E) e infectado (B, C, D e F) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na fase aguda. No cólon pode ser observada a camada mucosa (M), submucosa (S), muscular interna (MI) e externa (ME) e entre essas camadas o plexo mientérico (pontilhado). Nos animais infectados há intenso infiltrado inflamatório mononuclear na camada submucosa e muscular (B), no plexo mientérico (C) e na camada muscular externa com fibras em necrose (D), além de necrose e apoptose das células da cripta das glândulas (F). Coloração de hematoxilina-eosina, a barra equivale a 20µm em A e B e 10µm em C, D, E e F.	<b>49</b>
<b>FIGURA 3</b> Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (A) e infectado (B, C, D, E e F) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na fase crônica. Infiltrado inflamatório mononuclear focal na camada muscular interna (B), periganglionar (C) e perivascular (I), caracterizando vasculite crônica com aumento da espessura da parede dos vasos e hipertrofia do endotélio (E) e presença de mastócitos na musculatura e perivascular (F). Colorações de Hematoxilina-Eosina (A, B, C e D), Prata Amoniacal de Gomori (E) e Azul de Toluidina (F). Barra equivale 20µm em A e B, 10µm em C, D, E e no detalhe de F e 4µm em F.	<b>52</b>
<b>FIGURA 4</b> Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na fase aguda (A, C e D) e na fase crônica (B). Na fase aguda há parasitismo associado (A) ou não a infiltrado inflamatório (C) e no plexo mientérico (D). Na fase crônica, na maioria dos casos, observa-se ausência de parasito nos focos inflamatórios (B). Imuno-histoquímica anti- <i>T. cruzi</i> , barra equivale a 10µm.	<b>55</b>
<b>FIGURA 5</b> Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss dos grupos controle (A e C) e infectado (B e D) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na de fase aguda. O grupo infectado apresentou infiltrado inflamatório (B), áreas de substituição com tecido de granulação (detalhe) e colabamento das fibras reticulares (D) na camada muscular. Coloração Tricrômico de Gomori (A e B) e Prata Amoniacal de Gomori (C e D). Barra equivale a 20µm em A e B e 10µm no detalhe B, C e D.	<b>61</b>
<b>FIGURA 6</b> Fotomicrografias representativas do cólon camundongos Swiss do grupo controle (A e C) e infectado (B e D) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na de fase crônica. O grupo infectado apresentou aumento das fibras colágenas (B) entremeando as fibras musculares (detalhe), porém as fibras reticulares (D) tinham padrão semelhante ao do grupo controle (C). Coloração Tricrômico de Gomori e Prata Amoniacal de Gomori, a barra equivale a 20µm em A e B e 10µm no detalhe B, C e D.	<b>64</b>
<b>FIGURA 7</b> Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (A, C e G) e infectado (B, D e H) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na fase aguda; grupo controle (E) e infectado (F) sacrificados na fase crônica. Plexo submucoso (A e B), inervação intermuscular longitudinal (cabeça de seta) e transversal (cabeça de seta preenchida), neurônios (C, D, E e F) e células da glia entérica (G e H) do plexo mientérico. Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5 (A, B, C, D, E e F) e anti-GFAP (G e H), a barra equivale a 10µm.	<b>72</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> Caracterização dos anticorpos primários e secundários, conjugados e sistema de detecção utilizados nas imuno-histoquímicas.	<b>38</b>
<b>TABELA 2</b> Análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório perivascular, na camada submucosa e muscular interna entre os grupos controle e infectado sacrificados nas fases aguda e crônica: mediana (valor mínimo/valor máximo) e p valor (significância estatística $p \leq 0,05$ ), Teste Mann Whitney.	<b>45</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b> Curva de parasitemia de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> durante a fase aguda da infecção (n=6).	<b>43</b>
<b>GRÁFICO 2</b> Porcentagem da taxa de mortalidade de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> avaliados durante 15 m.p.i. (n=30).	<b>44</b>
<b>GRÁFICO 3</b> Avaliação da espessura da parede total, camada mucosa, camada submucosa, muscular total, muscular interna e muscular externa do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase aguda da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).	<b>48</b>
<b>GRÁFICO 4</b> Avaliação da espessura da parede total, camada mucosa, camada submucosa, muscular total, muscular interna e muscular externa do cólon de camundongos do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase crônica da infecção. * representa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).	<b>51</b>
<b>GRÁFICO 5</b> Avaliação da área marcada por imuno-histoquímica anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y, sacrificados na fase aguda (n=10) e na fase crônica (n=10). * e a linha representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos e entre as regiões do grupo infectado de fase aguda, respectivamente.	<b>54</b>
<b>GRÁFICO 6</b> Avaliação do número total de núcleos celulares presentes na camada muscular interna e mastócitos nas camadas submucosa, musculares e serosa do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na fase aguda da infecção. * representa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).	<b>57</b>
<b>GRÁFICO 7</b> Número de mastócitos nas camadas submucosa, muscular e serosa do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase crônica da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=5).	<b>58</b>
<b>GRÁFICO 8</b> Avaliação da área das células musculares lisas das camadas interna do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados na fase crônica da infecção. * representa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).	<b>59</b>
<b>GRÁFICO 9</b> Avaliação da área de tecido conjuntivo e de fibra reticular na camada muscular interna do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase aguda da infecção. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) são representadas por * entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).	<b>60</b>
<b>GRÁFICO 10</b> Avaliação da área de tecido conjuntivo e de fibra reticular no cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase crônica da infecção. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) são representadas por * entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).	<b>63</b>
<b>GRÁFICO 11</b> Avaliação da área imunomarcada por PGP 9.5 no plexo mientérico nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase aguda da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3) e a linha representam diferença estatística entre as regiões do grupo infectado.	<b>66</b>
<b>GRÁFICO 12</b> Avaliação da área do plexo submucoso imunomarcado por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase aguda da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ )	<b>67</b>

entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3) e a linha representam diferença estatística entre as regiões do grupo infectado.	
<b>GRÁFICO 13</b> Avaliação da inervação intermuscular imunomarcada por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase aguda da infecção. * indica diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3) e a linha tracejada representam diferença estatística entre as regiões do grupo controle.	<b>68</b>
<b>GRÁFICO 14</b> Avaliação da área do plexo mientérico imunomarcado por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase crônica da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3).	<b>68</b>
<b>GRÁFICO 15</b> Avaliação da área do plexo submucoso imunomarcado por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase crônica da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3).	<b>69</b>
<b>GRÁFICO 16</b> Avaliação da inervação intermuscular imunomarcado por PGP 9.5 no cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase crônica da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3).	<b>69</b>
<b>GRÁFICO 17</b> Avaliação da área do plexo mientérico imunomarcado por GFAP nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase aguda da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3).	<b>70</b>
<b>GRÁFICO 18</b> Avaliação da área do plexo mientérico imunomarcado por GFAP nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle e infectado com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> , sacrificados durante a fase crônica da infecção. * indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3).	<b>71</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AH</b>	após hiperpolarização
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BAC</b>	cloreto de benzalcônio
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CEBIO</b>	Centro de Bioterismo
<b>CETEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>CGRP</b>	peptídeo gene-relacionado a calcitonina
<b>CNPq</b>	Comissão Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>d.p.i.</b>	dias pós-infecção
<b>DAB</b>	3,3'-diaminosobenzidina tetrahydrocloro
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>ELISA</b>	Análise de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
<b>ERK</b>	regulatório de quinase extracelular
<b>FAPEMIG</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
<b>GABA</b>	ácido aminobutírico gama
<b>GDNF</b>	fator neurotrófico derivado de célula da glia
<b>GFAP</b>	proteína ácida fibrilar glial
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleucina-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	interleucina-6
<b>Ig</b>	imunoglobulina
<b>iNOS</b>	enzima óxido nítrico sintase induzida
<b>IPAN</b>	neurônio aferente primariamente intrínseco
<b>m.p.i.</b>	meses pós-infecção
<b>NCS-1</b>	proteína de vesícula sináptica sensora de cálcio
<b>NGF</b>	fator de crescimento nervoso
<b>NIPE</b>	Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental
<b>NK</b>	natural killer
<b>nNOS</b>	enzima óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NPY</b>	neuropeptídeo Y
<b>PBS</b>	solução tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PGP 9.5</b>	produto protéico do gene 9.5
<b>S</b>	sináptico
<b>SEM</b>	erro padrão da média
<b>SNE</b>	sistema nervoso entérico
<b>SP</b>	substância P

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>TH</b>	tirosina hidroxilase
<b>TNBS</b>	ácido sulfônico trinitrobenzeno
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UFOP</b>	Universidade Federal de Ouro Preto
<b>VIP</b>	polipeptídeo intestinal vasoativo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
1.1 Doença de Chagas	16
1.2 Fase aguda da doença de Chagas	16
1.3 Fase crônica da doença de Chagas	17
1.4 Tropismo das cepas do <i>T. cruzi</i>	18
1.5 Hipóteses da patogênese	19
1.6 Trato gastrointestinal	19
1.7 Sistema nervoso entérico	20
1.8 Megacólon	24
1.9 Modelo experimental murino	27
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1 Animais	31
4.2 Infecção com <i>T. cruzi</i>	31
4.3 Curva de parasitemia e mortalidade	32
4.4 Sacrifício	32
4.5 Coleta de material histopatológico	34
4.6 Destino das lâminas histológicas	34
4.7 Colorações histopatológicas	35
4.7.1 Hematoxilina-Eosina	35
4.7.2 Azul de Toluidina Boráx	35
4.7.3 Tricrômico de Gomori	35
4.7.4 Prata Amoniacal de Gomori	36
4.8 Reação imuno-histoquímica	36
4.8.1 Imuno-histoquímica anti- <i>T. cruzi</i>	36
4.8.2 Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5 e anti-GFAP	37
4.9 Análise qualitativa	38
4.10 Análise quantitativa	39
4.10.1 Avaliação da espessura da parede do cólon	39
4.10.2 Quantificação do parasitismo tecidual	40
4.10.3 Quantificação do infiltrado inflamatório	40
4.10.4 Número de mastócitos	40
4.10.5 Avaliação da área das células musculares lisas	40
4.10.6 Avaliação da área de tecido conjuntivo e fibra reticular	41
4.10.7 Avaliação do corpo neuronal do plexo mientérico e submucoso e da inervação intermuscular lisa intestinal	41
4.10.8 Avaliação das células da glia entérica do plexo mientérico	41

## SUMÁRIO

4.11 Análise estatística	42
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>43</b>
5.1 Avaliação da taxa de parasitemia e mortalidade	43
5.2 Avaliação histopatológica qualitativa e análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório	44
5.3 Avaliação histopatológica quantitativa	47
5.3.1 Espessura da parede do cólon	47
5.3.2 Parasitismo tecidual	53
5.3.3 Quantificação do infiltrado inflamatório	57
5.3.4 Área citoplasmática da fibra muscular lisa (área de campo/número de núcleos)	58
5.3.5 Tecido conjuntivo e fibra reticular	59
5.3.6 Plexo mientérico e submucoso e inervação intermuscular lisa intestinal	66
5.3.7 Células gliais entéricas	70
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>74</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>85</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO CETEA/UFMG</b>	<b>99</b>

# 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## **1.1 Doença de Chagas**

A doença de Chagas (DC) causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido por insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Chagas, 1909), é uma entidade clínica polimórfica e importante causa de morbidade e mortalidade. Há relatos dos primeiros casos da DC há 9000 anos (Aufderheide, Salo *et al.*, 2004).

Estimativas anteriores indicavam prevalência da infecção em 16 a 18 milhões de indivíduos (W.H.O., 1991). Entretanto, após a implantação de medidas de controle vetorial houve redução dessa via de transmissão pelo *Triatoma infestans*, em muitas áreas endêmicas, proporcionando um decréscimo substancial na incidência da DC na América Latina (W.H.O., 2002; Moncayo, 2003). Todavia, essas medidas de vigilância epidemiológica não mantêm acompanhamento a longo prazo, o que pode possibilitar a reinfestação de insetos vetores (Dias, 2007; Villela, Souza *et al.*, 2009).

Atualmente, cerca de 13 milhões de indivíduos nas Américas Central e do Sul encontram-se infectados por esse parasito (W.H.O., 2005). Além desta forma de contaminação natural, a DC também pode ser transmitida através da placenta, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, contaminação oral ou até mesmo em acidentes de laboratório (Coura, 2007).

## **1.2 Fase aguda da doença de Chagas**

A infecção chagásica humana é caracterizada por duas fases clinicamente distintas (Dias, Laranja *et al.*, 1956). A fase inicial da infecção, denominada fase aguda, é de curta duração, aproximadamente dois meses, podendo ser assintomática ou sintomática. Nos casos sintomáticos podem ser observados febre, edema e sinais de porta de entrada do parasito, tais como, chagoma de inoculação e sinal de Romanã (Chagas, 1916).

Essa fase não é diagnosticada em aproximadamente 90% dos casos de transmissão vetorial devido à semelhança de seus sinais e sintomas com inúmeras outras enfermidades agudas, embora a presença de anticorpos imunoglobulina (Ig)M e IgG e parasitemia patente sejam características (Umezawa, Nascimento *et al.*, 1996).



O diagnóstico pode ser realizado por testes parasitológicos, como o exame de sangue a fresco, concentração em microhematócrito ou testes sorológicos, principalmente pela reação de Análise de Imunoadsorção por Ligação Enzimática (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta. Atualmente, testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizados no diagnóstico dessa enfermidade (Avila, Sigman *et al.*, 1991), apesar de seu uso na prática médica ser limitado.

Na fase aguda da infecção o parasito é facilmente encontrado no sangue periférico e nos tecidos (Parada, Carrasco *et al.*, 1997; Elias, Vigliano *et al.*, 2003). Do ponto de vista histopatológico, as lesões que se desenvolvem durante a fase aguda correlacionam-se temporal e topograficamente com elevada parasitemia e parasitismo em órgãos-alvo da infecção como coração, trato gastrointestinal e sistema nervoso (Andrade, Andrade *et al.*, 1994). As alterações histológicas características dessa fase compreendem edema e infiltrados inflamatórios com predomínio de células mononucleares que, se dispõem entre as fibras musculares, tanto no coração quanto no trato gastrointestinal. Além disso, ninhos e formas isoladas do parasito podem ser encontrados nos tecidos. É frequente a associação da resposta inflamatória, presença do parasito e dano tecidual caracterizado por necrose das células do parênquima dos órgãos.

Após a fase aguda o paciente progride para a fase crônica, na qual diferentes quadros clínicos podem se manifestar, desde a ausência de sintomas até o grave envolvimento cardíaco ou gastrointestinal. Cerca de 70% dos indivíduos infectados permanece sem sintomas clínicos (Tanowitz, Kirchhoff *et al.*, 1992; Prata, 2001), na denominada forma indeterminada da doença, que pode durar por duas ou mais décadas (Dias, 1989). Nesse período, o indivíduo apresenta ausência de sintomas, exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen normais, parasitemia e parasitismo reduzido e de difícil detecção. Entretanto, a suspeita da infecção pode ser confirmada por testes sorológicos ou parasitológicos, como a hemocultura, o xenodiagnóstico e a PCR (Chiari, Dias *et al.*, 1989; Barreto e Andrade, 1994; Gomes, Macedo *et al.*, 1998).

### **1.3 Fase crônica da doença de Chagas**

A detecção de parasitismo tecidual em pacientes com a forma crônica da DC era extremamente rara, por meio de técnicas histopatológicas convencionais levando à

formulação de hipóteses que não consideravam o papel direto do *T. cruzi* na gênese das lesões chagásicas crônicas. Atualmente, a detecção mesmo que de escassas formas visíveis do parasito através de imuno-histoquímica (Barbosa, 1985), além de técnicas de identificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) do parasito em tecidos (Freitas, Lages-Silva *et al.*, 2005), permite melhor correlação entre o processo inflamatório e a presença do antígeno do parasito (Zhang e Tarleton, 1999; Lages-Silva, Crema *et al.*, 2001).

A fase crônica é caracterizada pelo envolvimento cardíaco e/ou do trato gastrointestinal. A forma digestiva pode ser representada, em casos graves, pela presença de megaesôfago e megacólon (Chagas, 1916; Köberle, 1963; Da Silveira, Lemos *et al.*, 2007). Tais enfermidades são caracterizadas, por importantes alterações morfológicas, como dilatação e hipertrofia da parede intestinal, e por distúrbios fisiológicos que afetam predominantemente a região sigmóide, com perda da coordenação motora do órgão (Correa-Oliveira, Gomes *et al.*, 1999). Acredita-se que a desnervação do plexo mientérico, conseqüente à morte neuronal observada, bem como a formação de áreas de fibrose, que modificam a arquitetura do músculo liso e altera a inervação intermuscular, sejam responsáveis por sintomas como disfagia, odinofagia, dor retroesternal e progressiva constipação.

#### **1.4 Tropismo das cepas do *T. cruzi***

Brener (1965) observou que cepas de formas delgadas do *T. cruzi* penetravam mais rapidamente nas células do hospedeiro, enquanto que, as formas largas persistiam no sangue periférico. Guedes, Veloso *et al.* (2007) demonstraram que a cepa Y possui 91% de formas finas e que as mesmas são altamente infectantes em células VERO. Nesse mesmo estudo, 80% dos cães Beagles infectados apresentaram cardiomegalia com inflamação e fibrose grave.

Foi sugerido que a linhagem I do *T. cruzi* é encontrada preferencialmente em humanos (estado de Minas Gerais e região Nordeste), enquanto que a linhagem II provém do ciclo selvagem do parasito (Amazonas) (Fernandes, Souto *et al.*, 1998). Todavia, estudos recentes demonstraram a importante participação da cepa *T. cruzi* II na DC especificamente no Brasil, tanto em pacientes com a forma cardíaca quanto com a forma digestiva (Freitas, Lages-Silva *et al.*, 2005).

Trabalhos apontam relação entre a distribuição do parasito em diferentes órgãos, conforme a variabilidade genética da população do *T. cruzi* (Vago, Andrade *et al.*,

2000) e do hospedeiro (Freitas, Andrade *et al.*, 2009). Camundongos Swiss infectados com a cepa JG, classificada como cepa tipo II de *T. cruzi*, assim como a cepa Y utilizada neste estudo, apresentaram parasitismo preferencialmente no reto seis meses pós-infecção (m.p.i.) (Andrade, Machado *et al.*, 2002). Todavia, esse padrão de tropismo seletivo não foi observado em cobaias infectados com a cepa VIC, isolada de pacientes com forma mista da DC crônica (Cabrine-Santos, Lages Silva *et al.*, 2001).

Camundongos Swiss infectados com a cepa *T. cruzi* II apresentaram sorologia positiva para IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b nas fases aguda e crônica (Dos Santos, Talvani *et al.*, 2009). Mirkin, Celentano *et al.* (1997) apontaram que vários mecanismos imunes podem estar envolvidos na lesão do sistema nervoso periférico em camundongos infectados com cepas do *T. cruzi* de diferentes características biológicas.

### **1.5 Hipóteses da patogênese**

Dois hipóteses fundamentais sobre a patogênese das lesões crônicas baseiam-se nos estudos da cardiomiopatia chagásica crônica e compreendem a teoria da autoimunidade, na qual a infecção por *T. cruzi* induz respostas imunológicas contra constituintes teciduais normais, independente da presença do parasito (Acosta e Santos-Buch, 1985; Bonfa, Viana *et al.*, 1993; Cunha-Neto e Kalil, 1995; Kalil e Cunha-Neto, 1996; Kierszenbaum, 1996; Cunha-Neto, Coelho *et al.*, 1996; Oliveira, Fujisawa *et al.*, 2009) e aquela que sugere o parasitismo tecidual persistente como responsável pelas reações inflamatórias e consequentes danos às fibra musculares (Jones, Colley *et al.*, 1992; Higuchi Mde, Gutierrez *et al.*, 1993; Bellotti, Bocchi *et al.*, 1996; Levin, 1996; Anez, Carrasco *et al.*, 1999; Zhang e Tarleton, 1999).

Atualmente, com técnicas mais sensíveis de detecção do parasito, sugere-se a fase genômica, na qual a doença é considerada como produto da co-evolução entre o genoma do parasito e o humano, e que essa variabilidade genética influencie o curso da doença (Macedo, Machado *et al.*, 2004).

### **1.6 Trato gastrointestinal**

O trato gastrointestinal é um tubo oco, histologicamente constituído por quatro camadas: a mucosa, a submucosa, a muscular e a serosa. A camada mucosa é revestida por epitélio e apresenta lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos. A camada submucosa é composta por tecido conjuntivo com

vasos sanguíneos e linfáticos e plexo nervoso de Meissner (submucoso). A camada muscular composta por duas subcamadas: uma circular interna e outra longitudinal externa, entre essas camadas observa-se o plexo nervoso de Auerbach (mientérico). A camada serosa é composta de tecido conjuntivo frouxo, rica em vasos sanguíneos e linfáticos e tecido adiposo, sendo revestida por epitélio pavimentoso simples (Junqueira e Carneiro, 2004).

A integridade da mucosa é mantida por mecanismos de defesa que incluem junções oclusivas entre as células epiteliais, produção de bicarbonato, muco, fosfolípídeos e prostaglandinas, contínua renovação celular regulada por fatores de crescimento e inervação sensorial (Laine, Takeuchi *et al.*, 2008).

Os vasos sanguíneos mesentéricos são inervados, sobretudo, por axônios simpáticos que se apresentam imunopositivos para tirosina hidroxilase (TH) e neuropeptídeo Y (NPY), mas axônios sensitivos extrínsecos imunomarcados para substância P (SP) também estão presentes. Os vasos submucosos, além das fibras anteriormente descritas para os vasos mesentéricos, apresentam uma população adicional de fibras somatostatina positivas (De Fontgalland, Wattchow *et al.*, 2008).

A regulação das funções gastrointestinais, como secreção, motilidade, fluxo sanguíneo e controle imunológico é influenciada por uma rede complexa de neurônios, que compreende o sistema nervoso entérico (SNE) (De Giorgio, Barbara *et al.*, 1996).

### **1.7 Sistema nervoso entérico**

O SNE é a maior e mais complexa subdivisão do sistema nervoso autônomo. Sua ação é necessária para regular várias funções do trato gastrointestinal como a motilidade, a secreção e o fluxo sanguíneo. Compreende um vasto número de neurônios e células da glia que são organizados em uma complexa rede de gânglios interconectados distribuída por toda extensão do trato gastrointestinal (Wood, Alpers *et al.*, 1999).

O trato gastrointestinal é controlado pelo SNE e também por fibras extrínsecas simpáticas e parasimpáticas que, influenciam indiretamente os músculos lisos agindo sobre o plexo mientérico, com função de contrair os esfíncteres e inibir a motilidade e a secreção e relaxar esfíncter e estimular a motilidade e secreção, respectivamente (De Giorgio, Barbara *et al.*, 1996; Furness, Clerc *et al.*, 2000). As células musculares lisas formam um sincício elétrico que é inervado por centenas de neurônios excitatórios e inibitórios (Hansen, 2003b).

Os corpos neuronais pré-gangliônicos simpáticos são encontrados na medula espinhal desde o primeiro segmento torácico até o terceiro segmento lombar. Os axônios emergem pela raiz ventral e se projetam através do ramo comunicante branco para a cadeia paravertebral gangliônica, local em que ocorre a sinapse com os axônios pós-ganglionares que, migram para o órgão-alvo. Algumas fibras pré-ganglionares passam sem interrupção pela cadeia paravertebral e realiza sinapse com neurônios do gânglio pré-vertebral ou colateral, que incluem o gânglio celíaco e o mesentérico superior e inferior. O gânglio torácico simpático (T1 – T3) inerva o esôfago, o gânglio mesentérico superior e o celíaco inervam o estômago, intestino delgado e cólon ascendente, e o gânglio mesentérico inferior e o lombar inervam o cólon descendente e reto (Truex e Carpenter, 1969; Kandel, Schwartz *et al.*, 1991; Wood, Alpers *et al.*, 1999).

Os corpos neuronais parasimpáticos estão localizados em vários núcleos do tronco cerebral e nos segundo, terceiro e quarto segmentos sacrais da medula espinhal, os axônios pré-ganglionares se projetam para gânglios próximos ou dentro do órgão-alvo. Os axônios de neurônios motores do núcleo vago e do núcleo ambíguo emergem para o plexo mientérico e submucoso de todo o trato gastrointestinal via nervo vago. O nervo esplâncnico emerge dos segmentos sacrais da medula espinhal pela raiz ventral e no plexo pélvico as fibras pós-gangliônica inervam o cólon descendente, algumas fibras pré-ganglionares do nervo esplâncnico migra diretamente para os plexos do trato gastrointestinal (Truex e Carpenter, 1969; Kandel, Schwartz *et al.*, 1991; Wood, Alpers *et al.*, 1999).

Embriologicamente, os neurônios do SNE são derivados da crista neural. Os neuroblastos migram distalmente no corpo do embrião e desenvolvem interconexões e gânglios, concomitantemente com o desenvolvimento do reto a partir da cloaca. Os neurônios dos plexos mientérico e submucoso desenvolvem-se em número e tamanho após a 30ª semana até o 5º ano de vida (Emery, 1973).

O SNE apresenta três grandes plexos ganglionados: o mientérico ou Auerbach, o submucoso ou Meissner e o mucoso, além de vários plexos aganglionados. O plexo mientérico é localizado entre as camadas musculares interna e externa em todo o trato gastrointestinal e o submucoso é posicionado na camada submucosa, sendo mais proeminente nos intestinos (Hansen, 2003a).

Os neurônios do SNE podem ser classificados conforme morfologia (Dogiel tipos I-VII), propriedades funcionais (sensorial, interneurônio, motor muscular e

secretomotor), características químicas (transmissores e outros marcadores) e elétricas (tipo sináptico -S e após hiperpolarização - AH) (De Giorgio, Barbara *et al.*, 1996; Hansen, 2003a).

Segundo a classificação funcional existem cinco tipos de neurônios entéricos: neurônios motores excitatório e inibitório da musculatura, interneurônios, neurônios secretomotores/vasodilatadores e neurônios sensoriais (De Giorgio, Barbara *et al.*, 1996). Os neurônios sensoriais são formados por densa rede extrínseca, vagal e espinhal, e os neurônios aferentes primariamente intrínsecos (IPANs), marcado neuroquimicamente por SP, peptídeo gene-relacionado a calcitonina (CGRP), colina acetiltransferase e calbindina. Os IPANs exercem controle sobre neurônios secretomotores e vasodilatadores, no controle da dor, temperatura, distensão e conteúdo químico luminal (Hansen, 2003a).

Os interneurônios se projetam oral, maioria colinérgico, e principalmente aboral que é imunomarcado por acetilcolina (ACh), óxido nítrico (NO), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), somatostatina e serotonina (Hansen, 2003a).

Os neurônios motores são do tipo I conforme a classificação por Dogiel e do tipo S segundo a classificação elétrica. Inervam as camadas musculares longitudinais e circulares e a muscular da mucosa, são tanto excitatórios quanto inibitórios provocando a contração ou relaxamento da musculatura. Nos neurônios excitatórios a transmissão é predominantemente muscarínico colinérgico e taquicinérgico; nos neurônios inibitórios, que determinam o momento da contração, a transmissão é de NO, VIP, adenosina trifosfato (ATP), ácido aminobutírico gama (GABA), NPY e monóxido de carbono (Hansen, 2003a).

Os diversos neurotransmissores sintetizados por diferentes tipos de células nervosas, bem como o complexo circuito neuronal, são a base da coordenação da motilidade intestinal. Sabe-se que os neurotransmissores sintetizados e armazenados em vesículas no corpo neuronal, as quais são depois transportadas até ao terminal pré-sináptico pelo fluxo axonal rápido, incluem a ACh, as catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), a serotonina e a histamina. Já outros neurotransmissores excitatórios como glutamato e aspartato e inibitórios como GABA e glicina são sintetizados e armazenados em vesículas no terminal pré-sináptico (Hansen, 2003a).

Após exocitose, o neurotransmissor liga-se ao receptor pós-sináptico, o que resulta na alteração do potencial de membrana de modo excitatório ou inibitório. No potencial excitatório, quando ocorre despolarização, a célula torna-se mais excitável através do aumento da permeabilidade aos íons sódio e/ou cálcio, já no potencial

inibitório, em função de maior permeabilidade aos íons cloro ou potássio ou de menor permeabilidade aos íons  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ , a célula torna-se menos excitável, ou seja, hiperpolarizada.

Com base em equivalências estruturais, através de estudos em cobaias, sugere-se que neurônios humanos morfológicamente classificados como tipo I (imunorreativos para encefalina) são possivelmente interneurônios ou neurônios motores ascendentes, enquanto os do tipo II (não-dendrítico e multiaxonal) parecem IPANs. Por sua vez, os neurônios nitrérgicos e VIP positivos são, provavelmente, neurônios intermediários ou motores descendentes (Brehmer, 2006).

Em camundongos, o SNE do intestino delgado apresenta padrão bastante semelhante ao observado no intestino grosso (Sang e Young, 1998), nota-se que a maioria dos neurônios é imunorreativo para neurofilamento-N e CGRP e apresenta morfologia típica de neurônios do tipo II segundo a classificação de Dogiel, sendo que as fibras CGRP são numerosas na lâmina própria da mucosa (Qu, Thacker *et al.*, 2008). Todavia, neurônios tipo II do cólon de murinos são imunorreativos a calretinina e a CGRP, sendo que suas fibras são originárias do plexo mientérico e atuam na mucosa (Furness, Robbins *et al.*, 2004). Esses neurônios são considerados os primeiros neurônios da via de reflexo entérica. Sob estímulos como distensão, os neurônios intrínsecos sensores são ativados diretamente pelo estímulo ou indiretamente por potencial pós-sináptico excitatório (Furness, Clerc *et al.*, 2000), demonstrando a importância e a interação do plexo mientérico na regulação da mucosa.

Sabe-se que grande proporção dos corpos celulares e fibras do gânglio mientérico é imunorreativa a calretinina e SP em vários neurônios presumivelmente excitatórios motores (Qu, Thacker *et al.*, 2008).

No intestino delgado de camundongos os neurônios imunopositivos para óxido nítrico sintase (NOS), classificados em sua maioria, como tipo I, apresentam varicosidades imunorreativas ao NOS na camada muscular circular e gânglios mientéricos, com alto índice de co-localização com o VIP (Qu, Thacker *et al.*, 2008). Dentre os neurônios imunopositivos para NOS e VIP, uma pequena proporção é colinérgica e parece ser exclusivamente de interneurônios, já os não-colinérgicos são neurônios motores ou interneurônios (Sang e Young, 1998).

As subpopulações de neurônios do plexo mientérico imunoreativos à NOS, VIP, calbindina e serotonina projetam-se para a região anal no intestino delgado e grosso de camundongos. Enquanto que neurônios SP projetam-se no sentido oral e neurônios

contendo NPY e calretinina tem projeção local e, por outro lado, neurônios imunoreativos à GABA se projetam para oral e anal (Sang, Williamson *et al.*, 1997).

Trabalhos apontam semelhanças entre a morfologia e a distribuição do plexo mientérico de ratos e camundongos nas diferentes regiões do cólon (Araujo, Sant'ana Dde *et al.*, 2003). Contudo, os gânglios mientéricos de cobaias são esparsos na região antimesocólon e densos na região intermediária com formatos irregulares (Gabella, 1990).

A atividade funcional é regulada através da interação hormonal e neural, representada pela ação do sistema nervoso autônomo simpático, parassimpático e peptidérgico. Os neurônios encontrados no plexo mientérico normalmente são responsáveis por controlar a atividade peristáltica, enquanto os do plexo submucoso regulam a secreção e absorção (Furness e Costa, 1987). As lesões do plexo nervoso com desnervação acarretam hipersensibilidade dos órgãos, que, em presença de substâncias colinérgicas exibem resposta motora atípica (Lopes, Chapadeiro *et al.*, 1987).

O plexo mientérico apresenta-se bastante vulnerável a neurotoxinas e drogas, uma vez que não há proteção de barreira hemato-encefálica, como no sistema nervoso central (Smith, 1970).

Além dos neurônios, o SNE é composto por células da glia, que contém o filamento intermediário proteína ácida fibrilar da glia (GFAP), vimentina e a proteína ligadora de cálcio S-100. As células gliais entéricas apresentam funções citoprotetoras e tróficas e, atualmente, sugere-se que essas células também são importantes na barreira do trato gastrointestinal, uma vez que formam uma extensa rede na mucosa intestinal próxima aos vasos sanguíneos submucosos (Savidge, Sofroniew *et al.*, 2007).

## **1.8 Megacólon**

O megaesôfago e o megacólon são dilatações permanentes, difusas e podem atingir graus extremos, às vezes, com alongamento (megadólico), espessamento da parede, sobretudo das camadas musculares e neoformação conjuntiva. As alterações secundárias incluem ulcerações da mucosa devido ao acúmulo do bolo alimentar, formando os fecalomas (Lopes, Chapadeiro *et al.*, 1987).

A desordem da inervação intestinal mais conhecida é a doença de Hirschsprung, caracterizada pela ausência de célula nervosa intramural (aganglionose) ou pequeno número de gânglios (hipoganglionose), displasia neuronal e gânglio heterotópico, além de hipertrofia das fibras nervosas (Wedel, Roblick *et al.*, 1999). Essa doença parece ter



etiologia genética, causa obstrução intestinal, com incidência de 1 a cada 5000 nascimentos (Amiel, Sproat-Emison *et al.*, 2008).

Na doença de Crohn é comum a formação de estenose intestinal com espessamentos localizados, constituídos por desordem das fibras musculares, áreas de fibrose, inervação deficiente da camada muscular, além de perda dos neurônios intrínsecos, o que sugere o remodelamento da musculatura em decorrência de perda da inervação (Marlow e Blennerhassett, 2006), devido à substancial infiltração de leucócitos ativados pela mucosa intestinal (Marks, Rahman *et al.*, 2009) em todas as camadas do intestino grosso, úlceras e fístulas perianais (Ament, 1975).

Na colite ulcerativa, diferente da doença de Crohn, o infiltrado inflamatório acomete principalmente a mucosa, e ocasionalmente a submucosa (Ament, 1975). Em estudo comparativo entre essas doenças foi observada imunomarcção mais intensa para S-100 e sugeriu-se associação entre as alterações do SNE e à expressão de MHC-II pelas células enterogliais nos pacientes com doença de Crohn (Bongioanni, Castagna *et al.*, 1996). Cabarocas, Savidge *et al.* (2003) mostraram que camundongos transgênicos com ablação das células gliais entéricas apresentavam similaridades com a doença de Crohn, o que aponta o papel das células da glia no aumento da permeabilidade da mucosa e na consequente inflamação observadas nessa doença.

A inflamação afeta a arquitetura da fibra muscular, sendo descrita na colite aguda como um rápido e duradouro aumento do comprimento da fibra muscular, esse remodelamento não regride mesmo após o término da inflamação (Wells e Blennerhassett, 2004). Além disso, ocorre perda seletiva da proteína de vesícula sináptica sensora de cálcio - 1 (NCS-1) no cólon de camundongos com inflamação, embora a imunomarcção para PGP 9.5 não alterasse, demonstrando que o SNE pode modificar a expressão protéica em resposta a mediadores pró-inflamatórios (Lourenssen, Jeromin *et al.*, 2002).

Qualquer distúrbio, no movimento peristáltico, acarretará estagnação e retenção do conteúdo com consequente distensão das fibras musculares, a principal causa de hipertrofia. Essas alterações levarão a formação do mega, que é baseado no distúrbio da inervação intrínseca (Köberle, 1963), encontrado na fase crônica digestiva da DC. Microscopicamente, as lesões mais características são as do SNE, no plexo de Auerbach, ocorre inflamação dos gânglios (ganglionite e periganglionite) e dos nervos (neurite e perineurite) com intensos fenômenos neurodegenerativos, levando à destruição completa dos mesmos. Estudos ultra-estruturais do esôfago e do cólon salientam alterações quantitativas e qualitativas do componente vesicular (vesículas

granulares densas e agranulares) dos neurônios do plexo mientérico (Tafari, Maria *et al.*, 1973).

Na camada muscular e na submucosa de pacientes chagásicos crônicos com megacólon observa-se, frequentemente, infiltrado inflamatório focal predominantemente mononuclear e fibrose intersticial focal ou difusa (Lopes, Chapadeiro *et al.*, 1987) associada a mastócitos e macrófagos (Da Silveira, Adad *et al.*, 2007). A presença dos mastócitos, possivelmente, relaciona-se com o aumento de tecido conectivo peri-muscular e de focos fibróticos, que tem importância no estabelecimento do megacólon (Pinheiro, Rua *et al.*, 2003).

Nos pacientes chagásicos com megacólon observa-se células inflamatórias nos plexos submucoso e mientérico, com possível participação das células natural killer (NK) e de linfócitos citotóxicos na desnervação e diminuição no número de neurônios do SNE. Todavia, pacientes sem megacólon também apresentam focos inflamatórios ao redor dos gânglios, entretanto, a arquitetura dos plexos é preservada (Da Silveira, Arantes *et al.*, 2005).

Observa-se maior produção de citocinas nos pacientes com a forma digestiva da DC, sendo que no megacólon há aumento da produção basal de interferon (IFN)- $\gamma$  que, através de sua ação pró-inflamatória, favorece a produção de NO (Ribeiro, Crema *et al.*, 2008), importante mediador da lesão neuronal *in vitro* (Almeida-Leite, Galvao *et al.*, 2007).

Ao avaliar a destruição neuronal, nota-se que pacientes chagásicos apresentam menor número de corpos neuronais em ambos os plexos nas porções dilatadas em comparação às porções não-dilatadas do cólon, entretanto há aumento no número de neurônios expressando o marcador de regeneração, GAP-43, ressaltando a capacidade de regeneração neuronal preferencialmente nas regiões com alterações histopatológicas mais evidentes (Da Silveira, Freitas *et al.*, 2008b).

Trabalhos apontam que pacientes com megacólon apresentam desnervação superior a 55% no plexo mientérico, todavia descreve-se hipertrofia dos neurônios restantes, com aumento de 63% no diâmetro (Adad, Cancado *et al.*, 2001). Estudos recentes apontam uma destruição preferencial de neurônios inibitórios, imunorreativos ao VIP e à enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), o que pode ser responsável pelas alterações de tônus ou relaxamento da musculatura do cólon (Da Silveira, D'ávila Reis *et al.*, 2007).

Com relação às células da glia, sugere-se que, há aumento na expressão de GFAP nas porções não-dilatadas do cólon, o que possivelmente pode estar relacionado à

proteção do plexo e, conseqüentemente, à prevenção da dilatação do órgão (Da Silveira, Freitas *et al.*, 2008a).

Alguns autores notaram alterações características do megacólon chagásico humano em coelhos que morreram 9 m.p.i. com *T. cruzi* foram descritas dilatações das porções transversa e sigmóide do cólon, associadas à anorexia, sintoma também característico de pacientes chagásico (Teixeira, Teixeira *et al.*, 1975). Em ratos, 4 e 6 m.p.i., dilatação do trato gastrointestinal e alterações graves no estômago e no cólon, foram relatadas e caracterizadas como conseqüentes à perda dos gânglios mientéricos e ao adelgaçamento das camadas muscular e mucosa (Guillén-Pernia, Lugo-Yarbu *et al.*, 2001).

### **1.9 Modelo experimental murino**

Em função da dificuldade de se estudar a forma digestiva humana da DC devido às limitações de acesso a material histopatológico nas fases aguda e crônica, muito do conhecimento até o momento vem sendo obtido de modelos experimentais que, muitas vezes, não oferecem uma explicação patogênica definitiva para os fenômenos. Portanto, considera-se desejável um modelo experimental que reproduza as alterações morfofuncionais dessa doença no trato gastrointestinal.

O modelo murino tem sido alvo preferencial de diversos pesquisadores pela facilidade de obtenção, manutenção e manuseio, em comparação com outros modelos de DC crônica (Veloso, 2007). Diversos parâmetros têm sido analisados, tais como a relação parasito-hospedeiro, o comportamento das cepas do *T. cruzi*, a eficácia de fármacos, a resposta imunológica e os achados histopatológicos do hospedeiro (Brenner, Costa *et al.*, 1976; Andrade, Magalhaes *et al.*, 1985; Ben Younes-Chennoufi, 1988), sendo que a maioria dos estudos restringem-se a avaliar as alterações da fase aguda da doença, devido à alta mortalidade dos camundongos após o pico da parasitemia.

Histologicamente, em camundongos Swiss não-infectados, o plexo de Auerbach apresenta forma poligonal ou estrelada no cólon proximal, aspecto mais alongado na porção intermediária do cólon e torna-se fino e paralelo à circunferência no cólon distal. Nessas mesmas regiões do cólon de animais infectados pelo *T. cruzi*, o plexo apresenta forma irregular e aparente destruição seletiva dos neurônios de grande e médio porte com redução de até 36% (Maifrino, Liberti *et al.*, 1999). Apresenta evidências de disfunções de neurotransmissores, lesão em mais de um tipo de neurônio e em fibras

nervosas (Maifrino, Amaral *et al.*, 2005), além de redução da capacidade contrátil do músculo (Maifrino, Liberti *et al.*, 1999).

Conforme Arantes, Marche *et al.* (2004), em camundongos C57BL/6, a desnervação do plexo mientérico durante a fase aguda aparece como uma das alterações histológicas mais relevantes observadas no cólon, na qual se sugere o NO como mediador da lesão neuronal, já que os animais geneticamente deficientes para iNOS e IFN- $\gamma$  não apresentaram desnervação independente da presença de infiltrado inflamatório.

Essa desnervação compreende não apenas a perda de corpos neuronais ganglionares como também a alteração do padrão da inervação das camadas musculares, detectável por marcação imuno-histquímica de fibras nervosas. Além da presença de parasitismo e intenso infiltrado inflamatório na parede intestinal, há alterações da glia entérica e da inervação simpática extrínseca. Todos esses aspectos e suas consequências na fase crônica da doença não foram ainda estudados sistematicamente em humanos e há raros trabalhos que avaliaram esses aspectos em modelos murinos (Arantes, Marche *et al.*, 2004).

## **2 – JUSTIFICATIVA**

Em função da escassez de modelos experimentais murinos da fase crônica da DC, pretendemos avaliar as alterações histopatológicas da parede intestinal e do sistema nervoso entérico de camundongos da linhagem Swiss comparando as fases aguda e crônica da DC. Esperamos que este modelo possa colaborar com a compreensão da patogênese do ponto de vista da biologia das células e dos tecidos, incluindo os processos adaptativos intestinais relacionados ao controle neuromuscular, à estrutura e função do SNE, à degeneração e possível regeneração neuronal.

## 3 – OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Estabelecer um modelo murino de infecção crônica prolongada pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* que permita estudar as alterações histopatológicas da parede intestinal e do sistema nervoso entérico intramural nas fases aguda e crônica, a fim de reproduzir experimentalmente aspectos do megacólon chagásico humano e compreender as alterações fisiopatológicas características dessa doença.

### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar o curso da infecção através de curva de parasitemia e taxa de mortalidade;

Detectar a presença de ninhos de amastigotas ou formas isoladas do *T. cruzi* em ambas as fases da doença;

Avaliar qualitativa e quantitativamente as alterações histopatológicas, tais como presença de infiltrado inflamatório, neoformação conjuntiva, espessura das camadas da parede intestinal, área ocupada pelos gânglios mientérico e submucoso e terminações nervosas intermuscular em ambas as fases da doença;

Avaliar aspectos da plasticidade do sistema nervoso entérico e musculatura lisa intestinal através da comparação dos elementos estruturais na fase aguda e crônica da infecção experimental;

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 56 camundongos albinos Swiss fêmeas, com aproximadamente 4 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em gaiolas plásticas, ambiente no qual a temperatura e o fotoperíodo eram controlados. Os animais receberam ração convencional para camundongos (Nuvilab® Nuvital, Curitiba, Brasil), água filtrada *ad libitum* e foram vermifugados, durante 7 dias, com Ivomec® Merial, Paulínia, Brasil, via oral na diluição de 0,4ml/500ml de água filtrada.

O procedimento experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 222/2007 – **ANEXO A**).

### 4.2 Infecção com *T. cruzi*

Conforme apresentado na **FIGURA 1**, dos 56 camundongos, 10 animais foram utilizados como controles não-infectados, cinco compondo o grupo controle de fase aguda e cinco o grupo controle de fase crônica.

Os outros 46 animais foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y – *T. cruzi* II (Silva e Nussenzweig, 1953). As formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos Swiss infectados com a cepa Y do *T. cruzi* no dia do pico de parasitemia. A contagem dos parasitos para a preparação do inóculo foi feita conforme a técnica descrita por Brener (1962). Os parasitos foram cedidos pela Prof<sup>a</sup> Maria Terezinha Bahia, do Laboratório de Doença de Chagas do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP.

Foi confirmada a infecção de todos os animais inoculados através de exame de sangue a fresco. Os animais infectados foram divididos em três grupos, a saber, 10 animais foram destinados ao sacrifício no 11º dia após a infecção (d.p.i.), compondo o grupo infectado de fase aguda; neste mesmo dia, 30 animais foram tratados com Benzonidazol – Rochagan® Roche, Rio de Janeiro, Brasil – derivado 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), na dose única de 500 mg/Kg de peso corporal via oral, sendo mantidos até o sacrifício na fase crônica prolongada, aproximadamente 15 m.p.i., compondo o grupo infectado de fase crônica.

Outro grupo em paralelo, composto por 06 animais, acompanhou-se diariamente a taxa de parasitemia até a morte, para delineamento da curva de parasitemia.

### **4.3 Curva de parasitemia e mortalidade**

A taxa de parasitemia foi verificada diariamente a partir do 4º d.p.i. até a morte dos 06 camundongos avaliados conforme descrito por Brener (1962). Para isso, foram coletados 5µl de sangue da cauda dos camundongos para pesquisa de formas tripomastigotas do *T. cruzi* em 50 campos de 400x. A curva de mortalidade foi obtida durante todo o período experimental.

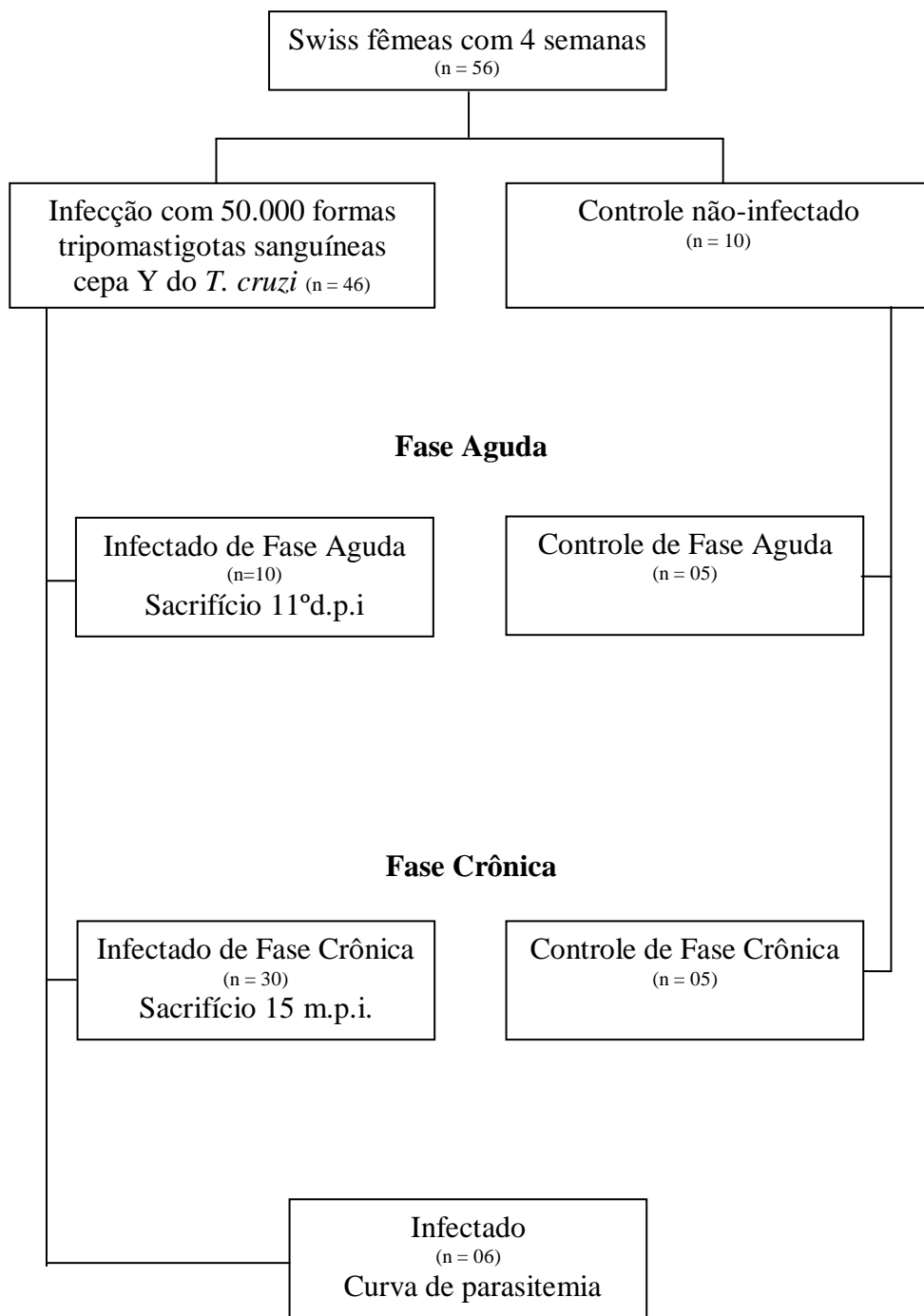
### **4.4 Sacrificio**

Os animais foram sacrificados utilizando-se o anestésico Pentobarbitol, na dose de 80 a 90mg/Kg de peso corporal, via i.p..

No 11º d.p.i. foram sacrificados 10 animais infectados, compondo o grupo infectado de fase aguda e 5 animais não-infectados, grupo controle de fase aguda.

No 15º m.p.i., 10 animais infectados e tratados com Benzonidazol sobreviventes compuseram o grupo infectado de fase crônica e 5 animais não-infectados com idade correspondente, controle de fase crônica, foram sacrificados para obtenção de material histológico (**FIGURA 1**).





**FIGURA 1:** Delineamento experimental

#### **4.5 Coleta de material histopatológico**

Sob anestesia, os animais foram sacrificados para coleta do trato gastrointestinal na sua totalidade. O estômago e o duodeno foram separados do restante do intestino através de secção da parede a 5cm do piloro (não utilizados nesse estudo). Todo o intestino foi separado do mesentério, lavado em PBS (tampão fosfato salino 0,01M, pH 7,3) e estendido com a serosa da borda mesentérica em contato com a superfície do papel de filtro.

O processamento do intestino grosso foi realizado de acordo com o descrito anteriormente por nosso grupo (Arantes e Nogueira, 1997). De forma resumida, o cólon foi separado do restante do intestino, estendido com a serosa em contato com o papel de filtro e aberto pela borda ante-mesentérica, removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Este fragmento foi transferido para um recipiente em forma de calha contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial, sendo mantido nesta solução por um período de 10 minutos para pré-fixação.

O cólon pré-fixado foi colocado sobre uma superfície plana e enrolado em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocambos), da porção distal (próxima ao ânus) em direção à proximal (próxima ao ceco), com adaptações da técnica descrita por Calvert, Otsuka *et al.* (1989). Os rocambos amarrados com barbante foram fixados por imersão em solução de formol por 24 horas.

Os rocambos de cólon foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (álcool 70°, 80°, 90°, absoluto 1, 2 e 3), diafanizados em duas trocas de xilol, embebidos e incluídos em parafina. Estes blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes semi-seriados com 4 µm de espessura.

#### **4.6 Destino das lâminas histológicas**

As lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina para análise de rotina; Tricrômico de Gomori para avaliação da presença de fibras colágenas; Prata Amoniacal de Gomori para visualização das fibras reticulares; e Azul de Toluidina Boráx para visualizar mastócitos (Behmer, Tolosa *et al.*, 1976).

Cortes histológicos foram submetidos à imuno-histoquímica para antígenos do *T. cruzi*, marcador genérico de neurônios (PGP 9.5) e subpopulação das células da glia entérica (GFAP) através da técnica de estreptavidina-peroxidase.

## **4.7 Colorações histopatológicas**

### **4.7.1 Hematoxilina-Eosina**

Cortes de 4 µm de espessura do cólon de cada animal foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada e lavados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram contra-corados pela Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos, sendo, em seguida corados pela Eosina por 1 minuto e 30 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados com Entellan (Merck) e lamínulas de vidro.

### **4.7.2 Azul de Toluidina Boróx**

Os cortes foram desparafinizados, hidratados e imersos por 5 segundos na solução de Azul de Toluidina com bórax, posteriormente, lavou-se em água rapidamente, em concentrações crescentes de álcool os cortes foram desidratados e montados com Entellan (Merck).

### **4.7.3 Tricrômico de Gomori**

De forma semelhante à coloração pela H&E, as lâminas foram desparafinizadas no xilol e hidratadas após passagens sucessivas em álcool com concentração decrescente e água corrente. Após a hidratação, foram imersas na Hematoxilina por 1 minuto e 30 segundos, lavadas em água corrente. Posteriormente, permaneceram imersas no corante de Gomori por aproximadamente 15 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente rapidamente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas utilizando-se Entellan (Merck) para fixação das lamínulas.

### **4.7.4 Prata Amoniaca de Gomori**

Após desparafinização e hidratação, as lâminas permaneceram na solução de permanganato de potássio 0,5% por 1 minuto, seguindo-se lavagem em água por 5

minutos. Posteriormente, a diferenciação foi feita com solução de Metabissulfito de potássio 2%, por 1 minuto, sendo lavadas em água por 5 minutos. Os cortes receberam solução de Prata amoniacal por 1 minuto, foram lavados em água destilada por 10 segundos, permaneceram imersas em formalina 20% por 3 minutos, foram lavadas pela solução de cloreto de ouro 2% por 10 minutos e, posteriormente, em água destilada por 5 minutos. Houve tratamento com metabissulfito de potássio 2% e hipossulfito de sódio 2% por 1 minuto cada. As lâminas foram lavadas em água por 2 minutos, contra-coradas com verde luz, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas utilizando-se Entellan (Merck).

#### **4.8 Reação imuno-histoquímica**

##### **4.8.1 Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi***

A técnica imuno-histoquímica da peroxidase-antiperoxidase foi utilizada para a detecção de parasitismo tecidual: ninhos de amastigotas, amastigotas isoladas e antígeno do parasito (Barbosa, 1985).

Os cortes histológicos do cólon foram desparafinizados, hidratados em concentrações decrescentes de álcool e imersas em PBS a 10 %, pH 7,2 – 7,4.

Posteriormente, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em banho de Metanol/Peróxido de Hidrogênio (100 ml de metanol e 3,5 ml de Peróxido de Hidrogênio a 30%), por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de banhos de PBS a 10%.

Subsequentemente, as lâminas foram imersas em um banho de leite desnatado em pó diluído em PBS a 10% (6g de leite desnatado em 100ml de PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, secou-se o excesso das bordas e os cortes foram incubados com soro anti-*T. cruzi*, diluído 1:5000 em PBS/albumina bovina 1% (1870, Inlab, Diadema, Brasil), em câmara úmida à 4°C por 15 horas. O soro anti-*T. cruzi* foram obtidos de coelhos inoculados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* (cedidos pela Profª Maria Terezinha Bahia).

Posteriormente, os cortes foram incubados em câmara úmida por 30 minutos a 37°C com o anticorpo secundário imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinilado pré-diluído (Kit Dako, LSAB, K0675).

Após banhos em PBS, procedeu-se à aplicação do complexo estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) e incubação por 30 minutos em

câmara úmida a 37°C. A revelação da reação da peroxidase foi obtida através da incubação em solução de DAB (50mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato em 200ml de PBS e 400µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 5 minutos. Para interromper a revelação, os cortes foram lavados em PBS por 5 minutos e, posteriormente, contra-corados com Hematoxilina de Harris diluída por 3 segundos, lavados em água corrente por 5 minutos, desidratados, diafanizados em xilol e montados com Entellan (Merck). As etapas foram intercaladas com três banhos de PBS por 5 minutos cada, exceto quando indicado diferente.

Cortes histológicos de tecido obtido de camundongos infectados de fase aguda foram incluídos em cada bateria de imuno-histoquímica; um deles, usado como controle negativo, teve o antisoro anti-*T. cruzi* substituído por PBS e no outro, usado como controle positivo procedeu-se à técnica imuno-histoquímica como descrita anteriormente.

#### **4.8.2 Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5 e anti-GFAP**

De forma semelhante à técnica de imuno-histoquímica descrita acima, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena em PBS/Peróxido de Hidrogênio (100 ml de PBS a 10% e 3,5 ml de Peróxido de Hidrogênio a 30%) por 30 minutos, à temperatura ambiente, e posteriormente, ao bloqueio com leite desnatado em pó diluído em PBS a 10% (06g de leite em 100ml de PBS) por 30 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-PGP 9.5 (1:500) ou anti-GFAP (1:500), diluído em PBS e albumina bovina a 2% (1870, Inlab, Diadema, Brasil), em câmara úmida à 4°C por 15 horas, seguido de três banhos em PBS de 5 minutos cada.

O anticorpo secundário imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinizada pré-diluída, e estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) foram consecutivamente utilizados por 30 minutos à temperatura ambiente. Entre cada etapa descrita, os cortes foram lavados em três banhos de PBS.

A revelação da reação foi feita por incubação em solução de DAB (50mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato em 200ml de PBS e 400µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 5 minutos. Posteriormente foram contra-corados com Hematoxilina de Harris diluída por 3 segundos, lavados em água corrente por 5 minutos, desidratados, diafanizados em xilol e montados com Entellan (Merck).

Em cada bateria de imuno-histoquímica foram incluídos dois cortes obtidos de camundongo controle. Um deles, usado como controle negativo, o anticorpo anti-PGP 9.5 ou anti-GFAP foi substituído por PBS e no outro, usado como controle positivo, procedeu-se à técnica imuno-histoquímica descrita anteriormente.

**TABELA 1** – Caracterização dos anticorpos primários e secundários, conjugados e sistema de detecção utilizados nas imuno-histoquímicas.

	Origem e Diluição	Código e Fabricante	Anticorpo Secundário	Conjugado
<i>T. cruzi</i>	Coelho 1:5000	Cedido Prof <sup>a</sup> Maria T. Bahia, UFOP, Ouro Preto, Brasil	Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinilada pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) *
PGP 9.5	Coelho 1:500	RA95101 UltraClone Ltd, Inglaterra	Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinilada pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) *
GFAP	Coelho 1:500	Z0334 Dako, Dinamarca	Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinilada pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) *

\* Revelação por diaminobenzidina (DAB)

#### **4.9 Análise qualitativa**

Todas as lâminas foram avaliadas ao microscópio óptico e alterações histopatológicas descritas.

A presença de infiltrado inflamatório perivascular e nas camadas submucosa, muscular interna foi semiquantificado e os resultados descritos utilizando os seguintes parâmetros: ausência de células inflamatórias (0), infiltrado inflamatório discreto (1), moderado (2) ou intenso (3). O valor da mediana foi comparado entre os grupos controle e infectado, em cada fase.

#### **4.10 Análise quantitativa**

As imagens obtidas ao microscópio óptico foram capturadas com resolução de 1392 X 1040 pixels e transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). Após calibração do sistema computadorizado, as imagens capturadas foram congeladas, salvas em CD e levadas ao Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral, onde foram analisadas no programa KS300 (Zeiss, Jena, Alemanha).

Para estabelecer o número mínimo de campos microscópicos representativos por amostra foram realizadas análises em 50 campos aleatórios, e com os dados desta amostra foram criados, através do sorteio com reposição, grupos com 10, 15, 20, 30, 40 e 50 amostras. A média e o desvio padrão foram calculados para cada grupo. O número mínimo representativo de campos microscópicos por tratamento foi obtido quando o aumento no número de campos não resultou em considerável redução no respectivo valor do desvio.

##### **4.10.1 Avaliação da espessura da parede do cólon**

As medidas da espessura da parede total e diferentes camadas que compõem o cólon foram realizadas em imagens capturadas das lâminas coradas por H&E, em aumento de 10x, codificadas e examinadas sem conhecimento da identificação, com a finalidade de comparar os grupos controle e infectado, em ambas as fases.

Foram avaliados 21 campos aleatórios por lâmina, sendo 7 campos de cada região do cólon (proximal, intermediária e distal). O comprimento linear da parede total (que inclui todas as camadas) e também em separado das camadas mucosa, submucosa, muscular total, muscular interna e externa foram medidos em 3 pontos por campo.

As médias por grupo experimental (controle e infectado) de ambas as fases, em cada parâmetro, foram submetidas à análise estatística. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da espessura ( $\mu\text{m}$ ) de cada camada.

#### **4.10.2 Quantificação do parasitismo tecidual**

As análises quantitativas do parasitismo (ninhos ou formas amastigotas isoladas) foram feitas nas lâminas imunomarcadas para *T. cruzi*. Foram capturadas imagem de 21 campos aleatórios, correspondendo a 7 campos por região do cólon, em aumento de 40x, totalizando a área de 430.008 $\mu\text{m}^2$  por lâmina. As áreas marcadas em marrom foram digitalizadas e automaticamente medidas em relação à área total do campo ( $\mu\text{m}^2$ ), comparando-se os grupos infectados de fase aguda e crônica (média  $\pm$  SEM).

#### **4.10.3 Quantificação do infiltrado inflamatório**

A quantificação do infiltrado inflamatório das camadas musculares interna e externa foi realizada em 9 campos aleatórios, 3 por região do cólon em 40x, totalizando a área de 184.289 $\mu\text{m}^2$  por lâmina (H&E). Através da contagem do número total de núcleos presentes na camada muscular interna e externa, as médias  $\pm$  SEM foram analisados estatisticamente.

#### **4.10.4 Número de mastócitos**

A coloração de Azul de Toluidina Bórax foi realizada para contrastar os mastócitos. Foram contados os mastócitos presentes nas camadas submucosa, muscular e serosa de toda a extensão do cólon, em 40x. Realizou-se análise estatística (média  $\pm$  SEM) entre os grupos experimentais em cada fase.

#### **4.10.5 Avaliação da área das células musculares lisas**

A área das células musculares lisas foi avaliada em 9 campos aleatórios, sendo 3 por cada região do cólon nas camadas muscular interna e externa em 40x, totalizando a área de 184.289 $\mu\text{m}^2$  por lâmina (H&E). Para isso, em cada campo realizou-se a quantificação do número de núcleos em uma área ocupada por cada camada muscular. As médias  $\pm$  SEM foram comparadas estatisticamente e expressas em ( $\mu\text{m}^2$ ).

#### **4.10.6 Avaliação da área de tecido conjuntivo e fibra reticular**



Os cortes histológicos foram corados por Tricrômico de Gomori e Prata Amoniaca de Gomori para evidenciar as áreas ocupadas por tecido conjuntivo e fibra reticular, respectivamente, na camada muscular interna e permitir a análise morfométrica. Avaliou-se 12 campos aleatórios por lâmina, sendo 4 de cada região do cólon, fotografados no aumento de 40x, totalizando a área de 245.719 $\mu\text{m}^2$ . As áreas de tecido conjuntivo marcadas por coloração verde e as fibras reticulares em preto foram digitalizadas em segmentação binária, automaticamente medidas ( $\mu\text{m}^2$ ) e analisado estatisticamente (média  $\pm$  SEM).

#### **4.10.7 Avaliação do corpo neuronal do plexo mientérico e submucoso e da inervação intermuscular lisa intestinal**

A imuno-histoquímica anti-PGP 9.5 (protein gene product) marca preferencialmente componentes citoplasmáticos neuronal e não marca elementos gliais, sendo caracterizada como marcador genérico de neurônios (Doran, Jackson *et al.*, 1983). Através desta técnica foi possível quantificar a área ocupada pelos neurônios presentes nos plexos mientérico e submucoso bem como a densidade de terminações nervosas por área de músculo da camada interna.

Analisaram-se os gânglios submucosos e mientéricos e a inervação intermuscular em 30 imagens cada, 10 campos por região do cólon, em aumento de 40x. As áreas imunomarcadas foram digitalizadas e medidas automaticamente em relação à área total do campo ( $\mu\text{m}^2$ ), realizou-se análise estatística (média  $\pm$  SEM) por grupo experimental.

#### **4.10.8 Avaliação das células da glia entérica do plexo mientérico**

A imunomarcagem das células da glia entéricas foi realizada através da imuno-histoquímica anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial), proteína associada ao filamento intermediário (Jessen e Mirsky, 1980) quase que exclusivamente expressa no plexo mientérico e pequeno número de células imunomarcadas para GFAP são observadas no plexo submucoso no cólon de ratos (Nada e Kawana, 1988).

Foram avaliadas 30 imagens do plexo mientérico, ou seja, 10 campos por região do cólon em 40x. As áreas imunomarcadas foram digitalizadas e medidas automaticamente em relação à área total do plexo ( $\mu\text{m}^2$ ), sendo que as médias  $\pm$  SEM foram analisadas estatisticamente por grupo experimental.

#### **4.11 Análise estatística**

Utilizou-se o programa GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As análises de dados não paramétricos foram realizadas através do teste de Mann Withney entre o grupo controle e infectado de cada fase. A descrição qualitativa das alterações foi expressa pelas medianas (valor mínimo/valor máximo). Foi indicado um valor conforme a intensidade do infiltrado inflamatório: 0 (ausente), 1 (discreto), 2 (moderado) e 3 (intenso).

Os dados paramétricos foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk ( $p > 0,05$ ) a fim de comprovar a normalidade dos dados, quando os dados não atenderam aos pressupostos de distribuição normal foram realizadas transformações.

Utilizou-se teste de análise de variância (ANOVA) devido ao delineamento inteiramente ao acaso com parcelas subdivididas (parcelas: grupo controle e grupo infectado e subparcelas: regiões proximal, intermediária e distal do cólon). Seguido por Teste *T de Student* para identificar a subparcela. Os dados foram expressos pelas médias  $\pm$  SEM. E também foi avaliada a correlação entre as respostas.

O limite crítico de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

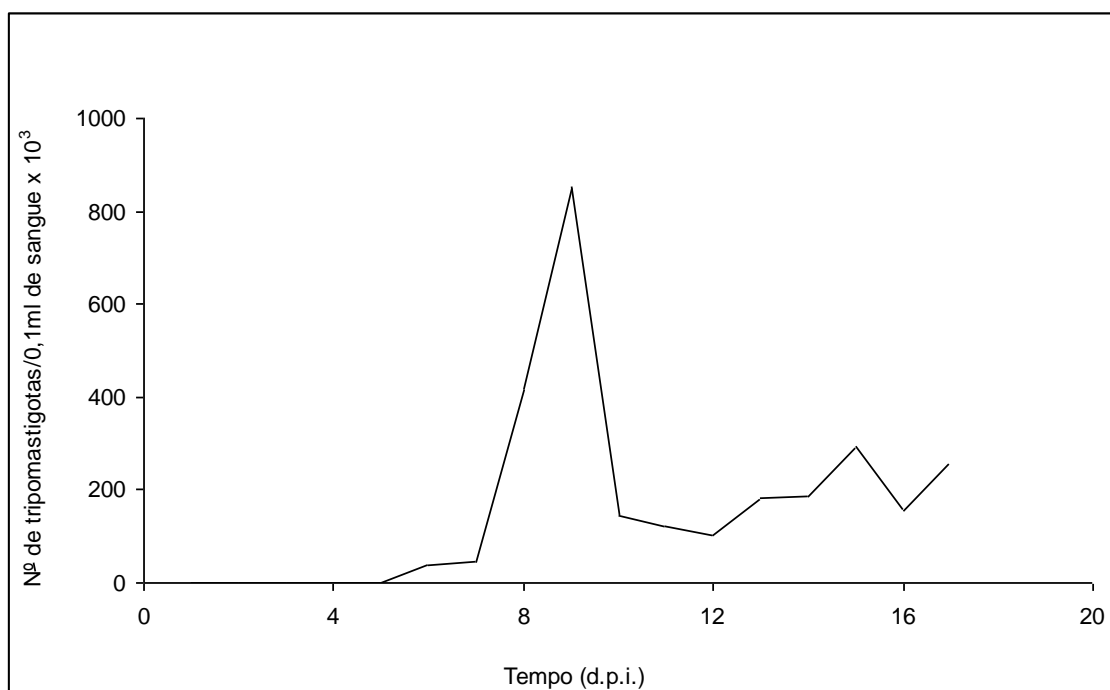
## 5 – RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da taxa de parasitemia e mortalidade

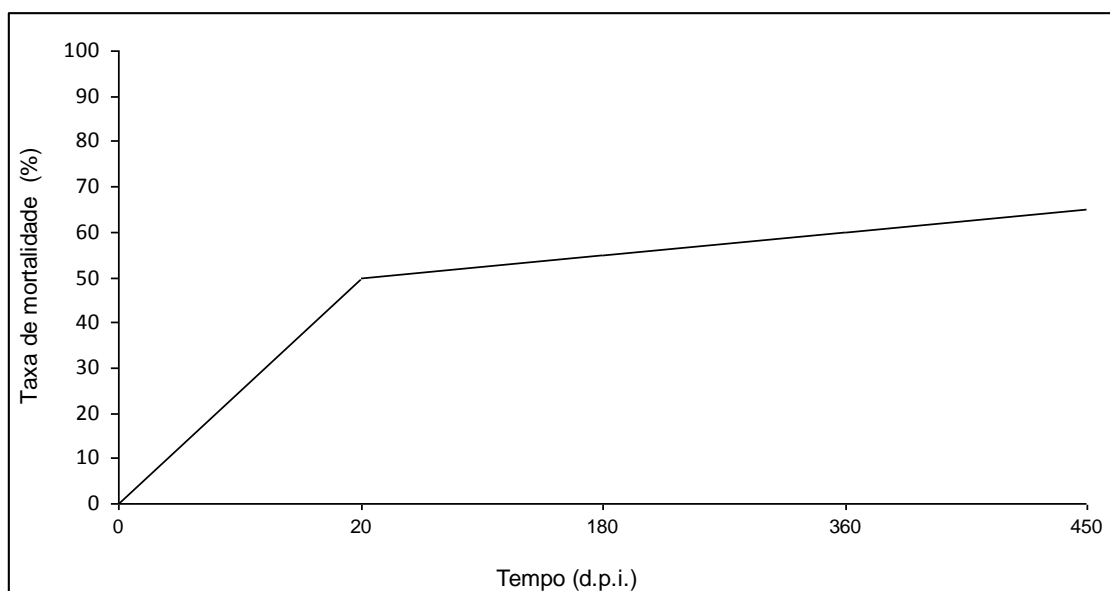
A taxa da parasitemia foi acompanhada diariamente a partir do 4º d.p.i. conforme descrito por Brener (1962) e o pico de parasitemia ocorreu no 9º d.p.i. (**GRÁFICO 1**).

Observa-se que os camundongos infectados com a cepa Y apresentam 100% de mortalidade no decorrer da fase aguda, entre o 14º e 18º d.p.i. (**GRÁFICO 1**). Portanto, para acompanhar a patologia durante a fase crônica fez-se necessário submetê-los ao tratamento com Benzonidazol (dose única de 500mg por Kg de peso corporal, via oral) no 11º d.p.i..

Nota-se que o tratamento foi parcialmente eficiente em prevenir a mortalidade dos animais, visto que essa cepa é parcialmente resistente ao Benzonidazol (Filardi e Brener, 1987). A taxa de mortalidade durante os primeiros 20 d.p.i. foi mais expressiva, quase que 50% dos animais morreram nesse período, sendo que no decorrer da fase crônica até o 15º m.p.i aproximadamente 15% dos animais morreram (**GRÁFICO 2**).



**GRÁFICO 1:** Curva de parasitemia de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção (n=6).



**GRÁFICO 2:** Porcentagem da taxa de mortalidade de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* avaliados durante 15 m.p.i. (n=30).

## **5.2 Avaliação histopatológica qualitativa e análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório**

### *Fase aguda*

O intestino grosso dos animais controle apresentou na camada mucosa revestimento de epitélio simples prismático com borda estriada pouco evidente nos enterócitos e células caliciformes nas longas e retilíneas glândulas. As glândulas ocupam toda a extensão da lâmina própria, a qual é composta também por tecido conjuntivo frouxo rico em células inflamatórias, vasos sanguíneos e linfáticos, e a delgada muscular da mucosa.

Abaixo da muscular da mucosa, a camada submucosa composta por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos e plexo nervoso de Meissner ou submucoso.

Em sequência observa-se a camada muscular com células musculares lisas orientadas em duas subcamadas, sendo a camada muscular interna circular e a camada muscular externa longitudinal. Entre essas duas subcamadas há o plexo nervoso de Auerbach ou mientérico e tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e linfáticos. Externamente, observa-se a delgada camada serosa composta de tecido conjuntivo frouxo, tecido adiposo e vasos às vezes em continuidade com partes do mesentério.

Ao comparar os grupos de fase aguda, nota-se que o grupo infectado apresentou camada mucosa descontínua, caracterizando descamação do epitélio por necrose ou apoptose, o que acarretou na diminuição da espessura desta camada (**GRÁFICO 3**). Há ainda aumento da celularidade da lâmina própria, presença de figuras de mitose e aspecto de ativação das células da cripta (**FIGURA 2F**), além de aparente diminuição do tamanho e/ou do número de células caliciformes.

A camada submucosa do grupo infectado de fase aguda apresenta-se dilatada (**GRÁFICO 3**) com edema, células inflamatórias predominantemente mononucleares (**FIGURA 2B**), vasos com endotélio reativo, congestão e infiltrado perivascular (**TABELA 2**).

Observa-se parasitismo discreto a intenso, com ninhos em toda extensão das camadas musculares (**FIGURA 4 A e C e GRÁFICO 5**), principalmente nas regiões próximas a vasos da camada submucosa, possivelmente em consequência da riqueza de vasos sanguíneos nessa camada. Ressalta-se a presença de ninhos no interior e ao redor do plexo mientérico (**FIGURA 4D**), muitas vezes em associação com neurônios aparentemente íntegros e sem sinais de necrose, todavia com alterações do aspecto do citoplasma e núcleo sugestivo de degeneração neuronal. Há alguns plexos infiltrados cujos neurônios apresentam intensos sinais de degeneração.

O infiltrado inflamatório foi avaliado em todas as camadas, sendo predominantemente mononuclear e mais intenso nas camadas muscular e submucosa (**TABELA 2**).

**TABELA 2:** Análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório perivascular, na camada submucosa e muscular interna entre os grupos controle e infectado sacrificados nas fases aguda e crônica: mediana (valor mínimo/valor máximo) e valor de p (significância estatística  $p \leq 0,05$ ), Teste Mann Whitney.

	<b>Fase Aguda</b>	<b>p</b>	<b>Fase crônica</b>	<b>p</b>
Infiltrado submucosa	1 (0,0/2,0)	0,004	1,5 (0,5/2,5)	0,0025
Infiltrado perivascular	0 (0,0/1,0)	0,4795	1 (0,0/2,5)	0,0198
Infiltrado muscular interna	1,5 (0,5/2,5)	0,0017	1 (0,5/2,0)	0,0059

Na fase aguda os infiltrados foram encontrados na camada muscular em toda extensão do cólon (**TABELA 2**), formando feixes que se dispõem entre as fibras musculares (**FIGURA 2B**). Essas fibras apresentam necrose isolada ou em pequenos grupos, evidenciada na maior densidade de fibras reticulares, devido ao colapamento dessa trama nas áreas de perda muscular, em geral associadas a áreas de substituição por tecido de granulação (**FIGURAS 5 B e D**).

Foi observado também infiltrado inflamatório entre as camadas musculares interna e externa (**FIGURA 2B**) e ao redor da cápsula dos gânglios mientéricos (**FIGURA 2C**). Ademais, na camada muscular externa havia áreas na qual o intenso infiltrado inflamatório interrompia a integridade das fibras musculares, restando poucas fibras entremeadas por tecido conjuntivo espesso e vasos congestionados (**FIGURA 2D**).

#### *Fase crônica*

Os animais controle de fase crônica apresentaram camada mucosa discretamente atrofiada em relação ao controle de fase aguda. Porém, o grupo infectado de fase crônica apresentou mucosa com aspecto normal, bastante preservada e espessada em relação ao controle de fase crônica (**GRÁFICO 4**).

Alguns animais infectados de fase crônica apresentaram parasitismo discreto, enquanto que em outros não foram observados ninhos ou formas amastigotas (**GRÁFICO 5 e FIGURA 4B**). Não foram encontrados parasitos no plexo mientérico nas amostras analisadas. Focos de infiltrado inflamatório estava presente ao redor de alguns gânglios mientéricos (**FIGURA 3C**).

O infiltrado inflamatório da camada submucosa variaram de discreto à moderado (**TABELA 2**), sendo sobretudo perivasculares, com predomínio homogêneo de células mononucleares na sua maioria linfócitos e macrófagos residuais. Houve aumento da espessura da parede dos vasos e hipertrofia do endotélio, o que sugere vasculite crônica, sem sinais de congestão (**FIGURA 3D, E e F**). Houve espessamento da camada submucosa (**GRÁFICO 4**), possivelmente devido ao aumento da celularidade e do tecido conjuntivo.

Observou-se aumento do número de mastócitos na camada submucosa, geralmente relacionado à perivasculite e na camada muscular (**FIGURA 3F e GRÁFICO 7**), porém, não associado com infiltrado inflamatório ou estruturas do plexo mientérico.

Na camada muscular, os discretos infiltrados inflamatórios (**TABELA 2**) foram, na maioria dos casos, focais especialmente cruzando a camada muscular interna (**FIGURA 3B**), entre as camadas musculares interna e externa e nas áreas de substituição por fibrose. Houve hipertrofia das células musculares lisas (**GRÁFICO 8**) e deposição de tecido conjuntivo ao redor das fibras musculares (**FIGURA 6B**). Todavia o padrão das fibras reticulares foi similar ao do grupo controle (**FIGURA 6D**).

Em geral, a área imunomarcada por PGP 9.5 nos plexos mientéricos e submucosos foram bem visíveis na fase aguda, embora alguns neurônios imunomarcados apresentassem alterações degenerativas. As células da glia entéricas imunomarcadas por GFAP foram pouco afetadas em número e aspecto na fase aguda (**GRÁFICO 11, 12 e FIGURA 7**). Na fase crônica houve discreta diminuição da área do plexo mientérico marcada por PGP 9.5 e aumento da área marcada por GFAP (**GRÁFICO 14, 15 e FIGURA 7**).

Houve intensa diminuição da inervação da camada muscular interna nos animais do grupo infectado de fase aguda e crônica, tanto em associação com infiltrado inflamatório quanto em áreas não infiltradas, o que pode explicar alteração funcional da coordenação motora do cólon (**GRÁFICO 13 e 16 e FIGURA 7**).

### **5.3 Avaliação histopatológica quantitativa**

Para avaliação quantitativa, o cólon foi subdividido em três regiões conforme as características histológicas: região proximal, que apresenta aspecto de transição do ceco para o cólon, a intermediária, região mais extensa e característica do intestino grosso com abundância de células caliciformes e absortivas nas glândulas intestinais, e a região distal que tem continuidade com o esfíncter anal.

#### **5.3.1 Espessura da parede do cólon**

##### *Fase aguda*

Em animais jovens sacrificados com 5 semanas de idade, o grupo controle da fase aguda, evidenciou maior espessura total do cólon na região distal (753,1 $\mu$ m) em relação à proximal (522,1 $\mu$ m;  $p = 0,0178$ ). Quando comparado com o grupo infectado (705,2 $\mu$ m), a região distal da parede total do cólon apresentou-se espessada em relação ao grupo controle (670,0 $\mu$ m;  $p = 0,0427$ ) (**GRÁFICO 3**).

Salienta-se que houve correlação direta entre a espessura da parede total com a camada mucosa ( $p < 0,0001$ ), submucosa ( $p = 0,0081$ ), muscular total ( $p = 0,0002$ ), camadas musculares interna ( $p = 0,0005$ ) e externa ( $p = 0,0511$ ).

A região distal da camada mucosa do grupo infectado (346,0 $\mu$ m) apresentou diminuição da espessura comparada ao grupo controle (498,0 $\mu$ m;  $p = 0,0044$ ) (**GRÁFICO 3**). Ao avaliar separadamente cada grupo, o controle apresentou a

espessura da região proximal (283,4 $\mu$ m) inferior à da região intermediária (546,4 $\mu$ m;  $p < 0,0001$ ) e a distal (498,0 $\mu$ m;  $p = 0,0007$ ). No grupo infectado a região intermediária (479,1 $\mu$ m) apresentou-se espessada em relação à proximal (293,3 $\mu$ m;  $p = 0,0001$ ) e à distal (346,0 $\mu$ m;  $p = 0,0022$ ).

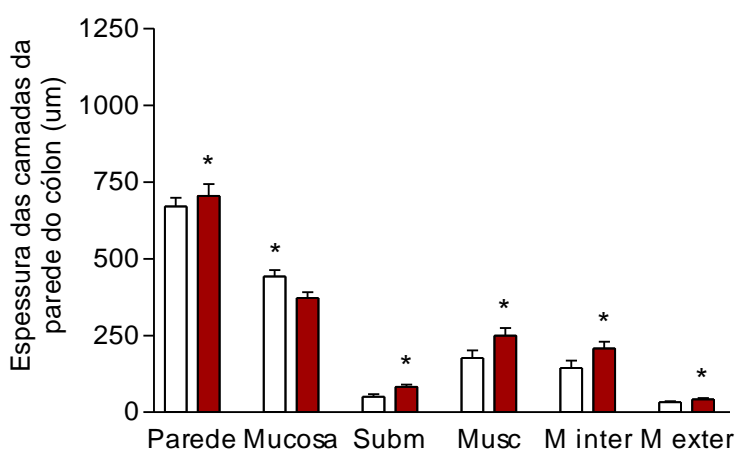
A camada submucosa foi mais espessa no grupo infectado (82,4 $\mu$ m) em relação ao grupo controle (50,5 $\mu$ m;  $p = 0,0011$ ) (**GRÁFICO 3 e FIGURA 2 A e B**), e a espessura média da região proximal foi menor que a das regiões intermediária e distal ( $p = 0,0184$ ).

A camada muscular total apresentava-se mais espessada no grupo infectado (250,0 $\mu$ m) em relação ao grupo controle (176,9 $\mu$ m;  $p = 0,0038$ ) (**GRÁFICO 3 e FIGURA 2 A e B**) e a espessura média da região proximal foi maior que a das regiões intermediária e distal ( $p = 0,0013$ ).

Houve espessamento da camada muscular interna do grupo infectado (207,5 $\mu$ m) em relação ao controle (144,4 $\mu$ m;  $p = 0,0364$ ) (**GRÁFICO 3 e FIGURA 2 A e B**) e a espessura média da região proximal foi maior a das regiões intermediária e distal ( $p = 0,0031$ ).

Esse mesmo padrão de espessamento foi observado para a camada muscular externa, com espessura de 42,4 $\mu$ m no grupo infectado e 32,4 $\mu$ m no grupo controle ( $p = 0,0297$ ) (**GRÁFICO 3 e FIGURA 2 A e B**). A espessura média da região distal foi maior que a das regiões intermediária e proximal ( $p = 0,0101$ ).

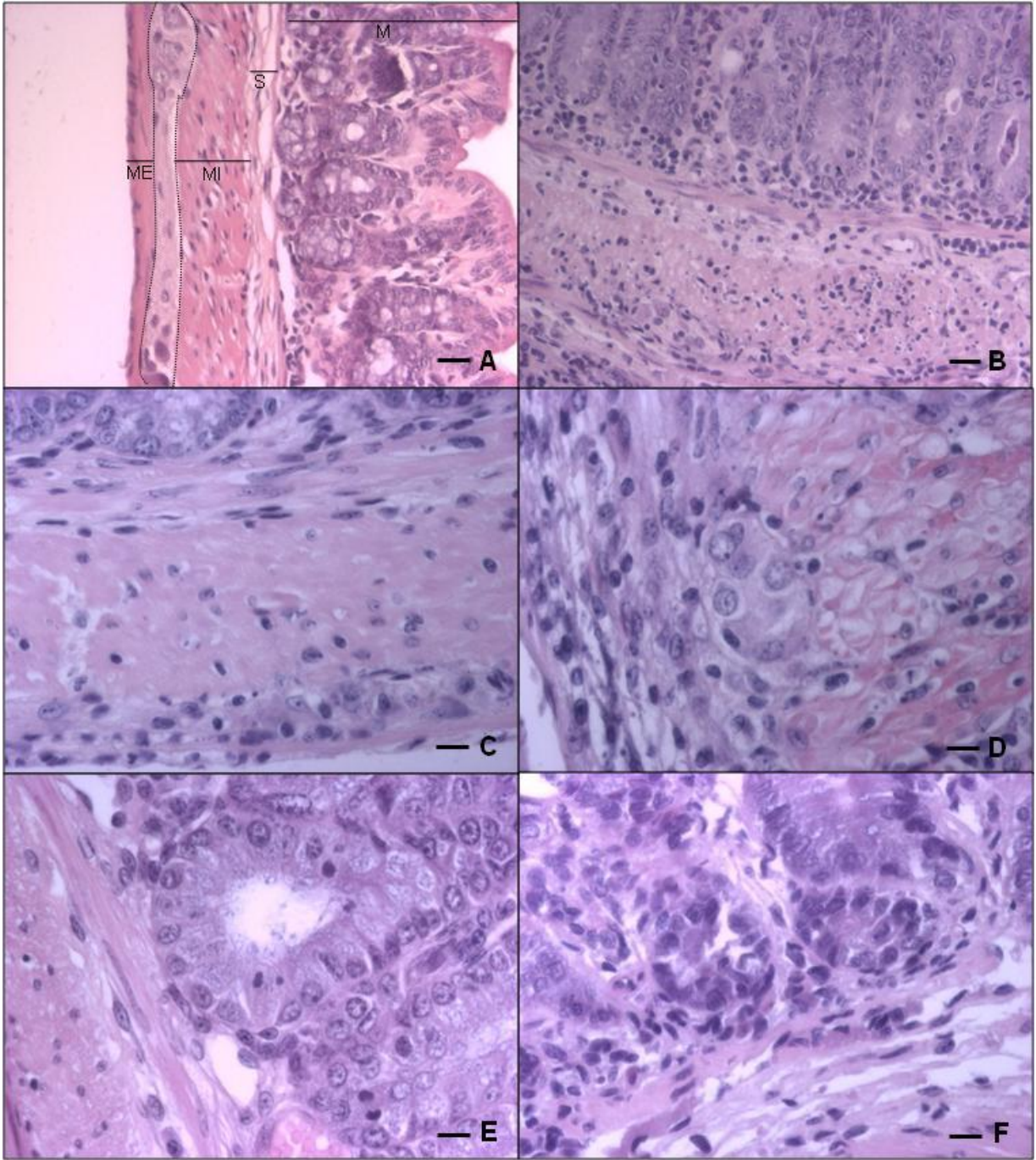
Houve correlação direta entre a espessura da muscular total e a espessura das camadas musculares interna ( $p < 0,0001$ ) e externa ( $p = 0,005$ ).



**GRÁFICO 3:** Avaliação da espessura da parede total, camada mucosa, camada submucosa, muscular total, muscular interna e muscular externa do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase aguda da infecção. \* indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle ( $n=5$ ) e infectado ( $n=10$ ).



**FIGURA 2:** Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (A e E) e infectado (B, C, D e F) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na fase aguda. No cólon pode ser observada a camada mucosa (M), submucosa (S), muscular interna (MI) e externa (ME) e entre essas camadas o plexo mientérico (pontilhado). Nos animais infectados há intenso infiltrado inflamatório mononuclear na camada submucosa e muscular (B), no plexo mientérico (C) e na camada muscular externa com fibras em necrose (D), além de necrose e apoptose das células da cripta das glândulas (F). Coloração de hematoxilina-eosina, a barra equivale a 20 $\mu$ m em A e B e 10 $\mu$ m em C, D, E e F.



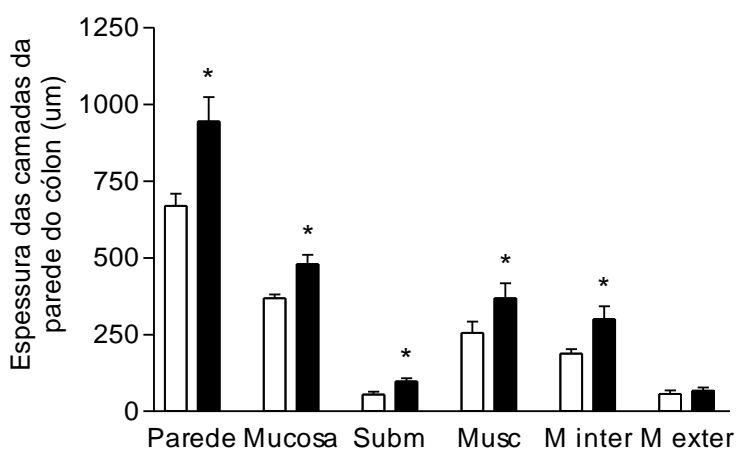
Ao avaliar a espessura das camadas do cólon dos grupos de fase crônica, observou-se espessamento da parede total do cólon do grupo infectado (944,0 $\mu$ m) em relação ao grupo controle (669,1 $\mu$ m;  $p = 0,002$ ) (**GRÁFICO 4**), no entanto não houve diferença entre as regiões avaliadas. Notou-se correlação direta entre a espessura da parede total à da camada mucosa, submucosa, muscular total, muscular interna ( $p < 0,0001$ ) e muscular externa ( $p < 0,0003$ ).

A camada mucosa do grupo infectado (479,1 $\mu$ m) apresentou-se espessada se comparada ao grupo controle (367,7 $\mu$ m;  $p = 0,008$ ) (**GRÁFICO 4**) e a espessura da região intermediária foi maior que as das demais regiões ( $p = 0,0079$ ).

Houve aumento significativo na espessura da camada submucosa do grupo infectado (97,1 $\mu$ m) em relação ao controle (54,4 $\mu$ m;  $p = 0,027$ ) (**GRÁFICO 4 e FIGURA 3 A e B**). A espessura das camadas mucosa e submucosa foi diretamente correlacionadas ( $p = 0,0341$ ).

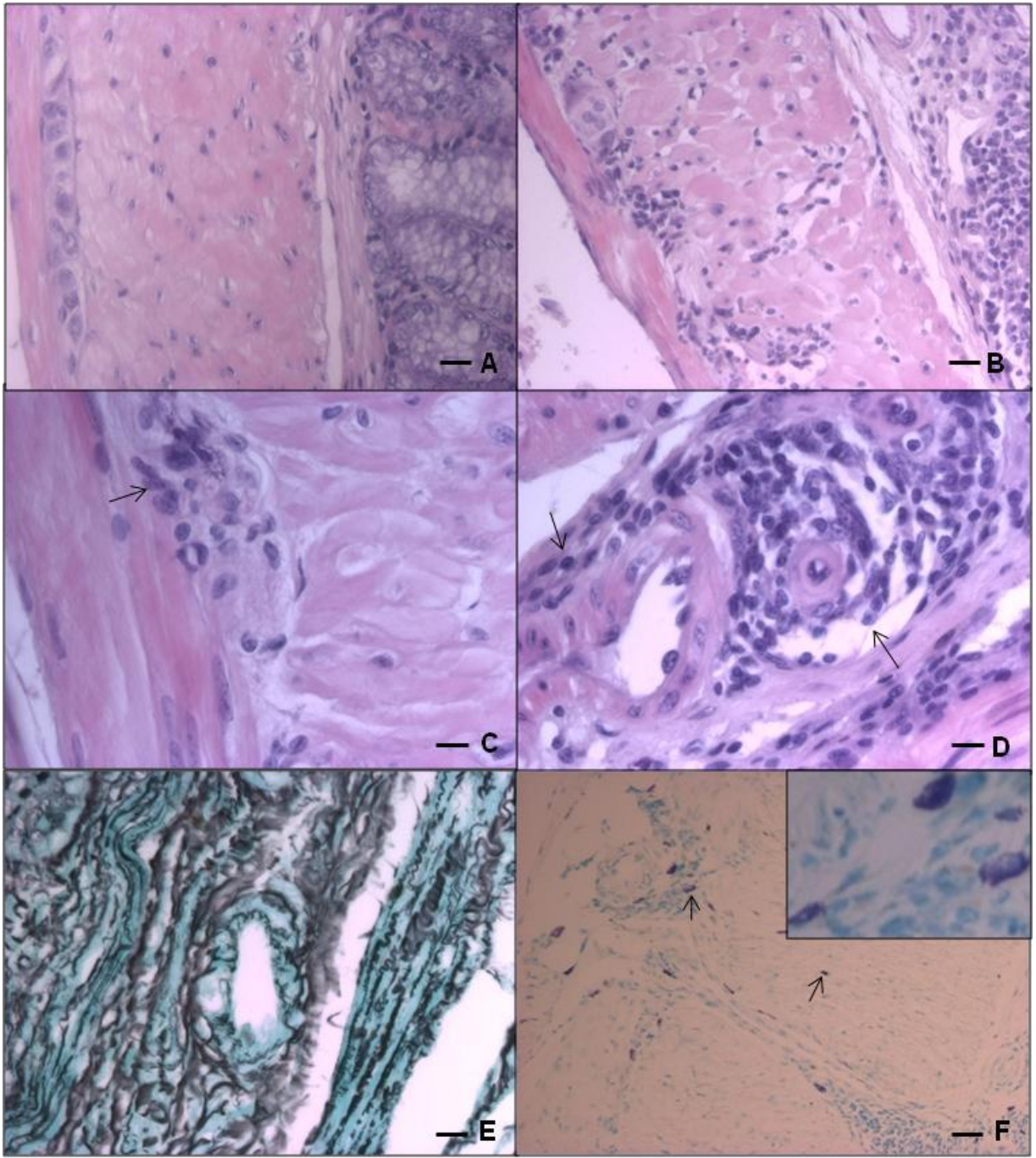
A muscular total do grupo infectado (367,7 $\mu$ m) apresentou-se espessada em relação ao controle (255,9 $\mu$ m;  $p = 0,0137$ ) (**GRÁFICO 4**), sendo que a região distal era espessada em relação às outras regiões ( $p = 0,0185$ ). A camada muscular interna apresentou aumento significativo no grupo infectado (300,0 $\mu$ m) em comparação ao controle (188,1 $\mu$ m,  $p = 0,00143$ ) (**GRÁFICO 4 e FIGURA 3 A e B**).

Houve correlação entre a espessura da muscular total e das camadas musculares interna e externa ( $p < 0,0001$ ). Todavia não foi observada diferença estatística ( $p = 0,0919$ ) na espessura da camada muscular externa entre os grupos (**GRÁFICO 4**).



**GRÁFICO 4:** Avaliação da espessura da parede total, camada mucosa, camada submucosa, muscular total, muscular interna e muscular externa do cólon de camundongos do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase crônica da infecção. \* representa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).

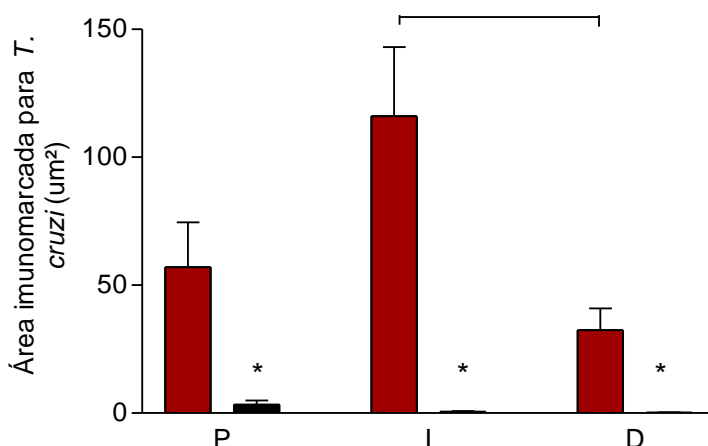
**FIGURA 3:** Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (A) e infectado (B, C, D, E e F) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na fase crônica. Infiltrado inflamatório mononuclear focal na camada muscular interna (B), periganglionar (C) e perivascular (D), caracterizando vasculite crônica com aumento da espessura da parede dos vasos e hipertrofia do endotélio (E) e presença de mastócitos na musculatura e perivascular (F). Colorações de Hematoxilina-Eosina (A, B, C e D), Prata Amoniacal de Gomori (E) e Azul de Toluidina (F). Barra equivale 20µm em A e B, 10µm em C, D, E e no detalhe de F e 4µm em F.



### 5.3.2 Parasitismo tecidual

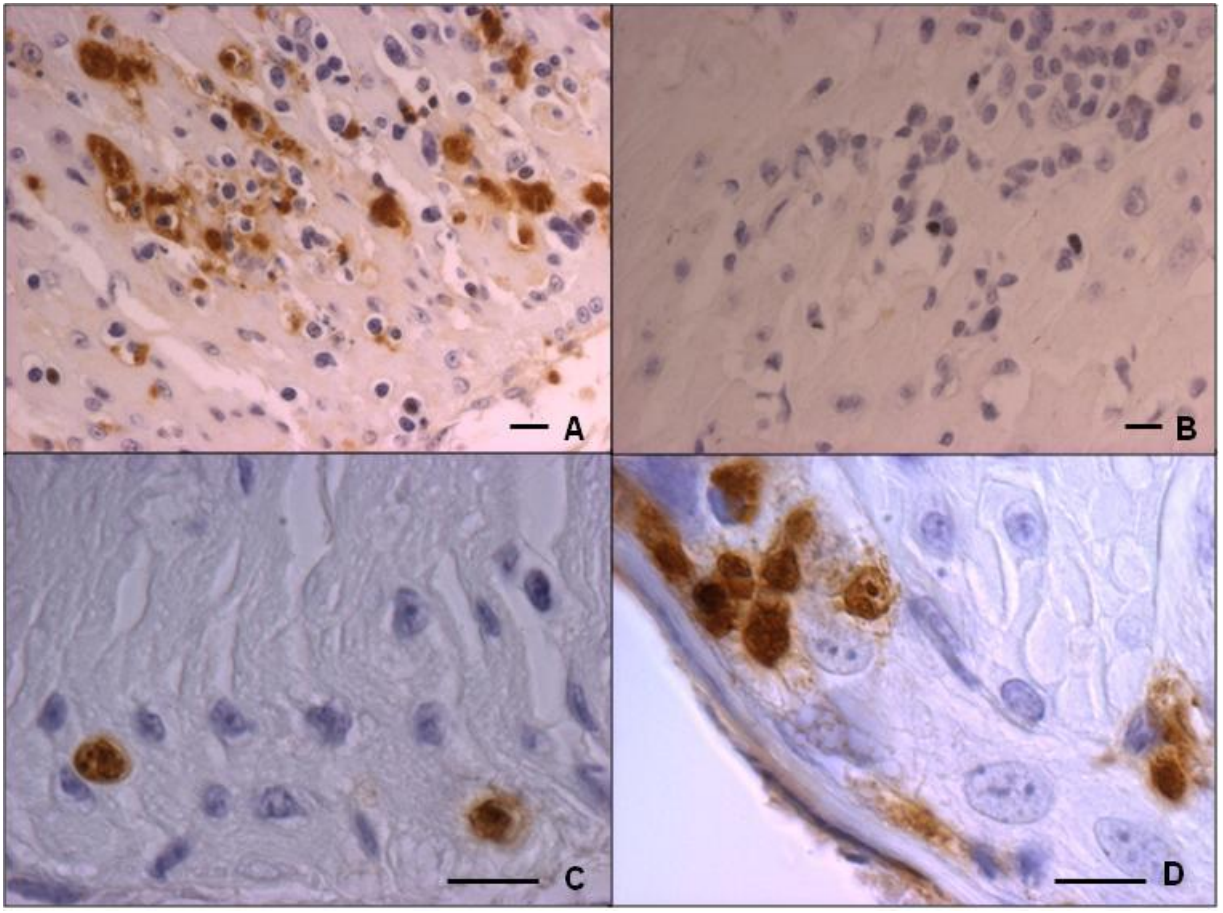
Ao comparar a área marcada por imuno-histoquímica anti-*T. cruzi* entre os animais infectados de fase aguda e os infectados de fase crônica, observou-se significativa redução da presença do parasito em formas amastigotas isoladas ou ninhos na fase crônica da infecção em todas as regiões do cólon ( $p < 0,001$ ).

Observou-se que o parasitismo da região intermediária do grupo infectado de fase aguda foi significativamente maior que o da região distal ( $p = 0,0137$ ) (**GRÁFICO 5**).



**GRÁFICO 5:** Avaliação da área marcada por imuno-histoquímica anti-*Trypanosoma cruzi* nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y, sacrificados na fase aguda (■ n=10) e na fase crônica (■ n=10). \* e a linha representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos e entre as regiões do grupo infectado de fase aguda, respectivamente.

**FIGURA 4:** Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na fase aguda (A, C e D) e na fase crônica (B). Na fase aguda há parasitismo associado (A) ou não a infiltrado inflamatório (C) e no plexo mientérico (D). Na fase crônica, na maioria dos casos, observa-se ausência de parasito nos focos inflamatórios (B). Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*, barra equivale a 10µm.



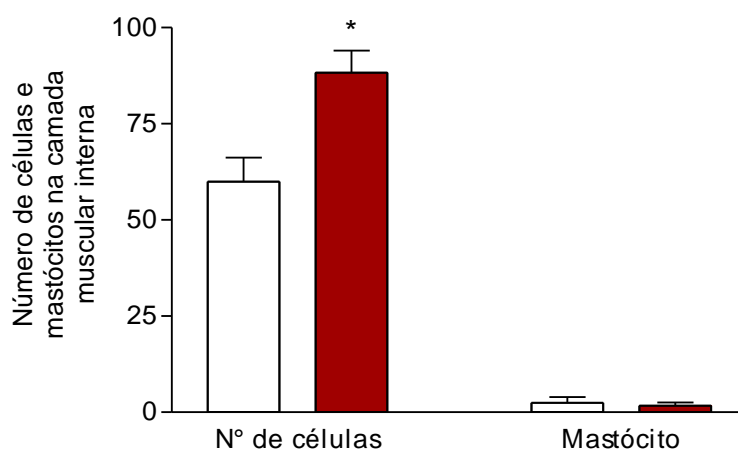


### 5.3.3 Quantificação do infiltrado inflamatório

#### *Fase Aguda*

O grupo infectado de fase aguda apresentou moderado a intenso infiltrado inflamatório na camada muscular interna em todas as regiões do cólon, refletindo em aumento da celularidade total por campo (média de 88,2 células) em comparação ao grupo controle (59,9 células,  $p < 0,0001$  - **GRÁFICO 6**). Na camada muscular externa não foi observado aumento significativo da celularidade (**FIGURA 2B**).

Entretanto, não houve diferença no número de mastócitos presentes em toda extensão do cólon nos animais do grupo controle e infectado ( $p = 0,670$ ) e não foi observado nenhum mastócito na camada muscular na fase aguda, em ambos os grupos (**GRÁFICO 6**).

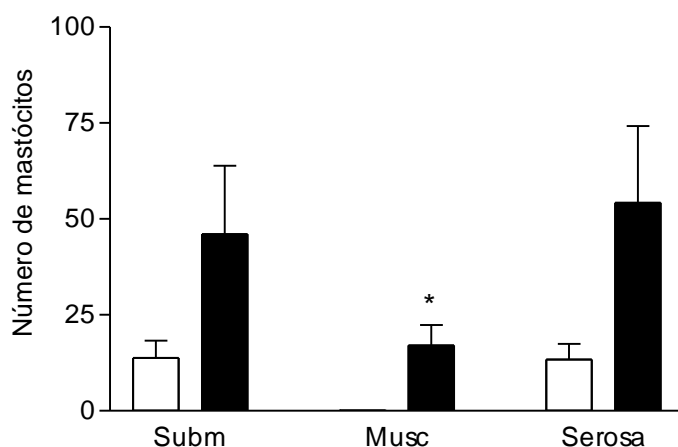


**GRÁFICO 6:** Avaliação do número total de núcleos celulares presentes na camada muscular interna (média por campo) e mastócitos nas camadas submucosa, musculares e serosa (toda extensão do corte) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na fase aguda da infecção. \* representa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).

#### *Fase crônica*

Na fase crônica, os focos de infiltrado inflamatório apresentavam-se distribuídos de forma esparsa, próximo à áreas de fibrose ou ao longo do trajeto de vasos, o que impediu a quantificação em campos aleatórios. No entanto, observou-se presença de infiltrados inflamatórios focais, predominantemente mononuclear, em toda a extensão do intestino (**FIGURA 3B**).

Nessa fase da doença experimental, ocorreu aumento significativo do número de mastócitos presentes na camada muscular do grupo infectado (17 mastócitos) em relação ao controle (0 mastócitos;  $p = 0,0561$ ) (**GRÁFICO 7**).

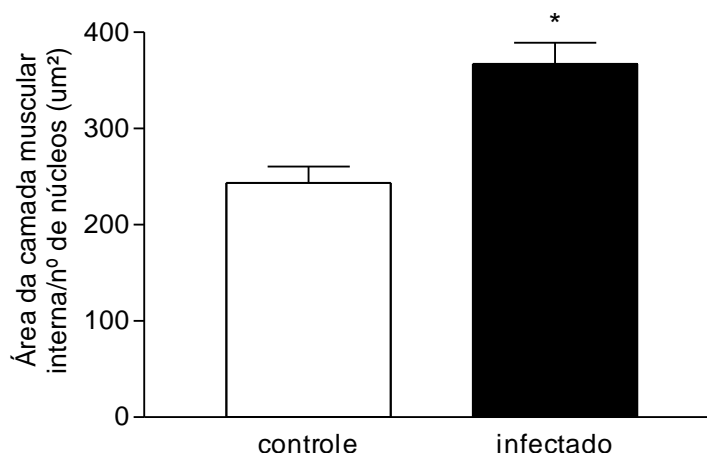


**GRÁFICO 7:** Número médio de mastócitos nas camadas submucosa, muscular e serosa (toda extensão do corte) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase crônica da infecção. \* indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle ( $n=5$ ) e infectado ( $n=5$ ).

#### **5.3.4 Área citoplasmática da fibra muscular lisa (área de campo/número de núcleos)**

Não houve diferença na área das fibras musculares das camadas interna e externa entre os animais controle e infectado de fase aguda.

Todavia, na fase crônica, o tamanho das fibras da camada muscular interna do grupo infectado ( $367,0\mu\text{m}^2$ ), medida nas regiões proximal, intermediária e distal do cólon, apresentou-se significativamente maior que as do grupo controle ( $243,6\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando hipertrofia das fibras (**GRÁFICO 8**).



**GRÁFICO 8:** Avaliação da área das células musculares lisas das camadas interna do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na fase crônica da infecção. \* representa diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).

### **5.3.5 Tecido conjuntivo e fibra reticular**

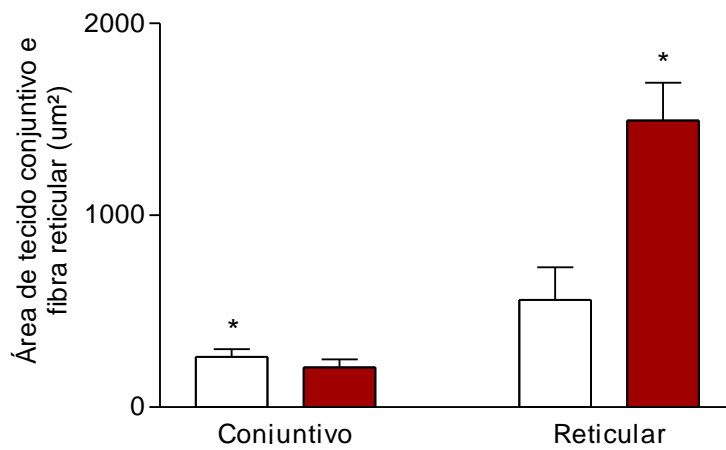
#### *Fase aguda*

O tecido conjuntivo é formado por fibras colágenas, elásticas e reticulares, o que pode ser observado através da coloração por Tricrômico de Gomori. Na fase aguda, houve redução da área de tecido conjuntivo presente na camada muscular interna, marcado por essa técnica no grupo infectado ( $207,7\mu\text{m}^2$ ) em relação ao grupo controle ( $262\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,0217$ ) (**GRÁFICO 9 e FIGURA 5 A e B**).

As finas fibras reticulares são argirófilas, com predomínio de colágeno tipo III associado à glicoproteínas e proteoglicanas e formam uma rede de sustentação ao redor das fibras musculares (Junqueira e Carneiro, 2004)). Nas preparações de Prata Amoniacal de Gomori a trama reticular normal (aproximadamente 30nm), marcada em preto, distribuiu-se delimitando delicadamente os contornos unicelulares da fibra muscular lisa e realçando a organização arquitetural e orientação celular na parede intestinal (Ushiki, 2002).

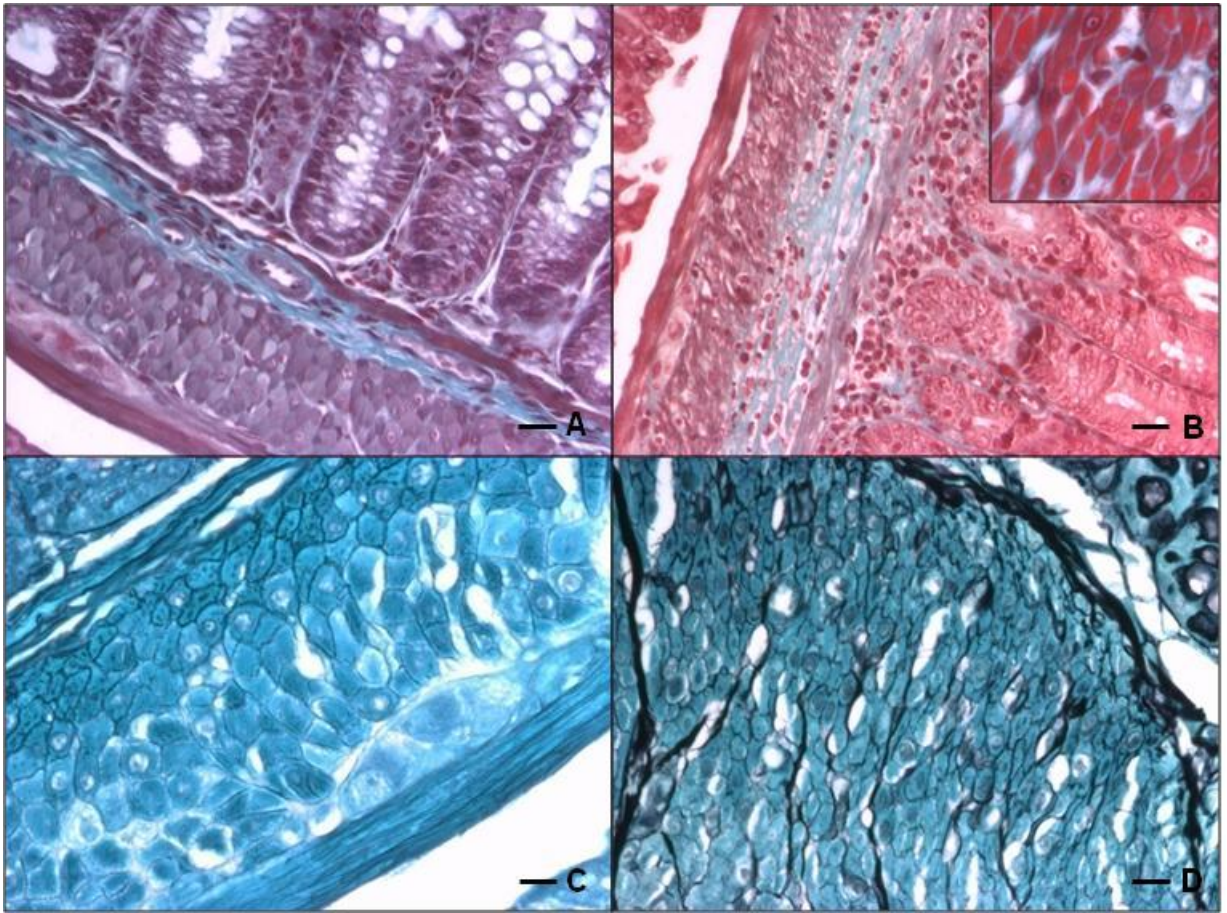
Detectamos aumento significativo das fibras reticulares na camada muscular interna do grupo infectado ( $1493,3\mu\text{m}^2$ ) em comparação ao grupo controle ( $558,6\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,0001$ ) (**GRÁFICO 9**), o que sugere necrose das fibras musculares com justaposição das fibrilas reticulares (**FIGURA 5 C e D**).

Ressalta-se que existe correlação direta entre o aumento das fibras reticulares com a presença de infiltrado inflamatório na camada muscular interna ( $p = 0,0193$ ).



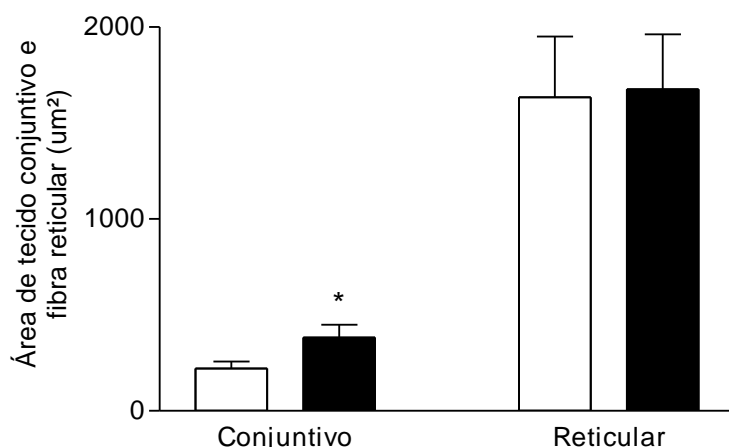
**GRÁFICO 9:** Avaliação da área de tecido conjuntivo e de fibra reticular na camada muscular interna do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase aguda da infecção. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) são representadas por \* entre os grupos controle (n=5) e infectado (n=10).

**FIGURA 5:** Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss dos grupos controle (A e C) e infectado (B e D) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na de fase aguda. O grupo infectado apresentou infiltrado inflamatório (B), áreas de substituição com tecido de granulação (detalhe) e colabamento das fibras reticulares (D) na camada muscular. Coloração Tricrômico de Gomori (A e B) e Prata Amoniacal de Gomori (C e D). Barra equivale a 20µm em A e B e 10µm no detalhe B, C e D.



### Fase crônica

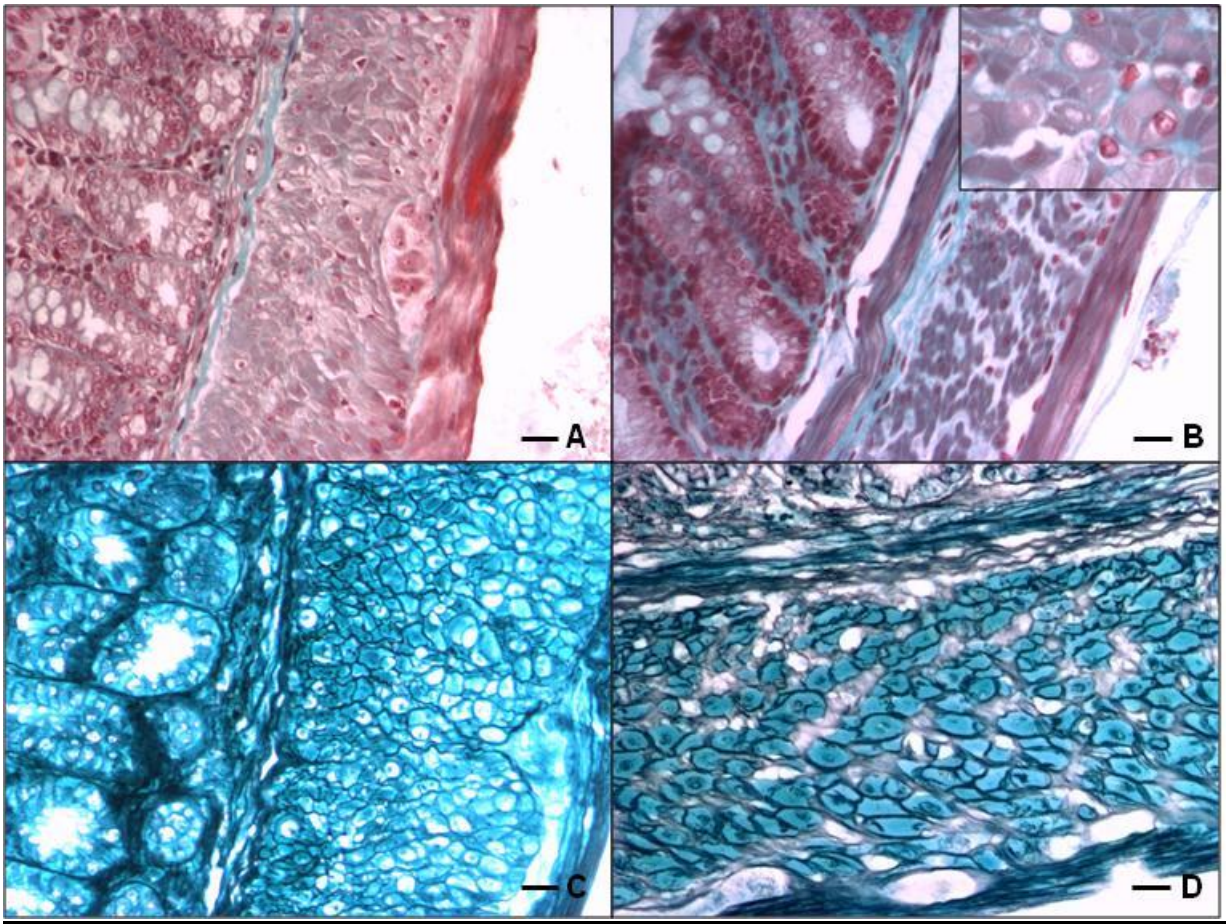
Na fase crônica, houve aumento significativo da área marcada pelo Tricrômico de Gomori no grupo infectado ( $382,4\mu\text{m}^2$ ) em relação ao controle ( $220,3\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,0001$ ), com áreas de fibrose (**FIGURA 6 A e B**). Porém a área ocupada por fibras reticulares nos animais de fase crônica não apresentou variação significativa entre os grupos ( $p = 0,8208$ ) (**FIGURA 6 C e D e GRÁFICO 10**).



**GRÁFICO 10:** Avaliação da área de tecido conjuntivo e de fibra reticular no cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase crônica da infecção. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) são representadas por \* entre os grupos controle ( $n=5$ ) e infectado ( $n=10$ ).

**FIGURA 6:** Fotomicrografias representativas do cólon camundongos Swiss do grupo controle (A e C) e infectado (B e D) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na de fase crônica. O grupo infectado apresentou aumento das fibras colágenas (B) entremeando as fibras musculares (detalhe), porém as fibras reticulares (D) tinham padrão semelhante ao do grupo controle (C). Coloração Tricrômico de Gomori (A e B) e Prata Amoniacal de Gomori (C e D). Barra equivale a 20 $\mu$ m em A e B e 10 $\mu$ m no detalhe B, C e D.

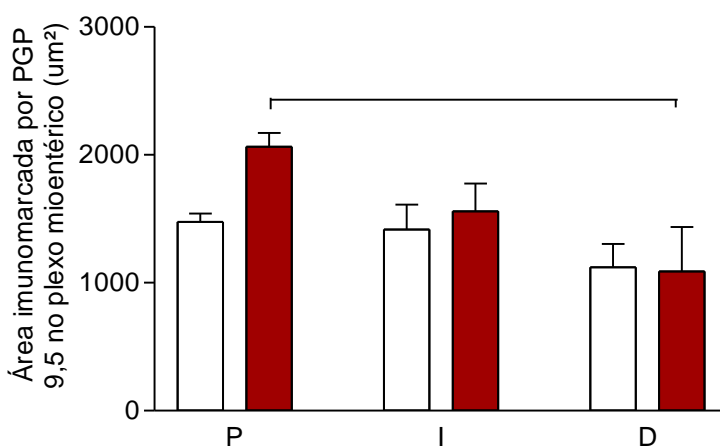




### 5.3.6 Plexo mientérico e submucoso e inervação intermuscular lisa intestinal

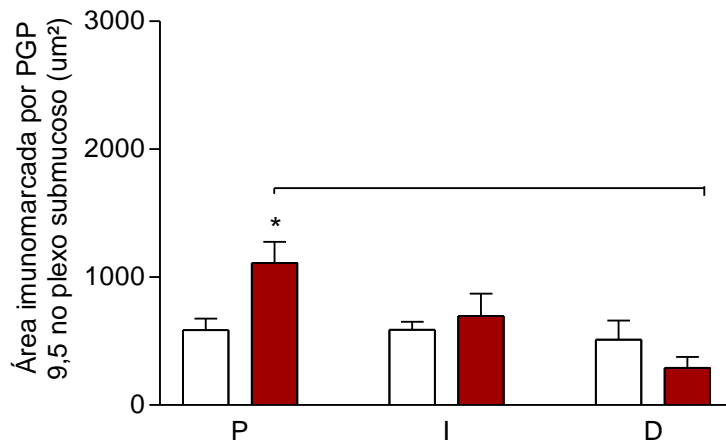
#### *Fase aguda*

A área imunomarcada por PGP 9.5 no plexo mientérico não apresentou diferenças significativas nos animais infectados em relação aos controles ( $p = 0,2678$ ) na fase aguda (**GRÁFICO 11**). A única diferença observada foi entre as regiões proximal ( $2064,0\mu\text{m}^2$ ) e distal ( $1088,0\mu\text{m}^2$ ) do grupo infectado ( $p = 0,0514$ ) (**FIGURA 7 C e D**).



**GRÁFICO 11:** Avaliação da área imunomarcada por PGP 9.5 no plexo mientérico nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase aguda da infecção. A linha representam diferença estatística entre as regiões do grupo infectado.

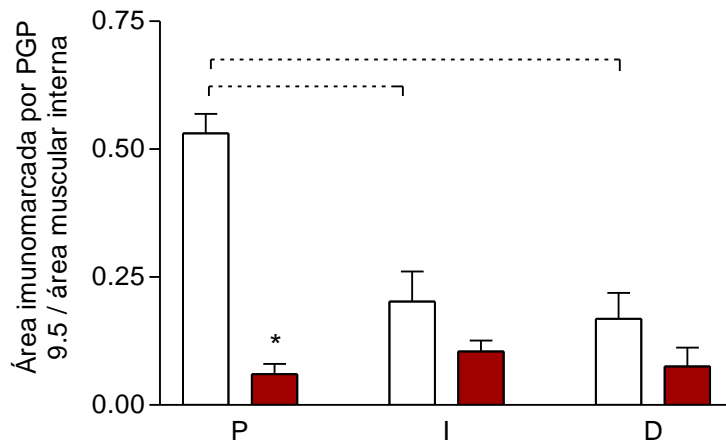
No plexo submucoso (**FIGURA 7 A e B**) da região proximal do cólon, houve diferença entre os grupos controle ( $586,7\mu\text{m}^2$ ) em relação ao infectado ( $1110,0\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,0528$ ) e essa apresentou-se maior imunomarcção por PGP 9.5 do que a região distal ( $290,4\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,013$ ) no grupo infectado (**GRÁFICO 12**).



**GRÁFICO 12:** Avaliação da área do plexo submucoso imunomarcado por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase aguda da infecção. \* indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle ( $n=3$ ) e infectado ( $n=3$ ) e a linha representam diferença estatística entre as regiões do grupo infectado.

No entanto, a densidade de elementos PGP 9.5 positivos entre as fibras musculares, característica da inervação intermuscular intestinal, foi menor no grupo infectado (0,0606) em relação ao grupo controle (0,5311;  $p = 0,0031$ ) na região proximal. Nota-se que no grupo controle a região proximal apresentava maior densidade de filetes nervosos PGP 9.5 positivos que a região intermediária (0,2023;  $p = 0,020$ ) e distal (0,1687;  $p = 0,02$ ) (**GRÁFICO 13**).

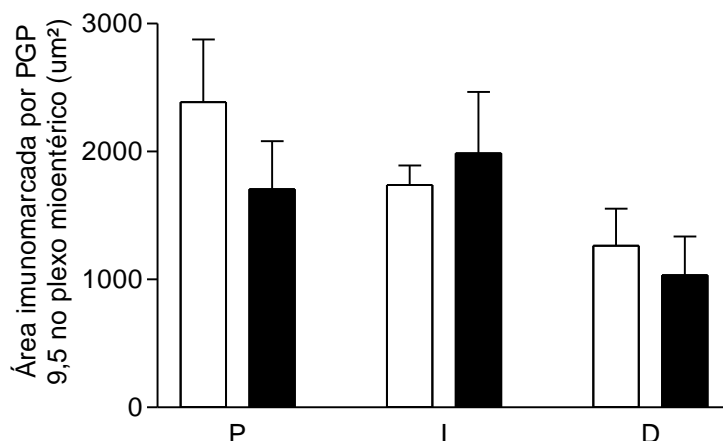
Salienta-se que apesar do plexo mientérico se apresentar relativamente preservado (**GRÁFICO 11**) não houve alteração da área marcada por PGP 9.5 nos gânglios, todavia a intensidade desta imunomarcção está menor no grupo infectado (**FIGURA 7C e D**). Ademais a densidade de fibras nervosas intermusculares PGP 9.5 positivas no campo referente a esse gânglio está reduzida (**GRÁFICO 13**), especialmente nas regiões musculares acometidas por infiltrado inflamatório (detalhe **FIGURA 7D**).



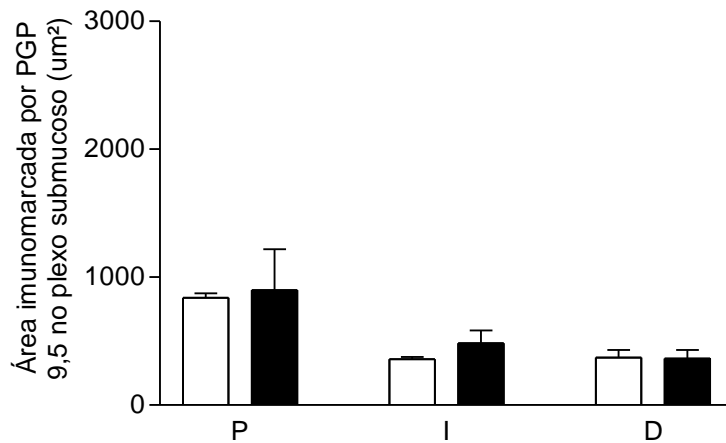
**GRÁFICO 13:** Avaliação da inervação intermuscular imunomarcada por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase aguda da infecção. \* indica diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle ( $n=3$ ) e infectado ( $n=3$ ) e a linha tracejada representam diferença estatística entre as regiões do grupo controle.

#### Fase crônica

Na fase crônica também não foi observada diferença na área imunomarcada por PGP 9.5 entre o grupo controle ( $1796,0\mu\text{m}^2$ ) e infectado no plexo mientérico ( $1575,3\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,4495$ ) (**GRÁFICO 14**) e no plexo submucoso (controle  $522,0\mu\text{m}^2$  e infectado  $582,4\mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,6975$ ) (**GRÁFICO 15**). Apesar de não haver diferença significativa da área marcada por PGP 9.5 salienta-se que no grupo infectado a intensidade da marcação apresentou-se diminuída (**FIGURA 7E e F**).

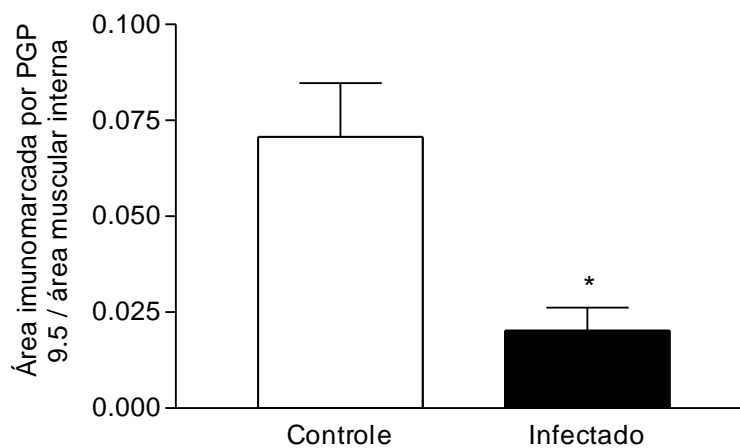


**GRÁFICO 14:** Avaliação da área do plexo mientérico imunomarcado por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase crônica da infecção. \* indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle ( $n=3$ ) e infectado ( $n=3$ ).



**GRÁFICO 15:** Avaliação da área do plexo submucoso imunomarcado por PGP 9.5 nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (n=3 □) e infectado (n=3 ■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase crônica da infecção.

Todavia, houve significativa diminuição da densidade de inervação intermuscular PGP 9.5 positiva nos animais infectados (0,02020) em relação a seu grupo controle (0,07070;  $p = 0,010$ ) na fase crônica (**GRÁFICO 16 e FIGURA 7 E e F**), à semelhança do que foi descrito para a fase aguda.

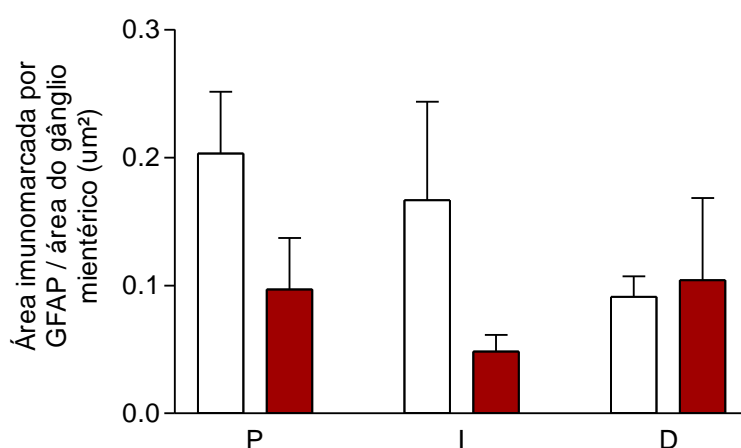


**GRÁFICO 16:** Avaliação da inervação intermuscular imunomarcado por PGP 9.5 no cólon de camundongos Swiss do grupo controle (□) e infectado (■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase crônica da infecção. \* indica significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos controle (n=3) e infectado (n=3).

### 5.3.7 Células glias entéricas

#### *Fase aguda*

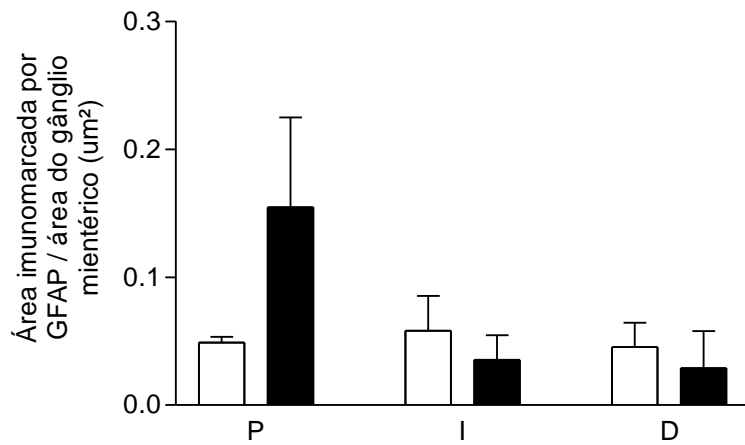
A área imunomarcada por GFAP no plexo mientérico (**FIGURA 7 G e H**) não apresentou diferença estatística entre as regiões proximal, intermediária e distal do cólon de animais infectados da fase aguda, embora a análise qualitativa tenha demonstrado uma diminuição dessa área à medida que se aproxima da região distal. Não houve diferença significativa na marcação das células da glia entéricas entre os grupos ( $p = 0,1156$ ) (**GRÁFICO 17**).



**GRÁFICO 17:** Avaliação da área do plexo mientérico imunomarcado por GFAP nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle ( $n=3$  □) e infectado ( $n=3$  ■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase aguda da infecção.

#### *Fase crônica*

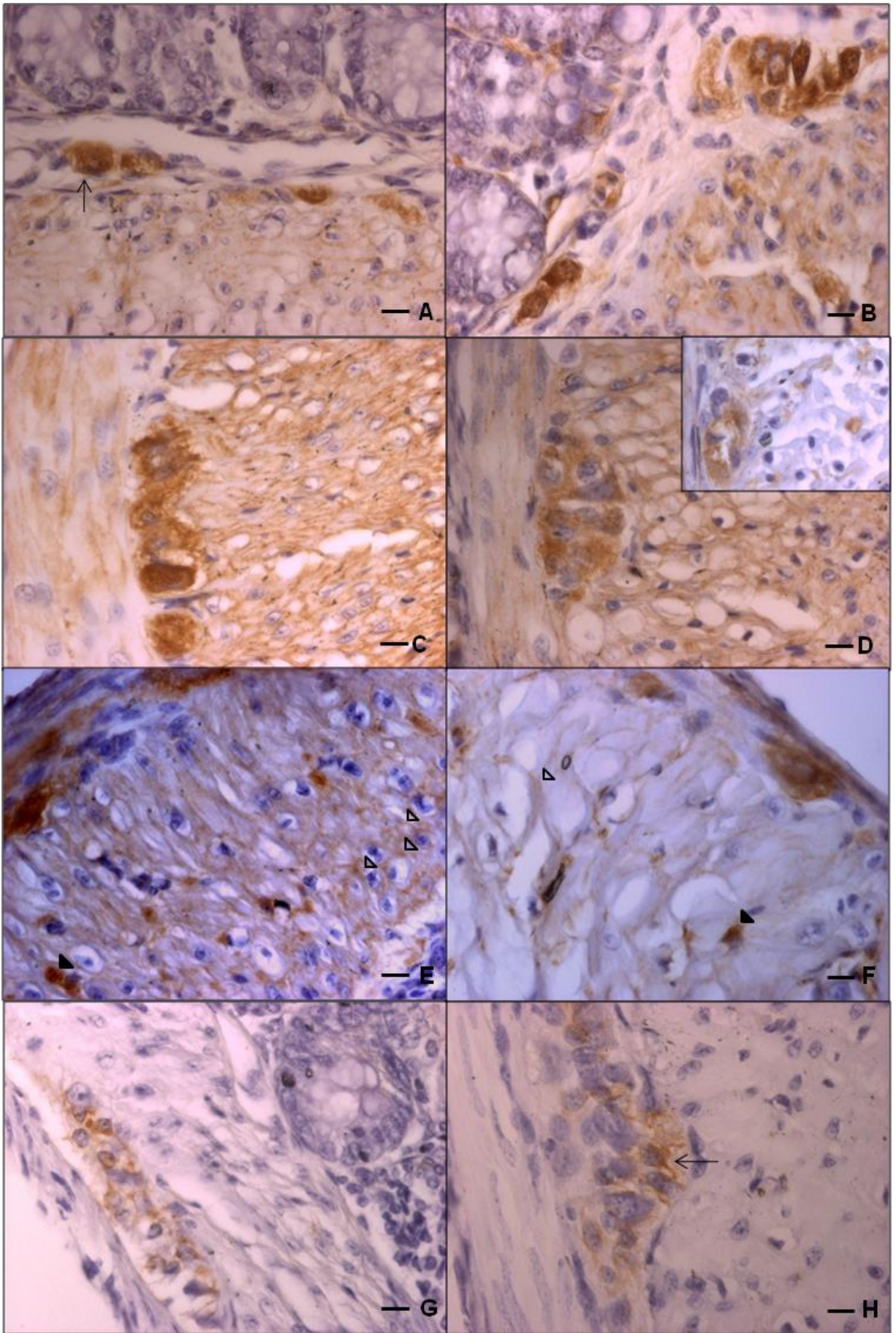
Na fase crônica também não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e infectado ( $p = 0,45$ ) nas diferentes regiões do cólon, no entanto, há evidência qualitativa de aumento da área imunomarcada por GFAP no plexo mientérico na região proximal do grupo infectado (**GRÁFICO 18**).



**GRÁFICO 18:** Avaliação da área do plexo mientérico imunomarcado por GFAP nas regiões proximal (P), intermediária (I) e distal (D) do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (n=3 □) e infectado (n=3 ■) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados durante a fase crônica da infecção.

**FIGURA 7:** Fotomicrografias representativas do cólon de camundongos Swiss do grupo controle (A, C e G) e infectado (B, D e H) com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, sacrificados na fase aguda; grupo controle (E) e infectado (F) sacrificados na fase crônica. Plexo submucoso (A e B), inervação intermuscular longitudinal (cabeça de seta) e transversal (cabeça de seta preenchida), neurônios (C, D, E e F) e células da glia entérica (G e H) do plexo mientérico. Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5 (A, B, C, D, E e F) e anti-GFAP (G e H), a barra equivale a 10 $\mu$ m.





## 6 – DISCUSSÃO

Os aspectos histopatológicos do intestino de camundongos infectados na fase aguda da doença de chagas experimental vêm sendo estudados por nosso grupo há alguns anos (Arantes, Marche *et al.*, 2004). Evidenciamos que a despeito das inúmeras referências à ausência de alterações intestinais no modelo murino, em geral obtidas de amostragens não sistemáticas e pouco abrangentes, o parasitismo intestinal, com maior ou menor injúria tecidual é frequente desde que a amostragem seja posterior ao pico da parasitemia.

No nosso trabalho o pico de parasitemia ocorreu no 9º d.p.i., no qual foram encontradas aproximadamente 900.000 formas tripomastigotas em 0,1ml de sangue periférico. Após dois dias (11º d.p.i.), os animais foram sacrificados para coleta de material histopatológico. Experimentos preliminares indicavam que ocorria migração das formas tripomastigotas para o órgão de interesse, o cólon, quando o animal já se apresentava clinicamente debilitado e, na maioria das vezes, evoluía para óbito. Dessa forma, através de estudos piloto, observamos que o sacrifício no dia do pico de parasitemia não permitia detectar parasitismo tecidual significativo. Por outro lado os animais morrem entre os 14º e 18º d.p.i. em função do intenso parasitismo. Tal constatação explica porque em grande parte das vezes acredita-se que o parasitismo intestinal não é significativo e tem sido pouco explorado no modelo murino.

Em função das altas taxas de parasitemia e de mortalidade da cepa Y, optamos por tratar os animais pertencentes ao grupo de fase crônica com Benzonidazol no 11º d.p.i., a fim de controlar a parasitemia e, conseqüentemente, aumentar a sobrevivência (Guedes, Veloso *et al.*, 2002; Caldas, Talvani *et al.*, 2008). Mesmo assim aproximadamente 65% dos animais infectados não resistiram até o 15º m.p.i., uma vez que essa cepa é parcialmente resistente ao tratamento com esse fármaco (Filardi e Brener, 1987).

Na análise histopatológica ao 11º d.p.i, encontramos parasitos em toda a extensão das camadas musculares do cólon, especialmente, na muscular interna próximo a vasos e predominantemente nas áreas perivasculares da submucosa, possivelmente por essa ser a porta de entrada dos parasitos no intestino, já que as células endoteliais são as primeiras a entrarem em contato com o *T. cruzi* (Mukherjee, Huang *et al.*, 2004).

Os vasos apresentavam epitélio reativo e intenso infiltrado perivascular, sendo que essa lesão endotélial geralmente leva à disfunção vascular, que, conseqüentemente, acarreta proliferação celular, redução do fluxo sanguíneo e isquemia (Mukherjee, Huang

*et al.*, 2004). A ativação de sinal regulatório de quinase extracelular (ERK) iniciada na fase aguda persiste até a fase crônica da doença (Hassan, Mukherjee *et al.*, 2006).

Esse intenso parasitismo recruta células inflamatórias, predominantemente mononucleares, que migram para a camada muscular na qual fenômenos vasculares da inflamação, tais como edema e congestão são intensos e dissociam as fibras musculares. Dessa forma, ocorre aumento da espessura das camadas submucosa e musculares.

Houve correlação direta entre o aumento da espessura da parede total com o das camadas mucosa, submucosa, muscular total, camadas muscular interna e externa, corroborando que o espessamento de cada camada acarreta o aumento da espessura da parede total.

Em decorrência dos distúrbios vasculares houve necrose das fibras musculares, e consequentemente, a formação do tecido de granulação composto por colágeno tipo III, o que explica o aumento da área de fibra reticular na fase aguda da doença (Sirica, 1996). Todavia, com o passar do tempo, esse tecido de granulação inicial com finas fibrilas vai sendo substituído por tecido de cicatrização com neoformação de colágeno, que pode levar à formação de áreas de fibrose e interrupção da fibra muscular, quadro observado na fase avançada da doença em nossos animais.

Salienta-se que houve diminuição da espessura da camada mucosa, possivelmente devido à descamação do epitélio por necrose ou apoptose, além de aparente diminuição do tamanho e/ou do número de células caliciformes. Aponta-se que as células epiteliais intestinais tem propriedade de proteger e regular o SNE (Moriez, Abdo *et al.*, 2009), e o SNE controla funções epiteliais, como absorção, secreção, integridade, proliferação, barreira e sistema de defesa e o fluxo sanguíneo (Hansen, 2003b). Alterações proliferativas epiteliais podem ser decorrentes de diversos distúrbios luminiais ou intraparietais.

Os neurônios dos gânglios mientérico e submucoso aparentavam-se íntegros, apesar da rara presença de células inflamatórias e/ou ninhos no interior e ao redor do plexo mientérico, assim como descrito por outros autores que estudaram o intestino na fase aguda experimental (Camargos, Franco *et al.*, 2000).

Possivelmente, a delgada cápsula de tecido conjuntivo que envolve o plexo e previne a migração de parasitos e células inflamatórias ou as células gliais entéricas, as quais tem participação no suporte do SNE, modulando a homeostase, neurotransmissão, apresentação de antígeno e atividade motora gastrointestinal (Bassotti, Villanacci *et al.*, 2007), podem também participar dessa barreira.

Existem controvérsias sobre a irrigação sanguínea no SNE, trabalhos anteriores apontam que os capilares não penetram no plexo mientérico, que não apresentam parede fenestrada e existem junções entre as células endoteliais (Gershon e Bursztajn, 1978). Atualmente, sugere-se que capilares de nervos simpáticos e sensoriais são bastante permeáveis a macromoléculas e proteínas extravasadas e entram em contato com neuritos e neurônios do plexo submucoso e mientérico (Allen e Kiernan, 1990; 1994; Kiernan, 1996).

Todavia, neurônios dos plexos submucoso e mientérico expressam claudina-4, proteína componente da junção oclusiva com função de diminuir o transporte paracelular (Karaki, Kaji *et al.*, 2007), sendo essa uma forma de barreira seletiva não vascular que visa proteção neuronal.

Não observamos alteração das células da glia entéricas GFAP positivas no plexo mientérico, de forma diferente do trabalho de Da Silveira, Freitas *et al.* (2008a) que observou aumento da percentagem de células S100 imunorreativas expressando GFAP, especialmente na porção não dilatada do cólon comparada à área com megacólon. A diferença entre os resultados pode ser em decorrência de Da Silveira, Freitas *et al.* (2008a) terem avaliado área de 3mm<sup>2</sup> em cada gânglio e comparado regiões com e sem megacólon, ao contrário do nosso trabalho, que avaliou toda a extensão do cólon indiscriminadamente, no qual foram amostrados 30 gânglios mientéricos com área total média de 1614µm<sup>2</sup> em cada animal. Além, potenciais diferenças entre a patologia humana e murina também podem justificar a diferença dos dois trabalhos. Mesmo assim existe uma tendência de aumento na imunomarcagem da região proximal na fase crônica. Pretendemos explorar melhor esse achado aumentando a amostragem e utilizando outros marcadores tais como S100 para identificar as células acessórias do plexo.

Trabalhos com ratos Wistar infectados com 200.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, inóculo quatro vezes maior que o utilizado por nosso grupo, apontam na fase aguda (18° d.p.i.), diminuição significativa do número de neurônios do plexo mientérico no cólon e coração, todavia sem parasitos nos neurônios, além de infiltrado inflamatório intenso e focal de leucócitos e linfócitos na camada muscular (Garcia, Paula *et al.*, 1999).

Similarmente ao que observamos, na colite causada por administração de *Trichinella spiralis*, houve diminuição da atividade motora apesar de não ocorrer alterações significativas no número de neurônios no plexo submucoso e mientérico, o que acarretou profundas adaptações neuromusculares (Auli, Nasser *et al.*, 2008).

Trabalho anterior do nosso grupo relatou que a desnervação do trato gastrointestinal na fase aguda da infecção de camundongos C57BL/6 por *T. cruzi* é dependente da produção de NO. Embora camundongos geneticamente deficientes para enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) apresentassem mais pronunciado infiltrado inflamatório e ninhos do parasito na parede intestinal, não havia diminuição no número de neurônios do plexo mientérico. Além disso, animais geneticamente deficientes para IFN- $\gamma$  também não apresentaram perda neuronal ou infiltrado inflamatório na parede intestinal. Nesse trabalho a documentação de perda neuronal foi feita concomitantemente, por dois grupos distintos, e facilmente relacionada ao padrão de inflamação intensa dos gânglios, que apresentavam-se muitas vezes invadidos por leucócitos e parasitos nas células acessórias. A partir desse trabalho, mostrou-se que a desnervação mientérica que ocorre nesse modelo de fase aguda da DC é consequência da produção de NO decorrente da ativação de iNOS por IFN- $\gamma$  no foco inflamatório (Arantes, Marche *et al.*, 2004).

Esses resultados indicam que a resposta inflamatória no plexo mientérico e na parede intestinal dos camundongos C57BL/6 é mais intensa que a observada nos camundongos Swiss. Podemos especular que os camundongos Swiss produzam menos NO que os C57BL/6 e, conseqüentemente, haja certa proteção dos neurônios dos plexos. Por outro lado, o infiltrado inflamatório e o parasitismo, embora presentes na parede intestinal, foram escassos no plexo mientérico dos camundongos Swiss, o que poderia explicar a ausência de perda neuronal significativa.

Além disso, utilizamos uma metodologia para avaliação da desnervação bastante diferente, visto que Arantes, Marche *et al.* (2004) quantificaram o número total de neurônios presentes no plexo mientérico em 20 secções espaçadas por 25 $\mu$ m, para evitar que o mesmo gânglio fosse contado duas vezes, e amostrar grande número de gânglios. No presente trabalho, a área imunomarcada por PGP 9.5 foi quantificada, automaticamente, nos plexos submucoso e mientérico em 30 campos por animal, ou seja, não realizamos uma contagem tão extensa o que pode explicar não termos encontrado desnervação dos plexos.

Apesar de não haver diferença entre a área marcada por PGP 9.5 nos plexos dos grupos infectado e controle, não podemos afirmar que não houve lesão neuronal já que qualitativamente a intensidade da marcação diminuiu o que pode sugerir certo grau de lesão neuronal, uma vez que a PGP 9.5 é uma proteína estrutural (Doran, Jackson *et al.*, 1983) expressa no citoplasma de neurônios sem homologia com outras proteínas (Day e

Thompson, 1987) e que a morte neuronal é um processo lento (Hart, Terenghi *et al.*, 2008).

Neurônios que apresentam importantes alterações funcionais detectáveis na condução do impulso, diminuição da velocidade no transporte anterógrado e alterações sugestivas de acúmulo de proteínas ao longo do axônio, ou seja, perda de atividade funcional, ainda são imunomarcados por PGP 9.5 e apresentam integridade morfológica (Howe, 2008).

Déficits funcionais causados por lesões do nervo podem ser compensados por três mecanismos: regeneração dos axônios lesados, reinervação por ramificações de axônios não danificados, bem como remodelamento de circuitos do sistema nervoso relacionadas com funções perdidas (Navarro, Vivo *et al.*, 2007).

As lesões de nervos periféricos resultam em perda parcial ou total das funções motoras, sensoriais e autonômas transmitida pelo nervo lesado ao segmento desnervado, devido à interrupção da continuidade dos axônios, à degeneração das fibras nervosas distais da lesão e à eventual morte dos neurônios que sofreram axotomia. Após axotomia o fenótipo neuronal altera para um estado regenerativo, alterando a regulação de inúmeros componentes celulares, bem como a síntese “de novo” de algumas moléculas normalmente não expressas em neurônios adultos. Essas mudanças na expressão gênica ativam e regulam as vias responsáveis pela sobrevivência neuronal e regeneração axonal (Navarro, Vivo *et al.*, 2007). Após a perda da continuidade axonal, a parte isolada do axônio entra em degeneração Walleriana, que se inicia por fase latente com perda gradual da função dos canais iônicos que acarreta em anormalidades na excitabilidade e em falha na condução do impulso e desintegração axonal (Moldovan, Alvarez *et al.*, 2009), o que envolve desorganização de microtúbulos, fragmentação axonal e recrutamento de fagócitos para remover os remanescentes (Saxena e Caroni, 2007).

Assim sendo, a DC constitui um verdadeiro modelo intrínseco de desnervação do trato gastrointestinal humano às importantes alterações da motilidade no cólon e reto, perda do relaxamento do esfíncter anal e resposta anômala do estímulo colinérgico da bexiga (Meneghelli, 1985), apontando para a perda de integridade e função neuronal, o que ainda precisa ser validado no modelo murino.

Além da degeneração Walleriana, trabalhos apontam que o aumento nos níveis de fator de crescimento nervoso (NGF) e de fator neurotrófico derivado de célula da glia (GDNF) não alteram o número de neurônios sensoriais em regeneração, todavia o aumento de GDNF prejudica a regeneração de neurônios motores, influenciando tanto o

crescimento axonal à longa distância quanto a reinervação dos músculos alvo (Tannemaat, Eggers *et al.*, 2008).

Os neurônios imunomarcados pela PGP 9.5 estavam preservados nos gânglios na fase aguda, todavia, salienta-se que a densidade da inervação intermuscular da camada muscular interna nos animais do grupo infectado estava significativamente diminuída, em especial nos locais de intenso infiltrado inflamatório. Esse fato pode explicar a alteração funcional da coordenação motora do cólon que caracteriza a instalação do megacólon ou apontar o início de uma lesão pós-gangliônica a qual neurônios motores são susceptíveis. Além disso, acredita-se que considerável proporção de neurônios sensoriais morrem após lesão distal (Hart, Terenghi *et al.*, 2008).

O mesmo padrão de diminuição da imunomarcagem por PGP 9.5 das fibras intermusculares observado neste trabalho foi encontrado em pacientes chagásicos crônicos com megacólon, sendo que as fibras eram mais delgadas quando comparadas aos pacientes controles. Essa diminuição foi interpretada como perda axonal característica do quadro de megacólon, visto que pacientes chagásicos sem megacólon não apresentavam diferenças significativas na distribuição de fibras em relação ao grupo controle (Da Silveira, Lemos *et al.*, 2007).

Ao compararmos os animais dos grupos controles de fase aguda e crônica observamos que houve considerável diminuição da inervação intermuscular, ao longo do tempo, o que pode estar relacionado com o envelhecimento do animal. Trabalhos apontam correlação entre a DC e a idade dos pacientes, demonstrando em adicional comprometimento das alterações motoras do esôfago (Dantas e Aprile, 2006).

O plexo mientérico é afetado com o envelhecimento em roedores (Santer e Baker, 1988; Gabella, 1989) e humanos (Gomes, De Souza *et al.*, 1997; Hanani, Fellig *et al.*, 2004) e a perda de neurônios e células da glia entéricas de ambos os plexos inicia-se na idade adulta e progride com o passar do tempo, sendo que a intensidade dessa diminuição é maior no intestino grosso do que no delgado e no estômago (Phillips e Powley, 2007). Os achados demostram perda de neurônio excitatório especificamente colinérgico, células intersticiais de Cajal e paralela perda de células da glia, enquanto que os neurônios inibitórios aparentemente não são afetados (Camilleri, Cowen *et al.*, 2008). As células de Cajal são apontadas como marcapassos que coordenam movimentos peristálticos mediando os impulsos nervosos. Trabalhos apontam diminuição do número dessas células nas camadas musculares interna e externa e no plexo mientérico de pacientes com megaesôfago (De Lima, Cabrine-Santos *et al.*, 2008) e megacólon (Hagger, Finlayson *et al.*, 2000).

Na fase crônica, nosso trabalho é praticamente o único a examinar sistematicamente o intestino em animais mantidos por longos períodos, os quais atestadamente apresentaram parasitismo intestinal na fase aguda. Nós observamos escassos parasitos na camada muscular de alguns animais através do método da imuno-histoquímica, todavia, se utilizássemos testes mais sensíveis como o da PCR (Gomes, Macedo *et al.*, 1998) a presença do DNA do parasito em todos os animais certamente seria demonstrado.

No megasôfago humano aponta-se a importância da presença do parasito na manifestação clínica, no entanto, nem sempre relacionado com o infiltrado inflamatório (Guarner, Bartlett *et al.*, 2001; Lages-Silva, Crema *et al.*, 2001). Trabalhos apontam a variação da taxa de parasitemia, mortalidade e intensidade do infiltrado inflamatório em diferentes tecidos conforme a genética do parasito e do modelo experimental (Andersson, Orn *et al.*, 2003).

Na camada submucosa é patente o aspecto da vasculite crônica, quadro também descrito no megacólon de pacientes chagásicos crônicos, na qual há infiltrado inflamatório linfocitário quase exclusivamente de células T, plasmócito e eosinófilo em alguns casos, permeando toda a parede da veia ou artéria, com perda da estrutura da parede do vaso (Nogueira, 1996).

Eram escassos os infiltrados inflamatórios focais na camada muscular dos camundongos mantidos por 15 m.p.i.. Pacientes chagásicos crônicos assintomáticos apresentam maior nível de IFN- $\gamma$  produzido por células T CD8<sup>+</sup> do que pacientes sintomáticos. Todavia, em pacientes sintomáticos, as células T CD8 diferenciam-se em células de memória ou entram em apoptose (Albareda, Laucella *et al.*, 2006). Em nosso material, a quantificação da imunomarcagem diferencial dos leucócitos está em andamento.

Apesar da diminuição do infiltrado inflamatório em relação à fase aguda, na camada muscular houve aumento significativo do número de mastócitos em comparação ao grupo controle de fase crônica e também ao infectado de fase aguda. Estudos *in vitro* apontam que a desgranulação de mastócitos favorece a morte de neurônios mientéricos possivelmente via receptor de proteinase 2 ativado, prostaglandina-D2 e interleucina (IL)-6, sendo que a liberação de histamina, serotonina, heparina, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  não teve efeito (Sand, Themner-Persson *et al.*, 2009). Pretendemos estudar posteriormente o efeito direto do mastócito e de seus produtos em culturas de neurônios entéricos e simpáticos na presença do *T. cruzi*.



A presença dos mastócitos possivelmente relaciona-se com o aumento evidente de tecido conjuntivo peri-muscular e de focos fibróticos, o que tem importância no estabelecimento do megacólon (Pinheiro, Rua *et al.*, 2003; Da Silveira, Adad *et al.*, 2007).

Em tese, a lesão ocorrida durante a fase aguda causou degeneração e necrose das fibras musculares, e apesar de haver certo grau de regeneração e aumento do número de mitoses, o tecido muscular não conseguiu regenerar-se completamente; levando essas áreas a serem ocupadas por tecido conjuntivo, formando fibrose entre as fibras musculares, quadro também descrito em pacientes chagásicos com megacólon (Pinheiro, Rua *et al.*, 2003). No final da fase aguda observa-se presença de laminina, colágeno IV e fibronectina relacionada ao infiltrado inflamatório e colágeno III em depósitos peri-arteriais (Andrade, Grimaud *et al.*, 1989), onde durante a fibrogênese, fibrilas de colágeno são formadas a partir da fusão de finas e curtas fibrilas (Ushiki, 2002).

As fibras musculares da camada circular apresentavam-se hipertrofiadas em relação ao grupo controle e houve aumento da espessura de todas as camadas do cólon nos animais infectados de fase crônica. Segundo Koberle (1968) a dilatação e hipertrofia do cólon é iniciada quando a redução das células do gânglio ultrapassa o limite crítico de 55%, o que reforçaria a possibilidade de que a quantificação de neurônios que obtivemos esteja de alguma forma subestimada.

Esse mesmo quadro foi observado em pacientes com megareto e megasigmóide idiopático, no qual havia marcante hipertrofia da musculatura longitudinal e em menor intensidade da musculatura circular. Também, nesse sentido, nossas observações estão de acordo com a discreta/moderada fibrose e menor imunomarcção por actina e miosina das fibras musculares externas (Gattuso, Smith *et al.*, 1998), além de diminuição da densidade nervosa entre as fibras (Lourenssen, Wells *et al.*, 2005).

Alguns pacientes chagásicos apresentam, anatomicamente, sigmóide e reto dilatados e atônicos com espessamento muscular, infiltrado inflamatório na camada submucosa enquanto as camadas musculares estão normais com exceção de alguns infiltrados focais particularmente no plexo mientérico que apresenta perda neuronal (Todd, Porter *et al.*, 1969).

Na camada muscular interna hipertrofiada há aumento da eficiência da contração estimulada por ACh, SP e íons potássio e maior sensibilidade a mediadores de relaxamento da camada muscular externa. Em tecidos hipertróficos a força de contração da camada circular é muito maior que a da longitudinal (Bertoni, Ballabeni *et al.*, 2008).

Pacientes chagásicos com megacólon apresentam alteração da motilidade do intestino grosso (Meneghelli, De Godoy *et al.*, 1982) e salienta-se que pacientes chagásicos sem megavísceras também tem diminuição do trânsito intestinal (Santos, Barcelos *et al.*, 2000).

Sugere-se que após a obstrução mecânica do intestino delgado ocorre espessamento da parede em função da hipertrofia (Bertoni e Gabella, 2001), diminuição do número de células intersticiais de Cajal e plasticidade neuronal, com aumento do número de neurônios do plexo mientérico expressando VIP, galanina e outros enteropeptídeos (Ekblad, Sjuve *et al.*, 1998), alteração do número e da forma do pericário neuronal, degeneração e regeneração axonal (Jew, Williams *et al.*, 1989). Embora seja difícil isolar essas respostas no contexto da DC crônica, acreditamos que a plasticidade e a mudança fenotípica neuronal, com produção seletiva de alguns neurotransmissores, possam também ser demonstradas no nosso modelo.

Na fase crônica, diferentemente da fase aguda, observamos espessamento da mucosa. Tal como em ratos Wistar infectados com *T. cruzi* 10 m.p.i., a hiperplasia do epitélio possivelmente decorrente da maior renovação das células da cripta, o que aumenta a absorção e secreção no cólon e que pode ter participação na enteromegalia chagásica (Fernandes, Zucoloto *et al.*, 1991).

Nossa avaliação morfométrica não demonstrou diferenças entre o número de neurônios (desnervação) do plexo mientérico e área marcada por PGP 9.5 em ambos os plexos ao comparar o grupo controle e infectado de fase crônica, tal como em cães infectados com as cepas 147 e SC-1 (Machado, Camilo Junior *et al.*, 2001). No entanto, é importante ressaltar a grande dificuldade para amostrar, de forma representativa, o plexo lesado em animais de grande porte na ausência de megas visíveis que direcionem a coleta localizada do tecido, como no caso das necrópsias de pacientes chagásicos crônicos com megavísceras.

Observamos diminuição significativa na densidade da inervação intermuscular, tal como em pacientes com megacólon (Da Silveira, Lemos *et al.*, 2007), demonstrando que camundongos Swiss infectados com *T. cruzi* reproduzem aspectos importantes da forma digestiva da DC crônica.

Após a operação para produzir estenose experimental em ratos e cobaias observou-se hipertrofia das fibras musculares, com aumento do volume da camada muscular externa, além de diminuir a densidade de inervação intermuscular (Gabella 1975).

Trabalhos apontam que na colite induzida por ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS), que causa severa inflamação transmural, ocorre diminuição da resposta da célula muscular lisa entérica ao carbachol e serotonina durante a inflamação aguda, e mesmo após a resolução do processo inflamatório, observa-se hipertrofia e alterações da contração são detectáveis (Wells e Blennerhassett, 2004), ressaltando que é comum haver perda de neurônios mientéricos devido à intensa migração de células inflamatórias (Marlow e Blennerhassett, 2006) e também diminuição da inervação intermuscular (Lourenssen, Wells *et al.*, 2005).

Em ratos Wistar tratados com cloreto de benzalcônio (BAC), agente neurotóxico que causa ablação seletiva de neurônios e nervos no local da aplicação, houve espessamento da camada muscular do íleo e aumento das fibras elásticas com a mesma distribuição das fibras de neo-colágeno. Essa fibrose possivelmente preencheu as áreas em que houve diminuição das finas fibras reticulares ao redor de cada célula muscular (Borges, Caldini *et al.*, 2008), tal como observamos nos animais infetados de fase aguda. Nesse mesmo estudo, a desnervação intrínseca do trato gastrointestinal, especificamente do plexo de Auerbach, acarretou megacólon e megaesôfago caracterizados por hipertrofia da musculatura e hiperplasia da mucosa (Oliveira, Llorach-Velludo *et al.*, 1990; Febronio, Britto-Garcia *et al.*, 1997; Zucoloto, De Deus *et al.*, 1997) e da submucosa (Garcia, Oliveira *et al.*, 1996). No jejuno houve espessamento de ambas as camadas musculares, decorrente de hiperplasia aparentemente devido à necrose ou perda total do plexo mientérico (See, Epstein *et al.*, 1998).

A inflamação do intestino causa alterações estruturais e funcionais no SNE e embora essas alterações sejam evidentes em algumas situações, assegura-se que modificações relativamente sutis na neurofisiologia, como alterações das propriedades sinápticas e excitabilidade dos neurônios entéricos já podem causar disfunções gastrointestinais (Lomax, Fernandez *et al.*, 2005). A inflamação também altera as subpopulações de neurônios como, por exemplo, na colite ulcerativa, o remodelamento de neurônios do plexo mientérico de maioria colinérgicos muda para SP positivos (Neunlist, Aubert *et al.*, 2003), o que pode explicar os distúrbios de motilidade observados nessa doença.

A resposta do SNE varia de acordo com o local e tipo de inflamação, tal como as conseqüências funcionais dependem da natureza do estímulo inflamatório. Tornou-se claro que uma inflamação pode produzir mudanças em locais distantes no trato gastrointestinal, possivelmente em decorrência da alteração do conteúdo de algumas

classes funcionais dos neurônios entéricos. Ademais, há evidências do papel ativo das células gliais entéricas na comunicação neuro-immune, particularmente durante a inflamação (Lomax, Fernandez *et al.*, 2005).

Existe um balanço entre a inervação do plexo submucoso e o mientérico, visto que após desnervação extrínseca ou do plexo mientérico, a imunomarcagem para norepinefrina, TH e PGP 9.5 diminui e, subseqüentemente, há restabelecimento desses marcadores apontando que o plexo submucoso tem participação na inervação da camada muscular interna (Luck, Dahl *et al.*, 1993). Além disso, o plexo submucoso tem papel na proliferação axonal intrínseca e extrínseca (Lourenssen, Wells *et al.*, 2005; Yamada, Terayama *et al.*, 2006). Ainda não estudamos a inervação extrínseca no nosso modelo.

Trabalhos apontam que existem neurônios com capacidade de células tronco no trato gastrointestinal pós-natal (Kruger, Mosher *et al.*, 2002) e alterações neuroplásticas (Jew, Williams *et al.*, 1989). A mesma célula nervosa apresenta múltiplos componentes neuroquímicos em combinação específica criando o conceito de transmissão pluriquímica (Costa e Brookes, 2008). Em nosso material não observamos redução do número de células da glia ou de neurônios na fase crônica, o que seria de se esperar se houvesse parasitismo intenso dos elementos do SNE, o que também não ocorreu, a despeito da inflamação das camadas musculares e submucosa.

Apesar da existência dessas alterações na arquitetura intestinal, nota-se que o SNE é relativamente preservado, devido à capacidade neuroplástica que é observada tanto em estado fisiológico, no desenvolvimento ou na senescência, quanto em situações patológicas, mesmo em locais distantes dos focos inflamatórios. (Sharkey e Kroese, 2001). A maioria das características da plasticidade neuronal entérica acarreta em rearranjo dos nervos, perda de células do gânglio, alterações na síntese e liberação de neurotransmissores, bem como maior ou menor regulação da síntese de receptores (Vasina, Barbara *et al.*, 2006).

Desta forma, o presente trabalho apresentou a caracterização geral do modelo murino da DC e aponta para uma série de prováveis fatores e co-fatores atuantes na patogênese do megacólon que devem ser explorados em desdobramentos futuros.

## 7 – CONCLUSÕES

Os animais infectados, na fase aguda, apresentaram parasitemia patente, alta taxa de mortalidade e alterações histopatológicas inflamatórias na camada submucosa e muscular correlacionados ou não com a presença do parasito;

O modelo induziu espessamento das camadas musculares do cólon em função da inflamação aguda, caracterizada pela migração de células e edema entre as fibras musculares. Também foi observado aumento da área das fibras reticulares, possivelmente decorrente da necrose das fibras musculares que também é acompanhado por diminuição da inervação intermuscular, na fase aguda;

Os animais infectados, na fase crônica, apresentaram parasitismo escasso, infiltrado inflamatório focal, vasculite crônica difusa e aumento da população de mastócitos na camada muscular, associado à hipertrofia das fibras musculares, áreas de fibrose, alterações focais dos neurônios mientéricos e submucosos e diminuição intensa da inervação intermuscular;

O modelo murino de infecção crônica da DC reproduziu várias características histopatológicas do megacólon humano e temos perspectivas de estudar os aspectos da plasticidade neural neste modelo.

## 8 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Acosta, A. M. e C. A. Santos-Buch. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. Circulation, v.71, n.6, Jun, p.1255-61. 1985.
- Adad, S. J., C. G. Cancado, *et al.* Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. Virchows Arch, v.438, n.3, Mar, p.254-8. 2001.
- Albareda M. C., C. A. Laucella *et al.* *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients. Int Immunol, v.18, n.3, Mar, p.465-71. 2006.
- Allen, D. T. e J. A. Kiernan. A circulating exogenous protein can enter enteric nervous tissue in the rat. Neuroreport, v.1, n.1, Sep, p.33-6. 1990.
- Allen, D. T. e J. A. Kiernan. Permeation of proteins from the blood into peripheral nerves and ganglia. Neuroscience, v.59, n.3, Apr, p.755-64. 1994.
- Almeida-Leite, C. M., L. M. Galvao, *et al.* Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. Neurobiol Dis, v.25, n.1, Jan, p.170-8. 2007.
- Ament, M. E. Inflammatory disease of the colon: ulcerative colitis and Crohn's colitis. J Pediatr, v.86, n.3, Mar, p.322-34. 1975.
- Amiel, J., E. Sproat-Emison, *et al.* Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. J Med Genet, v.45, n.1, Jan, p.1-14. 2008.
- Andersson, J., A. Orn, *et al.* Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. Immunol Lett, v.86, n.2, Apr 3, p.207-12. 2003.
- Andrade, L. O., C. R. Machado, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Exp Parasitol, v.100, n.4, Apr, p.269-75. 2002.
- Andrade, S. G., J. A. Grimaud, *et al.* Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg, v.40, n.3, Mar, p.252-60. 1989.
- Andrade, S. G., J. B. Magalhaes, *et al.* Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. Bull World Health Organ, v.63, n.4, p.721-6. 1985.
- Andrade, Z. A., S. G. Andrade, *et al.* Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. Am J Pathol, v.144, n.6, Jun, p.1403-11. 1994.
- Anez, N., H. Carrasco, *et al.* Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg, v.60, n.5, May, p.726-32. 1999.

Arantes, R. M., H. H. Marche, *et al.* Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Am J Pathol, v.164, n.4, Apr, p.1361-8. 2004.

Arantes, R. M. e A. M. Nogueira. Distribution of enteroglucagon and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. Cell Tissue Res, v.290, n.1, p.61-69. 1997.

Araujo, E. J., M. Sant'ana Dde, *et al.* Regional differences in the number and type of myenteric neurons in the descending colon of rats. Arq Neuropsiquiatr, v.61, n.2A, Jun, p.220-5. 2003.

Aufderheide, A. C., W. Salo, *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.7, Feb 17, p.2034-9. 2004.

Auli, M., Y. Nasser, *et al.* Neuromuscular changes in a rat model of colitis. Auton Neurosci, v.141, n.1-2, Aug 18, p.10-21. 2008.

Avila, H. A., D. S. Sigman, *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol, v.48, n.2, Oct, p.211-21. 1991.

Barbosa, A. J. Immunocytochemical method for the identification of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in routine histological sections. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.27, n.6, Nov-Dec, p.293-7. 1985.

Barreto, M. L. e M. E. Andrade. Impact of Chagas' infection on some demographic characteristics: results of an ecological study. Cad Saude Publica, v.10 Suppl 2, p.273-80. 1994.

Bassotti, G., V. Villanacci, *et al.* Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies. World J Gastroenterol, v.13, n.30, Aug 14, p.4035-41. 2007.

Behmer, O. A., E. Tolosa, *et al.* Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Edart, Editora da Universidade de São Paulo. 1976.

Bellotti, G., E. A. Bocchi, *et al.* In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. Am Heart J, v.131, n.2, Feb, p.301-7. 1996.

Ben Younes-Chennoufi, A., M. Hontebeyrie-Joskowicz, *et al.* Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. . Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.82, p.77-83. 1988.

Bertoni, S., V. Ballabeni, *et al.* Intestinal chronic obstruction affects motor responsiveness of rat hypertrophic longitudinal and circular muscles. Neurogastroenterol Motil, v.20, n.11, Nov, p.1234-42. 2008.

Bertoni, S. e G. Gabella. Hypertrophy of mucosa and serosa in the obstructed intestine of rats. J Anat, v.199, n.Pt 6, Dec, p.725-34. 2001.

- Bonfa, E., V. S. Viana, *et al.* Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. J Immunol, v.150, n.9, May 1, p.3917-23. 1993.
- Bongioanni, P., M. Castagna, *et al.* Immunohistochemical study of the enteric glia in chronic intestinal inflammatory disease. Minerva Med, v.87, n.7-8, Jul-Aug, p.323-9. 1996.
- Borges, L. F., E. G. Caldini, *et al.* Differential distribution of some extracellular matrix fibers in an experimentally denervated rat megacolon. Micron, v.39, n.4, Jun, p.397-404. 2008.
- Brehmer A. Structure of enteric nervous. Adv Anat Embryol Cell Biol, v.186, p.1-91. 2006.
- Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.4, Nov-Dec, p.389-96. 1962.
- Brener, Z. Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann Trop Med Parasitol, v.59, Mar, p.19-26. 1965.
- Brener, Z., C. A. Costa, *et al.* Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.18, n.6, Nov-Dec, p.450-5. 1976.
- Cabarrocas, J., T. C. Savidge, *et al.* Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. Glia, v.41, n.1, Jan, p.81-93. 2003.
- Cabrine-Santos, M., E. Lages Silva, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). Exp Parasitol, v.99, n.3, Nov, p.160-7. 2001.
- Caldas, I. S., A. Talvani, *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. Parasitol Res, v.103, n.2, Jul, p.413-21. 2008.
- Calvert, R. J., M. Otsuka, *et al.* Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. J Nutr, v.119, n.11, Nov, p.1610-6. 1989.
- Camargos, E. R., D. J. Franco, *et al.* Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. Am J Trop Med Hyg, v.62, n.5, May, p.604-12. 2000.
- Camilleri, M., T. Cowen, *et al.* Enteric neurodegeneration in ageing. Neurogastroenterol Motil, v.20, n.4, Apr, p.418-29. 2008.
- Chagas, C. Über eine Trypanosomiasis des Menschen., v.Band XIII, p.5-7. 1909.
- Chagas, C. Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia. Mem Inst Oswaldo Cruz n.8, p.37-60. 1916.



- Chiari, E., J. C. Dias, *et al.* Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop, v.22, n.1, Jan-Mar, p.19-23. 1989.
- Correa-Oliveira, R., J. Gomes, *et al.* The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.94 Suppl 1, p.253-5. 1999.
- Costa, M. e S. H. Brookes. Architecture of enteric neural circuits involved in intestinal motility. Eur Rev Med Pharmacol Sci, v.12 Suppl 1, Aug, p.3-19. 2008.
- Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.102 Suppl 1, Oct 30, p.113-22. 2007.
- Cunha-Neto, E. e J. Kalil. Autoimmunity in Chagas' heart disease. Sao Paulo Med J, v.113, n.2, Mar-Apr, p.757-66. 1995.
- Cunha-Neto, E., V. Coelho, *et al.* Autoimmunity in Chagas' Disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in the heart lesion of chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest, v.98, n.8, Oct, p.1709-1712. 1996.
- Da Silveira, A. B., S. J. Adad, *et al.* Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. Parasitology, v.134, n.Pt 6, Jun, p.789-96. 2007.
- Da Silveira, A. B., R. M. Arantes, *et al.* Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. Parasitology, v.131, n.Pt 5, Nov, p.627-34. 2005.
- Da Silveira, A. B., D. D'avila Reis, *et al.* Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. Dig Dis Sci, v.52, n.10, Oct, p.2877-83. 2007.
- Da Silveira, A. B., M. A. Freitas, *et al.* Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. Hum Pathol, Oct 3. 2008a.
- Da Silveira, A. B., M. A. Freitas, *et al.* Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. Parasitology, v.135, n.11, Sep, p.1337-42. 2008b.
- Da Silveira, A. B., E. M. Lemos, *et al.* Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. . Hum.Pathol., v.38 n.8, p.1256-1264. 2007.
- Dantas, R. O. e L. R. Aprile. Comparison of esophageal motility impairment caused by Chagas' disease in two age groups. Arq Gastroenterol, v.43, n.3, Jul-Sep, p.196-200. 2006.
- Day, I. N. e R. J. Thompson. Molecular cloning of cDNA coding for human PGP 9.5 protein. A novel cytoplasmic marker for neurones and neuroendocrine cells. FEBS Lett, v.210, n.2, Jan 5, p.157-60. 1987.

De Fontgalland, D., D. A. Wattchow, *et al.* Immunohistochemical characterization of the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels. Neurogastroenterol Motil, v.20, n.11, Nov, p.1212-26. 2008.

De Giorgio, R., G. Barbara, *et al.* The innervation of the digestive tract: its morphofunctional and neurochemical aspects. Minerva Gastroenterol Dietol, v.42, n.2, Jun, p.83-91. 1996.

De Lima, M. A., M. Cabrine-Santos, *et al.* Interstitial cells of Cajal in chagasic megaesophagus. Ann Diagn Pathol, v.12, n.4, Aug, p.271-4. 2008.

Dias, E., F. S. Laranja, *et al.* Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation, v.14, n.6, Dec, p.1035-60. 1956.

Dias, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. Rev Soc Bras Med Trop, v.22, n.3, Jul-Sep, p.147-56. 1989.

Dias, J. C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.102 Suppl 1, Oct 30, p.11-8. 2007.

Doran, J. F., P. Jackson, *et al.* Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. J Neurochem, v.40, n.6, Jun, p.1542-7. 1983.

Dos Santos, D. M., A. Talvani, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. Exp Parasitol, v.121, n.1, Jan, p.8-14. 2009.

Ekblad, E., R. Sjuve, *et al.* Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. Gut, v.42, n.6, Jun, p.836-44. 1998.

Elias, F. E., C. A. Vigliano, *et al.* Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. Am J Trop Med Hyg, v.68, n.2, Feb, p.242-7. 2003.

Emery, J. L. Colonic retention syndrome (megacolon) associated with immaturity of intestinal intramural plexus. Proc R Soc Med, v.66, n.3, Mar, p.222-3. 1973.

Febronio, L. H., S. Britto-Garcia, *et al.* Megaesophagus in rats. Res Exp Med (Berl), v.197, n.2, p.109-15. 1997.

Fernandes, M. I., S. Zucoloto, *et al.* Morphometric investigations of the colon mucosa in chronic *Trypanosoma cruzi* infected rats. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, v.60, n.2, p.119-22. 1991.

Fernandes, O., R. P. Souto, *et al.* Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg, v.58, n.6, Jun, p.807-11. 1998.

- Filardi, L. S. e Z. Brener. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.81, n.5, p.755-9. 1987.
- Freitas, J. M., L. O. Andrade, *et al.* The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. PLoS ONE, v.4, n.4, p.e5113. 2009.
- Freitas, J. M., E. Lages-Silva, *et al.* Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. Int J Parasitol, v.35, n.4, Apr 1, p.411-7. 2005.
- Furness, J. B., N. Clerc, *et al.* Memory in the enteric nervous system. Gut, v.47 Suppl 4, Dec, p.iv60-2; discussion iv76. 2000.
- Furness, J. B. e M. Costa. The Enteric Nervous System. Churchill Livingstone, New York. 1987.
- Furness, J. B., H. L. Robbins, *et al.* Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. Cell Tissue Res, v.317, n.1, Jul, p.1-12. 2004.
- Gabella, G. Hypertrophy of intestinal smooth muscle. Cell Tissue Res, v.163, n.2, p.199-214.1975.
- Gabella, G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. Gastroenterology, v.96, n.6, Jun, p.1487-93. 1989.
- Gabella, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. J Auton Nerv Syst, v.30 Suppl, Jul, p.S59-66. 1990.
- Garcia, S. B., J. S. Oliveira, *et al.* The relationship between megacolon and carcinoma of the colon: an experimental approach. Carcinogenesis, v.17, n.8, Aug, p.1777-9. 1996.
- Garcia, S. B., J. S. Paula, *et al.* Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol, v.93, n.4, Dec, p.191-7. 1999.
- Gattuso, J. M., V. V. Smith, *et al.* Altered contractile proteins and neural innervation in idiopathic megarectum and megacolon. Histopathology, v.33, n.1, Jul, p.34-8. 1998.
- Gershon, M. D. e S. Bursztajn. Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa. J Comp Neurol, v.180, n.3, Aug 1, p.467-88. 1978.
- Gomes, M. L., A. M. Macedo, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol, v.88, n.1, Jan, p.28-33. 1998.
- Gomes, O. A., R. R. De Souza, *et al.* A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. Gerontology, v.43, n.4, p.210-7. 1997.

- Guarner, J., J. Bartlett, *et al.* Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. Am J Trop Med Hyg, v.65, n.2, Aug, p.152-8. 2001.
- Guedes, P. M., V. M. Veloso, *et al.* *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.102, n.2, May, p.141-7. 2007.
- Guedes, P. M., V. M. Veloso, *et al.* The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. Acta Trop, v.84, n.1, Oct, p.9-17. 2002.
- Guillén-Pernia, B., A. Lugo-Yarub, *et al.* Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Invest. Clín., v.42. 2001.
- Hagger, R., C. Finlayson, *et al.* A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. J Auton Nerv Syst, v.80, n.1-2, Apr 12, p.108-11. 2000.
- Hanani, M., Y. Fellig, *et al.* Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. Auton Neurosci, v.113, n.1-2, Jun 30, p.71-8. 2004.
- Hansen, M. B. The enteric nervous system I: organisation and classification. Pharmacol Toxicol, v.92, n.3, Mar, p.105-13. 2003a.
- Hansen, M. B. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. Pharmacol Toxicol, v.92, n.6, Jun, p.249-57. 2003b.
- Hart, A. M., G. Terenghi, *et al.* Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. Neurol Res, v.30, n.10, Dec, p.999-1011. 2008.
- Hassan, G. S., S. Mukherjee, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells. Infect Immun, v.74, n.1, Jan, p.152-9. 2006.
- Higuchi Mde, L., P. S. Gutierrez, *et al.* Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, v.423, n.3, p.157-60. 1993.
- Howe, C. L. Immunological aspects of axon injury in Multiple Sclerosis. Advances in Multiple Sclerosis and Experimental Demyelinating Disease. Current Topics in Microbiology and Immunology, p.93-131. 2008.
- Jessen, K. R. e R. Mirsky. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. Nature, v.286, n.5774, Aug 14, p.736-7. 1980.
- Jew, J. Y., T. H. Williams, *et al.* The intestine as a model for neuronal plasticity. Arch Histol Cytol, v.52 Suppl, p.167-80. 1989.
- Jones, E. M., D. G. Colley, *et al.* A *Trypanosoma cruzi* DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Trans Assoc Am Physicians, v.105, p.182-9. 1992.

- Junqueira, L. C. U. e J. Carneiro. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan. 2004. 540 p.
- Kalil, J. e E. Cunha-Neto. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today*, v.12, n.10, Oct, p.396-9. 1996.
- Kandel, E., J. Schwartz, *et al.* *Principles of neural science*. Norwalk: Appleton & Lange. 1991
- Karaki, S., I. Kaji *et al.* The tight junction component protein, claudin-4, is expressed by enteric neurons in the rat distal colon. *Neurosci Lett*, v.428, n.2-3, p.88-92, 2007.
- Kiernan, J. A. Vascular permeability in the peripheral autonomic and somatic nervous systems: controversial aspects and comparisons with the blood-brain barrier. *Microsc Res Tech*, v.35, n.2, Oct 1, p.122-36. 1996.
- Kierszenbaum, F. Chronic chagasic tissue lesions in the absence of *Trypanosoma cruzi*: a proposed mechanism. *Parasitol Today*, v.12, n.11, Nov, p.414-5. 1996.
- Koberle, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol*, v.6, p.63-116. 1968.
- Koeberle, F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas Disease. *Gut*, v.4, Dec, p.399-405. 1963.
- Kruger, G. M., J. T. Mosher, *et al.* Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, v.35, n.4, Aug 15, p.657-69. 2002.
- Lages-Silva, E., E. Crema, *et al.* Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg*, v.65, n.5, Nov, p.435-41. 2001.
- Laine, L., K. Takeuchi, *et al.* Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, v.135, n.1, Jul, p.41-60. 2008.
- Levin, M. J. In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. *Parasitol Today*, v.12, n.11, Nov, p.415-6. 1996.
- Lomax, A. E., E. Fernandez, *et al.* Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil*, v.17, n.1, Feb, p.4-15. 2005.
- Lopes, E. R., E. Chapadeiro, *et al.* Bogliolo Patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987
- Lourenssen, S., A. Jeromin, *et al.* Intestinal inflammation modulates expression of the synaptic vesicle protein neuronal calcium sensor-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.282, n.6, Jun, p.G1097-104. 2002.
- Lourenssen, S., R. W. Wells, *et al.* Differential responses of intrinsic and extrinsic innervation of smooth muscle cells in rat colitis. *Exp Neurol*, v.195, n.2, Oct, p.497-507. 2005.

- Luck, M. S., J. L. Dahl, *et al.* Neuroplasticity in the smooth muscle of the myenterically and extrinsically denervated rat jejunum. Cell Tissue Res, v.271, n.2, Feb, p.363-74. 1993.
- Macedo, A. M., C. R. Machado, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.1, Feb, p.1-12. 2004.
- Machado, E. M., D. J. Camilo Junior, *et al.* Morphometry of submucous and myenteric esophageic plexus of dogs experimentally reinfected with *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.96, n.4, May, p.545-8. 2001.
- Maifrino, L. B., S. O. Amaral, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: preliminary investigation of NADH-positive and somatostatin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. Exp Parasitol, v.111, n.4, Dec, p.224-9. 2005.
- Maifrino, L. B., E. A. Liberti, *et al.* Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg, v.60, n.5, May, p.721-5. 1999.
- Marks, D. J., F. Z. Rahman, *et al.* Crohn's Disease: an Immune Deficiency State. Clin Rev Allergy Immunol, May 13. 2009.
- Marlow, S. L. e M. G. Blennerhassett. Deficient innervation characterizes intestinal strictures in a rat model of colitis. Exp Mol Pathol, v.80, n.1, Feb, p.54-66. 2006.
- Meneghelli, U. G. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. Braz J Med Biol Res, v.18, n.3, p.255-64. 1985.
- Meneghelli, U. G., R. A. De Godoy, *et al.* Basal motility of dilated and non-dilated sigmoid colon and rectum in Chagas' disease. Arq Gastroenterol, v.19, n.3, Jul-Sep, p.127-32. 1982.
- Mirkin, G. A., A. M. Celentano, *et al.* Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. Clin Exp Immunol, v.107, n.2, Feb, p.328-34. 1997.
- Moldovan, M., S. Alvarez, *et al.* Motor axon excitability during Wallerian degeneration. Brain, v.132, n.Pt 2, Feb, p.511-23. 2009.
- Moncayo, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.98, n.5, Jul, p.577-91. 2003.
- Moriez, R., H. Abdo, *et al.* Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: role of epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun, v.382, n.3, May 8, p.577-82. 2009.
- Mukherjee, S., H. Huang, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. Infect Immun, v.72, n.9, Sep, p.5274-82. 2004.

- Nada, O. e T. Kawana. Immunohistochemical identification of supportive cell types in the enteric nervous system of the rat colon and rectum. Cell Tissue Res, v. 251, n.3, p.523-529. 1988.
- Navarro, X., M. Vivo, *et al.* Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. Prog Neurobiol, v.82, n.4, Jul, p.163-201. 2007.
- Neunlist, M., P. Aubert, *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. Gut, v.52, n.1, Jan, p.84-90. 2003.
- Nogueira, A. M. M. F. Megacólon chagásico: estudo histopatológico e do sistema nervoso entérico com ênfase na inervação colinérgica. Belo Horizonte 1996. (Tese de doutorado)
- Oliveira, E. C., M. M. Fujisawa, *et al.* Neuropathy of gastrointestinal Chagas' disease: immune response to myelin antigens. Neuroimmunomodulation, v.16, n.1, Jan, p.54-62. 2009.
- Oliveira, J. S., M. A. Llorach-Velludo, *et al.* Megacolon in rats. Digestion, v.45, n.3, p.166-71. 1990.
- Parada, H., H. A. Carrasco, *et al.* Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. Int J Cardiol, v.60, n.1, Jun 27, p.49-54. 1997.
- Phillips, R. J. e T. L. Powley. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. Auton Neurosci, v.136, n.1-2, Oct 30, p.1-19. 2007.
- Pinheiro, S. W., A. M. Rua, *et al.* Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.4, Jul-Aug, p.461-6. 2003.
- Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis, v.1, n.2, Sep, p.92-100. 2001.
- Qu, Z. D., M. Thacker, *et al.* Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. Cell Tissue Res, v.334, n.2, Nov, p.147-61. 2008.
- Ribeiro, B. M., E. Crema, *et al.* Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. Hum Immunol, v.69, n.8, Aug, p.484-9. 2008.
- Sand, E., A. Themner-Persson, *et al.* Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture. Neuropharmacology, v.56, n.2, Feb, p.522-30. 2009.
- Sang, Q., S. Williamson, *et al.* Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. J Anat, v.190 ( Pt 2), Feb, p.209-22. 1997.
- Sang, Q. e H. M. Young. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. Anat Rec, v.251, n.2, Jun, p.185-99. 1998.

Santer, R. M. e D. M. Baker. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. J Auton Nerv Syst, v.25, n.1, Nov, p.59-67. 1988.

Santos, S. L., I. K. Barcelos, *et al.* Total and segmental colonic transit time in constipated patients with Chagas' disease without megaesophagus or megacolon. Braz J Med Biol Res, v.33, n.1, Jan, p.43-9. 2000.

Savidge, T. C., M. V. Sofroniew, *et al.* Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. Lab Invest, v.87, n.8, Aug, p.731-6. 2007.

Saxena, S. e P. Caroni. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. Prog Neurobiol, v.83, n.3, Oct, p.174-91. 2007.

Sharkey, K. A. e A. B. Kroese. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. Anat Rec, v.262, n.1, Jan 1, p.79-90. 2001.

See, N. A., M. L. Epstein, *et al.* Hyperplasia of jejunal smooth muscle in the myenterically denervated rat. Cell Tissue Res, v.253, n.3, p.609-617. 1998.

Silva, L. H. P. e V. Nussenzweig. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. . Folia Clin. Biol., v.20, p.191-203. 1953.

Sirica, A. E. Cellular and Molecular Pathogenesis, Lippincott-Raven, Philadelphia. New York. 1996

Smith, B. Disorders of the myenteric plexus. Gut, v.11, n.3, Mar, p.271-4. 1970.

Tafuri, W. L., T. A. Maria, *et al.* Electron microscopy of the myocardium in human trypanosomiasis cruzi. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.15, n.6, Nov-Dec, p.347-70. 1973.

Tannemaat, M. R., R. Eggers, *et al.* Differential effects of lentiviral vector-mediated overexpression of nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor on regenerating sensory and motor axons in the transected peripheral nerve. Eur J Neurosci, v.28, n.8, Oct, p.1467-79. 2008.

Tanowitz, H. B., L. V. Kirchhoff, *et al.* Chagas' disease. Clin Microbiol Rev, v.5, n.4, Oct, p.400-19. 1992.

Teixeira, A. R., M. L. Teixeira, *et al.* The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. Am J Pathol, v.80, n.1, Jul, p.163-80. 1975.

Todd, I. P., N. H. Porter, *et al.* Chagas disease of the colon and rectum. Gut, v.10, n.12, Dec, p.1009-14. 1969.

Truex, R. e M. Carpenter. Human Neuroanatomy. The Williams & Wilkins Company. 1969



Umezawa, E. S., M. S. Nascimento, *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol, v.34, n.9, Sep, p.2143-7. 1996.

Ushiki, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. Arch Histol Cytol, v.65, n.2, Jun, p.109-26. 2002.

Vago, A. R., L. O. Andrade, *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am J Pathol, v.156, n.5, May, p.1805-9. 2000.

Vasina, V., G. Barbara, *et al.* Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. Auton Neurosci, v.126-127, Jun 30, p.264-72. 2006.

Veloso, V. M. Doença de Chagas experimental em cães da raça Beagle: avaliação clínica, parasitológica, histopatológica e molecular. Belo Horizonte. 2007. (Tese de doutorado)

Villela, M. M., J. M. Souza, *et al.* Evaluation of the Chagas Disease Control Program and presence of *Panstrongylus megistus* in central-western Minas Gerais State, Brazil. Cad Saude Publica, v.25, n.4, Apr, p.907-17. 2009.

Wedel, T., U. Roblick, *et al.* Disorders of intestinal innervation as a possible cause for chronic constipation. Zentralbl Chir, v.124, n.9, p.796-803. 1999.

Wells, R. W. e M. G. Blennerhassett. Persistent and selective effects of inflammation on smooth muscle cell contractility in rat colitis. Pflugers Arch, v.448, n.5, Aug, p.515-24. 2004.

World Health Organization. Report of the scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas' Disease. WHO Technical Report Series, 1984.

World Health Organization. Control of Chagas Disease. Report a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, v.95, p.811. 1991.

World Health Organization. Control of Chagas' disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, v.905. 2002.

World Health Organization. Tropical Disease Research: progress 2003-2004 Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. . Programme Report 17. 2005.

Wood, J. D., D. H. Alpers, *et al.* Fundamentals of neurogastroenterology. Gut, v.45 Suppl 2, Sep, p.II6-III6. 1999.

Yamada, M., R. Terayama, *et al.* Regeneration of the abdominal postganglionic sympathetic system. Neurosci Res, v.54, n.4, Apr, p.261-8. 2006.

Zhang, L. e R. L. Tarleton. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis, v.180, n.2, Aug, p.480-6. 1999.

Zucoloto, S., D. A. De Deus, *et al.* The relationship between myenteric neuronal denervation, smooth muscle thickening and epithelial cell proliferation in the rat colon. Res Exp Med (Berl), v.197, n.2, p.117-24. 1997.