

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

PATRÍCIA ROCHA MARTINS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MASTÓCITOS NA IMUNOPATOLOGIA DO
MEGACÓLON CHAGÁSICO, COM ÊNFASE NA SUA INTERAÇÃO COM
NEURÔNIOS E EOSINÓFILOS**

Belo Horizonte

2015

PATRÍCIA ROCHA MARTINS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MASTÓCITOS NA IMUNOPATOLOGIA DO
MEGACÓLON CHAGÁSICO, COM ÊNFASE NA SUA INTERAÇÃO COM
NEURÔNIOS E EOSINÓFILOS**

Tese de doutorado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular.

Linha de Pesquisa: Imunopatologia da forma digestiva da doença de Chagas

Orientadora: Débora d'Ávila Reis

Coorientadora: Patrícia Massara Martinelli

BELO HORIZONTE

2015

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório Prof^a. Conceição Machado do departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas - ICB em conjunto com o Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e com o Laboratório de Doença de Chagas e Hospital Escola da Universidade Federal de Goiás.

Colaboradores:

Dra. Cleida Aparecida de Oliveira¹

Dra. Cristiane Menezes¹

Dr. Enio Chaves de Oliveira²

Dr. Alejandro O. Luquetti²,

1. Universidade Federal de Minas Gerais
2. Universidade Federal de Goiás

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

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, João e Assunção, que com amor me educaram e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, e as minhas irmãs, Juliane, Emanuelli e Jullyete, que com carinho me apoiaram nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Débora d'Ávila Reis, por ter me recebido em seu laboratório, que com carinho de uma “mãe” e ética de uma verdadeira cientista, me ensinou a ter um pensamento crítico e ao mesmo tempo fascinante da pesquisa.

Agradeço a professora Patricia Massara Martinelli, com quem pude aprender muito, pela atenção e orientação em todos os experimentos. Ela com seu dom de ensinar me inspira a continuar no caminho da docência.

Agradeço as agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, que propiciaram a realização desse trabalho.

Agradeço as alunas de iniciação científica Aline e Júlia, pela amizade e grande ajuda nesse trabalho.

Agradeço aos colaboradores: Dr. Enio, Prof. Luquette, Prof^a. Cleida, e Prof^a. Cristiane, que se disponibilizaram a contribuir com amostras e reagentes para realização desse trabalho.

Agradeço a todos os professores e colegas do laboratório Professora Conceição Machado, onde trocamos experiências e amizades.

Agradeço ao Carlos Henrique, técnico do laboratório Prof^a. Conceição Machado, por toda ajuda e amizade.

Agradeço a Luana, Rodolfo, Andrei e Jaqueline, alunos da professora Débora, pela amizade e companheirismo durante o mestrado e doutorado.

Agradeço a todos os professores da Pós-graduação em Biologia Celular, do departamento de Morfologia, por toda convivência e aprendizado.

Agradeço a todos os amigos da Pós-graduação em Biologia Celular, do departamento de Morfologia, por toda convivência, companheirismo e amizade.

Agradeço a DEUS, meus familiares, amigos e ao Ministério das Universidades renovadas (MUR), que são essências na minha vida.

"Os limites do mundo os meus pés não ultrapassam,

mas o que de mais alto existe,

minha alma alcança".

RESUMO

O megacólon é a complicação mais frequentemente observada entre os indivíduos que desenvolvem a forma clínica digestiva da doença de Chagas. Os pacientes apresentam dilatação e distúrbios de motilidade da porção reto-sigmóide do órgão, devido ao processo de desnervação. Números elevados de mastócitos (MC) e eosinófilos são constantemente observados no cólon dilatado, o que sugere um papel para essas células no desenvolvimento desse processo patológico. Além disso, os números de MCs expressando triptase (triptase - imunorreativo - IR) estão negativamente correlacionados com a área de fibras nervosas que expressam PGP 9.5 (marcador pan-neuronal) ou polipeptídio intestinal vasoativo (VIP-IR), um neuromediador anti-inflamatório. Em vista desses dados, levantamos a hipótese de que MCs triptase-IR desempenham um papel relevante no processo de inflamação e desnervação, relevantes na patologia do megacólon chagásico. A triptase é uma protease que cliva o receptor ativado por protease 2 (PAR2) na superfície de neurônios e de células inflamatórias, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, o recrutamento de leucócitos, especialmente eosinófilos, e a ativação e morte neuronal. Aqui, demonstramos a expressão de PAR2 por neurônios, confirmando os dados da literatura. Em cólon de pacientes com megacólon, observamos números elevados de MCs triptase-IR ou quimase-IR, estando a maioria deles com sinais de ativação (desgranulação *piecemeal* ou anafilática), e alguns localizados bem próximos (menos de 5 µm) de neurônios. Além disso, observamos uma correlação positiva entre o número de MCs triptase-IR e eosinófilos, bem como aumento do número de eosinófilos PAR2-IR no cólon de pacientes com megacólon. Em conjunto com os dados da literatura, os resultados aqui apresentados sugerem um papel para MCs triptase-IR na ativação e recrutamento de eosinófilos, no processo de desnervação e, consequentemente, no desenvolvimento do megacólon.

Palavras-chave: Desgranulação *piecemeal* e anafilática; Mastócitos triptase-IR; eosinófilos; PAR2; interação neuroimune; megacólon chagásico.

ABSTRACT

Megacolon is the most frequently observed complication among individuals who develop the digestive clinical form of Chagas disease. Patients present dilation of the rectum-sigmoid portion and motility disorders, due to the denervation process. Increasing of mast cell (MCs) and eosinophil numbers are constantly observed in the dilated colon, which suggests a role for those cells in such pathology. Besides, the numbers of tryptase-immunoreactive (IR) MCs are negatively correlated with the area of nerve fibers expressing PGP 9.5 or vasoactive intestinal polypeptide (VIP-IR), an anti-inflammatory neuromediator. On view of those data, we suggest that tryptase-IR MCs could play a role in the chronic infection associated inflammation and denervation process. Tryptase is a protease that cleaves the protease-activated receptor type 2 (PAR2) on the surface of inflammatory cells and neurons, inducing the production of pro-inflammatory cytokines, leukocyte recruitment, specially eosinophils, and neuronal activation and death. Here we demonstrated the expression of PAR2 by neurons, confirming data from the literature. In colon of patients with megacolon, we observed increased numbers of tryptase-IR or chymase-IR MCs, being most of them with signs of activation (piecemeal or anaphylactic degranulation), and some in close proximity (less than 5 μ m) to neurons. Besides, we observed a positive correlation between numbers of tryptase-IR MCs and eosinophils, and increased numbers of PAR2-IR eosinophils in colon of patients with megacolon. In conjunction with data from the literature, the results presented here suggest a role for tryptase-IR MCs in eosinophil activation and recruitment, in the denervation process and, consequently, in the development of megacolon.

Key words: Piecemeal and anaphylactic degranulation; Tryptase-IR mast cells; eosinophils; PAR2; neuroimmune interaction; chagasic megacolon.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Densidade de mastócitos (MCs) corados por Giemsa no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados.....47
- Figura 2.** Aspectos ultraestruturais da desgranulação *piecemeal* e anafilática em mastócitos na lâmina própria/ submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*.....49
- Figura 3.** Aspectos ultraestruturais de grânulos de mastócitos na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*.....50
- Figura 4.** Aspectos ultraestruturais de mastócitos não desgranulados e desgranulados na lâmina própria/ submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*.....52
- Figura 5.** Análise ultraestrutural de mastócitos não desgranulados e desgranulados no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados.....53
- Figura 6.** Densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados.....55
- Figura 7.** Ultramicrografia eletrônica mostrando mastócito desgranulado em proximidade a nervos na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*.....57
- Figura 8.** Ultramicrografias eletrônicas mostrando mastócito, vaso sanguíneo e nervo na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduo infectado com *Trypanosoma cruzi*.....58
- Figura 9.** Número de mastócitos (MCs) em proximidade < 5µm de nervos em indivíduos infectados e não infectados e correlação com o número de MCs desgranulados totais.....56
- Figura 10.** Expressão de triptase por mastócitos (MCs) no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados.....60
- Figura 11.** Expressão de quimase por mastócitos (MCs) no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados.....61
- Figura 12.** Correlação entre o número de mastócitos (MCs) triptase-IR ou quimase-IR e área de PGP 9.5-IR no cólon de indivíduos infectados e não infectados.....62
- Figura 13.** Expressão de PAR2 em neurônios no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e de indivíduos não infectados.....64

Figura 14. Distribuição de eosinófilos no cólon de indivíduos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e indivíduos não infectados.....	66
Figura 15. Correlação entre o número de eosinófilos e o número de mastócitos (MCs) triptase-IR no cólon de indivíduos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
Figura 16. Distribuição de eosinófilos PAR2-IR no cólon de indivíduos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e indivíduos não infectados.....	68
Figura 17. Correlação entre o número de eosinófilos PAR2-IR o número de mastócitos (MCs) triptase-IR no cólon de indivíduos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e indivíduos não infectados.....	69
Figura 18. Ultramicrografias eletrônicas de mastócito e eosinófilo na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduo infectado com <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
Figura 19. Ultramicrografias eletrônicas de eosinófilos na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduo infectado com <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
Figura 20. Níveis séricos de triptase em indivíduos não infectados e infectados com megacólon.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupo de estudo.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

CD – Grupamento de diferenciação

CCL- Ligante de quimiocina

CCR - Receptor de quimiocinas

EDN -Neurotoxina derivada de eosinófilos

ECP - Proteína eosinofílica catiônica

GM-CSF- Fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos

HB-EGF- Fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina

H&E - Hematoxilina & Eosina

IR- Imunorreativo

ICAM- Molécula de adesão celular

IFN- Interferon

IL – Interleucina

IPANs - Neurônios intrínsecos primários aferentes

LT- Leucotrienos

MBP - Proteína básica principal

MC- Mastócito

MCP- Proteína quimiotática de monócito

MIP- Proteína inflamatória de macrófagos

MMP- Matriz metaloproteinase

NGF- Fator de crescimento neuronal

NK- Receptor de neurocinina

PAF- Fator ativador de plaquetas

PAR- Receptor ativado por protease

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGP 9.5 - Proteína gene produzida 9.5

SCF - Fator de crescimento de células tronco

SNC - Sistema nervoso central

SNE - Sistema nervoso entérico

SP - Substância P

TIA-1 - Antígeno intracitoplasmático de células T

TGF- Fator de crescimento tumoral

TGI- Trato gastrointestinal

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VEGF- Fator de crescimento endotelial

VIP - Polipeptídeo intestinal vasoativo

VPAC- receptor de polipeptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Doença de Chagas.....	14
1.2 Forma digestiva.....	17
1.3 Mastócitos no trato gastrointestinal.....	23
1.4 Mastócitos e interações neuroimunes no trato gastrointestinal.....	30
1.5 Eosinófilos e sua interação com mastócitos.....	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3. CASUÍSTICA.....	37
3.1 Pacientes e coleta de amostras.....	37
3.2 Preparação das amostras para microscopia óptica.....	39
3.3 Imunoperoxidase indireta.....	39
3.4 Análise morfológica.....	41
3.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	42
3.6 Dosagem de triptase.....	44
3.7 Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Evidências da participação de mastócitos (MCs) na patologia do megacólon chagásico.....	46
4.1.1 Análise comparativa da densidade de MCs.....	46
4.1.2 Avaliação ultraestrutural dos MCs.....	46
4.1.3 Correlação entre o número de MCs e densidade de fibras nervosas.....	54
4.1.4 Avaliação ultraestrutural das relações espaciais entre MCs e nervos.....	56
4.2 Avaliação da expressão de triptase e quimase em MCs.....	59
4.3 Avaliação da participação de triptase na patologia do megacólon chagásico: evidências da interação entre MCs e neurônios/nervos mediada por triptase.....	62
4.3.1 Correlação entre o número de MCs triptase-IR e densidade de fibras nervosas.....	62
4.3.2 Avaliação da expressão de PAR2-IR em neurônios.....	63
4.3.3 Correlação entre o número de neurônios PAR2- e o número de MCs triptase-IR.....	63
4.4 Avaliação da participação de triptase na patologia do megacólon chagásico: evidências da interação entre MCs e eosinófilos mediada por triptase.....	65
4.4.1 Densidade de eosinófilos e correlação entre MCs triptase-IR e eosinófilos.....	65
4.4.2 Avaliação da expressão de PAR2 em eosinófilos.....	67
4.4.3 Correlação entre eosinófilos de PAR2-IR e MCs triptase-IR.....	69
4.4.4 Avaliação ultraestrutural das relações espaciais entre MCs e eosinófilos.....	70
4.5 Avaliação da utilização de triptase como diagnóstico de lesão.....	73
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS	86
8. ANEXO.....	102
8.1 Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (COEP).....	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* e acomete milhões de pessoas em todo o mundo. Apresenta ampla distribuição no continente americano, com alta morbidade e mortalidade, o que tem provocado mais de 10 mil mortes por ano (HOTEZ *et al.*, 2013). É um problema de saúde pública negligenciado, principalmente na América Latina (DIAS, 2006; COURA, 2007; COURA; DIAS, 2009), região onde estima-se a existência de 8 a 10 milhões de pessoas infectadas (RASSI; MARIN-NETO, 2010) e que mais de 90 milhões ainda estejam expostas à infecção (LEE *et al.*, 2013).

No Brasil, existem várias regiões endêmicas, como a Sudeste, Nordeste e Centro-oeste do país e as regiões Norte e Sul com aparecimento de novos casos. Pernambuco, Bahia, Piauí, Goiás e Minas Gerais são estados que apresentam alta incidência da doença de Chagas (VINHÃES; DIAS, 2000; DIAS *et al.*, 2002; DIAS, 2006; BRAZ *et al.*, 2011), dentre os quais Minas Gerais é o estado onde a doença foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas. O *T. cruzi* é transmitido por inseto triatomíneo, conhecido como barbeiro, que antes era restrito à vida silvestre e, em consequência das alterações ambientais causadas por interferências antropológicas, passou a se alojar em habitações humanas, principalmente casas de pau a pique nas áreas rurais. Dessa forma, a transmissão vetorial tornou-se o mecanismo primário de difusão da doença (KOBBERLE, 1963; VINHÃES; DIAS, 2000; KROPF, 2005). Outros mecanismos de transmissão do parasito incluem transmissão por via oral, transfusional, congênita e, em menor frequência, por transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (COURA, 2007). Segundo Luquetti e cols. (2011), atualmente, permanece no Brasil uma falsa ideia da inexistência da transmissão vetorial

nos últimos anos. Isso se deve a políticas públicas utilizadas para erradicar os focos de transmissão vetorial da doença, que, apesar de eficazes, não cessaram totalmente a transmissão. Estudos de soro-prevalência para avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil, entre os anos 2001 e 2008, demonstraram casos de transmissão vetorial principalmente no nordeste brasileiro (Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas) e, ainda, casos de transmissão congênita no Rio Grande do Sul (LUQUETTI *et al.*, 2011).

A transmissão vetorial da doença de Chagas se dá através das fezes do barbeiro, contaminadas com as formas tripomastigotas infectantes do parasito, que são depositadas no local da picada. Os tripomastigotas penetram ativamente através de mucosas ou áreas lesadas da pele e chegam à circulação linfática e sanguínea para, em seguida, terem acesso a diversos tipos celulares do hospedeiro. Uma vez dentro das células, os tripomastigotas se transformam em amastigotas e, após diversos ciclos de multiplicação, dão origem novamente a numerosas formas tripomastigotas, que rompem as células hospedeiras e infectam os tecidos adjacentes e a circulação. O ciclo se completa quando o inseto pica um indivíduo infectado e adquire as formas tripomastigotas circulantes (KÖBERLE, 1968; BRENER, 1982).

As formas tripomastigotas podem infectar macrófagos, células adiposas, células endoteliais, fibras musculares lisas, estriadas esqueléticas e cardíacas, fibroblastos e células da glia entérica, incluindo células de Schwann (KÖBERLE, 1967; BRENER, 1982). O sistema imunológico é ativado durante o rompimento das células infectadas, com liberação de citocinas para controlar o parasitismo. A presença do parasito e as reações inflamatórias decorrentes da infecção causam destruição tecidual em diversos órgãos, que pode levar a complicações na fase aguda (KÖBERLE, 1970; DIAS, 2001). Os sintomas da fase aguda começam a aparecer após um período de incubação de 7 a 14 dias, caracterizando-se por lesão inflamatória no local da picada, febre, náusea, vômitos, diarreia, tosse, anorexia, adenomegalia e hepatoesplenomegalia. Nessa fase, alguns indivíduos podem morrer devido a complicações associadas à miocardite,

meningoencefalite e/ou broncopneumonia (KÖBERLE, 1968). Posteriormente à fase aguda, a doença evolui para uma fase assintomática, conhecida como fase indeterminada, que pode perdurar pela vida toda do indivíduo ou evoluir para as formas crônicas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (COURA, 2007). A transição da fase aguda para a fase crônica é acompanhada por uma diminuição acentuada na parasitemia, devido à resposta imunológica do indivíduo (DUTRA *et al.*, 2009).

O diagnóstico da infecção chagásica pode ser realizado por meio de diversos testes sorológicos, tais como imunofluorescência, imunoensaios enzimáticos, *western blot* e *immunoblot* recombinante. O diagnóstico no Brasil se dá pela positividade para pelo menos dois de três exames realizados (LUQUETTI; CASTRO, 1997).

A progressão clínica da doença de Chagas é variável e tem sido alvo de numerosas pesquisas. Indivíduos assintomáticos apresentam anticorpos específicos contra o *T.cruzi*, mas não apresentam quaisquer sintomas das formas crônicas. Esses indivíduos representam uma possível adaptação da resposta imunológica na relação parasito-hospedeiro, sendo que a forma indeterminada ocorre na maior parte dos casos (DUTRA *et al.*, 2009). Entretanto, uma significativa porcentagem dos pacientes, aproximadamente 30%, desenvolve sintomas cardíacos e apresenta maior taxa de morbidade e mortalidade entre as formas crônicas. As complicações cardíacas são detectadas através de exames eletrocardiográficos e radiológicos, os quais percebem as alterações clínicas, como distúrbios da condução e do ritmo cardíaco, insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos e arritmias graves. Em estágios mais avançados, pacientes cardíacos apresentam um aumento acentuado do coração, com diversas alterações microscópicas. Observam-se um infiltrado inflamatório focal ou difuso, degeneração de células miocárdicas e fibrose intersticial. A função contrátil é comprometida, caracterizando a cardiopatia chagásica crônica, que, muitas vezes, leva à morte. Esses sintomas

são resultantes, ao menos em parte, da degeneração do plexo neuronal intrínseco autonômico, a qual conduz a arritmias cardíacas (MARIN-NETO *et al.*, 2007; RASSI; RASSI, 2007; ROCHA; TEIXEIRA; RIBEIRO, 2007).

A forma crônica digestiva da doença de Chagas acomete aproximadamente 8-10% dos indivíduos infectados em áreas endêmicas e é responsável, em parte, pela alta morbidade e mortalidade da doença (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002). Lesões neuronais do sistema nervoso autônomo (SNA) são complicações comuns a todas as manifestações clínicas sintomáticas da doença de Chagas. Contudo, alguns autores destacam lesões do sistema nervoso central (SNC) como maneira de diferenciar a forma clínica neurológica, porém essa classificação é controversa (CÓRDOVA *et al.*, 2010).

No Brasil, a ocorrência das formas clínicas da doença de Chagas pode ter diferenças regionais. Casos da forma digestiva englobam, principalmente, a região Central do país, compreendendo parte dos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Bahia e sul do Piauí (DE REZENDE, 1984). Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal são os estados com maior mortalidade associadas às três formas crônicas (MARTINS-MELO *et al.*, 2012).

1.2 Forma digestiva

A principal alteração da forma digestiva é o alargamento do lúmen e espessamento da parede de órgãos ocos do trato gastrointestinal (TGI), principalmente esôfago e cólon, associado à aperistalse, quadro descrito na literatura como “mega” chagásico (LOPES; CHAPADEIRO, 1997). Além do aumento do diâmetro, desordens motoras, como acalásia da cárdia, distúrbios do esvaziamento gástrico, alterações do trânsito intestinal e da vesícula biliar podem estar associadas (KÖBERLE, 1968; MENEGHELLI, 2004). O diagnóstico geralmente é

realizado através de exames clínicos e radiológicos, por meio da ingestão de contraste para avaliação da motilidade e da dilatação do órgão acometido (MENEGBELLI, 2004).

O megacólon é a manifestação clínica mais frequente, seguida pelo megaesôfago, e a associação das duas desordens é a terceira alteração digestiva mais comumente descrita na doença de Chagas (LOPES *et al.*, 1989; DIAS, 2001). Acredita-se que ele se desenvolva a partir de lesões do sistema nervoso entérico (SNE), as quais conduzem a distúrbios de motilidade, diminuem o trânsito local intestinal e, juntamente com acúmulo do conteúdo do lúmen (que leva à distensão física, associado à dificuldade no relaxamento dos esfíncteres), proporciona a dilatação do cólon (MARTINS-CAMPOS; TAFURI, 1973; REZENDE; MOREIRA, 1988). Devido à aperistalse, a constipação crônica é o principal sintoma clínico relacionado ao megacólon; e pode estar acompanhada por complicações, como formação de massa fecal rígida (fecaloma) e volvo (torção da alça intestinal). O diagnóstico é, em geral, tardio, após o instituir da dilatação e, na maioria dos casos, a porção colônica sigmoide é cirurgicamente retirada como forma de tratamento dos pacientes (PINAZO *et al.*, 2010). O exame radiológico é o enema opaco, mostrando dilatação e perda de haustrações, eventualmente seguido pelo alongamento do comprimento do cólon. Além disso, pacientes com megacólon podem apresentar acalásia do esfíncter anal, com prejuízo no relaxamento muscular (MOREIRA *et al.*, 1983; MENEGBELLI, 1985; ADAD *et al.*, 2001).

Diversas alterações histopatológicas são observadas em pacientes portadores de megacólon, tais como hipertrofia e fibrose das túnicas musculares, ulceração da mucosa e lesões do SNE e SNA. Todas essas alterações estão associadas a processos inflamatórios intensos, os quais podem ser fator de causa e/ou efeito. São observados focos de miosite, de intensidade variável, com degeneração e necrose de fibras musculares; além de fibrose intramuscular focal ou difusa, relacionada direta ou indiretamente com os focos de miosite (ADAD *et al.*, 1991).

Segundo Tafuri e *cols.* (1971), os danos à mucosa e submucosa ocorrem por um mecanismo indireto e secundário. O acúmulo de fezes no cólon, em função dos distúrbios peristálticos contribui para a dilatação da luz e a compressão da mucosa. A compressão, por sua vez, leva a isquemia e, secundariamente, conduz a degeneração, necrose e ulceração da mucosa. Na mucosa ulcerada, inicia-se um processo inflamatório secundário e independente da inflamação induzida pela infecção chagásica. A inflamação secundária à estase, somada à destruição dos plexos e dos componentes intersticiais, evolui para a fibrose da submucosa e do conjuntivo intermuscular (TAFURI, 1971). No entanto, não podemos deixar de considerar que os danos à mucosa e submucosa também podem ocorrer por um mecanismo primário, devido à infecção/inflamação causada pelo parasito, uma vez que essa região também apresenta espessamento da muscular da mucosa com redução da inervação e perda neuronal no plexo submucoso, porém em menor grau que o plexo mioentérico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; JABARI *et al.*, 2014a).

As alterações morfológicas do plexo mioentérico consistem em lesões inflamatórias, em geral focais, de todos os componentes dos gânglios viscerais: corpos e fibras neuronais, bem como células da glia, podendo chegar à sua destruição completa. Porém, pode ser observado no mesmo gânglio, a existência de neurônios às vezes profundamente lesados ao lado de outros morfolologicamente íntegros (TAFURI, 1971). Acredita-se que as lesões do SNE sejam progressivas e se agravem proporcionalmente à duração e ao grau do “mega”, seja no esôfago ou no cólon. A degeneração dos gânglios do SNE pode ser devida à presença do parasito aliada ao intenso processo inflamatório, o qual, aparentemente, tem início na fase aguda e persiste até a fase crônica da doença (ANDRADE; ANDRADE, 1969). O grau de desnervação, que antes era avaliado apenas pela contagem neuronal, tem sido também quantificado pela medida da área de filetes nervosos imunorreativos (IR) ao marcador pan-neuronal PGP (protein gene product) 9.5 (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Em 1968, Köberle já descrevia que a intensidade da desnervação teria que ser superior a 55% e 95% para a formação do megacólon e megaesôfago, respectivamente. Em contrapartida, Adad e cols. (1991) descreveram que alguns pacientes chagásicos, sem megaesôfago e sem qualquer comprometimento digestivo, apresentavam baixo número de neurônios no plexo mioentérico e de filetes nervosos nas camadas musculares. Esses pacientes não desenvolveram a doença, mesmo apresentando desnervação (ADAD *et al.*, 1991). Resultados similares foram descritos mais tarde pelo nosso grupo de pesquisa, os quais confirmaram que alguns pacientes infectados sem “mega” já apresentavam significativo grau de desnervação mesmo sem sintomas ou dilatação, contrariando, em parte, a hipótese inicial descrita por Köberle em 1968 (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; NASCIMENTO *et al.*, 2010). Resultados de estudos posteriores sugerem que uma avaliação meramente quantitativa não é a melhor forma de se estudar o grau de comprometimento do SNE em indivíduos infectados com *T. cruzi* (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; MOREIRA *et al.*, 2013; JABARI *et al.*, 2014b), devido principalmente à imensa rede de neurônios e diferentes neuromediadores do SNE (FURNESS, 2000).

A rede nervosa na parede do TGI que constitui o SNE é formada por diferentes subpopulações de neurônios: 1) neurônios sensoriais, também chamados neurônios intrínsecos aferentes primários (IPANS); 2) interneurônios e 3) neurônios motores viscerais inibitórios ou excitatórios, os quais permanecem interconectados por sinapses, assim como no SNC (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000). A distribuição e a codificação neuroquímica dos neurônios que compõem o SNE podem variar em diferentes locais do TGI (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000). Os IPANS são neurônios colinérgicos presentes em ambos os plexos, submucoso e mioentérico, e seus axônios estão projetados principalmente para a mucosa (KIRCHGESSNER; GERSHON, 1988). Neurônios motores podem ser excitatórios ou inibitórios e inervam as camadas musculares, vasos sanguíneos e glândulas. Os neurônios motores excitatórios produzem como moléculas sinalizadoras a acetilcolina e taquicinas

(substância P e neurotaquicinina A). Os neurônios inibitórios utilizam uma gama de transmissores, tais como óxido nítrico (NO), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), adenosina trifosfato (ATP), monóxido de carbono, entre outros (BORNSTEIN; COSTA; GRIDER, 2004). Os interneurônios integram a informação entre IPANS e neurônios motores. Entre os neurotransmissores excitatórios utilizados pelos interneurônios estão acetilcolina e taquicininas, enquanto que os inibitórios são NO e VIP (FURNESS, 2000).

Em indivíduos infectados, tem sido descrito um processo seletivo de desnervação, tanto no cólon quanto no esôfago (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; NASCIMENTO *et al.*, 2013a; JABARI *et al.*, 2011, 2014b). Em pacientes com mega predomina um desbalanço entre neurônios inibitórios e excitatórios, com menor taxa relativa de NOS-IR e VIP-IR e aumento relativo de substância P (SP). Já naqueles pacientes infectados sem megaesôfago, a área relativa de VIP-IR e SP-IR nas túnicas musculares é similar a de indivíduos controle, o que poderia ser responsável pela manutenção da homeostasia tecidual (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Esses achados foram importantes não apenas para demonstrar uma alteração no balanço entre neurônios excitatórios e inibitórios, o que deve de alguma maneira explicar os distúrbios no peristaltismo, mas também para investigar os mecanismos envolvidos na manutenção ou progressão do processo inflamatório, já que VIP e SP são moléculas anti e pró-inflamatórias, respectivamente (ERCAN *et al.*, 2006; POZO *et al.*, 2007).

A frequente observação de ganglionite e periganglionite em pacientes com dilatação aponta para a participação de células do sistema imune no mecanismo de lesão neuronal (ADAD *et al.*, 2001). A presença do DNA do parasito (cinetoplasto, kDNA) em 100% dos casos analisados nas lesões teciduais crônicas de indivíduos com megaesôfago confirma a participação do *T. cruzi* no processo inflamatório, mesmo na fase crônica (DA SILVEIRA *et al.*, 2005). Esses autores observaram uma correlação positiva entre intensidade do processo inflamatório, presença do parasito e grau de desnervação, sugerindo que as lesões teciduais

observadas na forma digestiva da doença de Chagas sejam pelo menos em parte, consequência de mecanismos citotóxicos do sistema imunológico, dependentes da presença do *T. cruzi* (VAGO *et al.*, 1996; DA SILVEIRA, *et al.*, 2005). No entanto, entre o grupo de indivíduos infectados assintomáticos e com esôfago de calibre dentro da faixa de normalidade, foram observados o kDNA do parasito com ou sem inflamação associada, evidenciando que a presença do kDNA do parasito nem sempre conduz ao processo inflamatório e que poderiam existir outros fatores que justifiquem a inflamação na fase crônica da doença (DA SILVEIRA *et al.*, 2005).

A caracterização do processo inflamatório originou dados importantes para o entendimento dos mecanismos imunes em resposta à infecção chagásica na fase crônica. Os focos inflamatórios nas túnicas musculares do esôfago e do cólon de pacientes chagásicos crônicos são compostos por linfócitos T CD3-IR; linfócitos B CD20-IR; macrófagos CD68-IR; células *Natural Killers*; linfócitos T citotóxicos TIA-1-IR; eosinófilos e mastócitos (D'AVILA REIS *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005; 2007a). Em indivíduos infectados sem megacólon, foi observado aumento de linfócitos T regulatórios, quando comparado a indivíduos controles e com megacólon. Os autores sugerem que essas células possam controlar o processo inflamatório, atrasando ou impedindo assim a progressão da doença digestiva em indivíduos infectados (DA SILVEIRA *et al.*, 2009; DE ARAÚJO *et al.*, 2011).

Alguns autores tem relatado uma intensa mastocitose, tanto no esôfago como no cólon de pacientes com megaesôfago (PINHEIRO *et al.*, 2003) e megacólon chagásicos (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; PINHEIRO *et al.*, 2008; CÔBO *et al.*, 2012). Sabe-se que mastócitos armazenam proteases, triptase e quimase, as quais, entre diversas ações, clivam neuropeptídios, ativam moléculas pró-inflamatórias e atuam como quimioatraentes para eosinófilos (WONG *et al.*, 2009). Conjuntamente à mastocitose, é observada uma intensa eosinofilia no megacólon chagásico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c). Em indivíduos infectados com megaesôfago foi

observado um aumento significativo de mastócitos triptase-IR na muscular interna e plexo mioentérico desses pacientes. Esse aumento na densidade de mastócitos triptase-IR se correlacionou negativamente com a área de filetes nervosos PGP9.5-IR e com a área relativa de filetes nervosos VIP-IR, o que sugere a participação da triptase no processo de desnervação do megaesôfago (MARTINS *et al.*, 2014). O aumento do número de MCs triptase-IR, bem como a diminuição da inervação VIPérgica também foram observados em outras doenças do TGI, como acalásia idiopática, esofagite de refluxo, doenças inflamatórias intestinais e síndrome do cólon irritável (STOYANOVA; GULUBOVA, 2002; RIJNIERSE; NIJKAMP; KRANEVELD, 2007; MAINTZ *et al.*, 2011; SOHN *et al.*, 2014).

A triptase é uma protease que cliva VIP tecidual e dessa forma poderia diminuir a ação desse neuropeptídeo anti-inflamatório (CAUGHEY *et al.*, 1988; ABRAHAM, 2002). Além disso, alguns estudos mostram menor número de neurônios quando os mesmos estiveram em cocultura com mastócitos que liberaram triptase, sugerindo que essa protease pode induzir morte neuronal, talvez por sua ação sobre seu receptor ativado por protease (PAR) do tipo 2, expresso em neurônios (SAND; THEMNER-PERSSON; EKBLAD, 2009). Em outras análises a triptase ativou a liberação de substância P em neurônios, contribuindo indiretamente com a exacerbação do processo inflamatório (STEINHOFF *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2003), e induziu um aumento do número de eosinófilos teciduais (RAMACHANDRAN *et al.*, 2012). Esses resultados abriram um novo leque de possibilidades para o entendimento do processo inflamatório e da desnervação, observados na fase crônica da forma digestiva da doença de Chagas, incluindo o megacólon chagásico.

1.3 Mastócitos no trato gastrointestinal

Mastócitos (MCs) são células residentes que recebem a influência de fatores de crescimento e citocinas teciduais, e seu crescimento e proliferação são regulados pelas

interleucinas (IL)-3, IL-4, IL-9, IL-10, fator de crescimento neural (NGF), fator de célula-tronco ou *stem cell factor* (SCF) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , GALLI *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1998). Tais substâncias promovem o desenvolvimento dos estágios progenitores até a diferenciação completa, mantêm a sobrevivência e regulam a liberação de seus mediadores (YOSHIMICHI OKAYAMA, 2006).

Na mucosa intestinal, o TGF- β 1 regula a sobrevivência de MCs, sendo uma citocina constitutivamente expressa por células epiteliais e diferentes células imunes da lâmina própria. Por indução de células T regulatórias, ele atua como uma citocina anti-inflamatória, inibindo a proliferação exagerada de MCs e mantendo a homeostase intestinal (GEBHARDT *et al.*, 2005). Na ausência ou diminuição de TGF- β 1, ou sob estímulos locais de mediadores da resposta do tipo Th2, como diversas interleucinas, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-25 (ISAILOVIC *et al.*, 2015), MCs aumentam em número, devido a uma combinação do aumento do seu recrutamento, sobrevivência e / ou diferenciação e maturação, bem como pela proliferação de mastócitos residentes (GALLI; GRIMBALDESTON; TSAI, 2008). O aumento do número de MCs na resposta imune Th2 promove o início da inflamação e pode ampliar a sua magnitude, ou até conduzir à injúria tecidual, quando associada a respostas contra parasitas e reações alérgicas, com consequente remodelamento tecidual e inflamação persistente (ISAILOVIC *et al.*, 2015). Por outro lado, MCs também podem ser influenciados por citocinas típicas da resposta Th1, como interferon gama (IFN)- γ . Essa citocina é um inibidor de MCs e tem sido considerada como marca da resposta Th1 em desordens autoimunes e na doença de Crohn (SELLGE *et al.*, 2014).

Os MCs sintetizam e armazenam, em seus grânulos, moléculas pré-formadas como histamina, heparina e proteases (carboxipeptidases, triptase e quimase), além de sintetizar e secretar, no ato da ativação, citocinas, quimiocinas, leucotrienos e interleucinas (BISCHOFF, 2009). Muitas das ações dos MCs são efetuadas principalmente pela extrusão de seus grânulos

na superfície celular, processo conhecido como desgranulação. Os mecanismos de secreção dos MCs têm sido descritos em três diferentes tipos de desgranulação: anafilática, *piecemeal* e transgranulação. A desgranulação anafilática e *piecemeal* são os dois tipos mais descritos, em que o primeiro processo se baseia na fusão entre os grânulos e estes com a membrana plasmática; e na desgranulação *piecemeal* ocorre a liberação do conteúdo granular de forma total ou parcial, sem fusão entre os grânulos. A transgranulação é menos evidenciada e consiste na liberação de grânulos de uma célula no citoplasma de outra célula, através de contato celular (CRIVELLATO *et al.*, 2006; WILHELM; SILVER; SILVERMAN, 2012).

Algumas funções dos MCs podem ser justificadas pela desgranulação de proteases. As proteases triptase, quimase, carboxipeptidase e catepsina G estão armazenadas simultaneamente, mas existem MCs que possuem grânulos apenas contendo triptase (IRANI *et al.*, 1989); ou ainda, alguns MCs armazenam quimase e carboxipeptidase, mas não triptase (WEIDNER; AUSTEN, 1993; YU *et al.*, 2009). As proteases mais estudadas são a triptase e quimase e muitos trabalhos classificam os MCs em duplo positivo (triptase/quimase-IR), apenas triptase-IR ou apenas quimase-IR (WEIDNER; AUSTEN, 1993). Assim, a caracterização do fenótipo dos MCs nos tecidos pode ser justificada pelo conteúdo das proteases triptase e quimase (RODEWALD *et al.*, 1996).

A maioria dos MCs humanos são triptase/quimase-IR e se localizam principalmente ao redor de vasos sanguíneos e no tecido conjuntivo. MCs triptase/quimase-IR podem ser encontrados, embora em menor número, entre as túnicas musculares, nos plexos e na serosa. MCs triptase positivo e quimase negativo se localizam preferencialmente na mucosa e são dependentes da ativação por linfócitos T (NASSAUW *et al.*, 2007), via interleucinas, IL-4, IL-9, fator de necrose tumoral (TNF), e até mesmo por contato celular (NAKAE *et al.*, 2006). Estudos de caracterização de MCs por imunohistoquímica identificaram que, na mucosa intestinal humana, 58% dos MCs expressavam triptase; 35% expressavam triptase e quimase;

e 7% expressavam apenas quimase. Por outro lado, na submucosa, 83% dos MCs expressavam triptase e quimase e 17% expressavam apenas quimase (WEIDNER; AUSTEN, 1993).

As proteases triptase e quimase podem ou não possuir ações comuns. Ambas possuem ações pró-inflamatórias tais como: degradação direta e indireta da matriz extracelular, recrutamento de neutrófilos e eosinófilos e proliferação de fibroblastos. As duas também possuem ação protetora ao participarem da resposta imune inata, sendo a primeira linha de defesa contra parasitos (PEJLER *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* têm demonstrado que tanto a triptase quanto quimase possuem a capacidade de clivar neuropeptídeos, como VIP. Quimase cliva não somente VIP, mas também SP, limitando a ação dessas moléculas e mediando o microambiente inflamatório (CAUGHEY *et al.*, 1988).

A quimase é armazenada como um complexo macromolecular, com heparina e proteoglicanas nos grânulos secretores dos MCs (TAKAI; JIN; MIYAZAKI, 2010b). Tem sido descrito que a secreção de quimase constitui uma importante via alternativa na produção de angiotensina nos tecidos, pois cliva angiotensina I em angiotensina II. A formação tecidual de angiotensina II se deve, em grande parte, a clivagem por quimase, podendo ultrapassar 75% de angiotensina II gerada de forma dependente de quimase no tecido cardíaco humano. A angiotensina II participa do controle do fluxo sanguíneo, aumenta a neovascularização e está relacionada à hipertensão. Desse modo, a participação da quimase na via de produção de angiotensina tem sido estudada em diversas doenças cardiovasculares (MIYAZAKI *et al.*, 2006a, 2006b; TAKAI, JIN; MIYAZAKI, 2010a, 2011).

O efeito enzimático da quimase também inclui a ativação de TGF- β e matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), pois converte seus precursores nas suas formas ativas. TGF- β promove a produção de componentes de matriz extracelular, sendo o principal regulador da formação de fibrose tecidual, e MMP-9 é um componente de matriz, que degrada seus

elementos e participa do *turnover* da mesma, agindo como potente indutor de dano tecidual (TAKAI; JIN; MIYAZAKI, 2010b). Por outro lado, como dito anteriormente, TGF- β é um potente inibidor da proliferação de MCs, e sua ativação por quimase poderia ser um mecanismo regulatório autócrino. Esses dados, tomados em conjunto, sugerem que a quimase seja um grande indutor de fibrose tecidual, e sua inibição farmacológica em doenças inflamatórias intestinais tem sido especulada (TAKAI; JIN; MIYAZAKI, 2011; HEUSTON; HYLAND, 2012). O papel da quimase parece envolver participação nos processos de proliferação e diferenciação de fibroblastos e de secreção e degradação de componentes da matriz extracelular, importantes nos processos de fibrose (ANDOH *et al.*, 2006) e angiogênese (SUN *et al.*, 2007; RIBATTI *et al.*, 2011).

A triptase, por sua vez, é armazenada nos grânulos dos MCs na forma de um tetrâmero, formado por monômeros estabilizados por heparina e proteoglicanas carregadas negativamente. O tetrâmero dificilmente pode ser inibido, mas, sob dissociação, os monômeros perdem sua atividade. Após a ativação de MCs, a triptase se liga à heparina, e é secretada em paralelo com a histamina (SCHWARTZ; BRADFORD, 1986). Diversas ações pró-inflamatórias, importantes no contexto das doenças pulmonares alérgicas e inflamatórias crônicas, tem sido atribuídas à triptase (HAMILTON; FREI; STEVENS, 2015). Ela induz fibrose via ativação de fibroblastos (ABRAHAM, 2002), que tem sido investigada em doenças fibróticas humanas (FRUNGIERI *et al.*, 2002). Além disso, a triptase cliva outros substratos extracelulares, dentre eles, colágeno tipo IV e fibronectina, o que facilita o recrutamento celular em processos inflamatórios e de remodelamento (HEUTINCK *et al.*, 2010). Recentemente, foi descrito que a triptase participa de mecanismos de morte celular. A triptase foi encontrada dentro do núcleo celular e cliva a porção N-terminal de histonas, mesmo durante a homeostase. Em estudos *in vitro*, o mecanismo de morte celular de MCs deficientes em triptase, difere muito do de células provenientes de animais selvagens,

demonstrando que a triptase também tem ação na modificação de histonas no núcleo celular e indução de apoptose (MELO *et al.*, 2014) em neurônios como anteriormente descrito (SAND; THEMNER-PERSSON; EKBLAD, 2009).

A maior parte dos MCs intestinais expressa triptase (IRANI *et al.*, 1989), considerada a principal protease estocada em seus grânulos (SCHWARTZ *et al.*, 1981). Assim, seu papel tem sido amplamente investigado nas doenças inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa, doença de Chron e síndrome do intestino irritável (RAITHEL *et al.*, 2001; STOYANOVA; GULUBOVA, 2002a; SOHN *et al.*, 2014). O aumento da permeabilidade da mucosa intestinal está associado ao aumento de MCs triptase em pacientes com diarreia (LEE *et al.*, 2013), tendo esse processo sido atribuído ao fato de a triptase induzir menor expressão de moléculas de adesão juncionais em células epiteliais (WILCZ-VILLEGA; MCCLEAN; O'SULLIVAN, 2013). Inibidores de triptase têm sido testados como alvos para possíveis intervenções terapêuticas (CAUGHEY, 2015), tanto em animais (LUNDEQUIST *et al.*, 2003), como *in vitro* (WANG *et al.*, 2014). Em humanos, inibidores da triptase foram testados em pacientes com colite ulcerativa, em quem foi observada a redução dos sintomas gastrointestinais (GEORGE, 2011); e em animais, foi evidenciada a redução da gravidade da colite (ISOZAKI *et al.*, 2006).

Um dos substratos da triptase é o receptor ativado por protease 2 (*protease activated receptor 2*, PAR2. PAR2 pertence a uma família de quatro receptores: PAR1, PAR2, PAR3 e PAR4) acoplados à proteína G. Esses receptores, na superfície celular, através da ligação de proteases, são clivados e posteriormente internalizados. A ativação se dá pela clivagem do domínio extracelular N terminal de PARs, o qual conduz à exposição de um ligante, que subsequentemente se liga ao receptor e induz eventos de sinalização intracelular e internalização do receptor/ligante. O receptor, após interagir com ligante, sofre uma dessensibilização, interiorização e direcionamento aos lisossomos (RAMACHANDRAN *et*

al., 2012). As proteases que ativam PARs são descritas como proteases serinas. Elas formam uma grande família de enzimas que clivam proteínas. A regulação da proteólise induzida por estas proteases serinas é essencial para evitar danos teciduais. Há inibidores especializados das proteases serinas, as serpinas, as quais se encontram amplamente distribuídas no corpo (HEUTINCK *et al.*, 2010). Proteases serinas regulam múltiplos tipos celulares pela clivagem de PARs na superfície celular. A duração e a magnitude dos efeitos de PARs nas células são determinadas por um balanço entre a abundância e distribuição de proteases serinas, bem como pelo número e disponibilidade da expressão do receptor na superfície celular (AMADESI; BUNNETT, 2004; SHEA-DONOHUE *et al.*, 2010).

A expressão de PAR2 varia no TGI, sendo mais detectado no intestino delgado e cólon. É observado em vários tipos celulares, incluindo enterócitos, células enteroendócrinas, células endoteliais, células musculares, neurônios entéricos, fibroblastos e algumas células do sistema imunológico, tais como MCs, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos (D'ANDREA *et al.*, 1998; VERGNOLLE, 2005; HALLGREN; PEJLER, 2006; KIM *et al.*, 2010). Sabe-se que, dependendo do tipo celular estimulado, as ações da ativação de PAR-2, via triptase, podem ser inúmeras. Assim, algumas das funções já descritas para triptase são agora registradas sob a ótica da ativação de PAR2. São elas: a participação em processos de fibrose, através da estimulação da proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (FRUNGIERI *et al.*, 2002); a angiogênese, por meio da produção de fator de crescimento endotelial (VEGF) em mastócitos e em células endoteliais (ZHANG; HANIG; DE FELICE, 2011); a alteração da motilidade e permeabilidade da mucosa intestinal, através do aumento da secreção de cloreto, diminuição de zônulas de oclusão e adesão em enterócitos (NGUYEN *et al.*, 2003; VERGNOLLE, 2005); a modulação do processo inflamatório e recrutamento celular, por meio da ativação e recrutamento de células inflamatórias (CENAC *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2003; HYUN *et al.*, 2008); e ativação neuronal, através do aumento da concentração de cálcio

intracelular, induzindo uma descarga elétrica e hiperexcitação (CORVERA *et al.*, 1999; LINDEN *et al.*, 2001; REED *et al.*, 2003; KUGLER *et al.*, 2012), com consequente inflamação neurogênica (STEINHOFF *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2003). Essa última ação pode ser explicada pelo fato de que a triptase ser responsável por induzir a hipersensibilidade e a despolarização neuronal em neurônios entéricos. Além disso, a triptase ativa neurônios, via PAR2, e induz a liberação de SP, amplificando a inflamação e recrutando mais células inflamatórias (STEINHOFF *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2003).

Na doença de Chagas, o aumento do número MCs triptase-IR (MARTINS *et al.*, 2014), o aumento da área relativa de SP-IR e a diminuição da área relativa de VIP-IR (NASCIMENTO *et al.*, 2013) em pacientes portadores de megaesôfago chagásico já foram descritos, e acreditamos que a alteração nas concentrações dessas substâncias contribua para exacerbar a inflamação na fase crônica da doença. No entanto, o estudo ultraestrutural de MCs, a quantificação dos subtipos de MCs e a expressão de PAR2 no cólon de indivíduos *T. cruzi* infectados, ainda não foram investigadas. Consideramos esse trabalho essencial para o campo da imunopatologia da forma digestiva em doença de Chagas, principalmente no que diz respeito ao estudo das ações efetoras da triptase no recrutamento de células inflamatórias, na ativação de eosinófilos e no estímulo neuronal.

1.4 Mastócitos e interações neuroimunes no TGI

A interação neuroimune e quaisquer mecanismos que causem prejuízos nessa comunicação têm sido alvos de pesquisas em diversas patologias que atingem o TGI (BORRELLI *et al.*, 2009; OHMAN; SIMRÉN, 2010; BUCKLEY; O'MAHONY; O'MALLEY, 2014; FUENTE, 2014). A associação anatômica e funcional entre nervos e MCs é crucial para a manutenção da homeostase da mucosa e para assegurar uma resposta adequada às células em processos de injúria. MCs respondem a neuropeptídeos e esses poderiam regular

sua função, impedindo uma ativação exacerbada (BUHNER; SCHEMANN, 2012). Tanto terminações de nervos aferentes extrínsecos, quanto de neurônios entéricos, estão em estreita proximidade com MCs. Estima-se que 70% dos MCs da mucosa intestinal estão em contato direto com os nervos, e outros 20% estão dentro de 2 μ m de proximidade (STEAD *et al.*, 1987, 1989).

Fatores que regulam a associação anatômica entre MCs e nervos ainda não são bem compreendidos. Supõe-se que a inervação em direção a MCs poderia ser iniciada pela liberação de mediadores a partir de MCs, em particular NGF (BLENNERHASSETT; BIENENSTOCK, 1998). Em contrapartida, pode ser possível que MCs sejam atraídos a nervos mediante a liberação de neuropeptídios. Através da liberação de mediadores, os MCs transferem a informação química para as redes nervosas do SNE. MCs produzem e secretam neuropeptídeos, entre eles NGF, VIP e SP (CHURCH *et al.*, 1989), e os mesmos possuem receptores para esses neuropeptídios e secretam outros neuromediadores (KULKA *et al.*, 2008). Sob o estímulo de SP, MCs são desgranulados e sintetizam citocinas pró-inflamatórias (ERIN *et al.*, 2004; 2006; KAWANA *et al.*, 2006). A SP, uma vez liberada, induz mastócitos a secretarem quimiocinas: CCL2 e proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1), potentes quimioatraentes de monócitos, linfócitos, basófilos, neutrófilos e macrófagos (CASTELLANI *et al.*, 2009).

A manutenção da comunicação entre SNE e sistema imune no TGI é sustentada também pela secreção de citocinas e neuromediadores. VIP e SP se destacam como neuromediadores fundamentais para esse processo. VIP possui um efeito anti-inflamatório (DELGADO *et al.*, 2002; BERNARD *et al.*, 2009), sendo que ele desempenha suas atividades por meio de ligação a receptores VPAC1 e VPAC2, que são expressos em diferentes tipos celulares, incluindo células inflamatórias (YUKAWA *et al.*, 2007; SMALLEY; BARROW; FOSTER, 2009). Por outro lado, SP desempenha efeitos pró-inflamatórios sobre as células imunes (KOON; POTHOUKAKIS, 2006). Estudos têm demonstrado que a substância P é

capaz de induzir a desgranulação de mastócitos (ERIN *et al.*, 2004; 2006; KAWANA *et al.*, 2006) e a migração e citotoxicidade de células *Natural killer* (FEISTRITZER *et al.*, 2003; FU *et al.*, 2011). Além de neurônios e mastócitos, outras células imunes, como, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas secretam SP (LAI; DOUGLAS; HO, 1998; LAI *et al.*, 2002), a qual atua por meio de seu receptor neurocinina-1 (NK-1) (GOODE *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado o significativo papel dos neuromediadores VIP e SP na patofisiologia de muitas doenças, incluindo aquelas do TGI. A expressão de VIP tem se apresentado diminuída em doenças autoimunes, como lupus e artrite reumatóide (BANGALE *et al.*, 2003; JUARRANZ *et al.*, 2008), bem como a expressão de seus receptores em doenças do TGI (YADAV; HUANG; GOETZL, 2011). Por outro lado, SP tem sido descrita em concentrações elevadas no soro de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (TAVANO *et al.*, 2012). Além disso, estudos imunohistoquímicos realizados no cólon de pacientes com diverticulite (SIMPSON *et al.*, 2009) e com colite ulcerativa (NEUNLIST *et al.*, 2003), demonstraram aumento de neurônios SP-IR no plexo mioentérico. Assim, algumas terapias com bloqueio de SP (UEMATSU *et al.*, 2011; ENGEL *et al.*, 2012; MAKINO *et al.*, 2012) e indução de VIP (ABAD *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2008) têm sido testadas.

Como relatado anteriormente, na doença de Chagas, também foi observada diminuição na razão entre as áreas relativas de VIP (neuromediador anti-inflamatório) e SP (pró-inflamatório), em indivíduos infectados com dilatação, tanto no esôfago (NASCIMENTO *et al.*, 2013b) como no cólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b), sugerindo que exista um desbalanço neuroquímico nesses pacientes. Dada a influência desses mediadores em células do sistema imune, incluindo MCs, acreditamos que o estudo dos MCs e sua associação com o SNE poderá fornecer subsídios para compreensão de alterações neuroimunes que possam estar, de alguma forma, envolvidas no desenvolvimento do “mega” chagásico.

1.5 Eosinófilos e sua interação com mastócitos

Eosinófilos são células produzidas na medula óssea vermelha, onde amadurecem sob a ação da IL-5 e eotaxina, e migram para a corrente sanguínea (RAAP; WARDLAW, 2008). A meia-vida dos eosinófilos na corrente sanguínea é de cerca de 26h, e sob a ação de quimioatraentes eles migram para os tecidos, onde assumem um perfil tecidual e recebem influência de fatores de crescimento e citocinas locais, ou migram para órgãos como o baço, onde serão destruídos (STEINBACH *et al.*, 1979). Eles armazenam muitos compostos bioquímicos importantes em seus grânulos, que vão compor a resposta imune inata e adquirida (JACOBSEN *et al.*, 2007). São produtos da secreção dos eosinófilos as quimiocinas, incluindo eotaxina, IL-8, proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1a, RANTES, além de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF), NGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-b, SCF, TGF α , TGF- β , IFN- γ , TNF e fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF). Uma vez ativados, os eosinófilos podem liberar citocinas pró-inflamatórias (IL-1a, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16, IFN- γ , GM-CSF, TGF- α e TGF- β), mediadores lipídicos, [fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrienos (LT) C4, LTD4], prostaglandinas, ânions superóxido, além de um arsenal de potentes proteínas citotóxicas dos grânulos, incluindo proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) e peroxidase. Essas moléculas têm efeitos pró-inflamatórias que incluem a regulação do sistema de adesão e tráfico celular, a regulação da permeabilidade vascular, a secreção de muco e a contração do músculo liso (ZECK-KAPP; CZECH; KAPP, 1994; KITA, 1996; RAAP; WARDLAW, 2008).

Os eosinófilos participam ainda da proteção contra patógenos e alérgenos, e aumentam em número nas doenças alérgicas e infecções parasitárias (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Eles têm a capacidade de matar helmintos através da geração de potentes oxidantes e liberação do conteúdo de seus grânulos com proteínas catiônicas; podem ser ativados por mecanismos dependentes de IgE, qualificando-os para as respostas alérgicas; e podem iniciar a resposta imune por possuírem a capacidade de apresentar antígenos (GLEICH; ADOLPHSON, 1986).

O recrutamento e a sobrevivência dos eosinófilos no TGI são regulados por citocinas e quimiocinas, tais como a IL-5, secretada por células Th2 e eotaxina-1 (CCL11), expressas constitutivamente na lâmina basal do TGI; e também por neuropeptídeos, como o NGF, que promovem a sobrevivência e proliferação eosinofílica (AHRENS *et al.*, 2008; NEILSEN; BRYCE, 2010; KRITAS *et al.*, 2014). Em contrapartida, um dos mecanismos de recrutamento de novas células se dá pela desgranulação de histamina, TNF- α e serotonina, secretadas por MCs frente a condições inflamatórias (HE; PENG; WALLS, 1997).

A triptase produzida por MCs tem um papel importante na ativação e recrutamento de eosinófilos, através de sua ligação com PAR2 (SCHMIDLIN *et al.*, 2002; BOLTON *et al.*, 2003; VLIAGOFTIS *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2013), levando à liberação celular de leucotrienos e formação de espécies reativas de oxigênio (BOLTON *et al.*, 2003). Além disso, o papel da triptase no tráfico de eosinófilos parece ser mediado pela sua capacidade de interagir com as células endoteliais e promover eosinofilia pela aderência à selectina, durante o processo inflamatório (GREEN *et al.*, 2000; ITOH; SENDO; OISHI, 2005).

Uma vez nos tecidos, os eosinófilos podem exercer uma comunicação bidirecional com MCs e neurônios. Através da secreção de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, grânulos de proteínas citotóxicas e neuromediadores, como NGF, SP e VIP, eosinófilos podem interagir direta e indiretamente com o SNE e o sistema imune, uma vez que eles também possuem receptores para tais neuromediadores (ROTHENBERG; HOGAN, 2006; HOGAN *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos têm mostrado a associação de MCs e eosinófilos em doenças inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa (STOYANOVA; GULUBOVA, 2002b; ALBERT *et al.*, 2011; STASIKOWSKA-KANICKA *et al.*, 2012) e doença de Crohn (RAITHEL *et al.*, 2001; CHRISTERSON *et al.*, 2009; SMYTH *et al.*, 2013). Na doença de Chagas digestiva, estudos morfométricos demonstraram aumento do número de eosinófilos no cólon de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, com e sem megacólon, sugerindo a participação dessa população celular em diferentes fases de desenvolvimento da doença digestiva (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; CÔBO *et al.*, 2012).

Diante do exposto, consideramos relevante para o estudo da forma digestiva da doença de Chagas, o levantamento de dados que nos ajudem a compreender o cenário que envolve o desenvolvimento da imunopatologia da dilatação chagásica, no que diz respeito às interações entre MCs e neurônios e entre MCs e eosinófilos, bem como evidências da participação da triptase na migração e ativação de eosinófilos.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar o papel dos mastócitos (MCs) na imunopatologia do megacólon chagásico, com ênfase na interação entre MCs com neurônios e com eosinófilos no cólon de indivíduos infectados com e sem megacólon, e de indivíduos não infectados.

2.2 *Objetivos específicos*

Através da análise comparativa no cólon de indivíduos infectados com megacólon, de indivíduos infectados sem megacólon e de indivíduos não infectados, buscou-se os seguintes objetivos específicos:

- 2.2.1 Investigar evidências da participação de MCs na patogênese do megacólon, pela avaliação ultraestrutural de MCs e análise da densidade de MCs quimase e triptase.
- 2.2.2 Investigar evidências da interação entre MCs e neurônios, pela análise da existência de correlação entre a densidade de MCs e a área de inervação e pela análise ultraestrutural de contato entre MCs e neurônios/nervos; e análise ultraestrutural de MCs desgranulados próximos a nervos.
- 2.2.3 Investigar evidências da participação de triptase na patologia do megacólon, pela análise da expressão do receptor de triptase (PAR2) em neurônios; correlação entre neurônios-PAR2 e triptase, bem como correlação entre MCs triptase e densidade de fibras nervosas; e dosagem dos níveis séricos de triptase.
- 2.2.4 Investigar evidências da interação entre MCs triptase-IR e eosinófilos, pela análise de correlação entre o número de MCs triptase-IR e eosinófilos; avaliação da expressão de PAR2 em eosinófilos; análise de correlação entre eosinófilos PAR2-IR e MCs triptase-IR e avaliação ultraestrutural das relações espaciais entre MCs e eosinófilos.

3. Casuística

3.1 Pacientes e coleta de amostras

Neste trabalho, utilizamos amostras de tecidos de 20 indivíduos infectados com o *T. cruzi* e dez indivíduos não infectados. Todas as biópsias foram obtidas de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos no Hospital Escola da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, pelo professor Dr. Enio Oliveira Chaves. Todos os indivíduos se submeteram a testes sorológicos para doença de Chagas (hemaglutinação, imunofluorescência indireta e ELISA), tendo sido considerados infectados aqueles que apresentaram sorologia positiva para, no mínimo, dois dos testes aplicados. Antes da coleta das amostras, foi obtido termo de consentimento de cada paciente ou de familiares. Este trabalho compõe um estudo clínico transversal e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo número: 04939212.9.0000.5149 (Anexo 1).

Dos vinte pacientes infectados, dez apresentavam megacólon e se submeteram, como forma de tratamento, à remoção cirúrgica da porção reto-sigmóide, região afetada pela dilatação. Outros dez indivíduos infectados não apresentavam dilatação. No entanto, foram submetidos a procedimento cirúrgico devido a doenças neoplásicas (três casos), doenças diverticulares (dois casos) ou complicações relacionadas à constipação (5 casos). Estes últimos foram classificados com colopatia chagásica. O grupo controle foi composto por dez pacientes com sorologia negativa para o *T. cruzi* e que foram submetidos a cirurgias do cólon devido à doença diverticular (quatro casos), câncer de cólon (cinco casos) e trauma (um caso). A biópsia no cólon de indivíduos infectados sem megacólon e indivíduos não infectados foi realizada em área correspondente à área dilatada de indivíduos infectados com megacólon. Apesar de todos os indivíduos participantes da pesquisa (controles e infectados, com e sem

megacólon) apresentarem alguma doença no cólon, nenhuma diferença significativa do processo inflamatório foi observada entre os grupos infectados e não infectado. O processo inflamatório foi avaliado por meio de análise da proporção volumétrica de infiltrados linfocitários na lâmina própria e muscular interna, em secções coradas por Hematoxilina & Eosina (dados não mostrados).

As características dos sujeitos da pesquisa estão apresentadas na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição de sexo e idade entre indivíduos não infectados e indivíduos infectados e seus subgrupos. O perímetro do anel do cólon foi medido, e a porção dilatada de indivíduos infectados com megacólon apresentou perímetro estatisticamente maior quando comparado à porção não dilatada dos mesmos pacientes (dados não apresentados) e quando comparado ao perímetro dos indivíduos infectados sem megacólon e indivíduos não infectados (Tabela 1).

Tabela 1. Grupo de estudo

	Indivíduos não infectados	Indivíduos infectados sem megacólon	Indivíduos infectados com megacólon
	n=10	n=10	n=10
Idade (anos)	57,50±15,93	56,50±13,01	61,60±11,11
Sexo (F/M)	4/6	5/5	4/6
Perímetro do cólon (cm)	4,47±1,98	5,65±1,38	18,51±5,17*

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os indivíduos não infectados e infectados e seus subgrupos quanto a sexo e idade. (*) Foi observada diferença estatística entre o perímetro do cólon de indivíduos com megacólon e indivíduos dos outros grupos, $p < 0.0001$. Valores expressos por média $\pm$ desvio padrão (SD).

3.2 Preparação das amostras para microscopia óptica

Amostras coletadas foram imediatamente fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2-7,4), e enviadas ao laboratório Professora Conceição Machado da Universidade Federal de Minas Gerais. Os tecidos foram incluídos em parafina, e, após a microtomia, as lâminas foram mantidas em estufa a 40° C, durante 12 horas. Foram obtidos cortes consecutivos de 5µm de espessura cada, colhidos em lâminas histológicas previamente sinalizadas, totalizando 25 lâminas por paciente, com 1 corte por lâmina.

3.3 Imunoperoxidase indireta

A retirada da parafina das lâminas foi realizada com três banhos de xilol de 15 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em sucessivos banhos de concentrações decrescentes de álcool (álcool absoluto II e I, álcool 90%, 80% 70%), por 10 minutos em cada banho. Na etapa posterior, o material foi incubado em PBS (tampão fosfato padrão) pH 7,2 – 7,4, durante 30 minutos, seguido de reativação antigênica em tampão citrato (pH 6.0) ou solução de TRIS EDTA (pH 9.0) no micro-ondas, por 8 minutos. As lâminas foram mantidas nessa solução até retornarem à temperatura ambiente.

O bloqueio da ligação inespecífica foi obtido por incubação dos cortes com solução de albumina de soro bovino (BSA) a 2% em PBS, por 30 minutos. Os cortes foram então incubados a 4°C *overnight*, com 100µl da mesma solução de bloqueio, contendo os anticorpos primários apropriadamente diluídos. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anticorpo policlonal de coelho, anti-PGP 9.5, marcador pan-neuronal (DAKO; Carpinteria, CA, USA; código Z5116; diluição 1:100); anticorpo monoclonal de camundongo, anti-triptase (DAKO, Denmark A/S, clone AA1; código M 7052; diluição 1:100) e anticorpo monoclonal de camundongo, anti-quimase (ABCAM, Cambridge, MA; clone CC1, código ab2377;

diluição 1:100). Após 24 horas de incubação, as lâminas foram lavadas com PBS durante 10 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi inibida, utilizando-se solução de PBS contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 4% e azida sódica a 0,05M, por 30 minutos à temperatura ambiente. A incubação com anticorpo biotinilado (Kit de biotina-estreptavidina, DAKO) também foi realizada à temperatura ambiente, por 60 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS por duas vezes (10 minutos cada) antes da aplicação da solução de estreptoavidina-peroxidase, do mesmo kit, por 60 minutos. Em seguida, foi realizada a incubação com a solução de 0.03% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, SIGMA) e 0.5% de peróxido de hidrogênio em 0.01 M PBS, pH 7.4 por 10 minutos (100 µl em cada lâmina). Finalmente, os cortes foram novamente lavados em PBS por duas vezes (10 minutos cada), contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados (álcoois 70%, 80%, 90%, absoluto I e II, 5 minutos cada), diafanizados (três banhos em xilol, 5 minutos cada) e montados com lamínula com meio sintético (Entelan, SIGMA).

Para imunomarcção do receptor ativado por protease (PAR2) foi utilizado protocolo como se segue: As secções foram submetidas à recuperação antigênica em micro-ondas, seguida por bloqueio de biotina e avidina endógenas (kit comercial para bloqueio de avidina / biotina, Vector Laboratories, EUA). Posteriormente as secções foram incubadas com PBS contendo BSA a 2 % e anticorpo anti-PAR2 (anticorpo policlonal de cabra, Santa Cruz, Texas, USA; 1:200), a 4°C, *overnight*. Como controle negativo, foi realizada a omissão do anticorpo primário em algumas secções. Após a lavagem em PBS, as secções foram incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário biotinilado, na diluição de 1:100 em PBS. Após este passo, as secções foram incubadas com complexo avidina-biotina (kit Vectastain Elite ABC - Vector Laboratories, EUA) durante 30 minutos e a imunorreacção foi visualizada utilizando 3-3'-diaminobenzidina contendo 0,01 % de H_2O_2 em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6. Os cortes foram ligeiramente contrastados com hematoxilina de Mayer.

3.4 Análise morfométrica

Imagens de secções de cólon submetidas à imunohistoquímica e imunorreativas aos anticorpos anti-PGP 9.5 e anti-PAR2 foram capturadas e digitalizadas por uma vídeo-câmera *Olympus Q Colour 3 Camera*, acoplada ao microscópio *Olympus BX 50*, conectados a um computador. As imagens foram analisadas em programa de análise de imagens *Image J 1.42* e posteriormente as figuras foram montadas utilizando o programa *Adobe Photoshop CC 2014*.

As áreas selecionadas para a análise de PGP 9.5 foram a lâmina própria da mucosa, onde os filetes nervosos estão em maior proximidade com as células inflamatórias da mucosa, e a túnica muscular interna, que é innervada principalmente pelo SNE e sofre menos interferência do sistema nervoso extrínseco, quando comparado à túnica externa. Imagens imunorreativas a PGP 9.5 foram capturadas em 20 campos consecutivos da lâmina própria e da camada muscular interna, na objetiva de 40X. Para análise da innervação da lâmina própria foi excluído o tecido epitelial da mucosa, o qual corresponde às criptas intestinais. Foi analisada a área total de cada imagem ($58708,233\mu\text{m}^2$), diminuída a área total de criptas, que resultou na área de lâmina própria. Todas as secções de mucosa selecionadas para essa análise estavam em plano longitudinal. A área correspondente à innervação da lâmina própria foi representada por média, em micrometros quadrados (μm^2). Para análise da innervação na túnica muscular interna foi considerada a área imunorreativa a PGP 9.5, em 20 campos, tendo sido analisada uma área de $1174 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

Para análise da porcentagem de neurônios PAR-2IR, foram capturadas imagens consecutivas cobrindo toda a região de plexo mioentérico em objetiva de 63x. Foi analisado um total de 10 neurônios por paciente, em uma única secção de cólon, tendo sido considerados somente neurônios cujos núcleos eram visíveis no corte. A partir da contagem

total, calcularam-se as porcentagens referentes aos neurônios PAR2(-) e PAR2-IR de cada paciente.

Para análise de mastócitos (MCs) no cólon de pacientes infectados e indivíduos não infectados, foi quantificado o número total de MCs, em secções coradas com Giemsa; o número de MCs triptase-IR; e o número de MCs quimase-IR. As contagens foram realizadas em microscópio óptico com ampliação de 400X, em 20 campos consecutivos, totalizando uma área de $4410 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ por paciente, em cada uma das áreas de interesse (lâmina própria, camada muscular interna e região do plexo mioentérico).

As contagens do número total de eosinófilos, em secções coradas por H&E, e do número de eosinófilos PAR2-IR foram realizadas em 50 campos consecutivos, em microscópio óptico com ampliação de 1000X, totalizando uma área de $2076 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ por paciente, em cada uma das áreas de interesse (lâmina própria, camada muscular interna e região do plexo mioentérico).

Todas as contagens de células foram normalizadas em função do grau de dilatação do cólon. A normalização foi feita aplicando-se um fator de correção, o qual consiste na multiplicação do número de células pela razão entre o perímetro do cólon de cada indivíduo e a média do perímetro do cólon de indivíduos não infectados (Fator de correção = n° de células x perímetro do cólon/ média do perímetro do grupo controle), conforme utilizado por Adad e cols. (2001).

3.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão

Dentre as amostras dos 30 indivíduos participantes da pesquisa, amostras selecionadas de três indivíduos não infectados, três indivíduos infectados sem megacólon e cinco indivíduos infectados com megacólon foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Amostras foram imersas em solução fixadora de Karnovsky modificado

(paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M) em pH 7,2 e overnight, a 4°C. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão, desidratadas em série crescente de etanol, seguido de banhos em acetona e incluídas em resina a base de Epon. Secções semi-finas foram obtidas com navalhas de vidro e coradas com azul de toluidina para seleção da área de interesse, no caso, a lâmina própria e submucosa do cólon. Cortes ultrafinos (60nm) foram contrastados com acetado de uranila e citrato de chumbo e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Biotwin G2 Tecnai (FEI Company, The Netherlands), instalado no Centro de Microscopia da UFMG.

Imagens adquiridas no microscópio eletrônico foram avaliadas qualitativa e quantitativamente. Foi realizada a análise de 10 a 15 mastócitos por indivíduo e uma média de 45 mastócitos por grupo. Após a exclusão de áreas que compreendiam exclusivamente estruturas epiteliais ou musculares da mucosa, foram analisados na lâmina própria e submucosa os seguintes parâmetros: (1) o número total e características ultraestruturais de MCs (presença de irregularidades e projeções, presença de microvesículas citoplasmáticas, diferenças na elétron-densidade de grânulos e tipos de grânulos citoplasmáticos); (2) o número de MCs com sinais de desgranulação *piecemeal* e anafilática; (3) o número de MCs em contato com ou próximos a nervos. No caso de proximidade, foram considerados MCs situados no máximo a 5 µm de distância de nervos; e (4) características ultraestruturais de eosinófilos e existência de contato desse tipo celular com MCs.

A caracterização dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos baseou-se na descrição de Heard e cols. (1990). Segundo os autores, MCs podem armazenar seu conteúdo granular de várias formas e assim os grânulos podem ser classificados em: (1) grânulos enrolados (*scrolled*), nos quais o conteúdo se assemelha a um rolo de pergaminho; (2) grânulos particulados, cujo conteúdo se apresenta de forma particulada; (3) grânulos mistos (*mixed*), nos quais o conteúdo armazenado apresenta uma combinação do conteúdo de grânulos

enrolados e particulados; e (4) grânulos densos, os quais possuem conteúdo elétron-denso com ou sem halos (zonas claras ao redor do conteúdo granular).

De acordo com critérios estabelecidos por Farhadi (2005; 2007), realizou-se a contagem de MCs (1) não desgranulados, (2) desgranulados com sinais de desgranulação *piecemeal* e (3) desgranulados com sinais de desgranulação anafilática e *piecemeal*. Considerou-se como não desgranulados MCs que apresentavam todos os grânulos com elétron-densidade homogênea no citoplasma celular. Foram considerados MCs com sinais de desgranulação do tipo *piecemeal* aqueles que apresentaram pelo menos uma das seguintes características: presença de halo claro na periferia granular e diferenças na elétron-densidade do conteúdo granular. Finalmente, MCs que apresentaram fusão entre os grânulos ou fusão dos grânulos com a membrana e, mais raramente, formação de labirintos citoplasmáticos, foram considerados MCs com sinais de desgranulação do tipo anafilática. Vale ressaltar que não foram observados MCs com desgranulação somente do tipo anafilática, ou seja, todos os MCs com sinais de desgranulação anafilática também apresentaram sinais de desgranulação *piecemeal*. Ainda, foi analisada a proximidade de MCs desgranulados totais a nervos. Para isso, foi analisada a correlação entre o número de MCs desgranulados totais e número de MCs desgranulados a no máximo 5 micrômetros de nervos, conforme estudo realizado por Barbara e cols. (2007). Para essa análise, foi medida a menor distância entre a borda da membrana plasmática de MCs e a membrana do axônio mais próximo, excluindo-se extensões acima de 5µm.

3.6 Dosagem de triptase

Para a dosagem de triptase foram utilizados amostras de soros de indivíduos do banco de amostras do laboratório de Chagas da Universidade Federal de Goiânia. Assim o grupo utilizado para a dosagem de triptase foi diferente do grupo de indivíduos utilizados para as

outras análises. Foram utilizados soros provenientes de 21 indivíduos infectados com megacólon e 21 indivíduos não infectados diferentes dos indivíduos. A concentração de triptase sérica foi dosada utilizando-se kit e protocolo de ELISA comercial (Enzyme-linked Immunosorbent assay kit, Cloud-Clone Corp. USA). Brevemente, amostras de soro diluídas (5x), foram distribuídas, em duplicata, em placa pré-sensibilizada com anticorpo policlonal conjugado a biotina, específico para triptase humana. Posteriormente, foi adicionada solução de avidina conjugada à peroxidase, seguida de substrato fornecido pelo kit. A absorbância das amostras foi lida em leitor de ELISA com comprimento de onda de 450nm. A concentração da triptase foi calculada com base na curva padrão para triptase, obtida no mesmo experimento, utilizando-se o software SoftMax Pro v5.

3.7 Análise estatística

A análise de variância foi realizada utilizando-se o *Graphpad Prism* (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). Todos os dados foram testados para normalidade, pelo *D'Agostino and Pearson omnibus normality test* e para presença de valores *outliers*, pelo programa *QuickCalcs online, GraphPad outlier calculator*. Os dados não apresentaram distribuição normal, tendo sido, portanto, utilizados os testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunn* para análise estatística dos mesmos. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão no corpo do texto e mediana para os gráficos. As análises de correlação foram realizadas a partir do coeficiente de correlação de *Spearman*. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Evidências da participação de mastócitos (MCs) na patologia do megacólon chagásico

4.1.1 Análise comparativa da densidade de MCs

MCs metacromáticos corados por Giemsa são observados em todas as túnicas do cólon, isolados ou em acúmulos focais e preferencialmente ao redor de vasos; locais onde também são observados eosinófilos (Fig. 1A-D). Distribuem-se principalmente na lâmina própria (Fig. 1A e B), submucosa (Fig. 1 C e D) e serosa, regiões de tecido conjuntivo, mas também podem ser observados dispersos nas túnicas musculares e ao redor dos plexos, submucoso (Fig. 1C) e mioentérico. O número de mastócitos é significativamente maior na lâmina própria, submucosa, plexo mioentérico e muscular interna de indivíduos infectados com megacólon, quando comparado aos indivíduos não infectados (Fig. 1E-H). Esse aumento também é significativo em relação aos indivíduos infectados sem megacólon na lâmina própria, submucosa e muscular interna (Fig. 1E, F e H).

4.1.2. Avaliação ultraestrutural dos MCs

Por meio de análises ultraestruturais investigou-se a morfologia de MCs na lâmina própria e na submucosa do cólon de indivíduos infectados com *T.cruzi* e de indivíduos não infectados. Muitos MCs nessas regiões apresentam-se com morfologia típica de célula ativada, de acordo com os parâmetros descritos na metodologia, página 48. Alguns deles possuem numerosos prolongamentos citoplasmáticos, os quais eventualmente assemelham-se a dobras e estabelecem uma superfície de contato com outras células (Fig. 2A), sendo elas MCs, fibroblastos, eosinófilos ou neurônios. Essas relações serão descritas mais detalhadamente em outros itens.

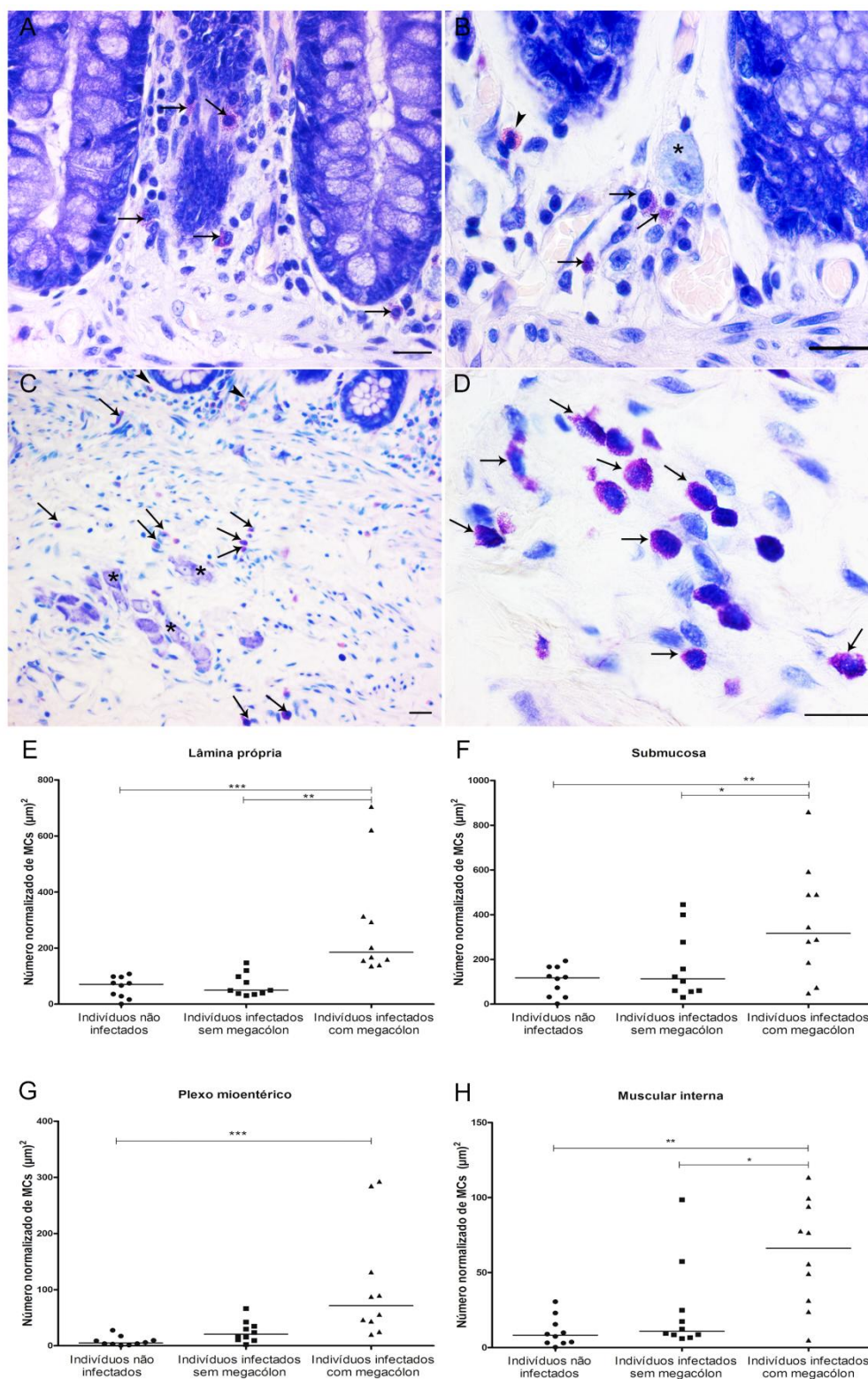


Figura 1. Densidade de mastócitos (MCs) corados por Giemsa no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Em (A-D), fotomicrografias de secções da lâmina própria e submucosa, submetidas à coloração de Giemsa em indivíduos infectados com megacólon. As setas indicam os MCs, cabeça de setas indicam eosinófilos e asterisco corpo neuronal. (Barra 20 μm , aumento original 630x em A, 200x em C e 1000x em B e D). Área total analisada 4410x10³ μm^2 para cada paciente. Os valores estão expressos como mediana. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos representada por (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$ e (*) $P < 0.05$; determinado por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*.

Outra característica de ativação vista em alguns MCs, além da irregularidade da superfície e contato com outros tipos celulares, consiste na presença de sinais de desgranulação, tanto do tipo *piecemeal* ou fragmentada, quanto do tipo anafilática (Fig. 2A-D). É possível observar a presença de halos claros ou elétron-lúcidos dentro dos grânulos, ao redor do conteúdo elétron-denso. Essa redução na elétron-densidade representa a perda do conteúdo granular, característica da desgranulação *piecemeal*, na qual, se podem observar grânulos com conteúdo bastante reduzido ou, mesmo, vazios. Outros sinais da desgranulação *piecemeal* são a presença de pequenas vesículas no citoplasma e grânulos alargados com ampliação da circunferência granular (Fig. 2B e D). A fusão entre grânulos intracitoplasmáticos em MCs representa o início da desgranulação anafilática, em que os MCs secretam o conteúdo granular na superfície celular, fundindo os grânulos entre si e estes com a membrana plasmática (Fig. 2D).

Os MCs apresentam, ainda, grande diversidade no conteúdo de seus grânulos, o qual variou tanto na densidade quanto na organização. Notam-se, grânulos com conteúdo elétron-denso, com aparência homogênea (Fig. 3B), com a presença ou não de halos (Figs. 2A-D e 3C). Outros grânulos apresentam-se com conteúdo com aspecto de pergaminho, denominados “*scrolled granules*” (Fig. 3A e D), ou, com conteúdo com aspecto particulado, denominados “*particulate granules*” (Fig. 3B). Na maioria das vezes, é possível notar que o conteúdo granular apresenta regiões com conteúdo particulado entre estruturas do tipo pergaminho, sendo que grânulos com conteúdo desse tipo foram denominados mistos (Fig. 3A e D). Alguns grânulos apresentam uma diferença na elétron-densidade do conteúdo granular, com grânulos com conteúdo semelhante à meia lua (Fig. 3D).

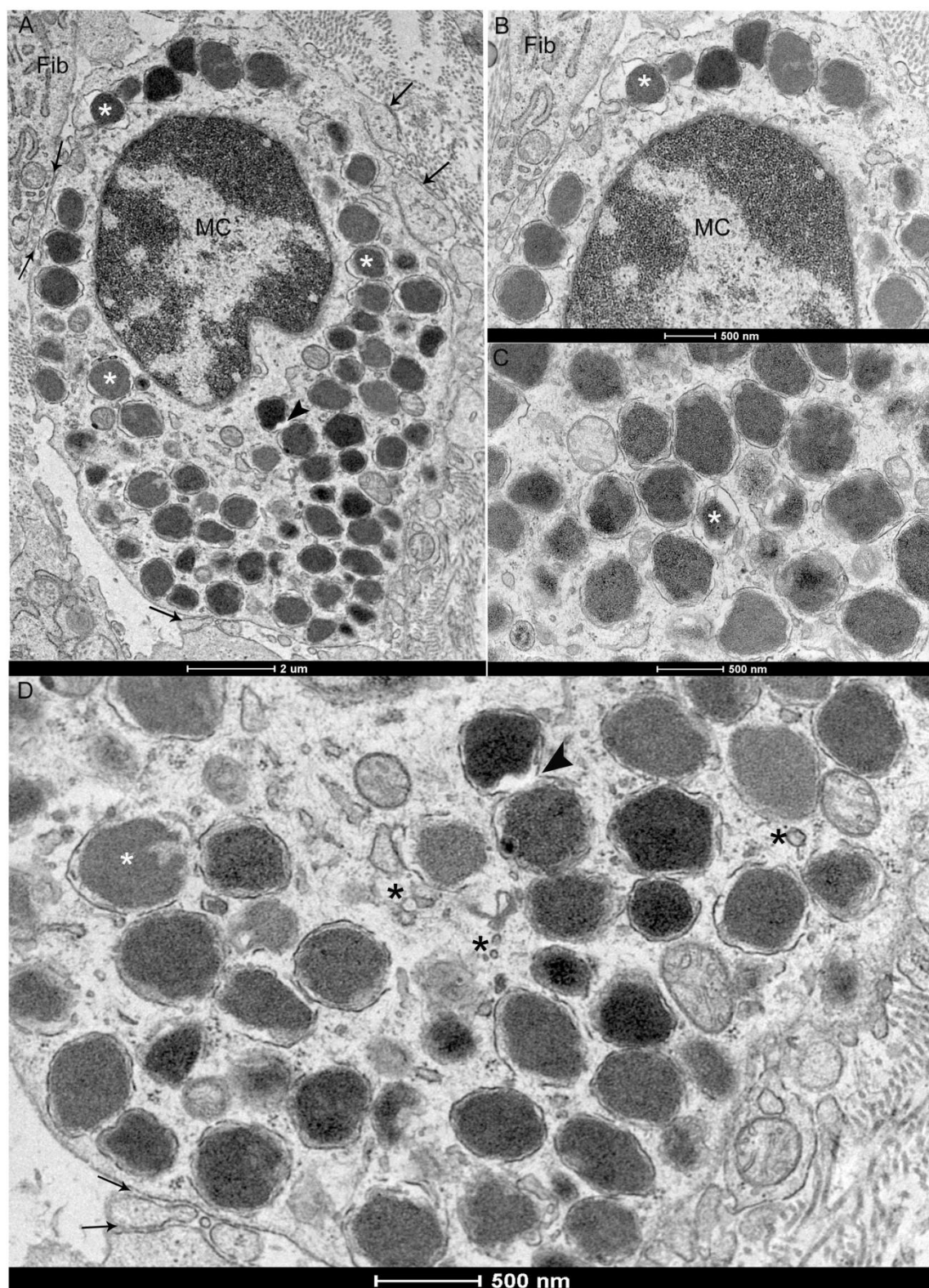


Figura 2. Aspectos ultraestruturais da desgranulação *piecemeal* e anafilática em mastócitos na lâmina própria/ submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Em (A), observa-se mastócito (MC) com numerosos grânulos citoplasmáticos e diversos prolongamentos celulares, os quais podem ser vistos estabelecendo contato com outros tipos celulares (setas). Em maior aumento (B), nota-se uma célula com morfologia sugestiva de fibroblasto (Fib). Em (B-D), são observados grânulos citoplasmáticos com sinais de desgranulação *piecemeal* (asterisco branco), representado por halo elétron-lúcido ao redor do conteúdo elétron-denso. Em (B), nota-se grânulo alargado, com ampliação da circunferência granular, (*) indicativo de aumento do tamanho granular que sugere à endocitose de vesículas. Em (D), podemos notar a fusão entre os grânulos apontada pela cabeça de seta, indicativo de desgranulação anafilática e numerosas vesículas citoplasmáticas de pequeno tamanho, indicadas por asteriscos pretos, que evidenciam a desgranulação *piecemeal*.

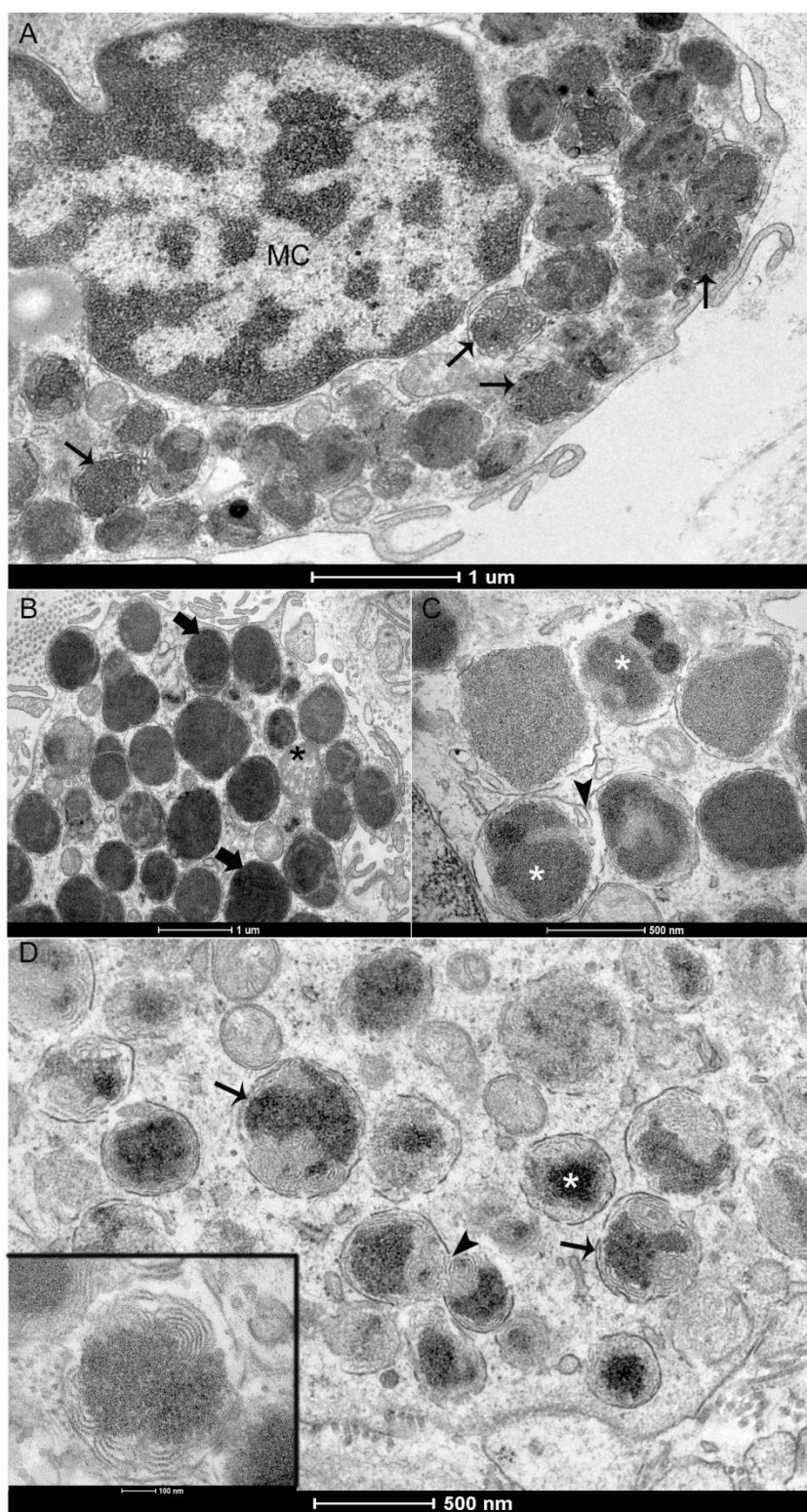


Figura 3. Aspectos ultraestruturais de grânulos de mastócitos na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Em (A), observa-se mastócito (MC) com numerosos grânulos citoplasmáticos de vários tipos. Detalhes de grânulos são mostrados em (B, C e D). Grânulos do tipo misto estão indicados por setas finas. Setas grossas apontam para grânulos elétron-densos e asteriscos pretos indicam grânulos do tipo particulado. Em (C e D), observa-se grânulos com diferenças na elétron-densidade (asteriscos brancos), indicativo de desgranulação *piecemeal* e fusão entre grânulos (cabeça de seta), indicativa de desgranulação anafilática. Em (D), os grânulos em fusão (cabeça de seta) estão com redução da elétron-densidade e com conteúdo em meia lua, indicativos de desgranulação *piecemeal*. No recorte em (D), detalhe de grânulo do tipo *scrolled*.

Além de MCs apresentando sinais de desgranulação, *piecemeal* ou anafilática, são observados também MCs sem sinais de desgranulação. Assim, realizamos uma contagem do número de MCs não desgranulados (Fig. 4A), MCs que apresentam apenas sinais de desgranulação *piecemeal* (Fig. 4B) e MCs que apresentam tanto sinais de desgranulação *piecemeal* quanto anafilática. Não foram observados MCs apresentando apenas sinais de desgranulação anafilática (Fig. 4C).

Entre os indivíduos não infectados, a maioria dos MCs (59%) apresentam-se como não desgranulados, diferente do grupo infectado com megacólon (6%) ou infectado sem megacólon (9%, Fig. 5A). Observamos que, no cólon de indivíduos com megacólon, 60% dos MCs estão com sinais de desgranulação *piecemeal* e anafilática, taxa semelhante àquela observada em infectados sem megacólon (54%) e muito superior à encontrada em indivíduos não infectados (11%, Fig. 5C). Em adição, 93% dos MCs estão desgranulados, o que nomeamos de desgranulados totais (soma de todos os MCs com sinais de desgranulação *piecemeal*, mais todos os MCs com sinais de desgranulação anafilática e *piecemeal*) na mucosa e submucosa do cólon de indivíduos infectados com e sem megacólon, aumento significativo, quando comparado aos indivíduos não infectados (Fig. 5D). Não houve diferença significativa na porcentagem de MCs com apenas sinais de desgranulação *piecemeal* entre os três grupos (Fig. 5B).

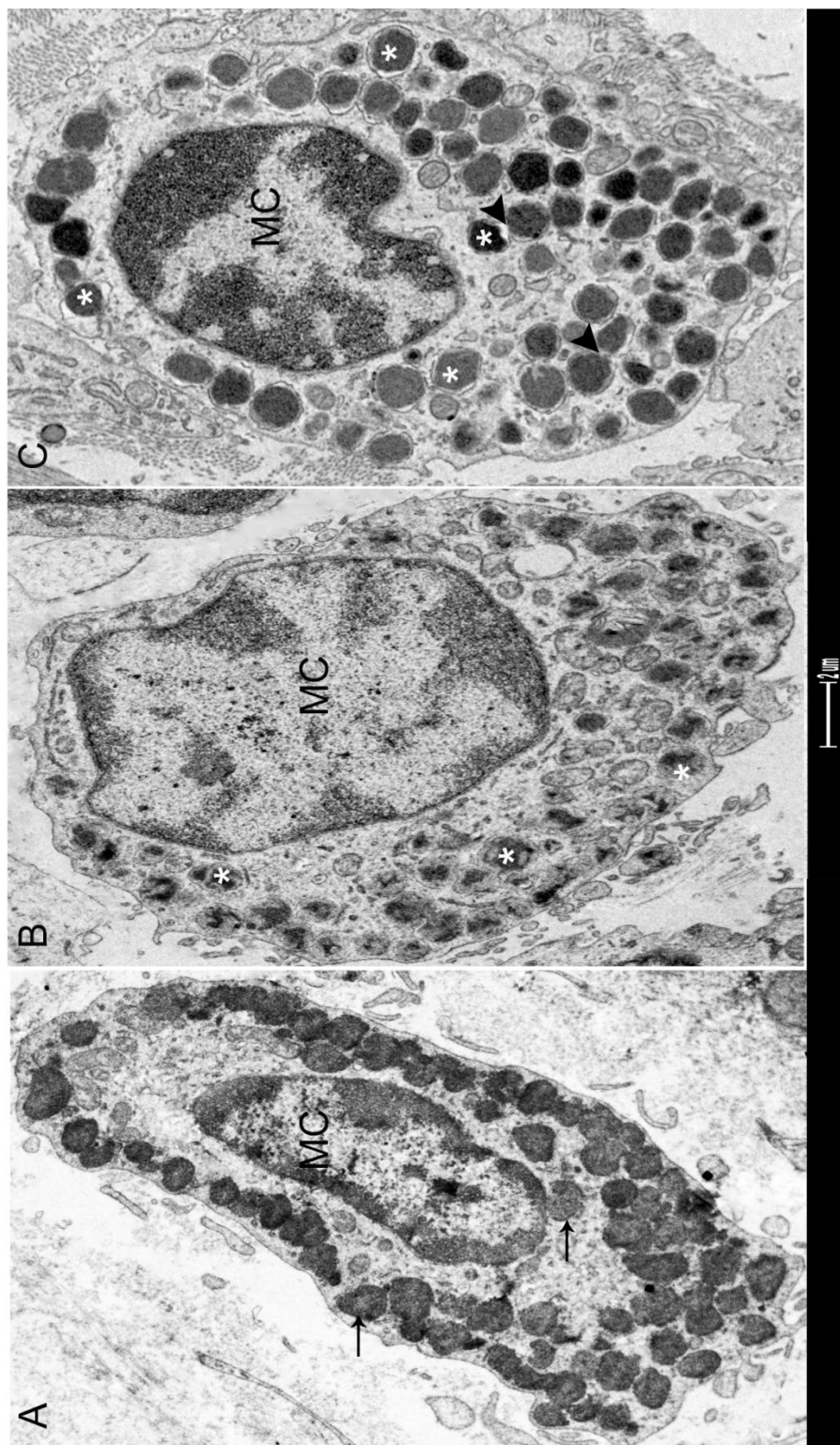


Figura 4. Aspectos ultraestruturais de mastócitos não desgranulados e desgranulados na lâmina própria/ submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Em (A), mastócito (MC) não desgranulado, apresentando apenas grânulos elétron-densos homogêneos sem halos elétron-lúcidos (setas). Em (B), MC com sinais de desgranulação *piecemeal*, apresentando grânulos com variável elétron-densidade e halos elétron-lúcidos (asteriscos). Em (C), MC com sinais de desgranulação anafilática, apresentando grânulos em fusão (cabeças de seta) e grânulos com halos elétron-lúcidos (asteriscos), indicativos de desgranulação *piecemeal*.

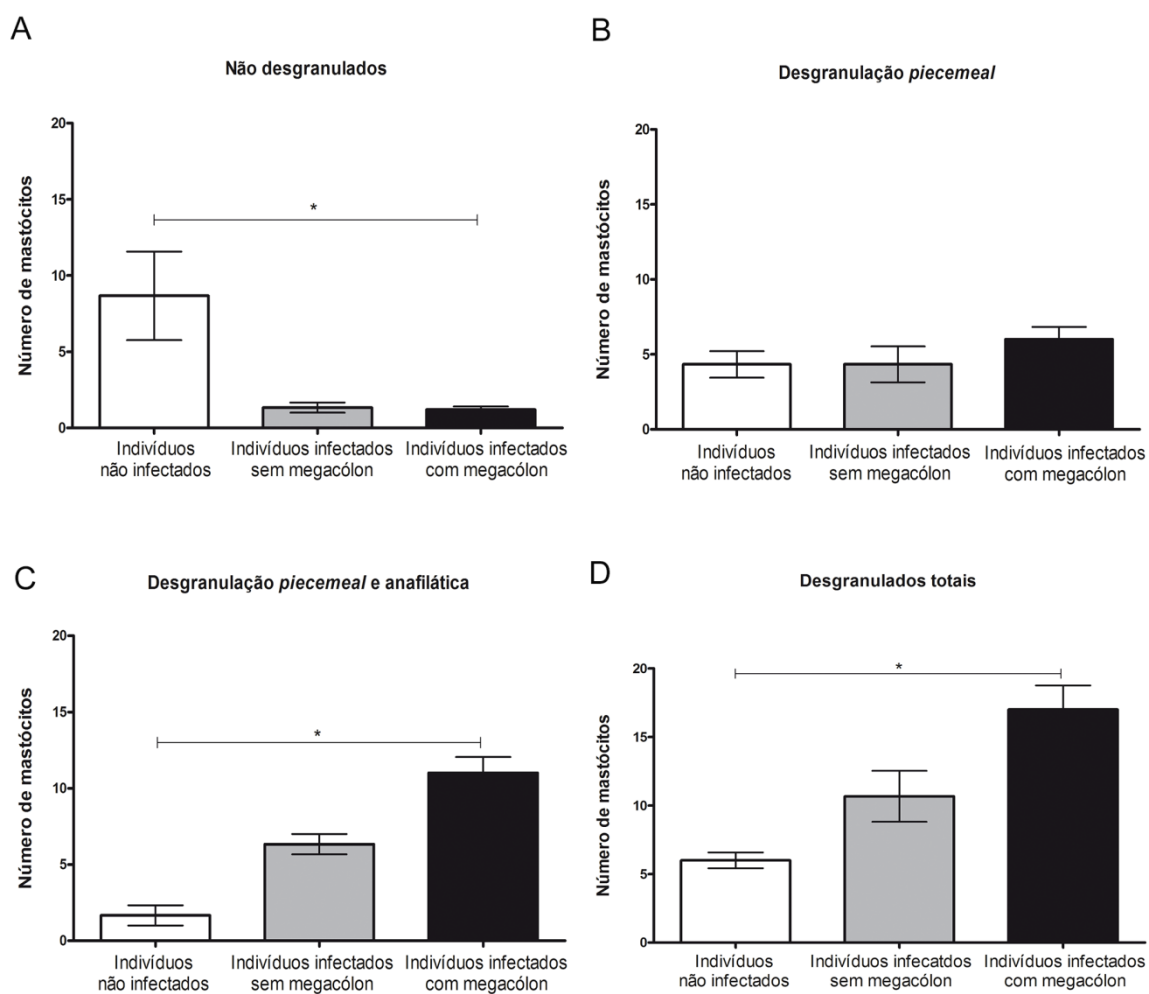


Figura 5. Análise ultraestrutural de mastócitos não desgranulados e desgranulados no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos representada por (*) $P < 0.05$; determinado por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*.

4.1.3 Correlação entre número de MCs e densidade de fibras nervosas

O processo de desnervação foi avaliado por meio da análise da área imunorreativa (IR) ao anticorpo anti-PGP 9.5 (marcador pan-neuronal) no cólon de indivíduos infectados e indivíduos não infectados. A distribuição de PGP 9.5-IR é observada em todas as camadas ou túnicas do cólon (Fig. 6A-F). No entanto, os feixes de filetes nervosos apresentam-se menos espessos em pacientes com megacólon (Fig. 6C e F), quando comparado às amostras de indivíduos não infectados (Fig. 6A e D). Essa diferença na espessura dos filetes nervosos não é observada entre indivíduos infectados sem megacólon e indivíduos não infectados.

A análise morfométrica revelou uma redução significativa da área de PGP 9.5-IR na lâmina própria (Fig. 6G) e na camada muscular interna (Fig. 6H) de indivíduos infectados com megacólon (339 ± 163 e 234 ± 151), em relação aos indivíduos não infectados (528 ± 96 e 1014 ± 452); e uma diminuição significativa na inervação da camada muscular interna entre indivíduos com e sem megacólon (807 ± 542). Não foi observada diferença significativa entre indivíduos infectados sem megacólon e indivíduos não infectados, tanto na lâmina própria como na muscular interna. Podemos notar uma correlação negativa entre o número de MCs corados por Giemsa e área de PGP 9.5-IR na muscular interna de indivíduos infectados e não infectados (Fig. 6I), no entanto, não houve correlação entre esses parâmetros na lâmina própria.

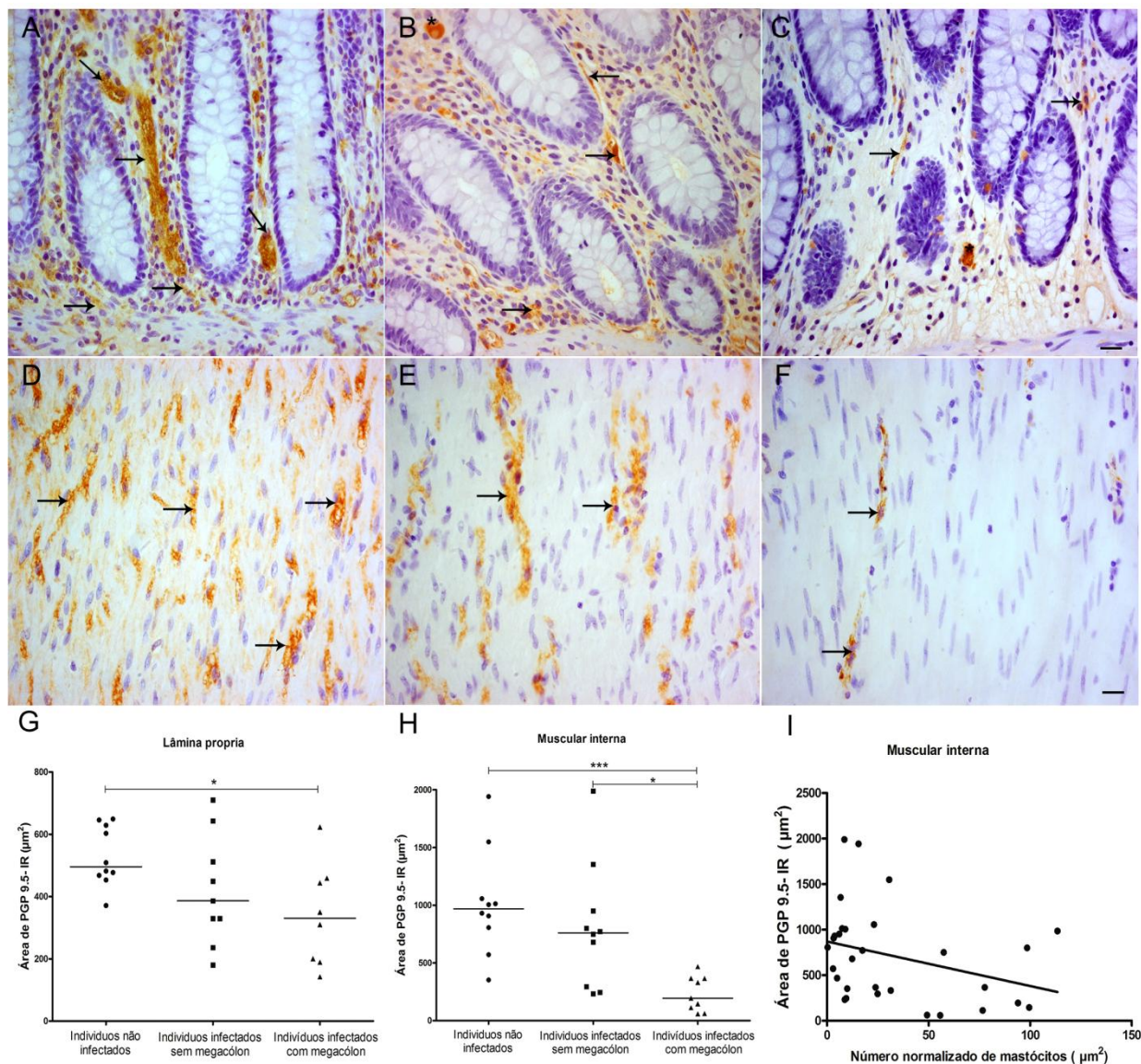


Figura 6. Densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Em (A-F), fotomicrografias de seções da lâmina própria e camada muscular interna, submetidas à reação de imunoperoxidase indireta com o anticorpo anti-PGP 9.5. Em (A e D), indivíduos não infectados; (B e E), indivíduos infectados sem megacólon; (C e F), indivíduos infectados com megacólon. As setas indicam os filetes nervosos e asteriscos corpos neuronais. (Barra 20μm, aumento original 400x). Em (G-H), área de PGP-IR na lâmina própria (G) e muscular interna (H). Área total analisada = $1914 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ por paciente. Valores expressos como mediana. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos representada por (***) $P < 0.001$ e (*) $P < 0.01$; determinado por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*. Em (I), correlação negativa entre o número de mastócitos corados por Giemsa e área de PGP 9.5 na muscular interna de indivíduos infectados e não infectados. Correlação de *Spearman*, ($r = -0,3922$ e $P = 0,0321$), $P < 0.05$.

4.1.4 Avaliação ultraestrutural das relações espaciais entre MCs e nervos

MCs da mucosa intestinal são frequentemente observados em proximidade a nervos e a vasos sanguíneos (Figs. 7 e 8). Muitas vezes, é possível observar MCs com grande proximidade a feixes nervosos, apresentando prolongamentos citoplasmáticos e dobras da membrana plasmática, além de seu contato com outros tipos celulares, inclusive com aumento da elétron-densidade na região de contato (Fig. 7A). Os grânulos citoplasmáticos, como já descritos, apresentam evidentes sinais de desgranulação, tanto *piecemeal* quanto de anafilática (Figs. 7B e C). Em uma única ocasião, podemos observar um MC em proximidade a um vaso sanguíneo e envolvido pela ramificação do perineuro de um feixe nervoso, cujas células apresentam-se em íntimo contato com prolongamentos do MC (Figs. 8A-D).

O número de MCs em proximidade menor do que 5 μ m de nervos, ou até mesmo em contato, foi maior em indivíduos infectados com megacólon ($5,4 \pm 3,3$) quando comparado aos indivíduos não infectados ($0,6 \pm 0,5$), $P < 0.05$ (Fig. 9A). Além disso, observamos uma correlação positiva entre proximidade de MCs/nervos e MCs desgranulados ($r = 0,9417$ e $P = 0,0001$) na mucosa/submucosa de indivíduos infectados e não infectados (Fig. 9B).

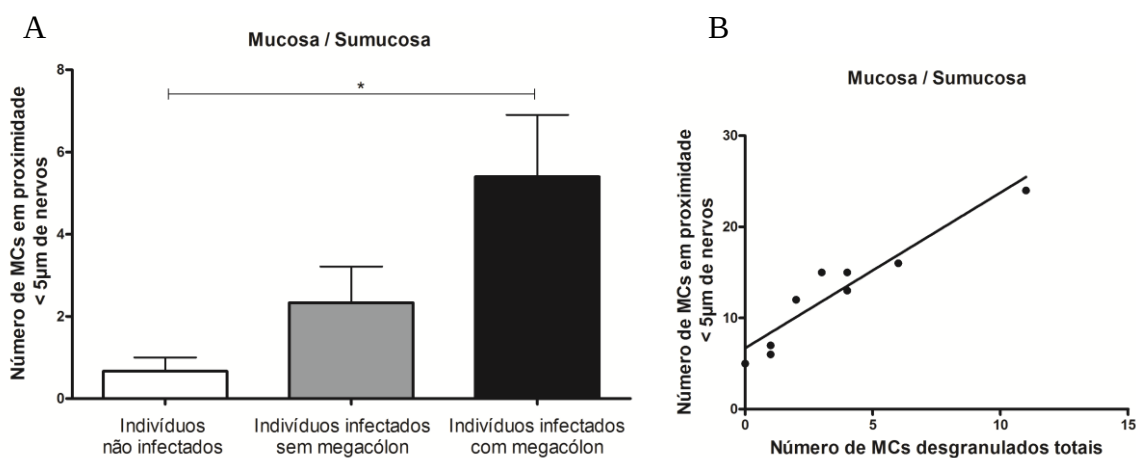


Figura 9. Número de mastócitos (MCs) em proximidade < 5μm de nervos em indivíduos infectados e não infectados e correlação com o número de MCs desgranulados totais. Em (A), os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos representada por (*) $P < 0.05$; determinado por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*. Em (B), observa-se correlação positiva entre o número de mastócitos desgranulados totais e o número de MCs localizados a uma distância < 5μm de nervos na mucosa/submucosa do cólon de indivíduos infectados e não infectados, determinada pelo teste de correlação de *Spearman*, ($r = 0,9417$ e $P = 0,0001$), $P < 0.05$.

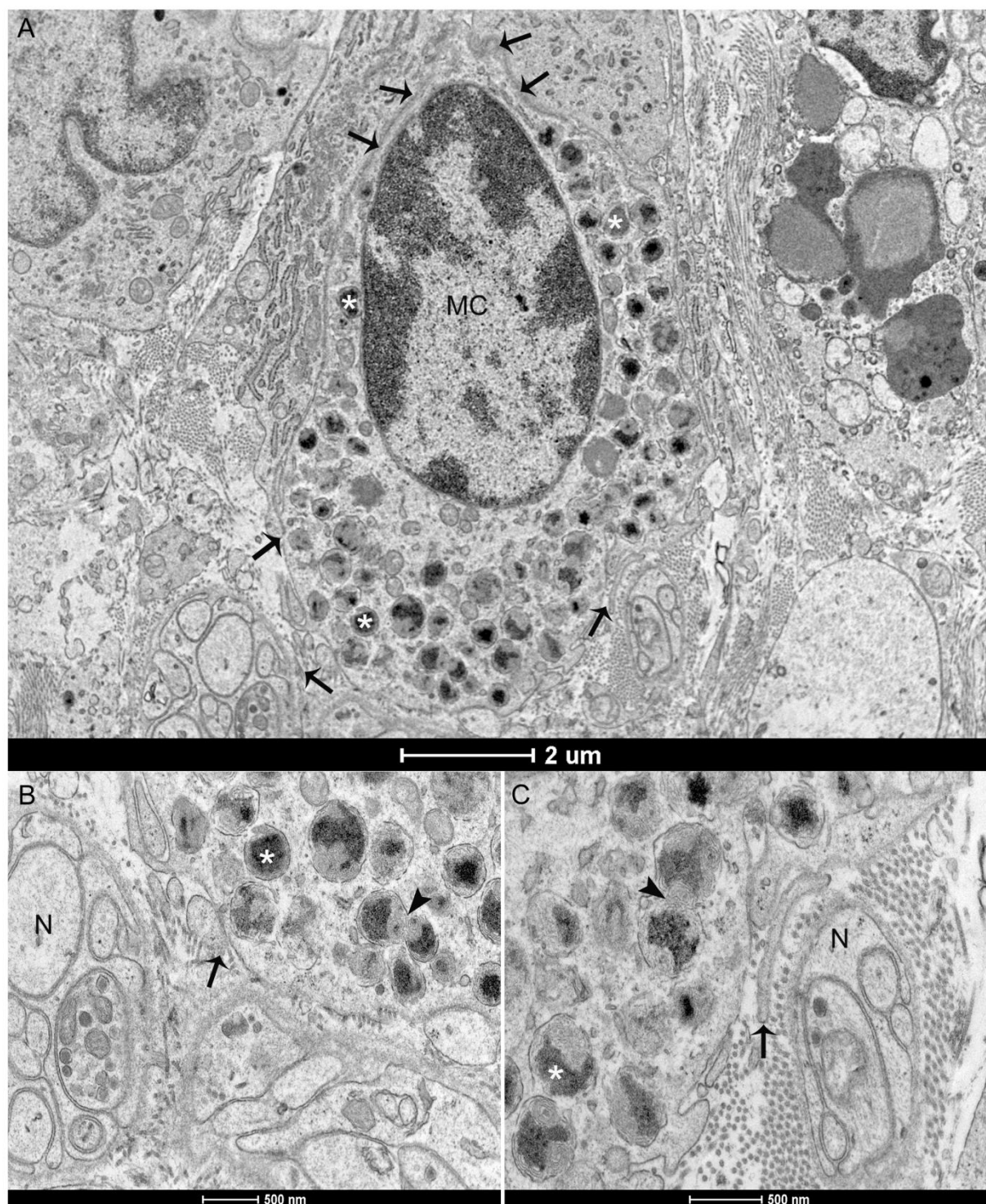


Figura 7. Ultramicrografia eletrônica mostrando mastócito desgranulado em proximidade a nervos na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Em (A), mastócito (MC) próximo a nervos (N), apresentado dobras da membrana plasmática e com elétrondensidade aumentada nas regiões de contato estreito com outros tipos celulares (setas). Em maior aumento (B e C) é possível observar grânulos *scrolled* com diminuição da elétrondensidade (asteriscos), grânulos em fusão (ponta de seta) e dobras ou prolongamentos da membrana plasmática entre MC e N.

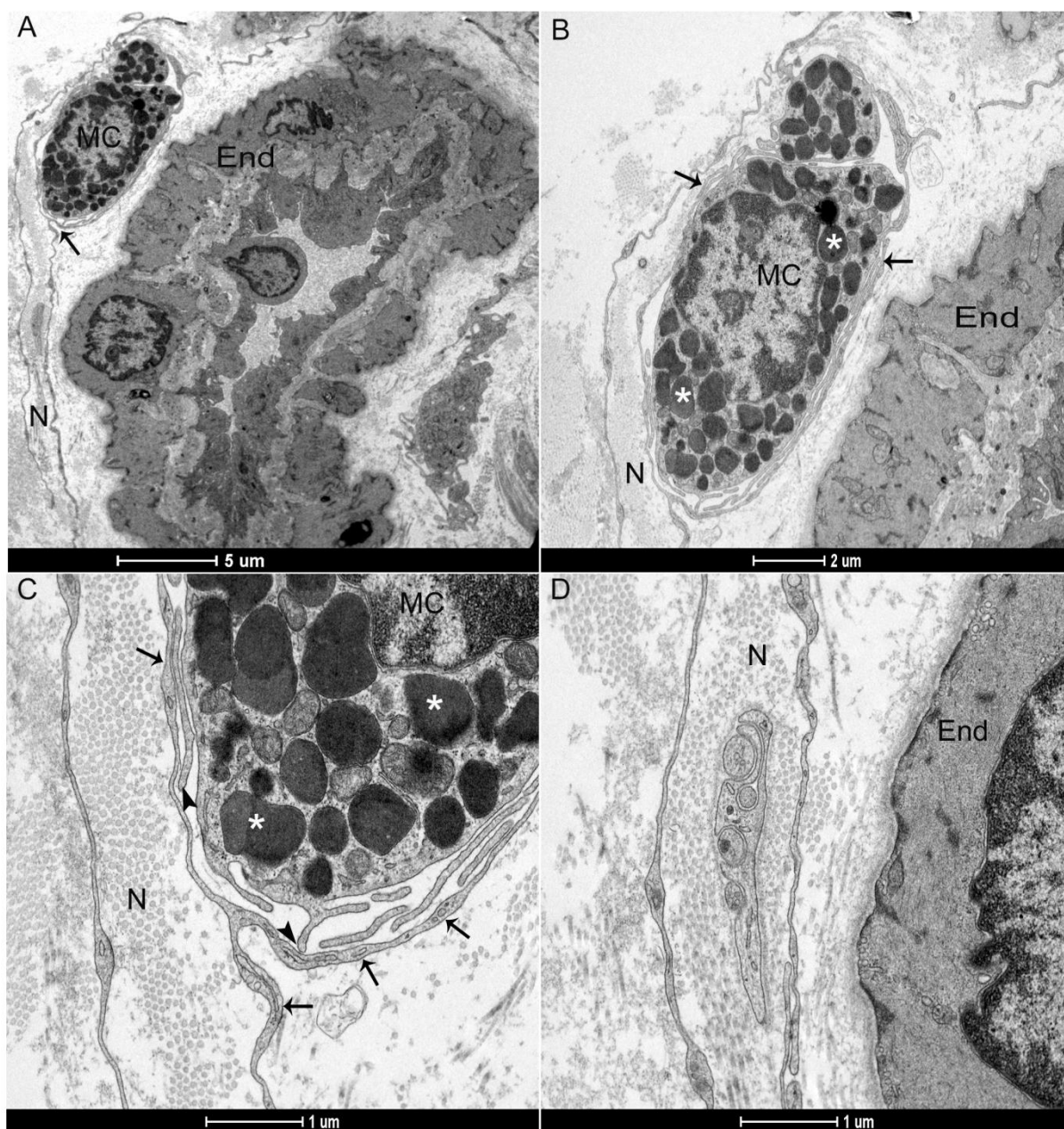


Figura 8. Ultramicrografias eletrônicas mostrando mastócito, vaso sanguíneo e nervo na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduo infectado com *Trypanosoma cruzi*. Em (A), mastócito (MC) é visto em proximidade ao endotélio (End) do vaso sanguíneo e está envolvido pelo perineuro (seta) de um feixe nervoso (N). Em (B e C), detalhes do MC, o qual apresenta grânulos elétron-densos (asteriscos) característicos de célula não desgranulada. Em (C), são evidenciados prolongamentos das células perineurais envolvendo o MC (setas) e em íntimo contato com sua membrana (cabeça de seta). Em (D), detalhe do nervo (N) próximo ao endotélio.

4.2 Avaliação da expressão de quimase e triptase em MCs

MCs triptase-IR e quimase-IR são observados distribuídos na lâmina própria, na túnica muscular e na região do plexo mioentérico do cólon de indivíduos dos grupos analisados (Figs. 10 e 11). Em indivíduos infectados, pode-se observar um grande número de MCs triptase-IR na lâmina própria (Figs. 10B e C). Nesses mesmos indivíduos, na região do plexo mioentérico, MCs triptase-IR são observados dentro de gânglios, em contato íntimo com neurônios e células da glia, além de serem vistos muito próximos a vasos sanguíneos (Figs. 10D e E). Análises morfométricas demonstraram que o número de MCs triptase-IR na lâmina própria foi maior em indivíduos infectados com megacólon quando se comparou com indivíduos não infectados e indivíduos infectados sem megacólon (Fig. 10G). Na túnica muscular interna, o aumento de MCs triptase-IR foi significativo em indivíduos infectados, com e sem megacólon, quando comparado com indivíduos não infectados (Fig. 10H). Já na região do plexo mioentérico, esse aumento se mostrou significativo em indivíduos com megacólon, quando comparado com indivíduos sem mega e indivíduos não infectados (Fig. 10I).

MCs quimase-IR distribuíram-se de modo similar aos MCs triptase-IR na lâmina própria, muscular interna e região de plexo mioentérico de indivíduos não infectados (Figs. 11A e D), indivíduos infectados sem megacólon (Figs. 11B e E) e indivíduos infectados com megacólon (Figs. 11C e F). As análises morfométricas mostraram aumento significativo do número de MCs quimase-IR na lâmina própria do cólon de indivíduos infectados portadores de megacólon, quando comparado a indivíduos sem megacólon e indivíduos não infectados (Fig. 11G).

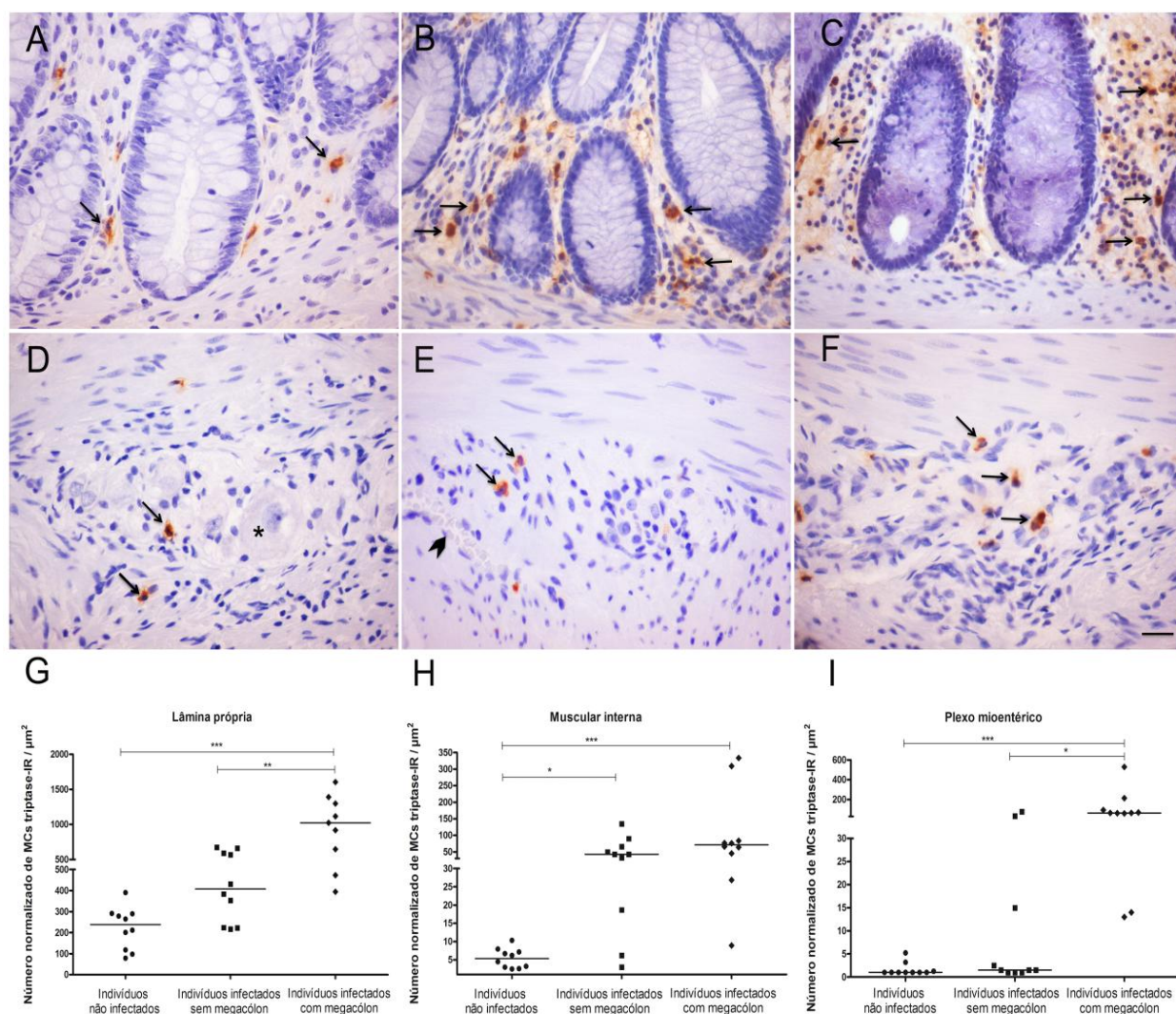


Figura 10. Expressão de triptase por mastócitos (MCs) no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Em (A-C), observam-se micrografias de seções da mucosa; e em (D-F), do plexo mioentérico do cólon de pacientes submetidas à reação de imunoperoxidase indireta com o anticorpo anti-triptase. As figuras (A e D) representam indivíduos não infectados; (B e E), indivíduos infectados sem megacólon e (C e F), indivíduos infectados com megacólon. Setas indicam MCs, asterisco indica corpo neuronal e cabeça de seta indica vaso sanguíneo. (Barra 20 μm , aumento original 400x). Em (G-I), análise morfométrica de MCs triptase-IR: (G), na lâmina própria; (H), camada muscular interna, e (I), região de plexo mioentérico em 20 campos por camada em cada indivíduo, utilizando objetiva de 40x. Área total analisada: 4410x10³ μm^2 por indivíduo. Os valores estão expressos como mediana. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos representada por (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$ e (*) $P < 0.05$; determinado por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*.

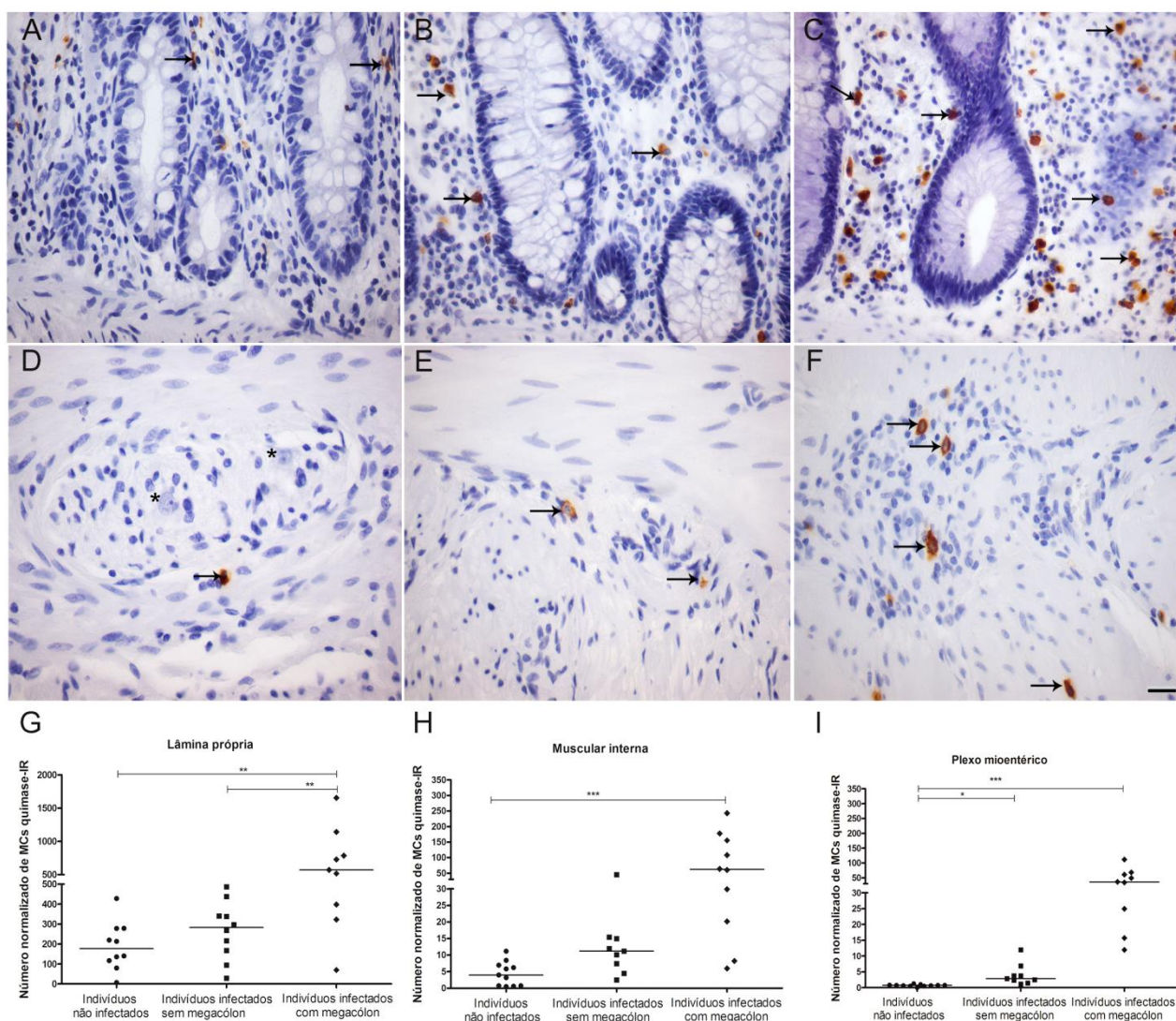


Figura 11. Expressão de quimase por mastócitos (MCs) no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Em (A-C), observam-se micrografias de secções da mucosa e em (D-F), do plexo mioentérico do cólon submetidas à reação de imunoperoxidase indireta com o anticorpo anti-quimase. As figuras (A e D) representam indivíduos não infectados; (B e E), indivíduos infectados sem megacólon e, (C e F), indivíduos infectados com megacólon. Setas indicam MCs e asterisco indica corpo neuronal. (Barra 20 μm , aumento original 400x). Em (G-I), análise morfométrica de MCs quimase-IR: (G), na lâmina própria; (H), na camada muscular interna e (I), na região de plexo mioentérico; em 20 campos por camada em cada indivíduo, utilizando objetiva de 40x. Área total analisada: 4410 $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ por indivíduo. Os valores estão expressos como mediana. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos representada por (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$ e (*) $P < 0.05$; determinado por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*.

O aumento de MCs quimase-IR também foi observado na muscular interna do cólon de indivíduos com megacólon, em relação aos indivíduos não infectados (Fig.11H); e, no plexo mioentérico do cólon de indivíduos infectados, com e sem megacólon, em relação aos não infectados (Fig. 11I).

4.3 Avaliação da participação de triptase na patologia do megacólon chagásico: Evidências da interação entre MCs e neurônios/nervos mediada por triptase

4.3.1 Correlação entre o número de MCs triptase-IR e densidade de fibras nervosas

Foi realizada análise de correlação entre a área de PGP 9.5-IR, e o número de MCs triptase-IR e quimase-IR na lâmina própria e muscular interna. Quando todos os grupos são analisados conjuntamente, observa-se que, na muscular interna, quanto maior o número de MC triptase-IR e quimase-IR, menor a área de PGP ($r = -0,4317$, $P = 0,0172$, [Fig.12A] e $r = -0,4695$, $P = 0,0089$ [Fig.12B]). No entanto, não há correlação significativa na lâmina própria ($r = 0,01936$, $P = 0,9191$ e $r = 0,01313$, $P = 0,9451$).

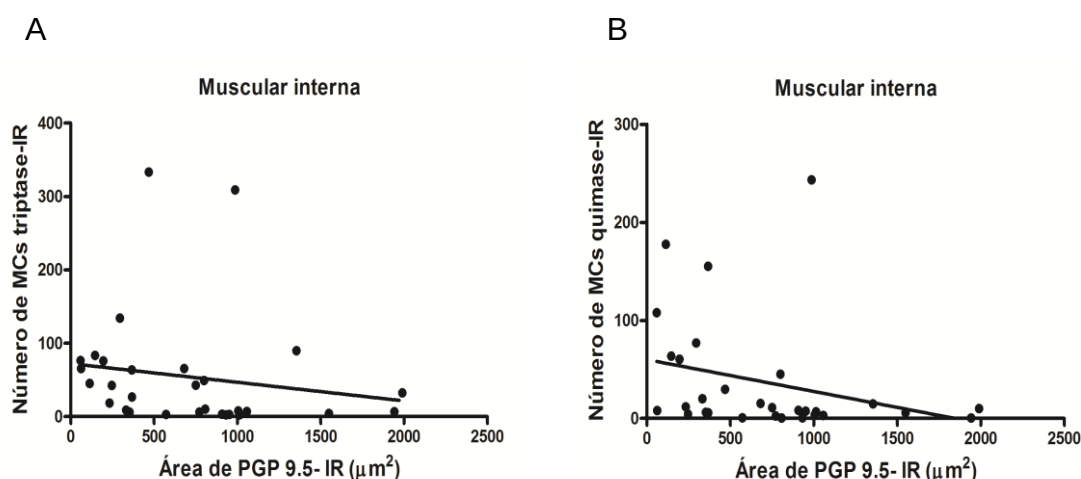


Figura 12. Correlação entre o número de mastócitos (MCs) triptase-IR ou quimase-IR e área de PGP 9.5-IR no cólon de indivíduos infectados e não infectados. Correlação de Spearman. Em (A, $r = -0,4317$ e $P = 0,0172$) e em (B, $r = -0,4695$, $P = 0,0089$), $P < 0.05$.

4.3.2 Avaliação da expressão de PAR2-IR em neurônios

Neurônios imunorreativos ao anticorpo anti-PAR2 são observados em gânglios dos plexos mioentéricos de indivíduos infectados com e sem megacólon e em indivíduos não infectados (Fig. 13A). Observamos também, em menor número, neurônios não reativos à técnica, os quais foram considerados negativos e, denominados PAR2(-). A porcentagem de neurônios PAR2-IR em indivíduos com megacólon ($42,48 \pm 28,82$) foi estatisticamente menor quando comparada à de indivíduos não infectados ($92,54 \pm 6,09$). Apesar de a média de neurônios PAR2-IR apresentarem-se menor em indivíduos infectados sem megacólon, esta não foi significativa em relação aos indivíduos não infectados (Fig. 13B).

4.3.3 Correlação entre a porcentagem de neurônios PAR2-IR e o número de MCs triptase-IR

Investigou-se a existência de correlação entre número de MCs triptase-IR e porcentagem de neurônios PAR2-IR do plexo mioentérico em indivíduos infectados com *T. cruzi* (com e sem megacólon). Foi encontrada a correlação negativa entre esses parâmetros ($r = -0.5181$, $P = 0,0193$, Fig. 13C), para $P < 0.05$.

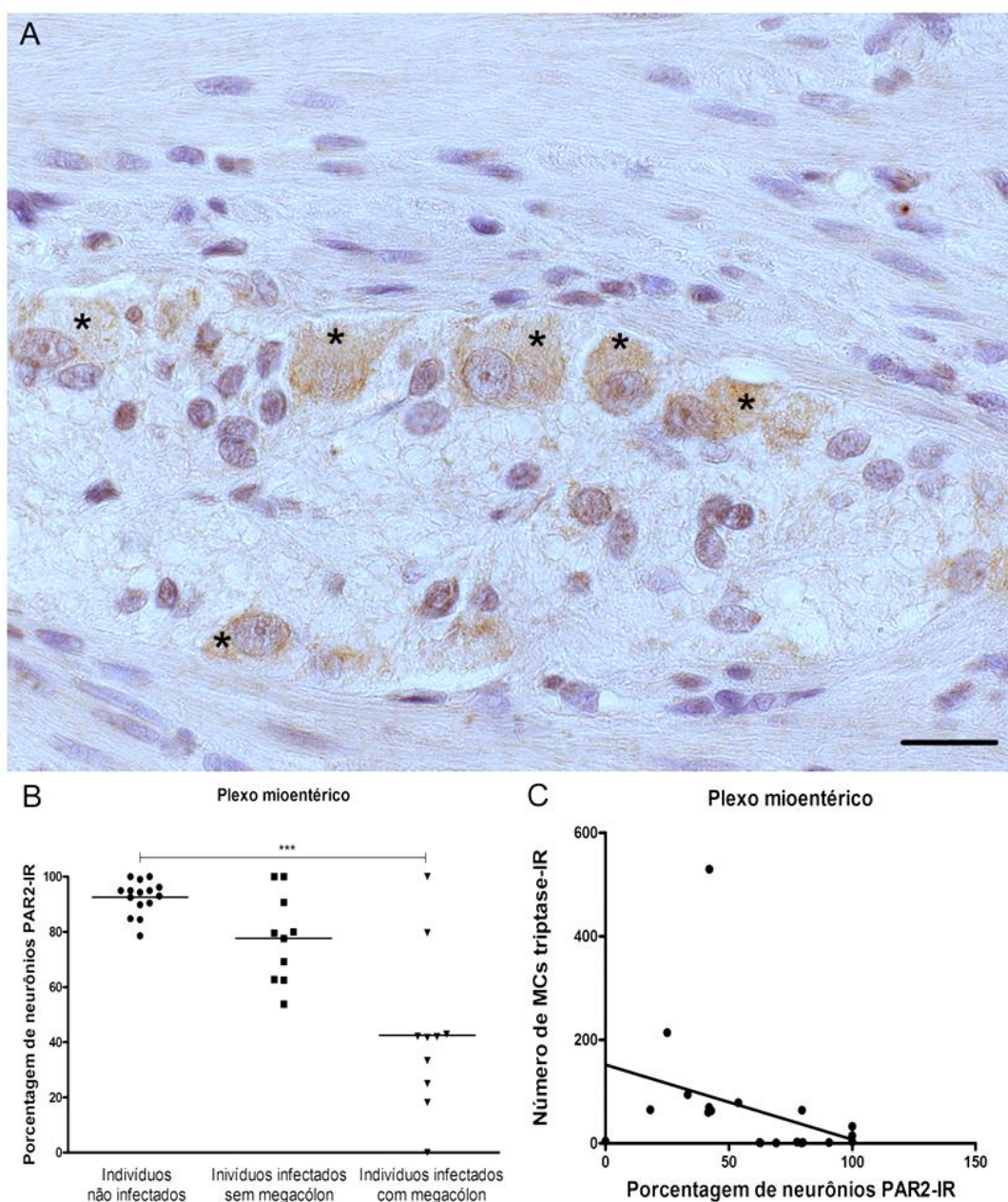


Figura 13. Expressão de PAR2 em neurônios no cólon de indivíduos infectados com *Tripanosoma cruzi* e de indivíduos não infectados. Em (A), observa-se micrografia de secção da região de plexo mioentérico do cólon submetida à reação de imunoperoxidase indireta com o anticorpo anti-PAR2 em indivíduo não infectado. Asteriscos indicam corpos neuronais imunorreativos. (Barra 20 μ m, aumento original 630x). Em (B), observa-se porcentagem de neurônios PAR2-IR em relação aos neurônios PAR2 (-) em gânglios do plexo mioentérico. Foram quantificados neurônios PAR2-IR e PAR2(-) em uma área de 39440 μ m² por campo, utilizando a objetiva de 63X. Os valores estão expressos como média. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi representada por (***) $P < 0.001$; determinada por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*. Em (C), observa-se análise estatística utilizando o teste de *Spearman*, o qual revelou correlação negativa entre o número de mastócitos (MCs) triptase-IR e porcentagem de neurônios PAR2-IR ($r = -0.5181$, $P < 0.0193$) do plexo mioentérico em indivíduos infectados por *T. cruzi*.

4.4 Avaliação da participação de triptase na patologia do megacólon chagásico: Evidências da interação entre MCs e eosinófilos mediada por triptase

4.4. 1. Densidade de eosinófilos e correlação entre MCs triptase-IR e eosinófilos

Eosinófilos corados por H&E foram quantificados na lâmina própria, camada muscular interna e na região de plexo mioentérico, estando representados na Figura 14. Eosinófilos são observados distribuídos na lâmina própria de indivíduos não infectados (Fig. 14A) e pacientes infectados (Fig. 14B e C). No entanto, maior número dessas células é observado em indivíduos infectados com *T.cruzi* quando comparado a indivíduos não infectados, como demonstrados na Figura 14G. Na região de plexo mioentérico o número de eosinófilos é bem menor do que normalmente é observado na lâmina própria (Figs. 14D-F), em todos os indivíduos analisados. Análises morfométricas revelaram aumento significativo do número de eosinófilos na porção dilatada de indivíduos infectados com megacólon comparado a indivíduos não infectados, tanto na muscular interna (Fig. 14H), como na região de plexo mioentérico (Fig. 14I). Esse aumento também é observado na região de plexo mioentérico de indivíduos com megacólon em relação aos indivíduos sem megacólon e indivíduos não infectados (Fig. 14I).

Na análise de correlação de *Spearman*, observa-se correlação positiva entre o número total de eosinófilos e MCs triptase-IR na muscular interna ($r=0.5329$ e $P=0,0156$, Fig. 15B) e no plexo mioentérico ($r=0.5980$ e $P=0,0054$, Fig. 15C), em indivíduos infectados. No entanto, nenhuma correlação entre esses dados é observada na lâmina própria ($r=0.3686$ e $P=0,1098$, Fig. 15A) quando $P < 0.05$ foi considerado.

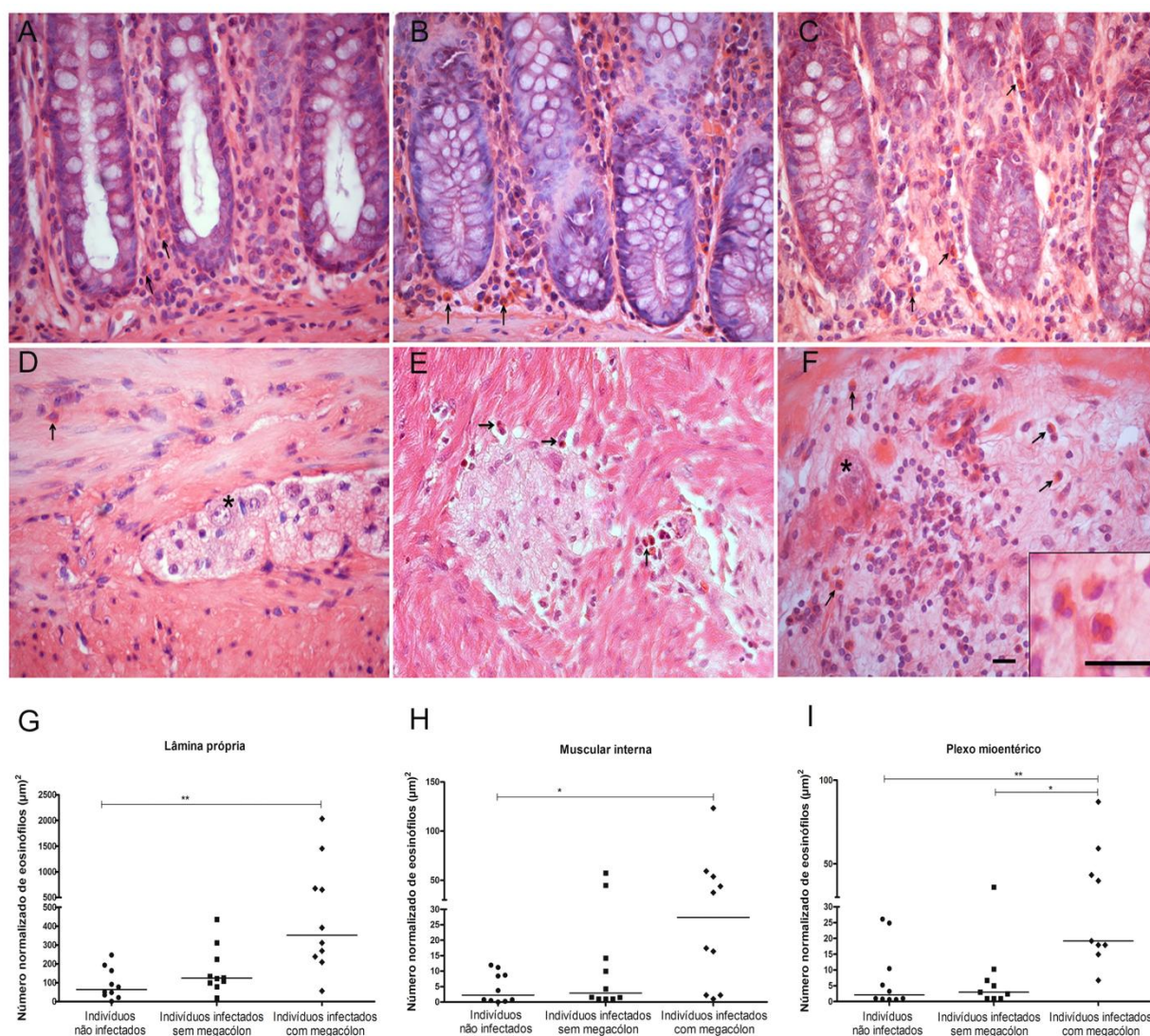


Figura 14. Distribuição de eosinófilos no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Em (A-C), observam-se micrografias de secções da mucosa e (D-F) da região de plexo mioentérico do cólon submetidos à coloração por H&E. As figuras (A e D) representam indivíduos não infectados; (B e E), indivíduos infectados sem megacólon e (C e F), indivíduos infectados com megacólon. Setas indicam eosinófilos. (Barra 20 μm , aumento original 400x). Em (G-I) análise morfométrica de eosinófilos: (G), na lâmina própria; (H), camada muscular interna e (I), região de plexo mioentérico; em 50 campos por camada em cada indivíduo, utilizando objetiva de 100x. Área total analisada 2076 $\times 10^3 \mu\text{m}^2$. Os valores estão expressos como média. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi representada por (**) $P < 0.01$ e (*) $P < 0.05$; determinados por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*.

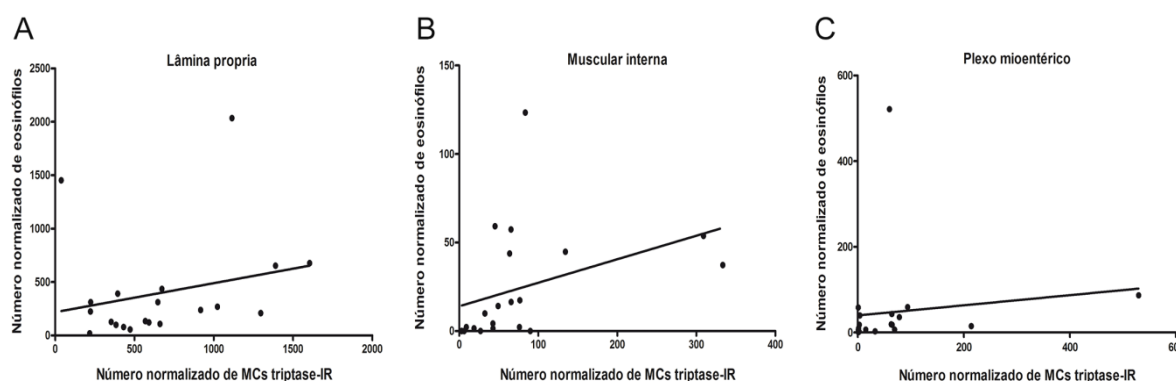


Figura 15. Correlação entre o número de eosinófilos e o número de mastócitos (MCs) triptase-IR no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Em (A-C) correlação positiva entre o número total de eosinófilos e MCs triptase-IR na muscular interna ($r=0.5329$ e $P=0,0156$, Fig. B) e na região de plexo mioentérico ($r=0.5980$ e $P=0,0054$, Fig. 15C). Pelo teste de *Spearman* nenhuma correlação entre esses dados foi observada na lâmina própria ($r=0.3686$ e $P=0,1098$, Fig. 15A), para $P < 0.05$.

4.4.2 Avaliação da expressão de PAR-2 em eosinófilos

Eosinófilos imunorreativos (IR) ao anticorpo anti-PAR2 (considerando-se a morfologia do núcleo, denso e bilobulado), foram quantificados na lâmina própria (Fig. 16A), camada muscular interna e região de plexo mioentérico. Na figura 16B, observa-se secção mostrando um vaso sanguíneo na região de plexo mioentérico repleto de células imunorreativas. Ainda, é observada uma variação na intensidade de imunomarcção, sugerindo que os eosinófilos possam apresentar diferenças na expressão do receptor PAR2. Na figura 16B é possível observar a presença de um eosinófilo negativo para reação, enquanto nas figuras 16A e C observam-se vários eosinófilos imunorreativos.

Através da quantificação de eosinófilos PAR2-IR, observa-se número maior dessas células em indivíduos infectados com megacólon na lâmina própria (Fig. 16D), na camada muscular interna (Fig. 16E) e na região de plexo mioentérico (Fig. 16F), quando comparados com indivíduos infectados sem megacólon e com indivíduos não infectados.

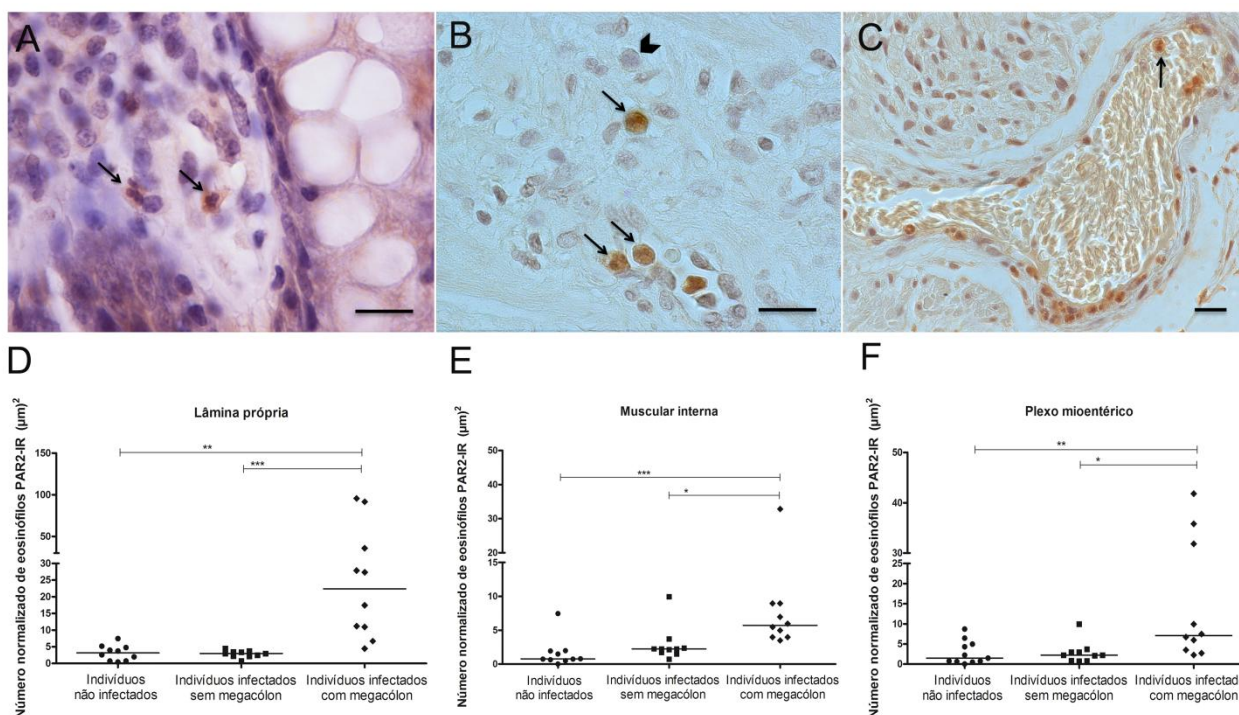


Figura 16. Distribuição de eosinófilos PAR2-IR no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Em (A), observam-se micrografias de secções da mucosa; (B), muscular interna; e (C), região de plexo mioentérico, submetidas à reação de imunoperoxidase indireta com o anticorpo anti-PAR2. Setas indicam eosinófilos imunorreativos e cabeças de seta indicam eosinófilos não marcados pela técnica. (Barra 20 μm , [A e B] aumento original 1000x, [C] aumento original 400x). Em (D-F), análise morfométrica de eosinófilos PAR2-IR: (D), na lâmina própria; (E), na camada muscular interna e (F), na região de plexo mioentérico; em 50 campos por camada em cada indivíduo, utilizando objetiva de 100x. Área total analisada 2076 $\times 10^3 \mu\text{m}^2$. Os valores estão expressos como média. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi representada por (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$ e (*) $P < 0.05$; determinados por teste de *Kruskal-Wallis*, seguido por teste de comparação múltipla de *Dunn*.

4.4.3 Correlação entre eosinófilos PAR2-IR e MCs triptase-IR

Pela análise de correlação de *Spearman*, observa-se correlação positiva entre o número total de eosinófilos PAR2-IR e MCs triptase-IR na lâmina própria ($r=0.5106$ e $P=0,0039$, Fig. 17A), na muscular interna ($r=0.5823$ e $P=0,0007$, Fig. 17B) e no plexo mioentérico ($r=0.5691$ e $P=0,0010$, Fig. 17C), em indivíduos infectados e não infectados, quando $P < 0.05$ foi considerado.

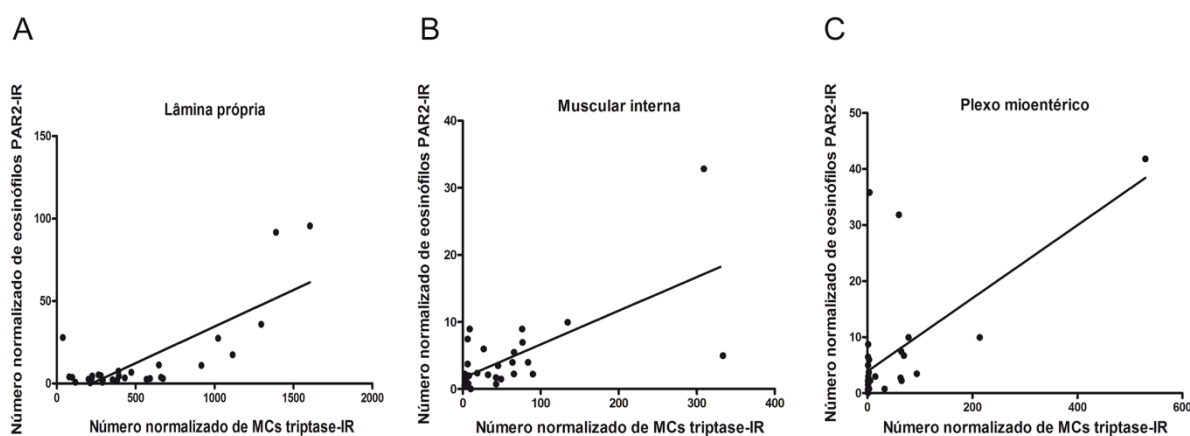


Figura 17. Correlação entre o número de eosinófilos PAR2-IR o número de mastócitos (MCs) triptase-IR no cólon de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos não infectados. Em (A-C) teste de *Spearman*, o qual revelou correlação positiva entre o número total de eosinófilos PAR2-IR e MCs triptase-IR na lâmina própria ($r=0.5106$ e $P=0,0039$, Fig. A), na muscular interna ($r=0.5823$ e $P=0,0007$, Fig. 15B), e na região de plexo mioentérico ($r=0.5691$ e $P=0,0010$, Fig. C), para $P < 0.05$.

4.4.4 Avaliação ultraestrutural das relações espaciais entre MCs e eosinófilos

A análise por microscopia eletrônica de transmissão de MCs e eosinófilos na lâmina própria e submucosa do cólon de indivíduos infectados e não infectados revelou uma estreita proximidade entre esses dois tipos celulares, os quais são vistos projetarem extensões de prolongamentos do citoplasma e estabelecerem superfícies de contato. Nas situações em que MCs estão em contato com eosinófilos (Figs 18A e B), os dois tipos celulares apresentam, muitas vezes, evidências morfológicas de ativação. Nota-se uma evidente desgranulação *piecemeal* nos MCs, enquanto eosinófilos em contato com os mesmos apresentam, muitas vezes, seus citoplasmas com número reduzido de grânulos, o que sugere atividade de desgranulação nessas células (Fig. 18A).

Além de estabelecer contatos com MCs, eosinófilos são vistos também em íntima relação com outros eosinófilos (Fig. 19A). Nesse caso, eosinófilos também apresentam sinais de ativação, como variação da elétrondensidade do conteúdo granular e fusão entre os grânulos. A fusão de grânulos foi frequente, indicando prevalência da desgranulação do tipo anafilática nesse tipo celular. Entretanto, é possível observar também, concomitantemente, a fusão entre grânulos, os mesmos com diminuição do conteúdo granular, típicos da desgranulação *piecemeal* (Figs. 19A e B).

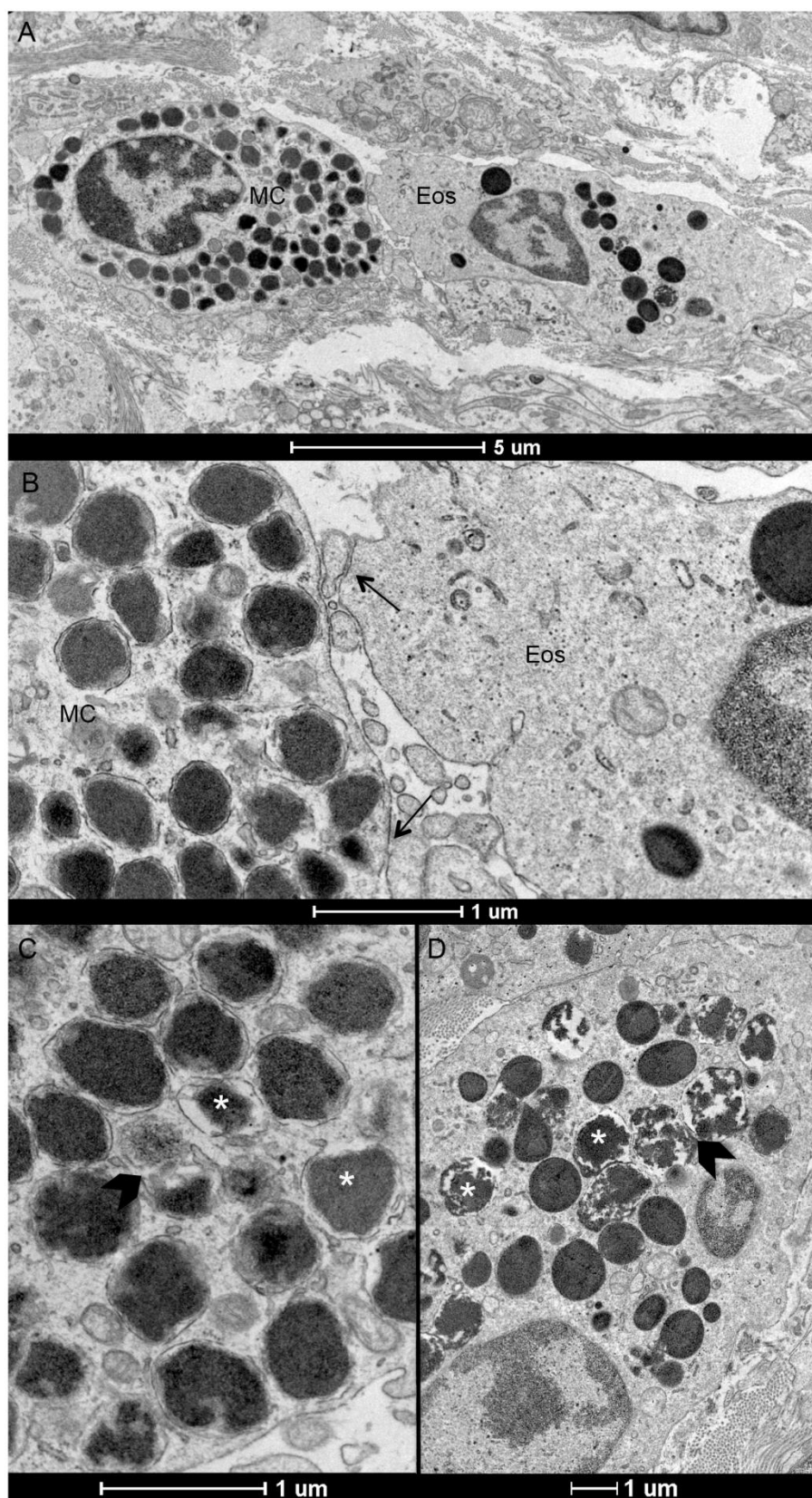


Figura 18. Ultramicrografias eletrônicas de mastócito e eosinófilo na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduo infectado com *Trypanosoma cruzi*. Em (A), mastócito (MC) pode ser observado em contato com eosinófilo (Eos), este com poucos grânulos citoplasmáticos. Em maior aumento (B), é possível observar um estreito contato entre prolongamentos dos dois tipos celulares (setas). Em (C), os grânulos do MC apresentam sinais evidentes de desgranulação *piecemeal*, demonstrado pelo conteúdo condensado em *scroolled* e com halos elétron-lúcidos (asteriscos); e, em menor frequência, desgranulação anafilática, indicada pela fusão entre os grânulos (cabeça de seta). Em (D), um eosinófilo com sinais evidentes de desgranulação *piecemeal* (asteriscos) e anafilática (cabeça de seta).

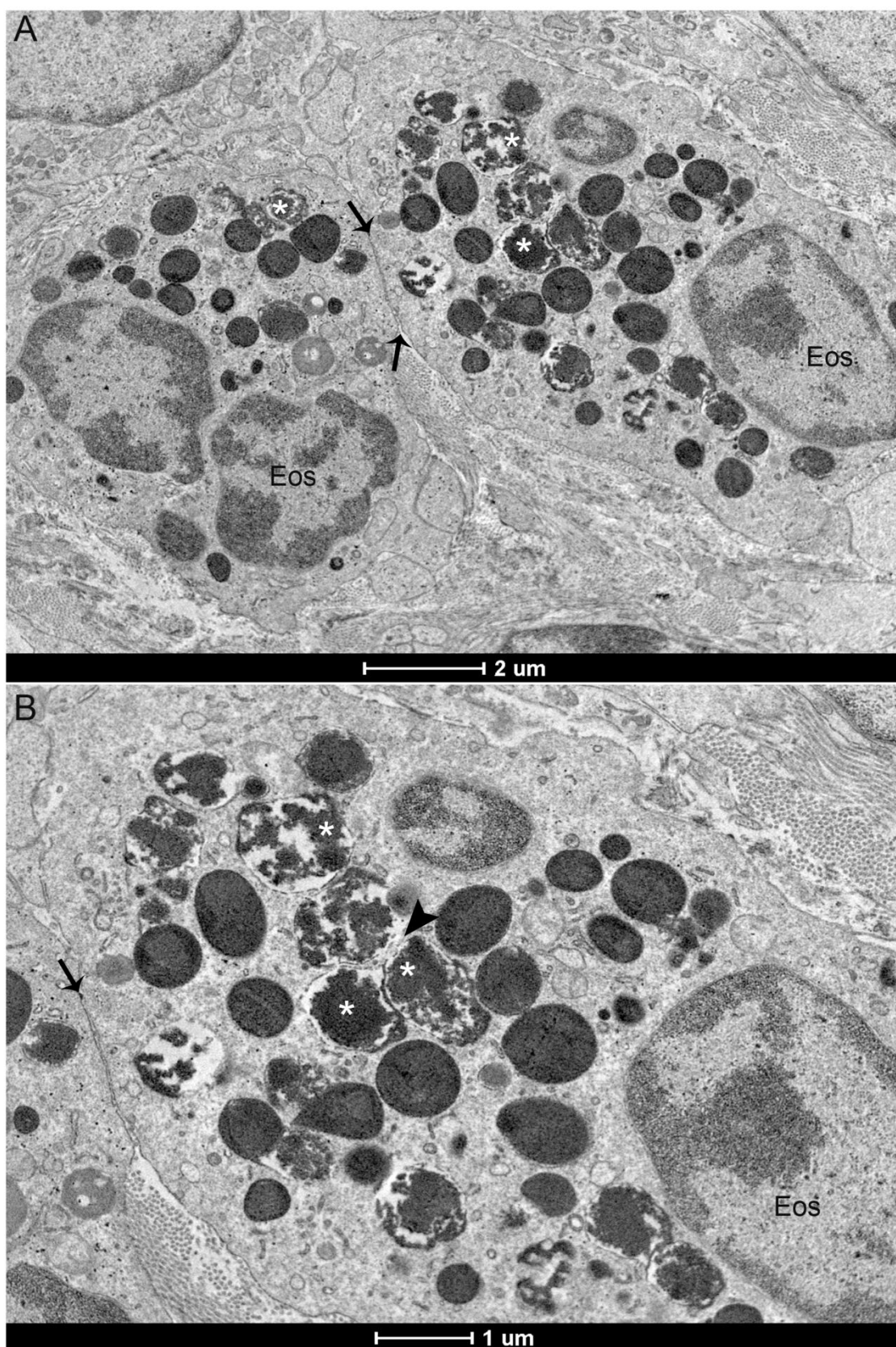


Figura 19. Ultramicrografias eletrônicas de eosinófilos na lâmina própria/submucosa do cólon de indivíduo infectado com *Trypanosoma cruzi*. Em (A), setas indicam íntimo contato entre eosinófilos (Eos), os quais apresentam sinais de desgranulação (asteriscos). Em maior aumento (B), é possível observar grânulos de um dos Eos com sinais evidentes, tanto de desgranulação *piecemeal* (asteriscos), quanto de desgranulação anafilática; esta, por meio da fusão entre três grânulos (cabeça de seta).

4.5 Avaliação da utilização de triptase como diagnóstico da lesão

A fim de investigar os níveis de triptase no soro de indivíduos infectados com megacólon foi realizada a dosagem por ELISA. A concentração de triptase não se mostrou diferente entre indivíduos não infectados (58.31 ± 39.77) e infectados com megacólon ($57.02 \pm 21,24$) como podemos observar na figura 20.

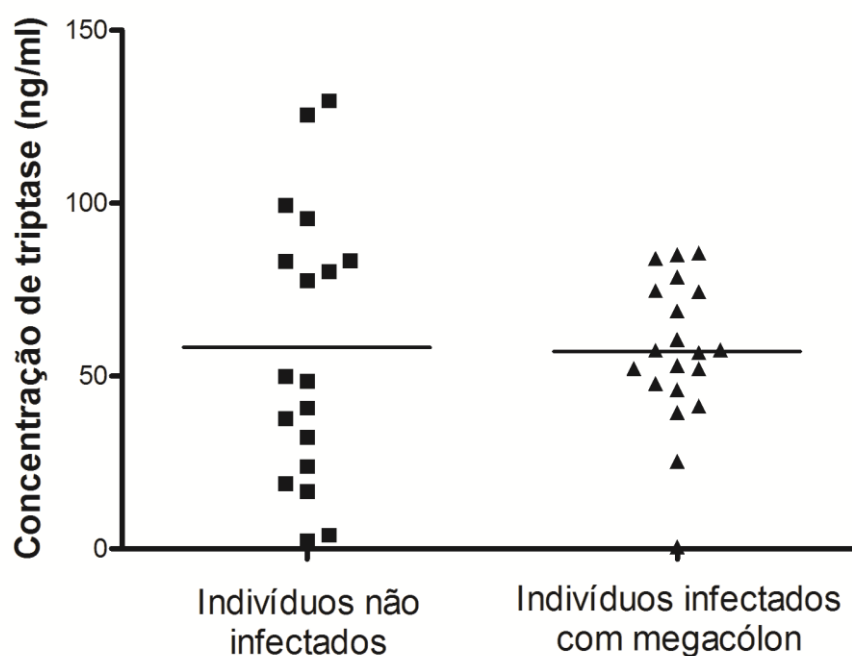


Figura 20. Níveis séricos de triptase em indivíduos não infectados e infectados com megacólon. Os valores estão expressos como média de triptase em ng/ml. Não foi observada diferença estatística entre os grupos quando considerado $P < 0.05$; $P = 0,80$, determinado por teste *Mann Whitney*.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objetivo a busca de evidências da interação entre MCs e neurônios e MCs e eosinófilos, para a avaliação do papel dos MCs na patologia do megacólon chagásico. Analisamos a distribuição de MCs triptase-IR ou quimase-IR e também a expressão de PAR2-IR, receptor de triptase, em eosinófilos e neurônios. Realizamos a análise ultraestrutural de MCs, bem como a investigação da interação espacial dessas células com neurônios e eosinófilos. Os dados obtidos fornecem evidências da participação de MCs na imunopatologia do megacólon chagásico, com ênfase nos processos de desnervação e recrutamento de eosinófilos, que serão aqui discutidas.

Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão, analisamos a morfologia dos grânulos citoplasmáticos dos MCs de indivíduos infectados e controles, em busca de sinais de ativação dessas células. Na mucosa/submucosa de pacientes com ou sem megacólon, 93% e 91% dos MCs, respectivamente, estão desgranulados. Esses MCs representam a soma de MCs com sinais de desgranulação somente do tipo *piecemeal* e com sinais de ambos os tipos de desgranulação, *piecemeal* e anafilática. Em contraste, não foi observado qualquer sinal de desgranulação em 59% dos MCs de indivíduos não infectados. Na literatura, MCs com desgranulação *piecemeal* têm sido chamados de MCs ativados, enquanto que MCs não desgranulados têm sido chamados de MCs inativos ou em repouso (FARHADI *et al.*, 2005, 2007). Outros estudos descrevem que MCs podem apresentar, dentro da mesma célula, grânulos em processo de desgranulação (ativos) e grânulos em repouso (CRIVELLATO *et al.*, 2006). É provável que no cólon inflamado de indivíduos com megacólon, o microambiente inflamatório, com produção elevada de citocinas como IL-4 e INFs, α e γ (RIBEIRO; CREMA; RODRIGUES, 2008), e também de alguns neuromediadores como substância P (DA SILVEIRA *et al.*, 2007), esteja contribuindo para ativação e o aumento da taxa de

desgranulação que ocorre nesses indivíduos. Estudos *in vitro* têm demonstrado a importância de IL4 e de IFNs na indução da desgranulação *piecemeal* em MCs (DVORAK *et al.*, 1994; CRIVELLATO *et al.*, 2002a; CHO *et al.*, 2015) e de SP na indução da desgranulação anafilática (BISCHOFF *et al.*, 2004).

Até o momento, os dados da literatura são inconsistentes e não elucidam totalmente o significado patofisiológico dos diferentes tipos de desgranulação. Por outro lado, a desgranulação anafilática é mediada pela ligação de antígenos a moléculas de IgE, que desencadeia a liberação de muitos grânulos dentro de poucos minutos, de forma que esse tipo de desgranulação tem sido associado aos sintomas típicos de alergias e infecções parasitárias, intestinais ou pulmonares, como tosse e diarreia (STEAD *et al.*, 1987; HÜGLE, 2014). Já a desgranulação *piecemeal* é lenta e pode ser relacionada a sintomas secundários nas doenças. Ela pode ser considerada um mecanismo parácrino capaz de iniciar a resposta imune, ou até mesmo autoimune, uma vez que é observada em doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide e esclerose sistêmica (HÜGLE, 2014). Outros autores afirmam que a desgranulação *piecemeal* é uma forma de exocitose constitutiva e basal, com MCs influenciando constantemente o meio onde estão (DVORAK *et al.*, 1992), e pode ser considerada uma etapa anterior à desgranulação anafilática. Estudos de MCs *in vitro* e em amostras de tecidos humanos têm demonstrado que, em uma mesma célula, é possível a existência de um fluxo contínuo de eventos secretores que envolva esses dois processos básicos de desgranulação (DVORAK; KISSELL, 1991; DVORAK *et al.*, 1992; CRIVELLATO *et al.*, 2002a). No megacólon chagásico, a desgranulação *piecemeal* é mais frequente do que a desgranulação anafilática, observada em todos os MCs com algum sinal de desgranulação, de forma análoga ao encontrado em outras doenças inflamatórias intestinais crônicas (BALÁZS; ILLYÉS; VADÁSZ, 1989; DVORAK; MORGAN, 1993; ERJEFÄLT *et al.*, 1998; CRIVELLATO *et al.*, 2002b).

A medida da proximidade entre MCs e nervos é mais uma abordagem utilizada para se avaliar a interatividade entre esses dois elementos. Sabe-se, por exemplo, que a proximidade entre MCs e nervos aferentes extrínsecos ou entéricos é crucial para a manutenção da homeostase intestinal (STEAD, 1992; STEAD *et al.*, 1987, 1989; BUHNER; SCHEMANN, 2012). Neurônios sensoriais de mucosa respondem aos sinais de alarme, como infecções, modificando o estado funcional do órgão (FURNESS, 2006; WOOD, 2004) e modulando a resposta imune contra patógenos (MAZZONE; FARRUGIA, 2007). Em doenças inflamatórias crônicas ou cólon irritável, a proximidade entre MCs e nervos está correlacionada com a piora dos sintomas clínicos (BARBARA *et al.*, 2007; RIJNIERSE; NIJKAMP; KRANEVELD, 2007; BUHNER *et al.*, 2009; CHRISTERSON *et al.*, 2009; BALESTRA *et al.*, 2012; DI NARDO *et al.*, 2014). No presente estudo, a proximidade e, em alguns casos, o contato entre MCs e nervos foram observadas, tanto no cólon de indivíduos chagásicos como de indivíduos não infectados. O número de MCs a uma distância menor do que 5µm de nervos é maior em indivíduos com megacólon, que aquele observado em indivíduos controles. Além disso, demonstramos correlação positiva entre a proximidade de MCs/nervos e MCs desgranulados totais em indivíduos infectados, como já observados também em outras doenças intestinais inflamatórias, incluindo colite ulcerativa (STOYANOVA; GULUBOVA, 2002) e cólon irritável (BARBARA *et al.*, 2004).

Alguns estudos *in vitro* demonstram que MCs e neurônios expressam moléculas de adesão, as quais promovem interação entre essas células, funcionando como moléculas coaccessórias na ativação celular. Nesse processo de sinapse neuroimune, os MCs aumentam a expressão de receptores como a neurocinina 1 (NK1), receptor de SP, e os neurônios, por sua vez, aumentam a liberação de SP. Essa interação bidirecional promove maior ativação neuronal e maior desgranulação de MCs (ITO; OONUMA, 2006; ITO *et al.*, 2007). Diante desse cenário, especulamos sobre o significado do aumento do contato entre MCs e nervos na

mucosa/submucosa de indivíduos infectados com megacólon reflita uma maior interação funcional entre essas células, na tentativa de restabelecer a homeostase intestinal.

Por outro lado, é possível que o aumento do número de MCs desgranulados em condições inflamatórias, localizados tanto dentro quanto ao redor de nervos, promova alterações na estrutura desses feixes nervosos (MONK *et al.*, 2007). Nesse estudo, demonstramos aumento de MCs triptase-IR em indivíduos infectados com megacólon. Triptase é uma protease que dentre outras funções, ativa neurônios e células inflamatórias, induzindo a hiperexcitação de neurônios e o aumento da inflamação, tanto na mucosa (REED *et al.*, 2003) como no plexo mioentérico (KUGLER *et al.*, 2012). A ativação e excitação prolongadas de uma grande proporção de neurônios por triptase pode promover a dismotilidade, inflamação (LINDEN *et al.*, 2001) e até morte neuronal (SAND; THEMNER-PERSSON; EKBLAD, 2009). Foi demonstrado que a taxa de sobrevivência de neurônios mioentéricos em cultura diminui na presença de MCs, porém a mesma é restaurada após inibição da desgranulação, inibição de triptase e/ou bloqueio do receptor ativado pela triptase PAR2 (SAND; THEMNER-PERSSON; EKBLAD, 2009). A ativação de PAR2, receptor de triptase, também foi capaz de reduzir a sobrevivência de neurônios do hipocampo de ratos, sugerindo papel neurodegenerativo para PAR2 (SMITH-SWINTOSKY *et al.*, 1997). A triptase em altas concentrações poderia induzir a hiperexcitação e morte neuronal, por meio de excessiva estimulação desses receptores de superfície em neurônios (LUO; WANG; REISER, 2007; DODD, 2002). Neste trabalho, demonstramos a expressão de PAR2 em neurônios, o que nos leva a sugerir o aumento da triptase como um dos fatores determinantes da desnervação na forma digestiva da doença de Chagas. Estudos ultraestruturais, envolvendo imunomarcção de triptase e de PAR2 em neurônios/nervos, bem como a medida da proximidade entre MCs e neurônios, poderão fornecer subsídios para investigar a implicação patofisiológica da triptase na desnervação em pacientes chagásicos.

Observamos que a porcentagem de neurônios PAR2-IR do plexo mioentérico, em pacientes com megacólon, está diminuída em relação ao grupo controle, com correlação negativa entre o número de MCs triptase-IR e a porcentagem de neurônios PAR2-IR em indivíduos infectados. Segundo dados da literatura, em um ambiente rico em triptase, como é o caso do cólon dilatado, ocorre internalização e degradação do receptor, quando este é ativado por triptase na superfície celular (CORVERA *et al.*, 1999; LINDEN *et al.*, 2001).

MCs corados por Giemsa, MCs triptase-IR e MCs quimase-IR estão aumentados, tanto na lâmina própria como na muscular interna e plexo mioentérico de indivíduos infectados com megacólon, em relação aos indivíduos não infectados. A mastocitose, bem como a ativação e desgranulação dessas células, observadas pelos estudos ultraestruturais, indicam a participação dos MCs na patogênese do megacólon chagásico, e o estudo do fenótipo de MCs norteia esses achados. O número de MCs expressando triptase é muito maior do que os que expressam quimase no TGI (MILLER; PEMBERTON, 2002). O papel dessas proteases é discutido em diversas condições patológicas (FRUNGIERI *et al.*, 2002; HEUTINCK *et al.*, 2010; PEJLER *et al.*, 2010). Uma vez liberadas, triptase e quimase podem atuar sinergicamente, principalmente no que diz respeito ao recrutamento de células inflamatórias e clivagem, com consequente inativação, de neuropeptídeos. A triptase cliva VIP tecidual, com ação pró-inflamatória, enquanto a quimase cliva SP, com ação anti-inflamatória (CAUGHEY *et al.*, 1988; PEJLER *et al.*, 2010). Algumas das ações anti-inflamatórias e protetoras da quimase consistem da degradação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-33, que mantém a barreira epitelial intestinal, controle parasitário e controle da pressão arterial, gerando angiotensina II durante a anafilaxia (GEORGE, 2011; ROY *et al.*, 2014). Já o papel da triptase tem recebido destaque em doenças inflamatórias intestinais, onde inflamações neurogênicas ocorrem de modo similar ao observado na forma digestiva da doença de Chagas, principalmente pela possível ação da triptase na ativação de PAR2 em neurônios e células

inflamatórias (BUNNETT, 2006; RIJNIERSE; NIJKAMP; KRANEVELD, 2007; DALE; VERGNOLLE, 2008; BUENO, 2008; KRANEVELD *et al.*, 2008; DE WINTER; DE MAN, 2010; ROTHMEIER; RUF, 2012).

Considera-se que na doença de Chagas a contínua ativação de células inflamatórias contribui para a persistência e exacerbação do processo inflamatório tecidual, observado na fase crônica da forma digestiva da doença (D'AVILA REIS *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005; 2007a). Acreditamos que o aumento de triptase possa influenciar a biologia dos leucócitos locais, promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1 β (MALAMUD *et al.*, 2003). Esses mediadores induzem o acúmulo de células inflamatórias e prolongam a sobrevivência dessas células nos tecidos (COX *et al.*, 1991; GRÖGER *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013).

Outro mecanismo inflamatório da triptase, anteriormente citado, é a indução da liberação de SP em neurônios do SNE que expressam PAR2. A SP atuaria como promotora da inflamação, ativando e recrutando mais células inflamatórias (GREEN *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2003; SU *et al.*, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2013); e induzindo a desgranulação de outros MCs pelo seu receptor, NK1, com liberação de mais triptase (CORVERA *et al.*, 1997). Vale ressaltar que MCs em condições basais não expressam receptores de SP, mas quando se tornam ativados via IgE passam a expressar NK1 (BISCHOFF *et al.*, 2004). No megaeosôfago (NASCIMENTO *et al.*, 2013b) e no megacólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c) chagásicos, o aumento da área relativa de SP-IR em filetes nervosos e neurônios sugere que maiores concentrações de SP tecidual estariam disponíveis nessas condições. Assim, acreditamos que a triptase também promova o processo inflamatório de forma indireta, por induzir neurônios a liberarem SP, além de clivar e inibir a ação de VIP nos tecidos (CAUGHEY *et al.*, 1988). Aqui, defendemos a ideia de que a persistência da inflamação observada em pacientes na fase

crônica da forma digestiva da doença de Chagas poderia ser explicada, ao menos em parte, pelo aumento de MCs triptase-IR.

Outra forma de contribuição de MCs para a imunopatologia do megacólon chagásico seria a indução do recrutamento, ativação e sobrevivência de eosinófilos nos tecidos. O aumento de MCs no megacólon é acompanhado pelo aumento de eosinófilos e, apesar de não podermos estabelecer uma relação de causa e efeito pela abordagem metodológica utilizada em nosso estudo, consideramos importante levantar a discussão sobre o papel dessa relação na imunopatologia do megacólon chagásico. Os MCs secretam proteases, histamina, serotonina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que conduzem ao aumento da permeabilidade microvascular, ao rolamento e à adesão leucocitária (HE; PENG; WALLS, 1997); além de induzirem, em células endoteliais, a produção de eotaxina, potente quimioatraente seletivo de eosinófilos (GARCIA-ZEPEDA *et al.*, 1996; DE BOER *et al.*, 2014). A correlação positiva entre o número de eosinófilos e o número de MCs triptase-IR, na túnica muscular e na região de plexo mioentérico, evidencia a participação de MCs triptase-IR no recrutamento de eosinófilos em indivíduos portadores de megacólon. Corroborando com essa ideia, as análises pelas microscopias de luz e eletrônica mostraram a presença de MCs próximos a vasos sanguíneos, o que poderia facilitar a difusão e atuação de mediadores e proteases dos MCs em células endoteliais, conforme discutido por Mekori e *cols.* (2001). Notamos também que a maioria dos vasos sanguíneos do cólon de indivíduos infectados são imunorreativos a anti-PAR2. Sabe-se que células endoteliais expressam constitutivamente PAR2 (BOLTON *et al.*, 2003) e que a triptase, através da ativação de PAR2 nessas células, pode favorecer a transmigração celular de leucócitos para os tecidos (GREEN *et al.*, 2000; ITOH; SENDO; OISHI, 2005). A ativação de PAR2 induz a produção de quimiocinas e endotelina em células endoteliais, além de estimular a exocitose de moléculas de adesão, como selectinas E, P, molécula de adesão vascular-1 e molécula de adesão intercelular-1 (VERGNOLLE, 1999;

MIIKE; KITA, 2003; SU *et al.*, 2005; CLEATOR *et al.*, 2006). PAR2 ativa também a produção de fator ativador plaquetário (PAF), essencial para o recrutamento de células inflamatórias, mediado por selectina P (MEYER *et al.*, 2005). PAF ligado à membrana endotelial é um importante estímulo à adesão leucocitária e, durante a marginação de leucócitos induzida por selectina P, permanece associado à célula endotelial e pode interagir com receptor de leucócito CD11/CD18, o que induz a adesão (ZIMMERMAN; PRESCOTT; MCINTYRE, 1992). Nesse contexto, poderíamos especular que o aumento do número de MCs triptase-IR, com o aumento da disponibilidade dessa protease no cólon dilatado, somado a outros mediadores de MCs, promova a ativação endotelial e posterior recrutamento de eosinófilos (GARCIA-ZEPEDA *et al.*, 1996; HE; PENG; WALLS, 1997; DE BOER *et al.*, 2014).

O aumento do número de eosinófilos que expressam PAR2 em pacientes com megacólon, em relação aos indivíduos sem megacólon e indivíduos não infectados, sugere, também, uma ação da triptase diretamente sobre os eosinófilos teciduais. Outros trabalhos corroboram esta ideia, ao demonstrarem a expressão de PAR2 em eosinófilos e sua ativação por triptase (MIIKE; MCWILLIAM; KITA, 2001; BOLTON *et al.*, 2003; MATOS *et al.*, 2013). Além de PAR2, eosinófilos podem expressar PAR1 (BOLTON *et al.*, 2003) e PAR3 (MIIKE; MCWILLIAM; KITA, 2001). No entanto, ao estimular esses receptores em eosinófilos *in vitro*, apenas a ativação de PAR2 foi capaz de induzir a desgranulação e a produção de superóxido (MIIKE; MCWILLIAM; KITA, 2001), além de induzir mudança no formato celular e liberação de leucotrienos e de espécies reativas de oxigênio (BOLTON *et al.*, 2003). Mediadores de MCs são capazes de induzir a liberação de IL-6 e IL8, citocinas pró-inflamatórias, em eosinófilos. Dentre muitos mediadores testados, a triptase foi a única substância que induziu o aumento da expressão de RNAm e da liberação de IL-8 em eosinófilos. A via de sinalização mediada pela clivagem de PAR2 por triptase envolve o

aumento de Ca^{2+} intracelular, com produção de trifosfato de inositol, ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosforilação do fator de transcrição AP-1, com consequente produção de IL-6 e IL-8 em eosinófilos humanos (TEMKIN *et al.*, 2002). Esses trabalhos evidenciam o papel de PAR2 na ativação eosinofílica e sugerem que a expressão funcional desse receptor, sob a ação de proteases, tem efeitos regulatórios nas funções dos eosinófilos durante a inflamação.

Eosinófilos expressam constitutivamente PAR2 na superfície celular em baixa quantidade e, uma vez que esses poucos receptores tornam-se ativados por triptase, novas moléculas de PAR2 são recrutadas dos estoques intracelulares para a superfície celular (MIIKE; MCWILLIAM; KITA, 2001; BOLTON *et al.*, 2003). Isso poderia explicar, pelo menos em parte, a observação, no cólon de pacientes chagásicos, da presença de alguns eosinófilos negativos para a marcação imunohistoquímica para PAR2, ao lado de outros fortemente imunorreativos para o receptor.

A análise ultraestrutural realizada em nosso estudo permitiu-nos evidenciar a interação entre eosinófilos e MCs, por meio da observação de contato entre essas células. Além dos sinais conspícuos de ativação, como desgranulação, tanto do tipo *piecemeal*, quanto anafilática, observadas em ambos os tipos celulares, foi possível observar regiões de contato entre as superfícies celulares dos MCs e eosinófilos. Eosinófilos, nessas condições, mostraram sinais de ativação, como redução do número de grânulos e vacuolização citoplasmática, sinais esses, também descritos em outros estudos (CARUSO *et al.*, 2007; ELISHMERENI *et al.*, 2011).

Sabe-se que mediadores de MCs e de eosinófilos têm efeitos parácrinos e interferem na biologia um do outro, em um processo de comunicação bidirecional (SHAKOORY *et al.*, 2004). Análises de cocultura dessas células demonstram a importância dos MCs para a sobrevivência de eosinófilos, mantida tanto pelo contato físico, como pela liberação de seus

mediadores (ELISHMERENI *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou a translocação direta de triptase para o citoplasma de eosinófilos por contato célula-célula, evidenciando que a transgranulação é uma possível via de desgranulação entre MCs e eosinófilos. Os autores enfatizaram o papel da triptase na ativação e sobrevivência de eosinófilos, especialmente sob condições inflamatórias (MINAI-FLEMMINGER *et al.*, 2010). Na imunopatologia do megacólon chagásico, é possível que os MCs contribuam tanto para a migração quanto para ativação e aumento da sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos. E os eosinófilos, enquanto células potencialmente citotóxicas (SMYTH *et al.*, 2013), seriam uma das populações responsáveis pela manutenção do processo de lesão tecidual na fase crônica da infecção.

Embora o alto número de MCs e eosinófilos esteja associado a estágios iniciais da resposta imune, eles são facilmente observados em tecidos inflamados na fase crônica e tardia das doenças alérgicas e inflamatórias intestinais. Intensa mastocitose e eosinofilia têm sido observadas na colite ulcerativa (STOYANOVA; GULUBOVA, 2002; ALBERT *et al.*, 2011; STASIKOWSKA-KANICKA *et al.*, 2012), doença de Crohn (RAITHEL *et al.*, 2001; CHRISTERSON *et al.*, 2009; SMYTH *et al.*, 2013), megaesôfago (MARTINS *et al.*, 2014) e megacólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b) chagásicos. Essas patologias possuem em comum um exacerbado processo inflamatório, o qual poderia ser orquestrado, ao menos em parte, por altas concentrações de triptase, uma vez que um grande número de MCs triptase-IR é observado nessas patologias e que o resultado das ações comumente atribuídas à triptase é também comum à patogênese dessas doenças. Assim, a dosagem de triptase, tanto dos níveis séricos, como nos tecidos, poderia ser realizada em pacientes com desordens do TGI em busca do estabelecimento dessa molécula como marcadores de prognóstico dessas doenças (GUILARTE *et al.*, 2007; AMMENDOLA *et al.*, 2014). Em indivíduos com megacólon chagásico, não foi observada diferença dos níveis séricos de triptase em relação aos indivíduos não infectados, o que descarta a possibilidade de utilizar a triptase como um

marcador de prognóstico na infecção por *T. cruzi*. Por outro lado, tem sido testado, com bons resultados, o uso de inibidores de triptase em intervenções terapêuticas na asma e na colite experimental (RICE *et al.*, 1998; ISOZAKI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2014; CAUGHEY, 2015). A dosagem dos níveis de triptase em amostras teciduais do cólon dilatado poderá ser um marcador da lesão tecidual e fornecer subsídios para o desenvolvimento e aplicação de drogas no tratamento da forma digestiva da doença de Chagas.

6. CONCLUSÕES

- 6.1 MCs Giemsa, triptase-IR e quimase-IR encontram-se em maior número no cólon de indivíduos infectados com megacólon em relação aos não infectados e apresentam evidentes sinais de ativação e desgranulação, principalmente do tipo *pecemeal*.
- 6.2 A interação entre neurônios e MCs pode ser evidenciada pela observação da proximidade e/ou pelo contato entre essas células e pela expressão do receptor de triptase, PAR2, em neurônios.
- 6.3 A porcentagem de neurônios do plexo mioentérico PAR2-IR em pacientes com megacólon é menor do que em indivíduos não infectados, e existe uma correlação negativa entre o número de MCs triptase-IR e neurônios PAR2-IR, o que reforça a ideia que a triptase possa contribuir para o processo de desnervação.
- 6.4 Evidências da interação, tanto espacial, quanto pela liberação de triptase, entre MCs e eosinófilos puderam ser observadas pelo contato entre essas células e pela expressão do receptor de triptase, PAR2, em eosinófilos.
- 6.5 O aumento de MCs triptase-IR correlaciona-se positivamente com o aumento de eosinófilos no megacólon, o que sugere que MCs possam contribuir com o recrutamento de eosinófilos e consequente eosinofilia.
- 6.6 O aumento de eosinófilos PAR2-IR no megacólon chagásico, em relação aos indivíduos infectados sem mega e indivíduos controle, sugere que a triptase possa ativar eosinófilos.
- 6.7 Eosinófilos apresentaram sinais de ativação e desgranulação, principalmente do tipo anafilática.

7. REFERÊNCIAS

- ABAD, C. et al. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 124, n. 4, p. 961–71, abr. 2003.
- ABRAHAM, W. M. Tryptase: potential role in airway inflammation and remodeling. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 282, n. 2, p. L193–6, fev. 2002.
- ADAD, S. J. et al. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 443–50, 1991.
- ADAD, S. J. et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Archiv**, v. 438, n. 3, p. 254–258, 12 mar. 2001.
- AHRENS, R. et al. Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis. **Journal of immunology**, v. 181, n. 10, p. 7390–9, 15 nov. 2008.
- ALBERT, E. J. et al. Tissue eosinophilia in a mouse model of colitis is highly dependent on TLR2 and independent of mast cells. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 150–60, jan. 2011.
- AMADESI, S.; BUNNETT, N. Protease-activated receptors: protease signaling in the gastrointestinal tract. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 551–556, dez. 2004.
- AMMENDOLA, M. et al. Correlation between serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density in colo-rectal cancer patients: possible biological-clinical significance. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99512, jan. 2014.
- ANDOH, A. et al. Immunohistochemical study of chymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease. **Oncology reports**, v. 16, n. 1, p. 103–7, jul. 2006.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. [Immunochemical study of experimental Chagas' disease]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 44–7, 1969.
- BALÁZS, M.; ILLYÉS, G.; VADÁSZ, G. Mast cells in ulcerative colitis. Quantitative and ultrastructural studies. **Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology**, v. 57, n. 6, p. 353–60, jan. 1989.
- BALESTRA, B. et al. Colonic mucosal mediators from patients with irritable bowel syndrome excite enteric cholinergic motor neurons. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 24, n. 12, p. 1118–e570, dez. 2012.
- BANGALE, Y. et al. VIPase autoantibodies in Fas-defective mice and patients with autoimmune disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 6, p. 628–35, abr. 2003.
- BARBARA, G. et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 26–37, jan. 2007.

- BERNARD, C. E. et al. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 21, n. 7, p. 746–e46, jul. 2009.
- BISCHOFF, S. C. et al. Substance P and other neuropeptides do not induce mediator release in isolated human intestinal mast cells. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16, n. 2, p. 185–93, abr. 2004.
- BISCHOFF, S. C. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. **Seminars in immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 185–205, jul. 2009.
- BLENNERHASSETT, M. G.; BIENENSTOCK, J. Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro. **Journal of neurobiology**, v. 35, n. 2, p. 173–82, maio 1998.
- BOLTON, S. J. et al. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. July, p. 60–68, 2003.
- BORNSTEIN, J. C.; COSTA, M.; GRIDER, J. R. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Suppl 1, p. 34–8, abr. 2004.
- BORRELLI, O. et al. Neuroimmune interaction and anorectal motility in children with food allergy-related chronic constipation. **The American journal of gastroenterology**, v. 104, n. 2, p. 454–63, fev. 2009.
- BRAZ, S. C. D. M. et al. Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 318–323, jun. 2011.
- BRENER, Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 60, n. 4, p. 463–73, jan. 1982.
- BUCKLEY, M. M.; O'MAHONY, S. M.; O'MALLEY, D. Convergence of neuro-endocrine-immune pathways in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 27, p. 8846–8858, 21 jul. 2014.
- BUENO, L. Protease activated receptor 2: a new target for IBS treatment. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 12 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 95–102, ago. 2008.
- BUHNER, S. et al. Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 137, n. 4, p. 1425–34, out. 2009.
- BUHNER, S.; SCHEMANN, M. Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1822, n. 1, p. 85–92, jan. 2012.
- BUNNETT, N. W. Protease-Activated Receptors: How Proteases Signal to Cells to Cause Inflammation and Pain. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 32, n. S 1, p. 39–48, 2006.
- CARUSO, R. A. et al. Mast Cell and Eosinophil Interaction in Gastric Carcinomas: **Anticancer Research**, v. 394, n. 27, p. 391–394, 2007.
- CASTELLANI, M. L. et al. Stimulation of CCL2 (MCP-1) and CCL2 mRNA by substance P in LAD2 human mast cells. **Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 154, n. 1, p. 27–33, jul. 2009.

CAUGHEY, G. H. et al. Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide Degradation by Mast CeO Tryptase and Chymase. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 244, n. 1, p. 133–137, 1988.

CAUGHEY, G. H. Mast cell proteases as pharmacological targets. **European journal of pharmacology**, 7 maio 2015.

CENAC, N. et al. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 8, p. 4296–300, 15 abr. 2003.

CHO, H.-Y. et al. Iopromide in combination with IFN- γ induces the activation of HMC-1 cells via IL-4 and MCP-1 expression. **Cellular immunology**, v. 293, n. 2, p. 95–103, fev. 2015.

CHRISTERSON, U. et al. Increased expression of protease-activated receptor-2 in mucosal mast cells in Crohn's ileitis. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 3, n. 2, p. 100–8, jun. 2009.

CHURCH, M. K. et al. Mast cells, neuropeptides and inflammation. **Agents and actions**, v. 27, n. 1-2, p. 8–16, abr. 1989.

CLEATOR, J. H. et al. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. **Blood**, v. 107, n. 7, p. 2736–44, 1 abr. 2006.

CÔBO, E. D. C. et al. Research on *Trypanosoma cruzi* and Analysis of Inflammatory Infiltrate in Esophagus and Colon from Chronic Chagasic Patients with and without Mega. **Journal of tropical medicine**, p. 232646, jan. 2012.

CÓRDOVA, E. et al. Neurological manifestations of Chagas' disease. **Neurological research**, v. 32, n. 3, p. 238–44, abr. 2010.

CORVERA, C. U. et al. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 6, p. 1383–93, 15 set. 1997.

CORVERA, C. U. et al. Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors _ 1 and -2. **Journal of Physiology**, v. 517.3, p. 741–756, 1999.

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 Suppl 4, p. iv15–9; discussion iv26, dez. 2000.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl , n. August, p. 113–22, 30 out. 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl , n. i, p. 31–40, jul. 2009.

COX, G. et al. Promotion of eosinophil survival by human bronchial epithelial cells and its modulation by steroids. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 4, n. 6, p. 525–31, jun. 1991.

CRIVELLATO, E. et al. Recombinant human alpha-2a interferon promotes an atypical process of mast cell secretion with ultrastructural features suggestive for piecemeal degranulation. **Journal of anatomy**, v. 201, n. 6, p. 507–12, dez. 2002a.

CRIVELLATO, E. et al. Granule changes of human and murine endocrine cells in the gastrointestinal epithelia are characteristic of piecemeal degranulation. **The Anatomical record**, v. 268, n. 4, p. 353–9, 1 dez. 2002b.

CRIVELLATO, E. et al. Dense-core granules in neuroendocrine cells and neurons release their secretory constituents by piecemeal degranulation (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1037–1046, 2006.

D'ANDREA, M. R. et al. Characterization of Protease-activated Receptor-2 Immunoreactivity in Normal Human Tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 157–164, 1 fev. 1998.

D'AVILA REIS, D. et al. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 177–8, 2001.

DA SILVEIRA, A. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human pathology**, v. 38, n. 8, p. 1256–64, 2007a.

DA SILVEIRA, A. et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 10, p. 2877–83, out. 2007b.

DA SILVEIRA, A. B. M. 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. 05, p. 627–634, 2005.

DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 6, p. 789–96, jun. 2007c.

DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. **Human immunology**, v. 70, n. 1, p. 65–7, jan. 2009.

DALE, C.; VERGNOLLE, N. Protease signaling to G protein-coupled receptors: implications for inflammation and pain. **Journal of receptor and signal transduction research**, v. 28, n. 1-2, p. 29–37, jan. 2008.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Human pathology**, v. 42, n. 2, p. 299–301, fev. 2011.

DE BOER, J. D. et al. Mast Cell-Deficient Kit Mice Develop House Dust Mite-Induced Lung Inflammation despite Impaired Eosinophil Recruitment. **Journal of innate immunity**, v. 6, n. 2, p. 219–26, jan. 2014.

DE REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 25 Spec No, p. 32–43, jan. 1988.

DE WINTER, B. Y.; DE MAN, J. G. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: Effect on gastrointestinal motility. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 44, p. 5523, 2010.

DELGADO, M. et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 80, n. 1, p. 16–24, jan. 2002.

DELGADO, M. et al. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. **Arthritis and rheumatism**, v. 58, n. 4, p. 1010–9, abr. 2008.

DI NARDO, G. et al. Neuroimmune interactions at different intestinal sites are related to abdominal pain symptoms in children with IBS. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 26, n. 2, p. 196–204, fev. 2014.

DIAS, J. C. P. Chagas disease , environment , participation , and the state. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 17, p. 165–169, 2001.

DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370–375, 2006.

DIAS, J.; SILVEIRA, A.; SCHOFIELD, C. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603–12, jul. 2002.

DODD, P. R. Excited to death: different ways to lose your neurones. **Biogerontology**, v. 3, n. 1-2, p. 51–6, jan. 2002.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl , p. 208–18, jul. 2009.

DVORAK, A M.; KISSELL, S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. **Journal of leukocyte biology**, v. 49, n. 2, p. 197–210, fev. 1991.

DVORAK, A. M. et al. Human gut mucosal mast cells: ultrastructural observations and anatomic variation in mast cell-nerve associations in vivo. **International archives of allergy and immunology**, v. 98, n. 2, p. 158–68, jan. 1992.

DVORAK, A. M. et al. Piecemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release in vivo by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. **Blood**, v. 83, n. 12, p. 3600–12, 15 jun. 1994.

DVORAK, A. M.; MORGAN, E. S. Ultrastructural demonstration that human gut mucosal mast cells secrete histamine by piecemeal degranulation in vivo. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n. 6, p. 812–820, 1993.

ELISHMERENI, M. et al. Physical interactions between mast cells and eosinophils: a novel mechanism enhancing eosinophil survival in vitro. **Allergy**, v. 66, n. 3, p. 376–85, mar. 2011.

ENGEL, M. A. et al. Opposite effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in oxazolone colitis. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 44, n. 1, p. 24–9, jan. 2012.

ERCAN, F. et al. Inhibition of substance P activity prevents stress-induced bladder damage. **Regulatory peptides**, v. 133, n. 1-3, p. 82–9, 15 jan. 2006.

- ERIN, N. et al. NK-1 antagonist CP99994 inhibits stress-induced mast cell degranulation in rats. **Clinical and experimental dermatology**, v. 29, n. 6, p. 644–8, nov. 2004.
- ERJEFÄLT, J. S. et al. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 102, n. 2, p. 286–94, ago. 1998.
- FARHADI, A. et al. Heightened responses to stressors in patients with inflammatory bowel disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 100, n. 8, p. 1796–804, ago. 2005.
- FARHADI, A. et al. Reduced immunostaining for c-kit receptors in mucosal mast cells in inflammatory bowel disease. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 22, n. 12, p. 2338–43, dez. 2007.
- FEISTRITZER, C. et al. Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. **Regulatory peptides**, v. 116, n. 1-3, p. 119–26, 15 nov. 2003.
- FRUNGIERI, M. B. et al. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: Possible relevance to human fibrotic disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 23, p. 15072–7, 12 nov. 2002.
- FU, W. X. et al. Regulation of NK92-MI cell cytotoxicity by substance P. **Scandinavian journal of immunology**, v. 74, n. 2, p. 107–13, ago. 2011.
- FUENTE, M. D. LA. Crosstalk Between the Nervous and the Immune Systems in Health and Sickness. v. 20, n. 29, p. 4605–4607, 2014.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 81, n. 1-3, p. 87–96, 3 jul. 2000.
- FURNESS, J. B. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 125, n. 1-2, p. 81–5, 30 abr. 2006.
- GALLI, S. J. et al. Analyzing mast cell development and function using mice carrying mutations at W/c-kit or Sl/MGF (SCF) loci. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 664, p. 69–88, jan. 1992.
- GALLI, S. J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 6, p. 478–86, jun. 2008.
- GARCIA-ZEPEDA, E. A. et al. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. **Nature medicine**, v. 2, n. 4, p. 449–56, abr. 1996.
- GEBHARDT, T. et al. Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor beta1. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 928–34, jul. 2005.
- GEORGE H, C. Mast Cell Proteases as Protective and Inflammatory Mediators. **Adv Exp Med Biol**, v. 716, p. 14–28, 2011.
- GLEICH, G. J.; ADOLPHSON, C. R. The eosinophilic leukocyte: structure and function. **Advances in immunology**, v. 39, p. 177–253, jan. 1986.
- GOODE, T. et al. Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. **Journal of cellular physiology**, v. 197, n. 1, p. 30–41, out. 2003.

- GREEN, B. T. et al. Intestinal type 2 proteinase-activated receptors: expression in opioid-sensitive secretomotor neural circuits that mediate epithelial ion transport. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 295, n. 1, p. 410–6, out. 2000.
- GRÖGER, M. et al. Mediators and cytokines in persistent allergic rhinitis and nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome. **International archives of allergy and immunology**, v. 159, n. 2, p. 171–8, jan. 2012.
- GUILARTE, M. et al. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. **Gut**, v. 56, n. 2, p. 203–9, fev. 2007.
- HALLGREN, J.; PEJLER, G. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. **The FEBS journal**, v. 273, n. 9, p. 1871–95, maio 2006.
- HAMILTON, M. J.; FREI, S. M.; STEVENS, R. L. HHS Public Access. v. 20, n. 12, p. 2364–2378, 2015.
- HE, S.; PENG, Q.; WALLS, A. F. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 12, p. 6216–25, 15 dez. 1997.
- HEUSTON, S.; HYLAND, N. P. Chymase inhibition as a pharmacological target: a role in inflammatory and functional gastrointestinal disorders? **British journal of pharmacology**, v. 167, n. 4, p. 732–40, out. 2012.
- HEUTINCK, K. M. et al. Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 1943–55, jul. 2010.
- HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 38, n. 5, p. 709–50, maio 2008.
- HOTEZ, P. J. et al. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2300, jan. 2013.
- HÜGLE, T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis. **Swiss Medical Weekly**, n. September, p. 1–8, 2014.
- HYUN, E. et al. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. **Gut**, v. 57, n. 9, p. 1222–9, set. 2008.
- IRANI, A. M. et al. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 37, n. 10, p. 1509–15, out. 1989.
- ISAILOVIC, N. et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **Journal of autoimmunity**, 18 maio 2015.
- ISOZAKI, Y. et al. Anti-tryptase treatment using nafamostat mesilate has a therapeutic effect on experimental colitis. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 41, n. 8, p. 944–53, ago. 2006.
- ITO, A. et al. Involvement of the SgIGSF/Necl-2 adhesion molecule in degranulation of mesenteric mast cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 184, n. 1-2, p. 209–13, mar. 2007.

- ITO, A.; OONUMA, J. Direct interaction between nerves and mast cells mediated by the SgIGSF/SynCAM adhesion molecule. **Journal of pharmacological sciences**, v. 102, n. 1, p. 1–5, set. 2006.
- ITOH, Y.; SENDO, T.; OISHI, R. Forum Mini review Physiology and Pathophysiology of Proteinase-Activated Receptors (PARs): Role of Tryptase / PAR-2 in Vascular Endothelial Barrier Function. v. 19, p. 14–19, 2005.
- JABARI, S. et al. Partial, selective survival of nitroergic neurons in chagasic megacolon. **Histochemistry and cell biology**, v. 135, n. 1, p. 47–57, jan. 2011.
- JABARI, S. et al. Mucosal layers and related nerve fibres in non-chagasic and chagasic human colon—a quantitative immunohistochemical study. **Cell and Tissue Research**, v. 358, n. 1, p. 75–83, 2014a.
- JABARI, S. et al. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 142, n. 3, p. 235–244, 2014b.
- JACOBSEN, E. A. et al. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 119, n. 6, p. 1313–20, jun. 2007.
- JUARRANZ, Y. et al. Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis and rheumatism**, v. 58, n. 4, p. 1086–95, abr. 2008.
- KAWANA, S. et al. Role of substance P in stress-derived degranulation of dermal mast cells in mice. **Journal of dermatological science**, v. 42, n. 1, p. 47–54, abr. 2006.
- KIM, D. H. et al. Stress-induced alterations in mast cell numbers and proteinase-activated receptor-2 expression of the colon: role of corticotrophin-releasing factor. **Journal of Korean medical science**, v. 25, n. 9, p. 1330–5, set. 2010.
- KIM, J.-A. et al. Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 9, n. 4, p. 224–9, jul. 2003.
- KIRCHGESSNER, A. L.; GERSHON, M. D. Projections of submucosal neurons to the myenteric plexus of the guinea pig intestine: in vitro tracing of microcircuits by retrograde and anterograde transport. **The Journal of comparative neurology**, v. 277, n. 4, p. 487–98, 22 nov. 1988.
- KITA, H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 97, n. 4, p. 889–92, abr. 1996.
- KÖBERLE, F. Enteromegaly and cardiomegaly in Chagas disease. **The Medical School of Ribeirido Preto**, v. 4, p. 399–405, 1963.
- KÖBERLE, F. Aspectos neurológicos da moléstia de chagas. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 160–174, 1967.
- KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in parasitology**, v. 6, p. 63–116, jan. 1968.
- KÖBERLE, F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 42, n. 5, p. 739–43, jan. 1970.

- KOON, H. W.; POTHOUKAKIS, C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, p. 23–40, nov. 2006.
- KRANEVELD, A. D. et al. Neuro-immune interactions in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: future therapeutic targets. **European journal of pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 361–74, 13 maio 2008.
- KRITAS, S. K. et al. Nerve growth factor interactions with mast cells. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 15–9, jan. 2014.
- KROPF, S. P. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962). **São Paulo em Perspectiva**, v. 10, n. 19, p. 107–124, dez. 2005.
- KUGLER, E. M. et al. Activity of protease-activated receptors in primary cultured human myenteric neurons. **Frontiers in neuroscience**, v. 6, p. 133, jan. 2012.
- KULKA, M. et al. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 398–410, mar. 2008.
- LAI, J. P.; DOUGLAS, S. D.; HO, W. Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. **Journal of neuroimmunology**, v. 86, n. 1, p. 80–6, 1 jun. 1998.
- LAI, J.-P. et al. Quantification of substance p mRNA in human immune cells by real-time reverse transcriptase PCR assay. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 1, p. 138–43, jan. 2002.
- LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–8, abr. 2013a.
- LEE, H. et al. Mucosal mast cell count is associated with intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 19, n. 2, p. 244–50, abr. 2013b.
- LINDEN, D. R. et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 excite guinea pig ileal myenteric neurons. **European journal of pharmacology**, v. 431, n. 3, p. 311–4, 23 nov. 2001.
- LOPES, E. R. et al. Prevalence of visceromegalies in necropsies carried out in Triângulo Mineiro from 1954 to 1988. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 4, p. 211–215, 1989.
- LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de chagas humana. 1997.
- LUNDEQUIST, A. et al. Polycationic peptides as inhibitors of mast cell serine proteases. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1171–1180, 2003.
- LUO, W.; WANG, Y.; REISER, G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. **Brain research reviews**, v. 56, n. 2, p. 331–45, dez. 2007.
- LUQUETTI, A. O. et al. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008) The National Survey of seroprevalence for evaluation of the control. p. 108–121, 2011.
- LUQUETTI, A. O.; CASTRO, A. M. DE. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In: **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]**. Fiocruz ed.Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 486.

- MAINTZ, L. et al. Neuropeptide blood levels correlate with mast cell load in patients with mastocytosis. **Allergy**, v. 66, n. 7, p. 862–9, jul. 2011.
- MAKINO, A. et al. Involvement of tachykinins and NK1 receptor in the joint inflammation with collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice. **Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi**, v. 79, n. 2, p. 129–38, jan. 2012.
- MALAMUD, V. et al. Tryptase activates peripheral blood mononuclear cells causing the synthesis and release of TNF- α , IL-6 and IL-1 β : possible relevance to multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 138, n. 1-2, p. 115–122, maio 2003.
- MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–23, 6 mar. 2007.
- MARTINS CAMPOS, V. .; TAFURI, W. L. Progress report Chagas enteropathy. **Gut**, v. 14, p. 910–919, 1973.
- MARTINS, P. R. et al. Neuroimmunopathology of *Trypanosoma cruzi*-induced megaoesophagus: Is there a role for mast cell proteases? **Human immunology**, v. 75, p. 302–305, 11 fev. 2014.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1508, jan. 2012.
- MATOS, N. A. et al. Mast cell tryptase induces eosinophil recruitment in the pleural cavity of mice via proteinase-activated receptor 2. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1260–7, dez. 2013.
- MAZZONE, A.; FARRUGIA, G. Evolving concepts in the cellular control of gastrointestinal motility: neurogastroenterology and enteric sciences. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 36, n. 3, p. 499–513, vii, set. 2007.
- MEKORI, Y. A. et al. Human mast cell apoptosis is regulated through Bcl-2 and Bcl-XL. **Journal of clinical immunology**, v. 21, n. 3, p. 171–4, maio 2001.
- MELO, F. R. et al. Proteolytic histone modification by mast cell tryptase, a serglycin proteoglycan-dependent secretory granule protease. **Journal of Biological Chemistry**, p. 1–19, 29 jan. 2014.
- MENEGHELLI, U. G. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 18, n. 3, p. 255–64, jan. 1985.
- MENEGHELLI, U. G. Chagasic enteropathy Enteropatia chagásica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 252–260, 2004.
- MEYER, M. C. et al. Potential role for mast cell tryptase in recruitment of inflammatory cells to endothelium. **American journal of physiology**, v. 63104, n. 289, p. 1485–1491, 2005.
- MIIKE, S.; KITA, H. Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 4, p. 704–713, abr. 2003.
- MIIKE, S.; MCWILLIAM, A S.; KITA, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 11, p. 6615–22, 1 dez. 2001.

- MILLER, H. R. P.; PEMBERTON, A. D. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. **Immunology**, v. 105, n. 4, p. 375–90, abr. 2002.
- MIYAZAKI, M. et al. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 668–676, 2006a.
- MIYAZAKI, M. et al. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 668–76, dez. 2006b.
- MONK, K. R. et al. Mast cells can contribute to axon-glia dissociation and fibrosis in peripheral nerve. **Neuron glia biology**, v. 3, n. 3, p. 233–44, ago. 2007.
- MOREIRA, H. et al. Megacolo chagásico. **Revista Brasileira de Colo-Proctologia**, v. 3, n. 4, p. 152–162, 1983.
- MOREIRA, M. D. et al. Regenerative process evaluation of neuronal subclasses in chagasic patients with megacolon. **Human immunology**, v. 74, n. 2, p. 181–8, fev. 2013.
- NAKAE, S. et al. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 4, p. 2238–2248, 2006.
- NASCIMENTO, R. D. et al. Characterization of enteroglia cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. **Human pathology**, v. 41, n. 4, p. 528–34, abr. 2010.
- NASCIMENTO, R. D. et al. An imbalance between substance P and vasoactive intestinal polypeptide might contribute to the immunopathology of megaesophagus after *Trypanosoma cruzi* infection. **Human Pathology**, v. 44, p. 269–276, 2013.
- NASSAUW, L. VAN; ADRIAENSEN, D.; TIMMERMANS, J.-P. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 133, n. 1, p. 91–103, 30 abr. 2007.
- NEILSEN, C. V; BRYCE, P. J. Interleukin-13 directly promotes oesophagus production of CCL11 and CCL24 and the migration of eosinophils. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 40, n. 3, p. 427–34, mar. 2010.
- NEUNLIST, M. et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 84–90, jan. 2003.
- NGUYEN, C. et al. Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 927, p. 920–927, 2003.
- OHMAN, L.; SIMRÉN, M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 3, p. 163–73, mar. 2010.
- PEJLER, G. et al. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**, v. 115, n. 24, p. 4981–90, 17 jun. 2010.

- PINAZO, M. J. et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterología y hepatología**, v. 33, n. 3, p. 191–200, mar. 2010.
- PINHEIRO, S. W. et al. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 461–466, 2003.
- PINHEIRO, S. W. et al. The different concentrations of mast cells in the musculature of the esophagus and the colon. **Human pathology**, v. 39, n. 5, p. 793; author reply 793, maio 2008.
- POZO, D. et al. Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: a new therapeutic approach for immune disorders. **Peptides**, v. 28, n. 9, p. 1833–46, set. 2007.
- RAAP, U.; WARDLAW, A. J. A new paradigm of eosinophil granulocytes: neuroimmune interactions. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 9, p. 731–8, set. 2008.
- RAITHEL, M. et al. Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 36, n. 2, p. 174–9, fev. 2001.
- RAMACHANDRAN, R. et al. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 1, p. 69–86, jan. 2012.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 17 abr. 2010.
- RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1101–8, 6 mar. 2007.
- REED, D. E. et al. Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. **The Journal of physiology**, v. 547, n. Pt 2, p. 531–42, 1 mar. 2003.
- REZENDE, J. M. DE. The digestive tract in Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 97–106, 1984.
- RIBATTI, D. et al. Tryptase and chymase are angiogenic in vivo in the chorioallantoic membrane assay. **The International journal of developmental biology**, v. 55, n. 1, p. 99–102, jan. 2011.
- RIBEIRO, B. M.; CREMA, E.; RODRIGUES, V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Human immunology**, v. 69, n. 8, p. 484–9, ago. 2008.
- RICE, K. D. et al. Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases. **Current pharmaceutical design**, v. 4, n. 5, p. 381–96, out. 1998.
- RIJNIERSE, A.; NIJKAMP, F. P.; KRANEVELD, A. D. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. **Pharmacology & therapeutics**, v. 116, n. 2, p. 207–35, nov. 2007.
- ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 4, p. 727–743, 1 ago. 2007.
- RODEWALD, H. R. et al. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5250, p. 818–22, 9 fev. 1996.

- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual review of immunology**, v. 24, p. 147–74, jan. 2006.
- ROTHMEIER, A. S.; RUF, W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 1, p. 133–49, jan. 2012.
- ROY, A. et al. Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 1, p. 237–50, 3 jan. 2014.
- SAND, E.; THEMNER-PERSSON, A.; EKBLAD, E. Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 2, p. 522–30, fev. 2009.
- SANTOS, J. et al. Targeting mast cells in the treatment of functional gastrointestinal disorders. **Current opinion in pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 541–6, dez. 2006.
- SCHMIDLIN, F. et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 9, p. 5315–21, 1 nov. 2002.
- SCHWARTZ ET AL. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 126, n. 4, p. 1290–4, abr. 1981.
- SCHWARTZ, L. B.; BRADFORD, T. R. Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. Stabilization of the active tetramer. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 16, p. 7372–9, 5 jun. 1986.
- SELLGE, G. et al. Interferon- γ regulates growth and controls Fc γ receptor expression and activation in human intestinal mast cells. **BMC Immunology**, v. 15, n. 1, p. 27, 2014.
- SHAKOORY, B. et al. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 24, n. 5, p. 271–81, maio 2004.
- SHEA-DONOHUE ET AL. Role of enteric nerves in immune-mediated changes in protease-activated receptor 2 effects on gut function. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 22, n. 10, p. 1138–e291, out. 2010.
- SIMPSON, J. et al. Post inflammatory damage to the enteric nervous system in diverticular disease and its relationship to symptoms. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 21, n. 8, p. 847–e58, ago. 2009.
- SMALLEY, S. G. R.; BARROW, P. A; FOSTER, N. Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 157, n. 2, p. 225–34, ago. 2009.
- SMITH-SWINTOSKY, V. L. et al. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) is present in the rat hippocampus and is associated with neurodegeneration. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1890–6, nov. 1997.
- SMYTH, C. M. et al. Activated eosinophils in association with enteric nerves in inflammatory bowel disease. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64216, jan. 2013.

SOHN, W. et al. Mast cell number, substance P and vasoactive intestinal peptide in irritable bowel syndrome with diarrhea. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 49, n. 1, p. 43–51, jan. 2014.

STASIKOWSKA-KANICKA, O. et al. Mast cells and eosinophils are involved in activation of ulcerative colitis. **Advances in medical sciences**, v. 57, n. 2, p. 230–6, jan. 2012.

STEAD, R. H. et al. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 9, p. 2975–9, maio 1987.

STEAD, R. H. et al. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. **Gastroenterology**, v. 97, n. 3, p. 575–85, set. 1989.

STEAD, R. H. Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract. **Regional immunology**, v. 4, n. 2, p. 91–9, jan. 1992.

STEINBACH, K. H. et al. Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. **Blut**, v. 39, n. 1, p. 27–38, jul. 1979.

STEINHOFF, M. et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. **Nature medicine**, v. 6, n. 2, p. 151–8, fev. 2000.

STOYANOVA, I. I.; GULUBOVA, M. V. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. **Acta histochemica**, v. 104, n. 2, p. 185–92, jan. 2002.

SU, X. et al. Protease-Activated Receptor-2 Activation Induces Acute Lung Inflammation by Neuropeptide-Dependent Mechanisms. 2005.

SUN, J. et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. **Nature medicine**, v. 13, n. 6, p. 719–24, jun. 2007.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. Lesões do plexo mioentérico do esôfago, do jejuno e do colo de chagásicos crônicos. Estudo ao microscópio eletrônico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 2, n. 13, p. 76–91, 1971.

TAKAI, S.; JIN, D.; MIYAZAKI, M. New Approaches to Blockade of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System: Chymase as an Important Target to Prevent Organ Damage. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 113, n. 4, p. 301–309, 2010a.

TAKAI, S.; JIN, D.; MIYAZAKI, M. Chymase as an important target for preventing complications of metabolic syndrome. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 28, p. 3223–9, jan. 2010b.

TAKAI, S.; JIN, D.; MIYAZAKI, M. Targets of chymase inhibitors. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 15, n. 4, p. 519–27, abr. 2011.

Takai, 2011. , [s.d.].

TAVANO, F. et al. Neuroimmune interactions in patients with inflammatory bowel diseases: disease activity and clinical behavior based on Substance P serum levels. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 6, n. 5, p. 563–70, jun. 2012.

TEMKIN, V. et al. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 5, p. 2662–9, 1 set. 2002.

- UEMATSU, T. et al. Intra-articular administration of tachykinin NK₁ receptor antagonists reduces hyperalgesia and cartilage destruction in the inflammatory joint in rats with adjuvant-induced arthritis. **European journal of pharmacology**, v. 668, n. 1-2, p. 163–8, 1 out. 2011.
- VAGO, A. R. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891–2, 28 set. 1996.
- VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 163, n. 9, p. 5064–9, 1 nov. 1999.
- VERGNOLLE, N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (PARS) in the gut. **Gut**, v. 54, p. 867–874, 2005.
- VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Chagas disease in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. Sup. 2, p. 7–12, 2000.
- VLIAGOFTIS, H. et al. Mast cell tryptase activates peripheral blood eosinophils to release granule-associated enzymes. **International archives of allergy and immunology**, v. 135, n. 3, p. 196–204, nov. 2004.
- WANG, Q. et al. A fluorescent light-up probe as an inhibitor of intracellular β -tryptase. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 50, n. 46, p. 6120–2, 2014.
- WEIDNER, N.; AUSTEN, K. F. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. **Pathology, research and practice**, v. 189, n. 2, p. 156–62, mar. 1993.
- WILCZ-VILLEGA, E. M.; MCCLEAN, S.; O'SULLIVAN, M. A. Mast cell tryptase reduces junctional adhesion molecule-A (JAM-A) expression in intestinal epithelial cells: implications for the mechanisms of barrier dysfunction in irritable bowel syndrome. **The American journal of gastroenterology**, v. 108, n. 7, p. 1140–51, jul. 2013.
- WILHELM, M.; SILVER, R.; SILVERMAN, A. J. NIH Public Access. v. 22, n. 9, p. 2238–2248, 2012.
- WONG, C. K. et al. Signalling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by mast-cell-derived chymase: implications for mast cell-eosinophil interaction in allergic inflammation. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 579–87, abr. 2009.
- WOOD, J. D. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology^{1,2} ¹The concepts for enteric neuroimmunophysiology in this article emerged, in part, from collaborative work with Professor Helen J. Cooke and several postdoctoral visitors and students in the author's lab. **Gastroenterology**, v. 127, n. 2, p. 635–657, ago. 2004.
- YADAV, M.; HUANG, M.-C.; GOETZL, E. J. VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis. **Cellular immunology**, v. 267, n. 2, p. 124–32, jan. 2011.
- YOSHIDA, N. et al. Role of nociceptors/neuropeptides in the pathogenesis of visceral hypersensitivity of nonerosive reflux disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 8, p. 2237–43, ago. 2013.
- YOSHIMICHI OKAYAMA, T. K. Development, Migration, and Survival of Mast Cells. **Immunol Res**, v. 34, n. 2, p. 97–115, 2006.

YU, S. et al. Characterization of mast cell subtypes, distribution, and antigen-induced activation in the guinea pig esophagus. **Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E**, v. 22, n. 7, p. 600–5, jan. 2009.

YUKAWA, T. et al. Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptor 1 expression in inflammatory bowel disease. **International journal of molecular medicine**, v. 20, n. 2, p. 161–7, ago. 2007.

ZECK-KAPP, G.; CZECH, W.; KAPP, A. TNF alpha-induced activation of eosinophil oxidative metabolism and morphology--comparison with IL-5. **Experimental dermatology**, v. 3, n. 4, p. 176–88, ago. 1994.

ZHANG, A. et al. Mast cell stabilization alleviates acute lung injury after orthotopic autologous liver transplantation in rats by downregulating inflammation. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e75262, jan. 2013.

ZHANG, J.; HANIG, J. P.; DE FELICE, A. F. Biomarkers of endothelial cell activation: candidate markers for drug-induced vasculitis in patients or drug-induced vascular injury in animals. **Vascular pharmacology**, v. 56, n. 1-2, p. 14–25, 2011.

ZHANG, S. et al. Human mast cells express stem cell factor. **The Journal of pathology**, v. 186, n. 1, p. 59–66, set. 1998.

ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunology today**, v. 13, n. 3, p. 93–100, mar. 1992.

8. ANEXO

8.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



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

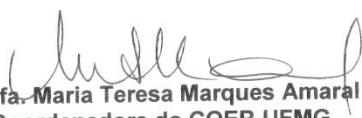
Projeto: CAAE – 04939212.9.0000.5149

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 11 de dezembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado **"Imunopatologia da forma clínica digestiva da doença de Chagas"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG