

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

TESE DE DOUTORADO

Aluna: Camila França Campos

Orientador : Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes - Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG

Co-orientadora: Prof^a Dra. Silvia Dantas Cangussú - Departamento de Ciências Biológicas
DECBI/UFOP

Colaboradores:

Profa Maria Terezinha Bahia
Profa Patricia Massara Martinelli
Profa Daniele Souza

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte
2016

Tese de Doutorado

O modelo de inflamação crônica associada ao *Trypanossoma cruzi* no intestino de camundongos como plataforma experimental para compreender mecanismos de plasticidade do sistema nervoso entérico e musculatura lisa intestinal

ALUNA: Camila França Campos

Orientador : Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes - Departamento de Patologia Geral - ICB/UFMG

Co-orientadora: Prof^a Dra. Silvia Dants Cangussú - Departamento de Ciências Biológicas –
DECBI/UFOP

Colaboradores:

Profa Maria Terezinha Bahia
Profa Patricia Martinelli Massara
Profa Daniele Souza

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte
2016

Área de concentração: Patologia Médica

AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIA

A pesquisa entrou em minha vida há cerca de 9 anos. Era uma aluna de Iniciação Científica, acadêmica no início do curso de graduação. E hoje me apresento para a defesa da minha tese de Doutorado. Nessa jornada, deparei-me com muitas pessoas que foram de suma importância nesse meu desafio. Em primeiro lugar, agradeço a Deus. Agradeço a minha orientadora, Rosa, por ter confiado em mim e investido seu tempo e conhecimento em minha formação. Aos meus pais e minha irmã, agradeço por sempre me apoiarem e me estimularem a me superar. Ao meu marido, pelo carinho e compreensão. À minha co-orientadora, Silvia, e às minhas amigas do NIPE, por todo incentivo e apoio. E aos meus amigos que sempre me acompanharam nessa jornada. Enfim, encerro o meu ciclo no Doutorado para iniciar outros projetos profissionais, mas sempre com a pesquisa em paralelo.

“ Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”

- Antoine de Saint-Exupéry -

“Sempre há uma outra chance, uma outra amizade, um outro amor, uma nova força. Para todo fim, um recomeço.”

- Antoine de Saint-Exupéry -

RESUMO

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo murino inédito de infecção de longo prazo com *Trypanosoma cruzi* com o intuito de elucidar a patogênese do megacólon e as alterações intestinais neuromusculares e adaptativas associadas. Nosso objetivo foi reproduzir a fase crônica da Doença de Chagas. Uma vez que o tratamento adequado e precoce pode evitar a mortalidade de 100% dos animais durante a fase aguda nós hipotetizamos que um tratamento parcial, aplicado imediatamente após o início do parasitismo tecidual, que se sabe ocorrer em paralelo com o pico de parasitemia, permitiria manter vivos os animais infectados e em vigência de parasitismo na parede muscular intestinal e, dessa forma, desenvolver a fase crônica da infecção. Um grupo de camundongos Swiss foi infectado com a cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia pós infecção, um sub-grupo foi eutanasiado (grupo de fase aguda) e outro sub-grupo foi tratado com benzonidazol e eutanasiado após 15 meses de infecção (grupo de fase crônica). Amostras de toda a extensão do cólon foram utilizadas para estudo da histopatologia do músculo liso intestinal e da plasticidade dos neurônios entéricos. Na fase aguda, todos os animais apresentaram lesões inflamatórias associadas com parasitismo intenso e difuso nas camadas submucosa e muscular própria, as quais se encontraram espessadas (espessura total do cólon) quando comparadas a seus controles. A ocorrência de alterações inflamatórias degenerativas intensas e aumento das fibras reticulares resultaram em edema e necrose induzida e idas células musculares. Na fase crônica, o parasitismo foi insignificante, entretanto, a arquitetura dos plexos de Auerbach estava afetada nas áreas inflamadas, e uma diminuição significativa do número de neurônios e na densidade de fibras nervosas intramusculares foi detectada de forma segmentar ao longo da extensão do cólon que foi total e sistematicamente examinado. Observamos ainda aumento da espessura da parede muscular do cólon, hipertrofia difusa

das células musculares e aumento no depósito de colágeno. Nosso modelo de longo prazo (15 meses) poderá ser utilizado no estudo da patogênese do megacólon chagásico em camundongos, uma vez que mimetiza a doença humana, a qual opera a partir da infecção por muitos anos, modificando drasticamente a estrutura e a função visceral, e ainda não foi totalmente elucidada. Neste modelo, as alterações estruturais induzidas em longo prazo nas células musculares lisas e no sistema nervoso entérico (gânglios intramurais e fibras nervosas intramusculares) sugerem o mecanismo básico de formação do megacólon chagásico.

Palavras-chave: doença de Chagas crônica, Sistema nervosa entérico, histopatologia, músculo liso, plasticidade neuromuscular, megacólon.

ABSTRACT

Our group had developed a novel murine model of long-term infection with *Trypanosoma cruzi* with the aim to elucidate the pathogenesis of megacolon and the associated adaptive and neuromuscular intestinal disorders. Our intent was to produce a chronic stage of the disease since the early treatment should avoid 100% mortality of untreated animals at acute phase. Treatment allowed animals to be kept infected and alive in order to develop the chronic phase of infection with low parasitism. A group of Swiss mice was infected with the Y strain of *T. cruzi*. At the 11th day after infection, a sub-group was euthanized (acute-phase group) and another sub-group was treated with benznidazole and euthanized 15 months after infection (chronic-phase group). Whole colon samples were used for studying the histopathology of the intestinal smooth muscle and the plasticity of the enteric nerves. In the acute phase, all animals presented inflammatory lesions associated with intense and diffuse parasitism of the muscular and submucosa layers, that were enlarged when compared with the controls. The occurrence of intense degenerative inflammatory changes and increased reticular fibers suggests inflammatory-induced necrosis of muscle cells. In the chronic phase, parasitism was insignificant; however, the architecture of Auerbach plexuses were focally affected in the inflamed areas and a significant decrease in the number of neurons and in the density of intramuscular nerves bundles were detected. Other changes observed included increased thickness of the colon wall, diffuse muscle cell hypertrophy, and increased collagen deposition. We propose a model for studying the long-term (15 months) pathogenesis of Chagasic megacolon in mice that mimics the human disease, which persists for several years and has not been fully elucidated. The long-term structural changes may represent the basic mechanism for the formation of the Chagasic megacolon.

Keywords: chronic Chagas disease, enteric nervous system, histopathology, smooth muscle, neuromuscular plasticity, megacolon

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Caracterização dos anticorpos primários e secundários, conjugados e sistema de detecção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental

Figura 2 – Morfometria da análise das espessuras total do cólon e da camada muscular interna

Figura 3 – Morfometria da análise de área imunomarcada em relação à área total do plexo mioentérico

Figura 4 – Morfometria da análise de área imunomarcada em relação à área total da camada muscular interna

Figura 5 – Análise estatística

Figura 6 – Curva de Parasitemia

Figura 7 – Taxa de mortalidade

Figura 8 – Massa corporal (gramas) dos grupos

Figura 9 – Média do comprimento longitudinal do cólon (cm) nos camundongos dos grupos

Figura 10 – Fotografia representativa da medida de comprimento longitudinal do cólon

Figura 11 – Avaliação histopatológica das fases aguda e crônica da Doença de Chagas em camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

Figura 12 – Área imunomarcada por anti-*T. cruzi* no cólon de camundongos *Swiss* infectados com *T. cruzi*

Figura 13 – Parasitismo tecidual em camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y

Figura 14 – Concentração de anticorpos anti-ELISA em camundongos *Swiss* infectados com *T. cruzi*

Figura 15 – Número total de células na camada muscular interna do cólon de camundongos *Swiss*

Figura 16 – Área da camada muscular interna do cólon em comparação ao número total de células em camundongos *Swiss*

Figura 17 – Hipertrofia em cólons de camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

Figura 18 – Área imunomarcada para PGP 9.5 em camundongos *Swiss*

Figura 19 – Número de neurônios imunomarcados por PGP 9.5 em camundongos *Swiss*

Figura 20 – Imunomarcção para PGP 9.5 intermuscular de camundongos *Swiss*

Figura 21 – Inervação do cólon em camundongos *Swiss* controles e infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

Figura 22 – Número de células CD3+ imuno-marcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon de camundongos *Swiss*

Figura 23 - Número de células CD4+ imuno-marcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon de camundongos *Swiss*

Figura 24 - Número de células CD8+ imuno-marcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon de camundongos *Swiss*

Figura 25 - Número de células CD20+ imuno-marcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon de camundongos *Swiss*

Figura 26 - Número de células CD68+ imuno-marcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon de camundongos *Swiss*

Figura 27 – Perfil de células inflamatórias (células CD4+, CD8+, CD20+ e CD68+) em cólons de camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

Figura 28 – Espessura total do cólon em camundongos

Figura 29 – Área ocupada por tecido conjuntivo em camundongos *Swiss* de fase aguda e crônica

Figura 30 – Fibrose no cólon de camundongos *Swiss* de fase crônica infectados com 50.000 formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*

Figura 31 – Área ocupada por fibras reticulares na camada muscular interna no cólon de camundongos *Swiss* na fase aguda e crônica

Figura 32 – Área ocupada por GAP-43 no plexo mioentérico do cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda e crônica da infecção

Figura 33 – Dosagem de IL-6 em cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda e crônica da infecção

Figura 34 - Dosagem de TNF- α em cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda e crônica da infecção

Figura 35 - Dosagem de TGF- β em cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda e crônica da infecção

Figura 36 - Dosagem de INF- γ em cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda e crônica da infecção

Figura 37 - Dosagem de IL-10 em cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda e crônica da infecção

Figura 38 – Avaliação da área imunomarcada por CGRP no plexo mioentérico do cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica

Figura 39 – Avaliação da área imunomarcada por nNOS no plexo mioentérico do cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica

Figura 40 – Aumento seletivo do neuropeptídeo nNOS em camundongos infectados com *T. cruzi* de fase crônica

Figura 41 – Avaliação da área imunomarcada por sinaptotagmina I/II no plexo mioentérico do cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica

Figura 42 – Aumento de sinaptotagmina I/II em animais infectados de fase crônica

Figura 43 – Área imunomarcada de alfa actina de músculo liso em cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica

Figura 44 – Comparação das idades dos animais em análise ultraestrutural

Figura 45 – Animais infectados de Fase Aguda em análise ultraestrutural

Figura 46 – Animais infectados de Fase Crônica em análise ultraestrutural

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (em ordem alfabética)

BDNF	Brain derived neurotrophic fator
BSA	Albumina sérica bovina
CEBIO	Centro de bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFA	Controle de fase aguda
CFC	Controle de fase crônica
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CIC	Célula intersticial de Cajal
cm	Centímetros
DAB	Diaminobenzidina
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.P.	Desvio padrão
d.p.i.	Dia após a infecção
ELISA	Análise de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
EPM	Erro padrão da média
GAP-43	Growth associated protein
GFAP	Proteína ácida fibrilar da glia
GI	Gastrointestinal
h	Horas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFA	Infectado de fase aguda
IFC	Infectado de fase crônica
IFN	Interferon
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
min	Minutos
m.p.i.	Meses pós infecção

NCS-1	Proteína de vesícula sináptica sensora de cálcio-1
NGF	Nerve growth fator
NK	Natural killer
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
NT-3	Neurotrofina 3
NT 4/5	Neurotrofina 4/5
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGP 9.5	Protein Gene Product 9.5
p.i.	Pós infecção
RE	Retículo endoplasmático
s	Segundos
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNAP	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fator attachment protein
SNARE	Receptores de soluble N-ethylmaleimide-sensitive fator attachment protein
SNE	Sistema nervoso entérico
SP	Substância P
Syb	Sinaptobrevina
Syt-VII	Sinaptotagmina VII
Syx	Sintaxina
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TLRs	Toll-like receptors
TNBS	2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1. Introdução e Justificativa	página 16
1.1. A Doença de Chagas: aspectos gerais.....	página 16
1.2. Hipóteses da patogenia da DC	página 22
1.3. Megacólon chagásico	página 23
2. Objetivos	página 34
2.1. Objetivos gerais	página 34
2.2. Objetivos específicos	página 34
3. Metodologia	página 36
3.1. Animais	página 36
3.2. Infecção com <i>T. cruzi</i>	página 36
3.3. Curva de parasitemia e mortalidade	página 38
3.4. Eutanásia	página 39
3.5. Coleta de material histopatológico	página 39
3.6. Método ELISA (títulos de IgG anti- <i>T. cruzi</i>)	página 40
3.7. Imuno-histoquímica	página 41
3.8. Microscopia Eletrônica	página 46
3.9. Processamento do tecido para dosagens de citocinas	página 46
3.10. Detecção de citocinas por ELISA	página 47
3.11. Análise morfométrica	página 48
3.12. Análise estatística	página 52
4. Resultados	página 54
4.1. Parasitemia	página 54
4.2. Taxa de mortalidade	página 55
4.3. Massa corporal dos camundongos	página 56
4.4. Comprimento longitudinal do cólon	página 57
4.5. Avaliação histopatológica	página 59
4.5.1. Fase aguda	página 59
4.5.2. Fase crônica	página 59
4.6. Parasitismo tecidual	página 63
4.7. Concentração de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> por ELISA	página 66

4.8. Celularidade tecidual	página 67
4.9. Hipertrofia das células musculares lisas	página 68
4.10. Inervação do plexo mioentérico	página 71
4.10.1. Área imunomarcada para PGP 9.5	página 71
4.10.2. Número de neurônios imunomarcados para PGP 9.5.	página 72
4.11. Inervação intramuscular	página 73
4.12. Tipagem de células imunes	página 76
4.12.1. Células CD3+	página 76
4.12.2. Células CD4+	página 77
4.12.3. Células CD8+	página 78
4.12.4. Células CD20+	página 79
4.12.5. Células CD68+	página 80
4.13. Espessura da parede muscular do cólon	página 83
4.14. Tecido conjuntivo	página 84
4.15. Fibra reticular	página 87
4.16. GAP-43	página 88
4.17. Dosagem de citocinas inflamatórias	página 89
4.17.1. IL-6	página 89
4.17.2. TNF- α	página 90
4.17.3. TGF- β	página 91
4.17.4. IFN- γ	página 92
4.17.5. IL-10	página 93
4.18. CGRP	página 94
4.19. nNOS	página 95
4.20. Sinaptotagmina	página 96
4.21. Alfa actina de músculo liso	página 98
4.22. Microscopia Eletrônica	página 99
5. Discussão	página 105
6. Conclusões gerais	página 133
7. Referências Bibliográficas	página 134

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Chagas: aspectos gerais

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente ameaçadora à vida causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Essa infecção ficou conhecida após as descobertas realizadas em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileiro (Chagas, 1909).

A DC está presente principalmente na América Latina. Entretanto, nas últimas décadas, observou-se aumento de sua presença nos Estados Unidos, Canadá, alguns países europeus e do oeste do Oceano Pacífico. Esse fato se deve principalmente à mobilidade populacional que ocorre entre a América Latina e o restante do mundo (Schmunis & Yadon, 2010).

Originalmente (há mais de 9.000 anos) o *T. cruzi* somente infectava animais e triatomíneos silvestres. Mais tarde, houve disseminação da infecção desse parasito para animais domésticos e humanos com progressiva adaptação de vetores neste ambiente, além da instalação do *Triatoma infestans* no domicílio pelos imigrantes. Uma vez que o *T. cruzi* possui como reservatórios animais silvestres e numerosas espécies de vetores nas Américas, torna-se praticamente impossível a erradicação desse parasito. Dessa forma, o controle da doença ocorre principalmente com a eliminação da transmissão vetorial e o controle de transfusão sanguínea (Dias, 2015; Prata *et al.*, 2011).

Atualmente, estima-se que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina (W.H.O, 2014), onde a doença é endêmica em 21 países. Estima-se que, em 2008, a mortalidade para DC tenha sido de cerca 8 mil pessoas e atualmente mais de 25 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença. Mais de 30% das pessoas infectadas na fase crônica desenvolvem desordens cardíacas e mais de 10% desordens digestivas ou mistas. (W.H.O., 2010).

Na América Latina, o *T. cruzi* é transmitido principalmente pelas fezes infectadas de insetos triatomíneos hematófagos. Esses insetos vivem em fendas de paredes de casas com construção precária em áreas rurais ou suburbanas. Normalmente, eles se escondem durante o dia e se tornam ativos durante a noite quando se alimentam de sangue humano. Geralmente, picam uma área exposta, como a face, e o inseto defeca próximo ao local da picada. O parasito penetra no corpo quando o indivíduo instintivamente, por meio de coçadura, traciona as fezes do inseto com as formas tripomastigotas que penetram pelo local da picada ou mucosa dos olhos, da boca ou para alguma região de pele com solução de continuidade. A transmissão do parasito também pode ocorrer através de alimentos contaminados, transfusão sanguínea, transmissão vertical, transplante de órgãos e acidentes de laboratório (Coura, 2007).

A DC se apresenta em duas fases clinicamente distintas (Rassi *et al.*, 2010). A inicial, fase aguda, dura cerca de dois a quatro meses após a infecção. Durante a fase aguda, há uma elevada parasitemia que se torna patente. Em muitos casos, os sintomas estão ausentes ou o paciente se apresenta oligossintomático, com febre e linfonodomegalia por algumas semanas, dentre outros sintomas comuns em infecções agudas. Podem ocorrer também cefaleia, mialgia, dispneia, palidez, sudorese, dor abdominal ou torácica, tosse,

hepatomegalia, *rash*, diarreia, anasarca e, mais raramente, meningoencefalite (paralisia, convulsões). A morbidade da doença pode ser maior em crianças com menos de cinco anos, idosos, imunocomprometidos ou em casos de infecção por grande inóculo de parasitos virulentos. Em menos de 50% das pessoas picadas pelo triatomíneo podem ser visualizados alguns sinais iniciais característicos, como lesão indicativa de porta de entrada do parasito na pele (chagoma de inoculação) (Mazza & Freire, 1949) ou edema bipalpebral unilateral (sinal de Romaña) (Romaña & Kirschbaum, 1953).

A fase aguda não é diagnosticada em aproximadamente 90% dos casos de transmissão pelo vetor devido à semelhança de seus sinais e sintomas com inúmeras outras enfermidades agudas, embora a presença de anticorpos imunoglobulina (IgM e IgG anti-*T. cruzi*) e parasitemia patente sejam características nessa fase (Umezawa, Nascimento *et al.*, 1996).

O diagnóstico da DC pode ser realizado por testes parasitológicos, como o exame de sangue a fresco, concentração em microhematócrito ou testes sorológicos, principalmente pela reação de Análise de Imunoadsorção por Ligação Enzimática (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta. Atualmente, testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizados no diagnóstico dessa enfermidade (Britto *et al.*, 1993), apesar de seu uso na prática médica ser ainda limitado.

Na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, o parasito é relativamente fácil encontrado no sangue periférico e nos tecidos (Parada, Carrasco *et al.*, 1997; Elias, Vigliano *et al.*, 2003). As alterações histológicas características compreendem edema e infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares que se dispõem entre as fibras musculares do coração e parede do trato gastrointestinal (TGI). Além disso, pseudocistos e formas amastigotas

isoladas do parasito podem ser encontrados nos tecidos. É frequente a associação da resposta inflamatória com a presença do parasito e dano tecidual, geralmente induzido por ambos, e caracterizado por necrose das células do parênquima dos órgãos afetados. Após a fase aguda, o parasitismo e a parasitemia, em geral, desaparecem ou diminuem consideravelmente, e o paciente progride para a fase crônica.

Na fase crônica da DC, com o parasito alojado, especialmente no coração e na musculatura lisa intestinal, podem ser desenvolvidas diferentes formas clínicas: a) **forma indeterminada**, mais frequente (cerca de 70%) (Rassi *et al.*, 2010; Prata, 2001) e típica no início da fase crônica e que pode durar por toda a vida na maioria dos pacientes (duas ou mais décadas) (Dias, 1989). Nesse período, o indivíduo apresenta ausência de sintomas, exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e do abdome normais, parasitemia e parasitismo reduzidos e de difícil detecção. Entretanto, a suspeita da infecção pode ser confirmada por testes sorológicos ou parasitológicos, como a hemocultura, o xenodiagnóstico e a PCR (Chiari, Dias *et al.*, 1989; Barreto e Andrade, 1994; Gomes, Macedo *et al.*, 1998); b) **forma cardíaca** em quase 30% dos pacientes, com alterações de condução, arritmia, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo secundário; c) **forma digestiva** (megaesôfago e megacólon) ou **formas cardiodigestivas** (cardíaca associada à digestiva), em até 10% dos pacientes. Nos anos seguintes, a infecção pode levar a morte súbita ou arritmias cardíacas devido à destruição progressiva da musculatura cardíaca com substituição por fibrose da área lesada (Rassi *et al.*, 2010; Prata, 2001); d) **manifestações neurológicas** (Prata, 2001).

Anteriormente, a detecção de parasitismo tecidual em pacientes com a forma crônica da DC era extremamente rara. Atualmente, a detecção de formas visíveis do parasito através de imuno-histoquímica (Barbosa, 1985) e de técnicas de identificação do ácido

desoxirribonucleico (DNA) do parasito em tecidos (Britto *et al.*, 1993; Freitas, Lages-Silva *et al.*, 2005), permite melhor correlação entre o processo inflamatório e a presença do antígeno/DNA do parasito (Zhang e Tarleton, 1999; Lages-Silva, Crema *et al.*, 2001).

A forma digestiva da DC pode ser representada, em casos graves, pela presença de megaesôfago e megacólon (Chagas, 1916; Köberle, 1963; Da Silveira, Lemos *et al.*, 2007a). Tais manifestações são caracterizadas por importantes alterações morfológicas como dilatação e hipertrofia da musculatura lisa esofágica e intestinal, e por distúrbios fisiológicos que afetam predominantemente a região do cólon sigmóide, com perda progressiva da coordenação motora do órgão (Correa-Oliveira, Gomes *et al.*, 1999). Acredita-se que a desnervação do plexo mioentérico, consequente à morte neuronal observada nos gânglios mioentéricos, bem como a formação de áreas de fibrose, que modificam a arquitetura do músculo liso e alteram a inervação intramuscular, sejam responsáveis por sintomas como disfagia, odinofagia e progressiva constipação intestinal (Correa-Oliveira, Gomes *et al.*, 1999). O megaesôfago e o megacólon humanos são dilatações progressivas permanentes, difusas e podem atingir graus extremos, às vezes, com alongamento (megadólico), espessamento da parede, sobretudo das camadas musculares e neoformação conjuntiva (Lopes, Chapadeiro *et al.*, 1987), com sérias consequências para o paciente. A patogênese das megavísceras não está devidamente esclarecida. Não há paralelos com a doença experimental murina até o momento, e portanto são ausentes as abordagens investigativas que intentam sua prevenção ou tratamento.

A DC apresenta melhores índices de cura se o tratamento é iniciado logo após a infecção, antes que as alterações estruturais sejam instaladas. Para combater o parasito, podem ser utilizadas as drogas Benzonidazol e Nifurtimox. As duas medicações são apresentam eficácia de 70-100% na cura da doença se utilizadas logo após a infecção, ainda

na fase aguda e em menores de 14 anos (de Andrade *et al.*, 1996; Sosa-Estani *et al.*, 2012). Entretanto, a eficácia de ambos diminui quanto maior for o tempo de infecção. O tratamento também é indicado para aqueles pacientes na fase crônica nos quais a infecção tenha reativado (por exemplo, em pacientes imunossuprimidos), para crianças com infecção congênita, transmissão acidental e para pacientes durante o início da fase crônica (W.H.O., 2010). Os potenciais benefícios da medicação em prevenir ou retardar o desenvolvimento da DC devem ser levados em consideração diante da longa duração do tratamento (mais de dois meses) e as possíveis reações adversas (ocorrem em mais de 40% dos pacientes tratados) (W.H.O., 2010). Benzonidazol e Nifurtimox não devem ser utilizados em gestantes ou em pacientes com insuficiência hepática ou renal. Nifurtimox também é contraindicado em pacientes com desordens neurológicas ou psiquiátricas oriundas de sequelas. No entanto, no contexto da produção das condições experimentais que buscamos neste modelo, o benzonidazol foi utilizado para garantir a sobrevivência de uma percentagem dos animais infectados com alta parasitemia.

Não há vacina eficaz contra a DC, dessa forma, o controle do vetor é o melhor método para preveni-la, excluindo-se os casos de vetores não domiciliados e a internacionalização do parasito. A triagem do sangue é vital para prevenir a infecção por meio de transfusão de sangue e transplante de órgãos. Dependendo da região, algumas outras medidas também são eficazes: melhoria da moradia (como paredes de alvenaria, piso de cimento, etc), medidas preventivas de uso pessoal (como uso de mosquiteiro) e práticas de boa higiene na preparação de alimentos em casos de contaminação destes por triatomíneos infectados. A prevenção secundária também é importante: diagnóstico de gestantes infectadas (não realizado como protocolo de pré-natal do Sistema Único de Saúde - SUS) e detecção de possível infecção do neonato com testes sorológicos e parasitológicos depois de 9-12 meses

de idade (ausência de anticorpos maternos); prevenção de acidentes de laboratório por meio da utilização de protocolos padronizados de segurança e equipamentos de proteção individual (gorro, luvas, máscara, jaleco, óculos), especialmente quando manusear tripomastigotas (W.H.O., 2010).

1.2. Hipóteses da patogenia da DC

Duas hipóteses fundamentais sobre a gênese das lesões crônicas da DC baseiam-se nos estudos da cardiomiopatia chagásica crônica e compreendem a teoria da autoimunidade, na qual a infecção por *T. cruzi* induziria respostas imunológicas contra constituintes teciduais normais, independente da presença do parasito (Acosta e Santos-Buch, 1985; Bonfa, Viana *et al.*, 1993; Cunha-Neto e Kalil, 1995; Kalil e Cunha-Neto, 1996; Kierszenbaum, 1996; Cunha-Neto, Coelho *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 2000; Oliveira, Fujisawa *et al.*, 2009), hoje desacreditada, e aquela que sugere o parasitismo tecidual persistente como responsável pelas reações inflamatórias e consequentes danos às fibras musculares (Jones, Colley *et al.*, 1992; Higuchi Mde, Gutierrez *et al.*, 1993; Bellotti, Bocchi *et al.*, 1996; Levin, 1996; Anez, Carrasco *et al.*, 1999; Zhang e Tarleton, 1999). Com técnicas mais sensíveis para a detecção do parasito, sugere-se também a fase genômica, na qual a doença é considerada como produto da co-evolução entre o genoma do parasito e o humano, e que essa variabilidade genética influencie o curso da doença (Macedo, Machado *et al.*, 2004). Desta forma, tanto a resposta humoral às diferentes populações de *T. cruzi* cruzada com elementos do sistema nervoso, quanto a inflamação crônica derivada da

ativação celular por antígenos do parasito no tecido tomam parte na instalação das lesões que caracterizam a DC.

1.3. Megacólon chagásico

O TGI é um tubo oco, histologicamente constituído por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Junqueira e Carneiro, 2004). A regulação das funções gastrointestinais, como secreção, motilidade, fluxo sanguíneo e controle imunológico é influenciada por uma rede complexa de neurônios, que compreende o sistema nervoso entérico (SNE) (De Giorgio, Barbara *et al.*, 1996). O TGI é controlado pelo SNE e também por fibras extrínsecas simpáticas e parassimpáticas que influenciam indiretamente os músculos lisos, agindo sobre o plexo mioentérico. As fibras simpáticas têm por função contrair os esfíncteres e inibir a motilidade e a secreção, enquanto as fibras parassimpáticas têm função de relaxar os esfíncteres e estimular a motilidade e secreção (De Giorgio, Barbara *et al.*, 1996; Furness, Clerc *et al.*, 2000). A atividade funcional do TGI é regulada através da interação hormonal e neural (sistema nervoso autônomo simpático, parassimpático e peptidérgico). Os neurônios encontrados no plexo mioentérico normalmente são responsáveis por controlar a atividade peristáltica, enquanto os do plexo submucoso regulam a secreção e absorção (Furness e Costa, 1987). As lesões por desnervação do plexo nervoso acarretam hipersensibilidade dos órgãos, que, em presença de substâncias colinérgicas, exibem resposta motora atípica (Lopes, Chapadeiro *et al.*, 1987).

Em camundongos, o SNE do intestino delgado apresenta padrão bastante semelhante ao observado no intestino grosso (Sang e Young, 1998). Nota-se que a maioria dos neurônios é imunorreativo para neurofilamento-N e peptídeo-relacionado ao gene da

calcitonina (CGRP) e apresenta morfologia típica de neurônios do tipo II segundo a classificação de Dogiel (Hansen, 2003). Sob estímulos como distensão, os neurônios intrínsecos sensores são ativados diretamente pelo estímulo ou indiretamente por potencial pós-sináptico excitatório (Furness, Clerc *et al.*, 2000), demonstrando a importância e a interação do plexo mioentérico na regulação da mucosa.

No intestino delgado de camundongos, os neurônios imunopositivos para a enzima sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS), classificados em sua maioria, como tipo I, apresentam varicosidades imunorreativas ao NOS na camada muscular circular e gânglios mioentéricos, com alto índice de co-localização com o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Qu, Thacker *et al.*, 2008). Dentre os neurônios imunopositivos para nNOS e VIP, uma pequena proporção é colinérgica e parece ser exclusivamente de interneurônios, já os não-colinérgicos são neurônios motores ou interneurônios (Sang & Young, 1998). Devido ao controle esfinteriano ser pelo menos em parte feito por neurônios nNOS-positivos, é importante saber como estes neurônios estão afetados durante a DC.

As subpopulações de neurônios do plexo mioentérico imunorreativos à nNOS, VIP, calbindina e serotonina projetam-se para a região distal no intestino delgado e grosso de camundongos. Enquanto que neurônios imunorreativos à substância P (SP) projetam-se no sentido proximal e neurônios contendo neuropeptídeo Y (NPY) e calretinina tem projeção local e, por outro lado, neurônios imunorreativos à GABA (ácido gama aminobutírico) se projetam para as regiões proximal e distal dos intestinos (Sang, Williamson *et al.*, 1997). É relevante questionar como esta organização morfofuncional complexa é afetada em condições inflamatórias crônicas que resultam em remodelamento neuromuscular presente, por exemplo, no megacólon chagásico.

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

Outro importante elemento do SNE que tem estreita relação com regulação de função neuromuscular lisa intestinal é a célula intersticial de Cajal. Antes se pensava que a inervação motora da musculatura gastrointestinal ocorria via estruturas sinápticas, e o transmissor seria liberado *en passage* assim que o potencial de ação invadisse o processo neural (Burnstock, 1981). O conceito de inervação *en passage* vem sendo aprimorado por estudos morfológicos mais recentes, nos quais órgãos inervados pelo sistema nervoso autônomo (SNA) foram seccionados de forma seriada e examinados por microscopia eletrônica. Reconstruções em 3D de imagens dessas preparações revelaram junções neuromusculares distintas (Luff *et al.*, 1987; Gabella, 1995), sugerindo que existem áreas-alvo específicas nas células pós-juncionais que proporcionariam mecanismos especializados para recepção e transdução de sinais neurotransmissores. Há evidências atuais de que o contato íntimo entre as terminações nervosas entéricas e as células pós-juncionais é importante característica da inervação motora do TGI. Sabe-se também que as junções neuromusculares são mais complexas que simples contatos entre as terminações nervosas e as células musculares lisas. O primeiro conceito proposto por Cajal (1911) e posteriormente por Daniel & Posey-Daniel (1984) de que as células intersticiais de Cajal (CIC) medeiam a neurotransmissão motora entérica se tornou mais consistente com recentes observações. Morfologistas têm analisado o papel da CIC na função GI motora por muitos anos e

observaram íntimas relações entre essas células, as células musculares lisas e as terminações dos neurônios entéricos (Cajal, 1911; Táxi, 1965; Thuneberg, 1982). Estudos recentes com camundongos mutantes sugeriram que as CIC geram e propagam ondas lentas em regiões fásicas do TGI (Ward *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1995; Torihashi *et al.*, 1995), e medeiam *inputs* do sistema nervoso entérico (Burns *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1998).

A descoberta de que CIC expressa c-kit, o proto-oncogene que codifica o receptor tirosina kinase, *Kit* (Maeda *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1994; Torihashi *et al.*, 1995; Huizinga *et al.*, 1995), permitiu o desenvolvimento de um método simples e viável de imuno-histoquímica para determinar a estrutura e a distribuição das redes de CIC. O fato de que Kit é um receptor de fator de crescimento e de que CIC necessita de sinalização por essa via para seu desenvolvimento forneceu embasamento para o estudo do desenvolvimento dessas células na musculatura gastrointestinal (GI). Essas preparações permitiram os primeiros testes fisiológicos completos do papel da CIC na motilidade GI. Os resultados sugerem importantes papéis da CIC na motilidade normal e, dessa forma, sua perda pode consequentemente gerar doenças motoras. Ainda não se sabe por que ou como as CIC estão diminuídas nas desordens GI motoras (Sanders *et al.*, 1999), mas as pesquisas sobre a fisiobiologia das CIC são importantes para o entendimento da etiologia das disfunções motoras GI. Neste contexto, as CIC constituem foco desse trabalho, uma vez que não há estudos na literatura a respeito da caracterização, densidade e papel das CIC nas infecções experimentais murinas por *T.cruzi* (Adad *et al.*, 2013).

Na Doença de Chagas, distúrbios no movimento peristáltico acarretam estagnação e retenção do conteúdo do TGI com consequente distensão das fibras musculares, que é a causa principal de hipertrofia. Essas alterações levariam à formação do mega, e seriam a

consequência de um distúrbio da inervação intrínseca, desencadeado pela desnervação da fase aguda (Köberle, 1963). Microscopicamente, as lesões mais características são as do SNE no plexo de Auerbach, em que ocorre inflamação dos gânglios (ganglionite e periganglionite) e dos nervos (neurite e perineurite) com intensos fenômenos neurodegenerativos, levando à destruição completa dos mesmos. Estudos ultraestruturais do esôfago e do cólon salientam alterações quantitativas e qualitativas do componente vesicular (vesículas granulares densas e agranulares) dos neurônios do plexo mioentérico (Tafari & Maria *et al.*, 1973).

A inflamação no intestino afeta a arquitetura da fibra muscular, não ocorrendo regressão do remodelamento mesmo após o término da inflamação (Wells e Blennerhassett, 2004). Além disso, ocorre perda seletiva da proteína de vesícula sináptica sensora de cálcio - 1 (NCS-1) em camundongos com colite, embora a imunomarcagem para PGP 9.5 não esteja alterada, demonstrando que o SNE pode modificar a expressão proteica em resposta a mediadores pró-inflamatórios (Lourenssen & Jeromin *et al.*, 2002).

Observa-se maior produção de citocinas nos pacientes com a forma digestiva da DC, e que no megacólon há aumento da produção basal de interferon (IFN)- γ que, por meio de sua ação pró-inflamatória, favorece a produção de óxido nítrico (NO) (Ribeiro, Crema *et al.*, 2008), importante mediador da lesão neuronal *in vitro* (Almeida-Leite & Galvão *et al.*, 2007). Em trabalho prévio de nosso grupo (Arantes *et al.*, 2004), observou-se que a desnervação do TGI na fase aguda de infecção em camundongos C57BL/6 é dependente da produção de NO, resultado da ativação de iNOS por IFN- γ no foco inflamatório. Macrófagos ativados são responsáveis pelo combate direto ao *T. cruzi* a partir da produção de NO durante a fase aguda da doença. Em contrapartida, NO pode também acarretar *stress* oxidativo, o que é prejudicial para o hospedeiro e pode provocar danos neuronais (Gutierrez *et al.*, 2009). O

papel de outras citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-6, TGF- β , TNF α) na patogénia do megacólon também merece ser mais bem investigado.

Em função da dificuldade de se estudar a forma digestiva humana da DC, devido às limitações de acesso sistemático ao material histopatológico nas fases aguda e crônica, o conhecimento sobre esta doença vem sendo obtido de diferentes e fragmentárias abordagens experimentais que em geral não oferecem uma explicação patogénica sistemática e convincente para os fenômenos. Portanto, considera-se desejável um modelo experimental *in vivo* que reproduza as alterações morfofuncionais dessa doença no TGI, que é o objetivo central deste trabalho.

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

No cólon de camundongos da linhagem *Swiss* infectados pelo *T. cruzi*, o plexo mioentérico apresenta forma irregular e aparente destruição seletiva dos neurônios de grande e médio porte com redução de até 36% (Maifrino & Liberti *et al.*, 1999). Os neurônios ganglionares apresentam evidências de disfunção de neurotransmissores, lesão em mais de um tipo de neurônio e em fibras nervosas (Maifrino & Amaral *et al.*, 2005), além de redução da capacidade contrátil do músculo (Maifrino & Liberti *et al.*, 1999).

Como citado anteriormente, conforme Arantes & Marche *et al.* (2004), em camundongos da linhagem C57BL/6, a desnervação do plexo mioentérico durante a fase aguda aparece como uma das alterações histológicas mais relevantes observadas no cólon. Neste trabalho, NO é implicado como um dos mediadores da lesão neuronal, já que os animais geneticamente deficientes para iNOS e IFN- γ não apresentaram desnervação independentemente da presença de infiltrado inflamatório. Essa desnervação compreendeu não apenas a perda de corpos neuronais ganglionares, mas também uma alteração do padrão da inervação das camadas musculares, o que foi sugerido pela marcação imuno-histoquímica de fibras nervosas, ainda não sistematicamente estudada em microscopia óptica ou eletrônica quanto aos aspectos da junção neuromuscular lisa. Na fase aguda da doença, além da presença de parasitismo e intenso infiltrado inflamatório na parede intestinal, há alterações da glia entérica e da inervação simpática extrínseca. Todos esses aspectos e suas consequências na fase crônica da doença não foram ainda estudados sistematicamente em humanos e há raros trabalhos que avaliaram esses aspectos em modelos murinos (Arantes & Marche *et al.*, 2004).

Especialmente o papel da lesão da inervação intramural e não apenas a desnervação ganglionar na gênese a longo prazo das modificações estruturais do megacolon será analisada pelo modelo que estamos propondo.

É também importante caracterizar os tipos de células do sistema imunológico (CD4+, CD8+, CD20+ e CD68+) presentes no infiltrado inflamatório da fase aguda e crônica no intestino murino, com a finalidade de correlacionar o potencial de neurotoxicidade das citocinas com as lesões encontradas nas fibras musculares e nervosas.

No intuito de solucionar a infecção por *T. cruzi*, é necessário um balanço entre resposta imune mediada por células Th1 e Th2 (Basso *et al.*, 2004). Células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias, enquanto que células Th2 possuem função anti-inflamatória e estão envolvidas na resposta mediada por anticorpos. IL-12 e IL-18 produzidas por macrófagos e células dendríticas promovem o desenvolvimento de células Th1 que produzem INF- γ , enquanto que IL-4 induz a expansão de células Th2 e a produção de grandes quantidades de IL-10. Como resultado desses processos, a regulação da resposta celular ocorre devido a redução na ativação de células dendríticas e no aumento da atividade microbicida do macrófago. Além disso, IL-4 também induz a produção de TGF- β , que regula a atividade das células apresentadoras de antígeno e aumentam a susceptibilidade da infecção por *T. cruzi* (Cardillo *et al.*, 2007). No entanto, o *T. cruzi* é capaz de sobreviver no hospedeiro por longos períodos, o que contribui para o desenvolvimento de sintomas e a evolução para doença crônica (Tzelepis *et al.*, 2006). Nesse contexto, nosso modelo pode auxiliar na compreensão desse fenômeno e também na relação das citocinas inflamatórias com as fases da DC.

Nosso grupo vem trabalhando em modelos *in vivo* e *in vitro* de DC, com foco nas lesões neuronais, tanto dos corpos de neurônios quanto de suas terminações nervosas que ocorrem no decorrer do processo inflamatório complexo que a infecção pelo parasito determina nos tecidos, tanto no homem quanto em animais de experimentação (Arantes *et al.*, 2004; Almeida-Leite, 2007). Paralelamente a esses estudos, foi descrito por nosso grupo um mecanismo de crescimento axonal que depende da aquisição de membranas de compartimentos derivados de lisossoma (LAMP-1 – positivos) nos cones de crescimento de neurônios simpáticos *in vitro* (Arantes & Andrews, 2006). O crescimento de neuritos é mediado por exocitose de vesículas intracelulares na extremidade de processos neurais que

estão se alongando. O compartimento de vesícula lisossomal que tem inserido em sua membrana um receptor insensível à neurotoxina do tétano (TI-VAMP/VAMP-7), já foi implicado nos eventos de fusão de vesículas à membrana. Tais eventos medeiam o crescimento do neurito por fornecer às membranas dos axônios em crescimento uma fonte de membrana a ser inserida estruturalmente nas extremidades que se alongam rapidamente (Galli & Haucke, 2005).

Neurônios obtidos a partir de animais deficientes para sinaptotagmina VII (Syt-VII^{-/-}) revelaram acentuado defeito de crescimento e arborificação axonal, sugerindo que um mecanismo cálcio-dependente envolvendo exocitose de lisossomas/endossomas tardios, regulado por Syt-VII exerce papel na adição de membrana aos neuritos em desenvolvimento (Arantes e Andrews, 2006). Uma vez que animais Syt-VII^{-/-} não apresentam fenótipos neurológicos evidentes, uma explicação para o fenômeno descrito acima é que a lesão mecânica dissociativa e o estresse traumático do plaqueamento e das primeiras horas de crescimento *in vitro* são reparados de forma deficiente na ausência de Syt-VII. Especula-se que este reparo possa acontecer em algumas condições patológicas, nas quais degeneração e regeneração neuronal possam estar ocorrendo em diversos graus (Arantes e Andrews, 2006).

Acredita-se que a manutenção da integridade sináptica e funcional das varicosidades seja obtida de forma plástica e há estudos a respeito da disponibilidade, transporte e reciclagem (exocitose e endocitose de vesículas de neurotransmissores) neste fenômeno. Entretanto, até o momento não existe na literatura observação implicando vesículas de membrana Lamp-1/Vamp 7 no reparo, na plasticidade ou mesmo na manutenção da

integridade de corpo neuronal ou terminações nervosas na DC por meio do alongamento neuronal.

Outra proteína de interesse no nosso estudo é a Growth Associated Protein (GAP-43). Essa proteína está associada ao crescimento neuronal e também é conhecida como neuromodulina, B-50, P-57, F1 e pp46 (Benowitz *et al.*; 1997). A importância de GAP-43, em geral, é demonstrada pelo fato de que a deleção de seu gene em camundongos resulta em morte precoce no período pós-natal (Strittmatter *et al.*; 1995). Em outro estudo, observou-se que os cones de crescimento neuronal que não possuíam GAP-43 apresentaram deficiência na persistência de ramificação, adesão e proliferação (Aigner *et al.*; 1995). Os neurônios crescem em resposta a agentes extracelulares. Esses agentes são tipicamente as neurotrofinas, incluindo NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), neurotrofina-3 (NT-3), e neurotrofina 4/5 (NT 4/5), assim como as moléculas da matriz extracelular laminina, proteoglicanos heparan-sulfato, e as moléculas de adesão celular L1 e N-caderina (Goldberg *et al.*; 2013). NGF aumenta a expressão de GAP 43 em células por meio do aumento da meia-vida do RNAm de GAP-43. Apesar de GAP-43 não ser necessário para a formação do cone de crescimento axonal, é indiscutível seu papel para o correto direcionamento do crescimento dos cones (Perrone-Bizzozero *et al.*; 1991).

No sistema nervoso periférico, axônio trans-seccionado por injúria ou doença irá crescer novamente até seu local de origem e restabelecer função motora ou sensorial (Granziera *et al.*; 2007). GAP-43 está presente em certos neurônios que liberam catecolaminas, mas não é restrito a neurônios catecolaminérgicos. Mudanças na liberação dos neurônios e na formação de novos ramos neuríticos, novas conexões sinápticas e novos pontos de adesão podem ser continuamente necessários, e isso implicaria em expressão

contínua de GAP-43. No sistema nervoso entérico, em modelos experimentais com ratos de aplicação direta de ácido acético causando lesão neural na mucosa fúndica gástrica, a GAP-43 já foi descrita agindo como marcador de regeneração nervosa e de maturação da mucosa do TGI (Nakamura *et al.*, 2000). Com a avaliação da proteína GAP-43 em nosso modelo murino de DC, podemos caracterizar a sua expressão durante a infecção por *T. cruzi* e avaliar se há relação de sua expressão com regeneração neuronal.

Em função dos interesses de estudo delineados acima, e da necessidade de um modelo experimental robusto para estudos murinos *in vivo* que reproduzam as alterações morfológicas do TGI da fase crônica da DC, nosso laboratório vem propondo um modelo experimental em camundongos da linhagem *Swiss* que permita acompanhar sequencialmente as fases aguda e crônica da DC, a partir de uma intervenção terapêutica medicamentosa (Benzonidazol) na fase aguda da doença. Esperamos que este modelo possa colaborar para o entendimento da patogenia dos processos adaptativos intestinais relacionados ao controle neuromuscular, à estrutura e função do SNE, e à degeneração neuronal na DC murina crônica. Em uma perspectiva de longo prazo o conhecimento da história natural da doença intestinal e de seus mecanismos patogénéticos, poderemos identificar processos alvos de uma intervenção preventiva em pacientes infectados.

2- OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVOS GERAIS

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

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a fase aguda e crônica experimental da DC:

2.2.1. Avaliando o curso da infecção por meio de curva de parasitemia e taxa de mortalidade;

2.2.2. Detectando a presença tecidual de pseudocistos e formas isoladas do *T. cruzi* em ambas as fases da doença;

2.2.3. Mensurando massa corporal dos camundongos e o comprimento do cólon durante as fases aguda e crônica da doença;

2.2.4. Avaliando qualitativa e quantitativamente as alterações histopatológicas;

2.2.5. Determinando a área ocupada pelos gânglios mioentéricos em relação à inervação intermuscular e intramuscular;

2.2.6. Avaliando a expressão de GAP-43 e sinaptotagmina I/II e correlaciona-la à inervação intermuscular;

2.2.7. Avaliando a presença e o grau de degeneração de células musculares lisas da parede intestinal por meio da análise quantitativa de alfa actina;

2.2.8. Avaliando qualitativamente a expressão de iNOS em macrófagos ativados do infiltrado inflamatório;

2.2.9. Avaliando os neuropeptídeos expressos;

2.2.10. Dosando citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, INF γ , TNF α , TGF β);

2.2.11. Analisando ultraestruturalmente as células musculares lisas, as células intersticiais de Cajal e o plexo mioentérico.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 56 camundongos albinos *Swiss* fêmeas, com massa corporal média de 25 gramas e aproximadamente quatro semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em gaiolas plásticas e ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados. Os animais receberam ração convencional para camundongos (Nuvilab® Nuvital, Curitiba, Brasil), água filtrada *ad libitum* e foram vermifugados, durante sete dias, com Ivomec® Merial, Paulínia, Brasil, via oral na diluição de 0,4 ml/500ml de água filtrada.

O procedimento experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 222/2007) e, posteriormente pelo protocolo 377/2012.

3.2 INFECÇÃO COM *T. cruzi*

Dos 56 camundongos, dez animais foram utilizados como grupo controle não-infectado, cinco compondo o grupo controle de fase aguda (CFA) e cinco o grupo controle de fase crônica (CFC). Os outros 46 animais foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y – *T. cruzi* II (Silva e Nussenzweig, 1953), sendo escolhida esta cepa específica de *T. cruzi* devido a trabalhos realizados anteriormente pelo nosso grupo em conjunto com o professor Washington Luiz Tafuri. As formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y do *T. cruzi* no dia do pico de parasitemia, cedidas pela Prof^a Maria Terezinha Bahia

do Laboratório de Doença de Chagas do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP. A contagem dos tripomastigotas para a preparação do inóculo foi feita conforme a técnica descrita por Brener (1962).

A infecção de todos os animais inoculados foi confirmada por exame de sangue à fresco na fase aguda e na fase crônica foi confirmada pelo método sorológico ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Os animais infectados foram divididos em três grupos, a saber, dez animais foram destinados à eutanásia no 11º dia após a infecção (d.p.i.), compondo o grupo infectado de fase aguda (IFA). Neste mesmo dia, 30 animais foram tratados com Benzonidazol – Rochagan® Roche, Rio de Janeiro, Brasil – derivado 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), na dose única de 500 mg/Kg de peso corporal via oral, e mantidos até a eutanásia na fase crônica prolongada, aproximadamente 15 meses pós infecção (m.p.i.), compondo o grupo infectado de fase crônica (IFC). Outro grupo composto por seis animais foi acompanhado em paralelo, sendo avaliada diariamente a parasitemia até a morte para determinação da curva de parasitemia. Esse mesmo experimento foi repetido por duas vezes, mantendo-se sempre a mesma metodologia acima descrita.

Abaixo segue delineamento experimental (Figura 1), apresentado de forma esquematizada:

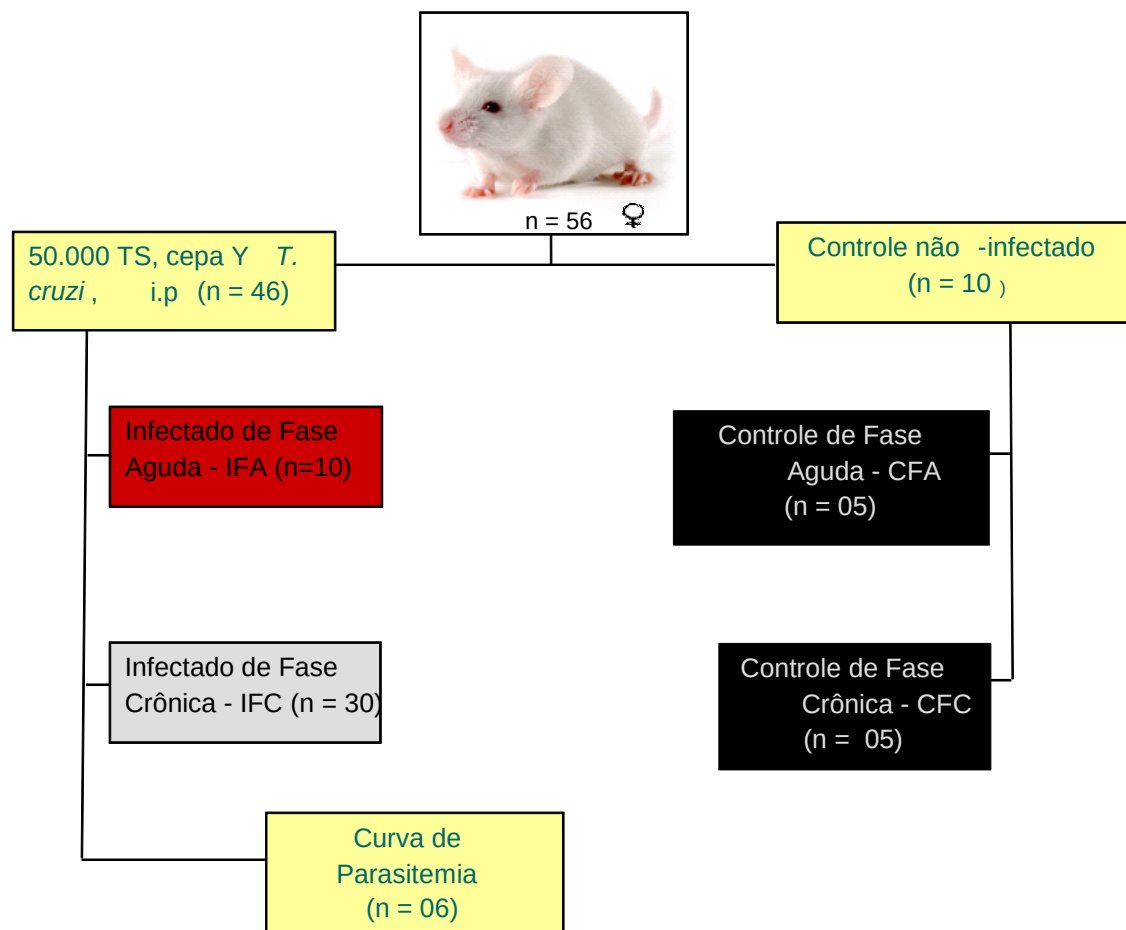


FIGURA 1: Delineamento experimental: Foram utilizados 56 camundongos Swiss fêmeas, destes, 46 foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y – *Trypanosoma cruzi* II, 10 foram eutanasiados no 11º dia d.p.i (grupo infectado de fase aguda – IFA); 30 foram tratados com Benzonidazol no 11º d.p.i e mantidos até à eutanásia na fase crônica (IFC). 10 animais foram utilizados como grupo controle não infectado, sendo cinco de fase aguda (CFA) e cinco de fase crônica (CFC). Para delineamento da curva de parasitemia foram utilizados 6 animais infectados. O experimentofoi realizado duas vezes.

3.3. CURVA DE PARASITEMIA E MORTALIDADE

A parasitemia foi verificada diariamente a partir do 4º d.p.i. até a morte dos seis camundongos avaliados conforme descrito por Brener (1962). Para isso, foram coletados 5 µl de sangue da cauda dos camundongos para pesquisa de formas tripomastigotas do *T. cruzi*,

contando-se os parasitos ao microscópio em 50 campos com aumento de 400x. A mortalidade foi acompanhada e registrada diariamente durante todo o período experimental.

3.4 EUTANÁSIA

No dia da eutanásia, os animais foram pesados para avaliação de massa corporal. Os animais foram eutanasiados utilizando-se o anestésico Pentobarbitol na dose de 80 a 90mg/Kg de peso corporal, via i.p. No 11º d.p.i., foram eutanasiados dez animais infectados, compondo o grupo infectado de fase aguda (IFA) e cinco animais não-infectados, grupo controle de fase aguda (CFA).

No 15º m.p.i., seis animais infectados e tratados com Benzonidazol sobreviventes compuseram o grupo infectado de fase crônica (IFC) e cinco animais não-infectados com idade pareada, controle de fase crônica (CFC), foram eutanasiados para obtenção de material histológico.

3.5 COLETA DE MATERIAL HISTOPATOLÓGICO

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

O processamento do intestino grosso foi realizado de acordo com o descrito anteriormente (Arantes & Nogueira, 1997). De forma resumida, o cólon foi separado do restante do intestino, estendido com a serosa em contato com o papel de filtro e aberto pela

borda ante-mesentérica, removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Nesse momento, todo o cólon foi medido (cm) em sua extensão longitudinal. Foram seccionados transversalmente dois fragmentos de cólon proximal, um para análise ultraestrutural (Microscopia Eletrônica) e outro para dosagem de citocinas inflamatórias pela técnica de PCR. O restante foi transferido para um recipiente em forma de calha contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial e mantido nesta solução por um período de 10 min para pré-fixação. O cólon pré-fixado foi colocado sobre uma superfície plana e enrolado em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), da porção distal (próxima ao ânus) em direção à proximal (próxima ao ceco), com adaptações da técnica descrita por Calvert, Otsuka *et al.* (1989). Os rocamboles amarrados com barbante foram fixados por imersão em solução de formol por 24h e desidratados em concentrações crescentes de álcool (álcool 70°, 80°, 90°, absoluto 1, 2 e 3), diafanizados em duas trocas de xilol, embebidos e incluídos em parafina. Esses blocos de parafina foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes semi-seriados com 4 µm de espessura.

3.6. MÉTODO ELISA (títulos de IgG anti-*T. cruzi*)

Quinze meses após infecção, foi coletado sangue do seio venoso orbital (500 µL) de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com Benzonidazol. A detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* foi realizada pela técnica descrita por Voller (1976). Placas para ELISA foram sensibilizadas com antígeno preparado com formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Foi utilizado conjugado peroxidase anti-mouse IgG (Sigma Chemical Co.). A média de absorbância para dez amostras controle negativas mais dois desvios-padrão foram utilizadas como *cut-off* para discriminar resultados positivos e negativos. Os experimentos foram realizados no Laboratório NUPEB/Departamento de Ciências Biológicas

da Universidade Federal de Ouro Preto sob supervisão da Professora Maria Terezinha Bahia.

3.7. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos do cólon foram desparafinados, hidratados em concentrações decrescentes de álcool e imersos em solução fosfato (PBS – phosphate-buffered saline) a 10 %, pH 7,2 – 7,4. Posteriormente, os cortes foram submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena em banho de Metanol/Peróxido de Hidrogênio (100ml de metanol e 3,5ml de Peróxido de Hidrogênio a 30%), por 30 minutos (min) à temperatura ambiente, seguido de banhos de PBS a 10%. Subsequentemente, as lâminas foram imersas em banho de leite em pó desnatado diluído em PBS a 10% (6 g de leite desnatado em 100 ml de PBS), por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso das bordas da preparação histológica foi retirado e os cortes incubados com o anticorpo primário diluído em PBS/albumina bovina 1% (1870, Inlab, Diadema, Brasil), em câmara úmida à 4°C por 15 horas (h). Em seguida, os cortes foram incubados em câmara úmida por 30 min a 37°C com o anticorpo secundário. Após banhos em PBS, procedeu-se à aplicação do complexo estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) e incubação por 30 min em câmara úmida a 37°C. A revelação da reação da peroxidase foi obtida por meio da incubação em solução de DAB (50mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato em 200ml de PBS e 400µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 5 min. Para interromper a revelação os cortes foram lavados em PBS por 5 min e, posteriormente, contra-corados com Hematoxilina de Harris diluída por 3 segundos (s), lavados em água corrente por 5 min, desidratados, diafanizados em xilol e montados com Entellan (Merck). As etapas foram intercaladas com três banhos de PBS por 5 min cada, exceto quando indicado diferente.

Foram utilizados os seguintes anticorpos segundo o protocolo citado acima: anti-*T.cruzi*, anti-PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5), anti-GAP 43 (Growth associated protein), anti-sinaptotagmina I/II, anti-alfa actina, anti-iNOS (óxido nítrico sintase induzida) para identificação de tipos de neurônios (CGRP – peptídeo relacionado ao gene de calcitonina - e nNOS – óxido nítrico sintase neuronal) (quadro 1).

Para identificação de subtipos de linfócitos (CD3, CD4, CD8, CD20, CD68), foi utilizado o protocolo descrito a seguir. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas, colocadas em hidróxido de amônia 10% em etanol 95% para remoção do pigmento formólico, e depois em água destilada, seguindo-se por recuperação antigênica com tampão citrato por 20 min. O próximo passo foi o bloqueio da peroxidase endógena em água destilada/Peróxido de Hidrogênio (270ml de água destilada e 30ml de Peróxido de Hidrogênio a 20%) dois banhos por 30 min cada, à temperatura ambiente e posteriormente, ao bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 0,1% por 30 min e Biotina/Avidina por 10 min cada, à temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20 e CD-68 diluídos em PBS e albumina bovina a 2% (1870, Inlab, Diadema, São Paulo, Brasil), em câmara úmida à 4°C por 2 h ou por 15 h, seguido de três banhos em PBS de 5 min cada.

O anticorpo secundário, imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinilada pré-diluída e estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) foram consecutivamente utilizados para incubação por 30 min à temperatura ambiente. Entre cada etapa descrita, os cortes foram lavados por três banhos de PBS, 5 min cada. A revelação da reação foi realizada por incubação em solução de DAB (50 mg de Diaminobenzidina em 200 ml de PBS e 400 µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 3 min. Posteriormente foram

contra-corados com Hematoxilina de Harris diluída por 3 s, lavados em água corrente por 5 min, desidratados em concentração crescente de álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan (Merck).

No Quadro 1 estão indicadas as principais características dos anticorpos e seu uso.

QUADRO 1 - Caracterização dos anticorpos primários e secundários, conjugados e sistema de detecção

<u>Anticorpos</u>	<u>Origem e Diluição</u>	<u>Código e Fabricante</u>	<u>Anticorpo Secundário conjugado com biotina</u>	<u>Reagente Terciário</u>	<u>Principal uso</u>
Anti- <i>T. cruzi</i>	Coelho 1:5000	Cedido Prof ^a Maria T. Bahia, UFOP, Ouro Preto, Brasil	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) *	Identificação de formas isoladas e ninhos de amastigotas de <i>T. cruzi</i>
PGP 9.5	Coelho 1:500	RA95101 UltraClone Ltd, Inglaterra	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) *	Identificação de neurônios e fibras nervosas
Anti-Gap 43	Coelho 1:500	Chemicon International, Temecula, Calif	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) *	Identificação de diferenciação neuronal (crescimento axonal)
Anti- sinaptotagmina I/II	Coelho 1:500	Synaptic Systems 105102	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída (Kit Dako)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Identificação de formação de vesículas sinápticas
Anti-alfa actina	Coelho 1:1000	Epitomics an abcam company	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída (Kit Dako)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Identificação de células musculares lisas viáveis
Anti-nNOS	Coelho 1:750	Epitomics an abcam company	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída (Kit Dako)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Identificação de neurônios NOS positivos
CGRP	Coelho 1:200	Ab8056 ABCAM	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Identificação de neurônios CGRP positivos
CD3 CD4 CD8 CD20 CD68	1:200 1:200 1:250 1:100 1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., United States	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinilada pré- diluída)	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Identificação de células inflamatórias para perfil do infiltrado inflamatório

Anti-iNOS	Coelho 1:750	Millipore	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) *	Estreptavidina- peroxidase pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	Identificação da produção de óxido nítrico por células inflamatórias
------------------	-------------------------	------------------	--	--	---

3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As amostras para microscopia eletrônica foram colocadas em uma solução fixadora contendo tampão fosfato monossódico/dissódico 0,1 M com pH final de 7,2; paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5%. Os tecidos foram fixados por 48 h e transferida para solução tampão 0,1 M (tampão 0,2 M diluído 1:1 em água destilada). As amostras foram, então, enviadas para o Centro de Microscopia Eletrônica, sob os cuidados da professora Patrícia Massara Martinelli do Departamento de Morfologia, ICB/UFMG, para posterior processamento. A análise ultraestrutural de componentes como células musculares lisas e plexo mioentérico foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV.

3.9. PROCESSAMENTO DO TECIDO PARA DOSAGENS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Foram pesados 100 mg do cólon dos animais, seccionado transversalmente como anel da porção proximal. O tecido foi macerado em um homogeneizador na presença de 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino 0,5%; Fluoreto defenilmetilsufonila 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI deaprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,89 g diluídos em 1 litro). A solução resultante foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi removido para a dosagem de citocinas pela técnica de ELISA. Estes experimentos foram realizados com a colaboração da Prof^a Daniele Souza.

3.10. DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

Para a dosagem das citocinas (IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α) foram utilizados kits murinos específicos (DuoSet R&D SYSTEMS), seguindo as instruções do fabricante. De acordo com o protocolo, 100 μ L/poço do anticorpo de captura (5,5 μ L/mL) diluído em PBS estéril foram adicionados a cada placa (NUNC FLAT, 96-well, FALCON) que foram vedadas e incubadas a 4°C por 24 h. O conteúdo de cada placa foi removido e cada poço foi lavado três vezes (300 μ L/poço) com tampão de lavagem (PBS/TWEEN 20 0,05%). Após esse procedimento, foram adicionados 300 μ L/poço do tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por no mínimo 1 h. O procedimento de lavagem foi repetido e adicionados 100 μ L/poço das amostras, tecido (cólón na diluição 1:3) e padrões, diluídos em tampão de diluição (BSA 0,1% em PBS 1x). As placas foram novamente incubadas por 24 h. Repetiu-se o procedimento de lavagem e foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de detecção biotinilado (5,55 μ L/mL) diluído em tampão de diluição (o mesmo das amostras e padrões). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 h. Após mais um procedimento de lavagem, foram adicionados 100 μ L/poço de estreptavidina – HRP 1:200 em tampão de diluição e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 20 min. Novamente as placas foram lavadas e adicionados 100 μ L/poço do substrato cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) (em tampão citrato pH 5 com adição de peróxido de hidrogênio). As placas foram incubadas por 20-30 min, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após esse período, observou-se a formação de cor e foram adicionados 50 μ L/poço de ácido sulfúrico 1M para interromper a reação. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) no comprimento de onda 492 nm e as concentrações já calculadas tendo como base a curva padrão de cada teste.

3.11. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As imagens obtidas por microscópio de luz foram capturadas com resolução de 1392x1040 pixels e transferidas via câmera de vídeo colorida Cool SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) para um sistema de vídeo acoplado a computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Elas foram analisadas no programa KS300 (Zeiss, Jena, Germany) no laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral, ICB/UFMG.

A massa corporal e comprimento do cólon foram medidos imediatamente após a eutanásia. Microscopicamente, os parâmetros medidos foram espessura da parede total do cólon (μm^2) (calculada a partir de 3 medidas em cada foto) (Figura 2); espessura da camada muscular própria (μm) (calculada a partir de 3 medidas em cada foto, totalizando a análise de 10 fotos por animal) (Figura 2); área da célula muscular (μm^2) (calculada por número de células musculares lisas/área do campo); área de fibrose na camada muscular própria (μm^2) (calculada por área marcada pela coloração especial tricrômico de Gomori em relação à área total de camada muscular própria); área de fibra reticular na camada muscular própria (μm^2) (calculada por área marcada pela coloração especial prata amoniacal de Gomori em relação à área total de camada muscular própria) e contagem do número de neurônios por área de plexo mioentérico (μm^2).

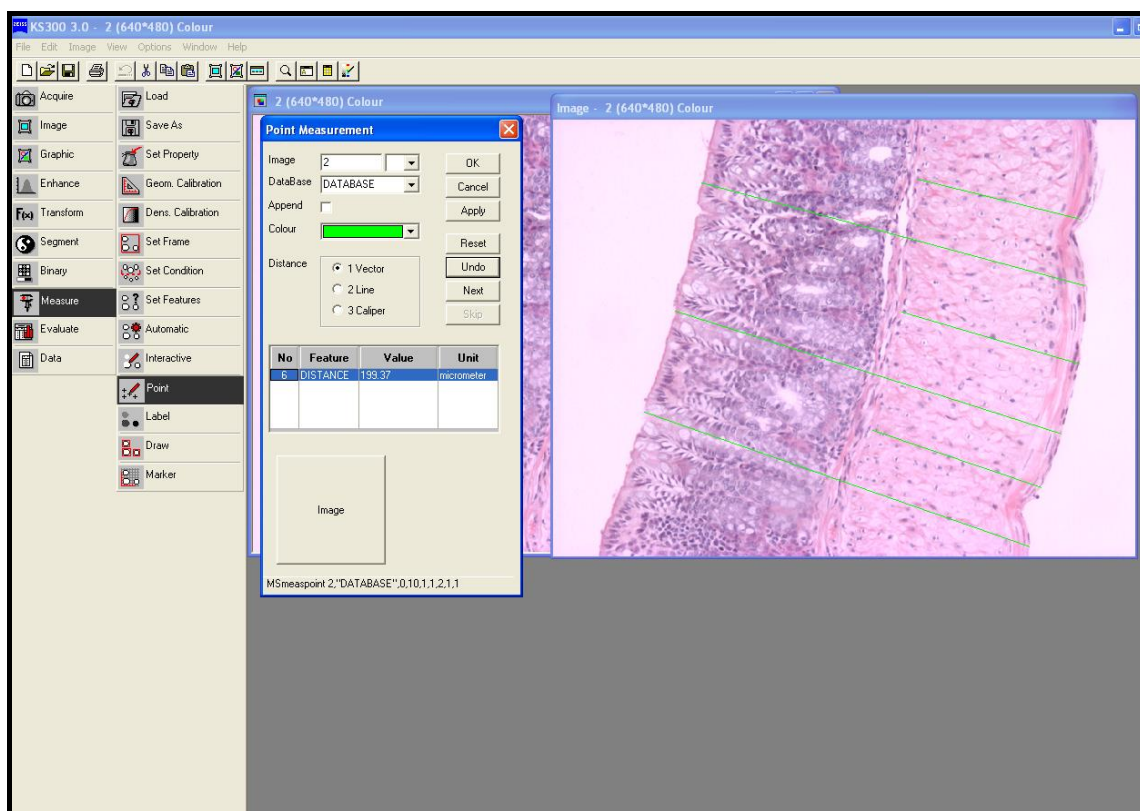


Figura 2: Morfometria da análise das espessuras total do cólon e da camada muscular interna de camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via i.p. Medida de espessura total e camada muscular interna, avaliando-se três medidas desses dois parâmetros em cada campo analisado e calculando-se a média dos valores obtidos.

A área imunomarcada por área total do campo (μm^2) foi medida para anti-*T. cruzi*, anti-GAP43, anti-nNOS, anti-CGRP, anti-alfa actina, anti-sinaptotagmina, anti-PGP 9.5 e anti-GFAP (Figuras 3 e 4). Para anti-iNOS somente análise qualitativa foi realizada.

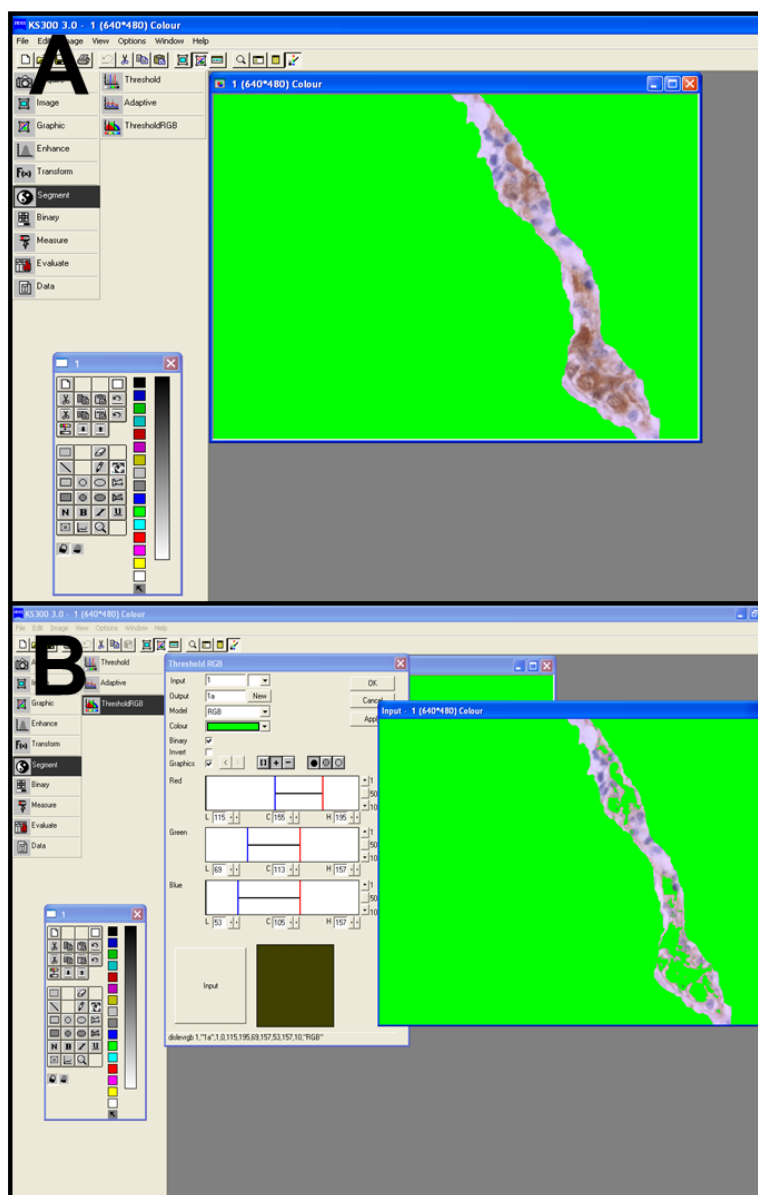


Figura 3: Morfometria da análise de área imunomarcada em relação à área total do plexo mioentérico de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via i.p. (A) Seleção da área total do plexo mioentérico, excluindo o restante de tecido do campo analisado. (B) Seleção da área imunomarcada (escolha de pixels).

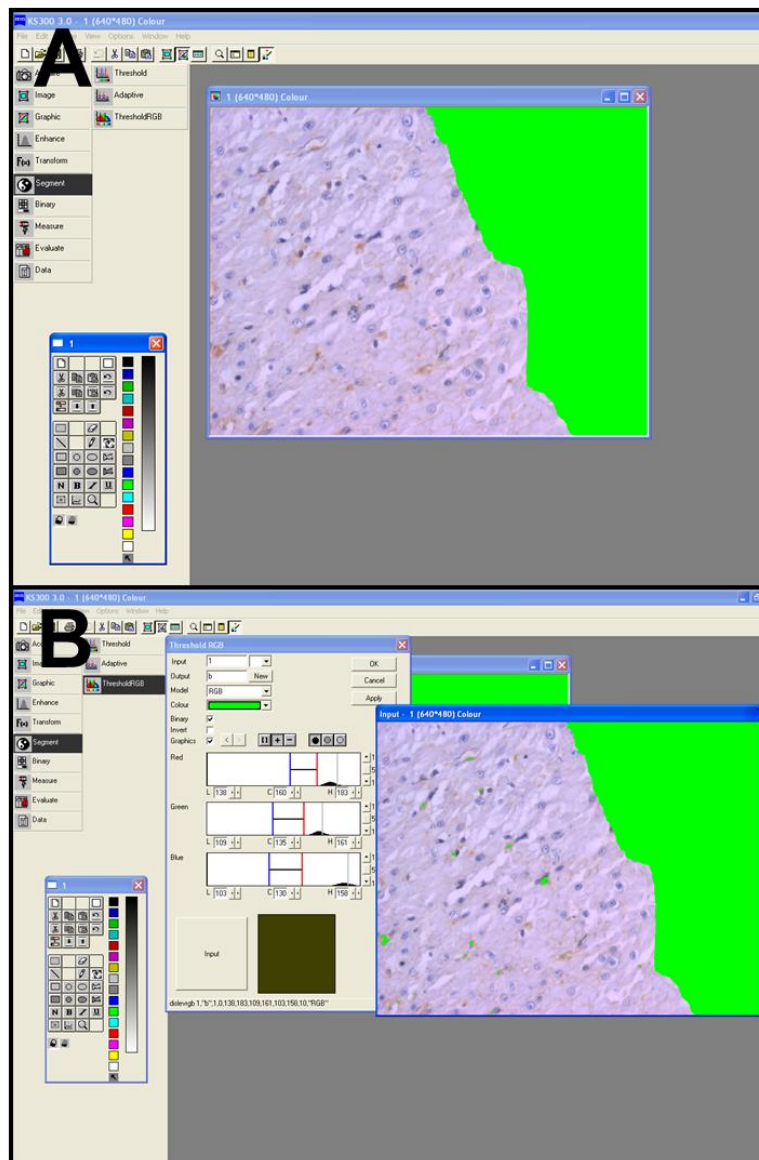


Figura 4: Morfometria da análise de área imunomarcada em relação à área total da camada muscular interna de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via i.p. (A) Seleção da área total da camada muscular interna, excluindo o restante de tecido do campo analisado. (B) Seleção da área imunomarcada (escolha de pixels).

Também foi realizada a contagem de células imunomarcadas por CD3, CD4, CD8, CD20 e CD68 em relação ao número total de células.

Todos os parâmetros foram medidos em 20 animais (cinco de cada grupo) pela análise de dez campos por animal em aumento da lente objetiva de 10x (espessuras da

parede total do cólon e da camada muscular própria) e de 40x (para os demais parâmetros avaliados), totalizando uma área de 238.336 μm^2 analisada por cada parâmetro.

Foram obtidos a média, o desvio-padrão (D.P) e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros quantificados nas fases aguda e crônica de infecção e de seus respectivos controles.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas utilizando o programa MINITAB versão 14 e Graph Pad Prisma 5. Todas as análises foram feitas aleatoriamente e os resultados agrupados em grupos de camundongos infectados de fase aguda ou crônica e camundongos não infectados de fase aguda ou crônica (controles). Os resultados obtidos referentes à massa corporal, comprimento longitudinal do cólon, parasitismo tecidual, celularidade tecidual, hipertrofia muscular, inervação intra e intermuscular, CGRP, espessura da parede do cólon, fibra reticular, tecido conjuntivo, GAP-43, citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α , TGF- β e IFN- γ), nNOS, sinaptotagmina e alfa actina foram comparados entre os grupos de camundongos infectados de fase aguda, crônica e respectivos controles usando ANOVA one-way e teste de Tukey post-hoc, seguido por análises residuais para verificar a distribuição de erro e adequação do modelo normal. Células CD3, CD4, CD8, CD20 e CD68 foram comparadas entre os grupos utilizando o teste de Kruskal-Wallis por não terem distribuição normal. Análise morfométrica de alguns parâmetros, como espessura da parede do cólon, fibra reticular, tecido conjuntivo e inervações intra e intermucosulares foram realizadas em duas repetições. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (Figura 5).

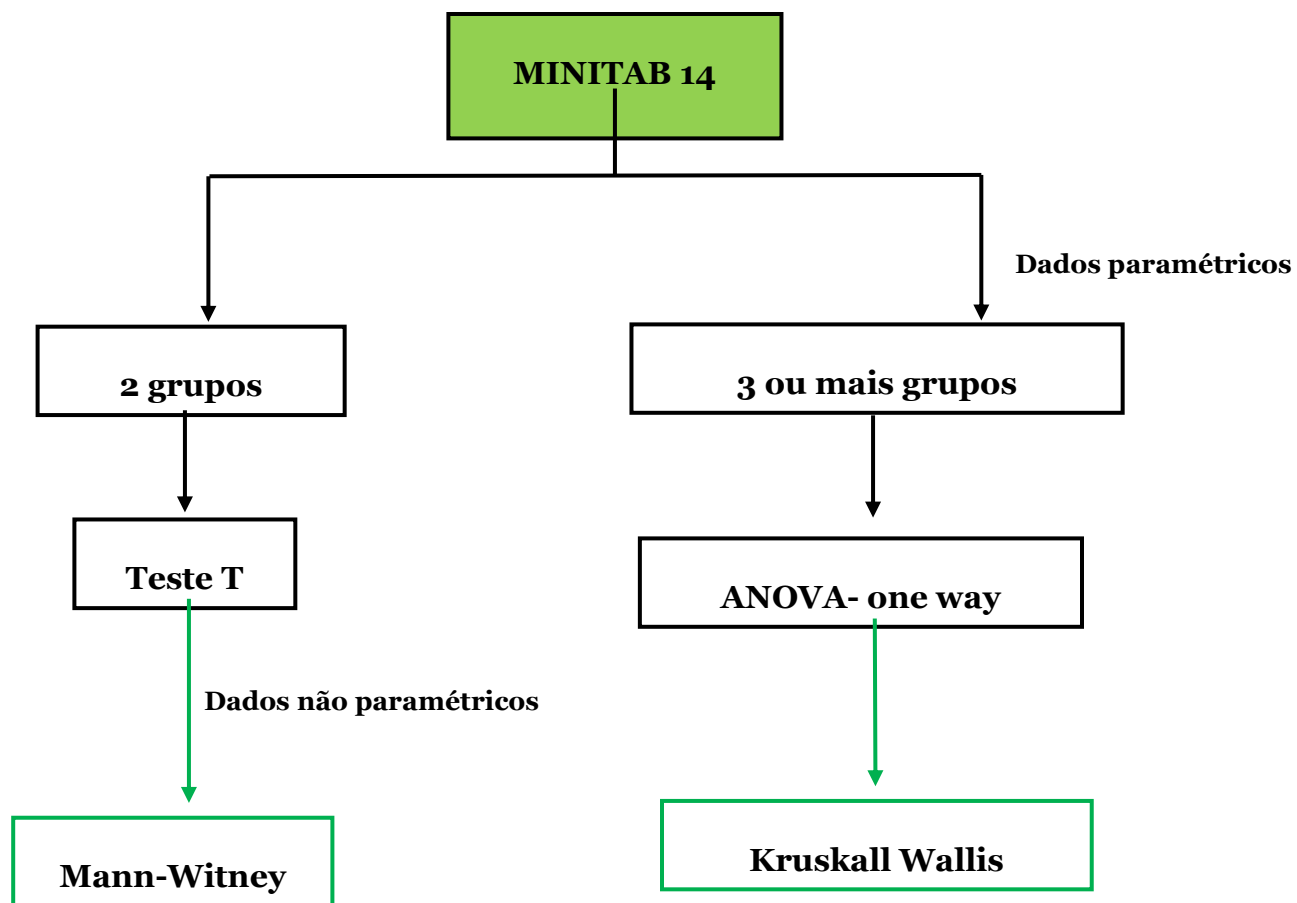


FIGURA 5: Análise estatística: Foram utilizados 56 camundongos Swiss fêmeas, destes, 46 foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y – *T. cruzi* II. 10 animais foram eutanasiados no 11º dia d.p.i (grupo infectado de fase aguda - IFA); 30 foram tratados com Benzonidazol e mantidos até à eutanásia na fase crônica (IFC). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4.1. Parasitemia

Camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* apresentaram o pico de parasitemia no 8º dia pós-infecção (p.i.), havendo depois desse tempo uma queda abrupta até o 10º dia. A partir desse momento, observou-se certa estabilização da parasitemia, seguida da morte progressiva de todos os animais até o 28º dia de infecção (Figura 6). Todos esses animais utilizados para delineamento da curva de parasitemia não foram tratados, e nenhum sobreviveu além de 28 dias pós-infecção.

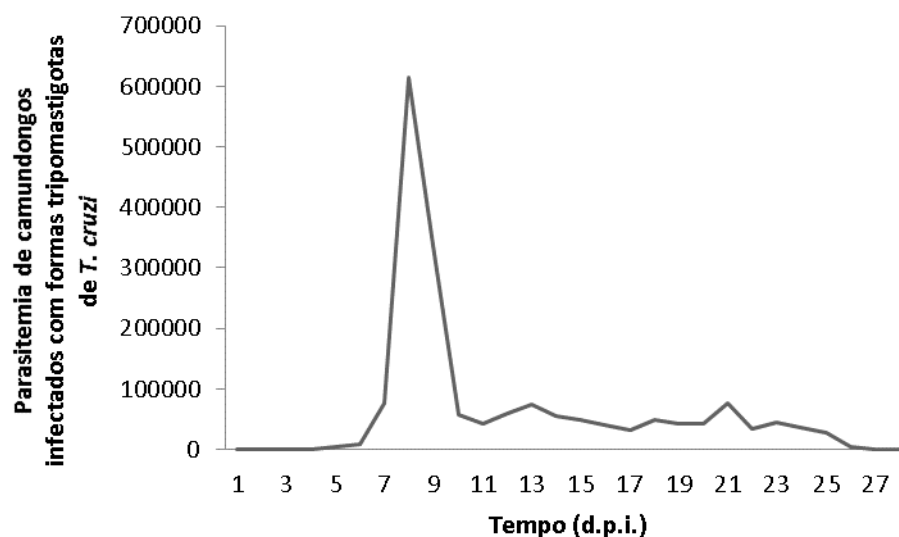


FIGURA 6: Curva de parasitemia: camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção (n=6), sem tratamento.

4.2. Taxa de Mortalidade

A figura 7 indica a porcentagem de mortalidade de camundongos *Swiss* infectados com *T. cruzi* e tratados no 11º d.p.i. com benzonidazol. Os animais obtiveram uma inclinação da curva de mortalidade acentuada até o 20º dia pós-infecção (> 50% dos animais), e, após esse período, houve uma desaceleração no ritmo de mortalidade. Ao final de 15 meses de experimento, 6 camundongos sobreviveram (20%) e foram eutanasiados, compondo o grupo infectado de fase crônica.

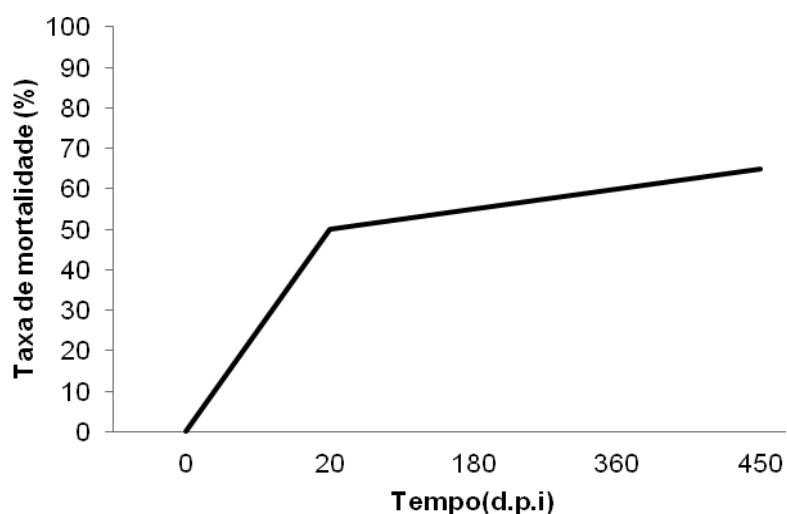


FIGURA 7: Taxa de mortalidade: camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, avaliados ao longo do período de todo o experimento (15 meses) (n=30). A mortalidade é acentuada até o 20º dia, com posterior desaceleração. O início do tratamento ocorreu no 11º dia pós-infecção.

4.3. Massa corporal dos camundongos

Observou-se maior massa corporal em camundongos do grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (**p = 0,0000; EPM = 1,832). Entretanto, observou-se menor massa corporal dos camundongos do grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação a seu controle (CFC) (*p = 0,0234; EPM = 2,317) (figura 8). Não houve diferença significativa em relação à massa corporal quando foram comparados os grupos controles (CFA e CFC) e quando comparados o grupo infectado de fase aguda (IFA) e seu respectivo controle (CFA) (figura 8).

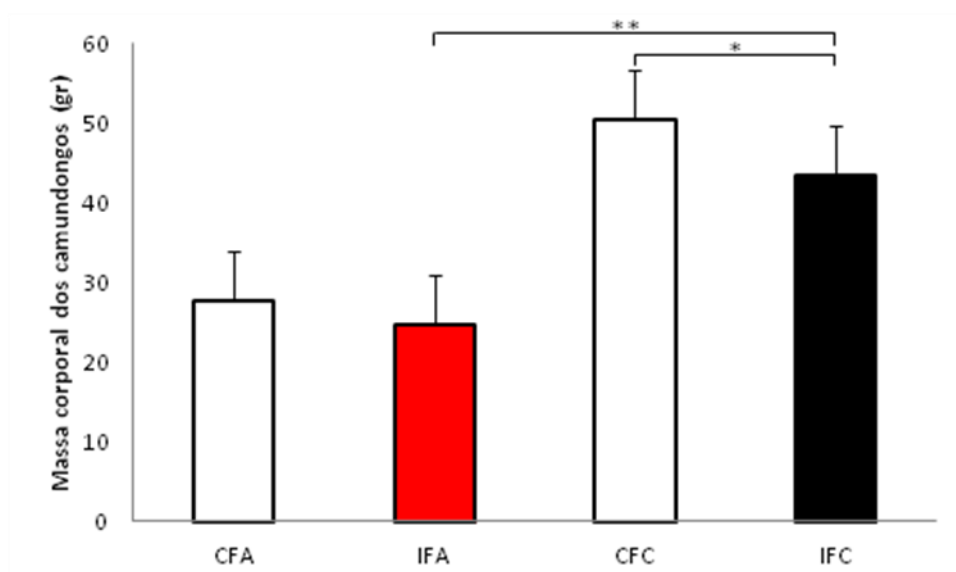


FIGURA 8: Massa corporal dos camundongos (gr): camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.4. Comprimento longitudinal do cólon

O grupo infectado de fase crônica (IFC) apresentou maior comprimento longitudinal do cólon em relação ao seu controle (CFC) ($p^* = 0,0014$; EPM = 0,4240) e em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) ($p^{**} = 0,0006$; EPM = 0,3672). Não houve diferença significativa em relação ao comprimento longitudinal do cólon quando foram comparados os grupos: controle de fase aguda (CFA) com o grupo infectado de fase aguda (IFA), e entre os grupos controles (CFA e CFC) (figura 9). Análise estatística ANOVA one-way.

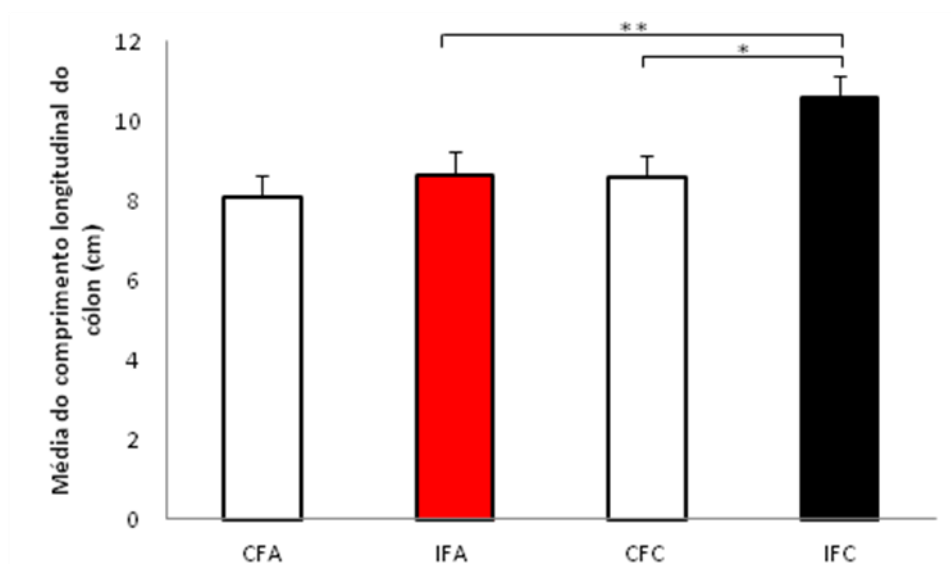


FIGURA 9: Média do comprimento longitudinal do cólon (cm): camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.



FIGURA 10: Fotografia representativa da medida de comprimento longitudinal (cm) do cólon de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase crônica da doença (15 meses após infecção).

4.5. Avaliação histopatológica

4.5.1. Fase aguda

O grupo CFA, representado por camundongos com idade pareada ao grupo IFA, apresentou celularidade e espessura normais, sem alterações evidentes (Figura 11 A).

Ao comparar os grupos de fase aguda, nota-se que o grupo infectado (IFA) apresentou camada mucosa descontínua, caracterizando descamação do epitélio por necrose ou apoptose, o que acarretou na diminuição da espessura desta camada. Há ainda aumento da celularidade da lâmina própria, presença de figuras de mitose e aspecto de ativação das células da cripta, além de aparente diminuição do tamanho e/ou do número de células caliciformes (Figura 11 C).

Observa-se no grupo IFA parasitismo discreto a intenso, com ninhos de amastigotas em toda extensão das camadas musculares, principalmente nas regiões próximas a vasos da camada submucosa. Ressalta-se a presença de ninhos no interior e ao redor do plexo mientérico (Figura 11 A), muitas vezes em associação com neurônios aparentemente íntegros e sem sinais de necrose, todavia com alterações do aspecto do citoplasma e núcleo sugestivos de degeneração neuronal, sendo estes achados também corroborados pela análise dos neurônios à ME (figura 45 A). O infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear e mais intenso nas camadas muscular e submucosa (Figura 11 C).

Na fase aguda, os infiltrados inflamatórios foram encontrados focalmente na camada muscular em toda extensão do cólon, formando feixes que se dispõem entre as fibras musculares. Essas fibras apresentam necrose isolada ou em pequenos grupos (Figura 11 C), evidenciada na maior densidade de fibras reticulares, devido ao colapamento dessa trama nas áreas de perda muscular, em geral associadas a áreas de substituição por tecido de granulação.

Foi observado também infiltrado inflamatório entre as camadas muscular interna e externa e ao redor da cápsula dos gânglios mientéricos. Ademais, na camada muscular externa havia áreas na qual o intenso infiltrado inflamatório interrompia a integridade das fibras musculares, restando poucas fibras entremeadas por tecido conjuntivo espesso (Figura 30 A) e vasos congestos.

4.5.2. Fase crônica

Os animais controle de fase crônica (CFC) apresentaram camada mucosa discretamente atrofiada em relação ao controle de fase aguda (CFA), sem outras alterações evidentes (Figura 11 A, B). Porém, o grupo infectado de fase crônica (IFC) apresentou mucosa com aspecto normal, bastante preservada e espessada em relação ao controle de fase crônica (CFC) (Figura 11 D).

Alguns animais do grupo IFC (2 animais) apresentaram parasitismo discreto (Figura 13 B), enquanto que em outros não foram observados ninhos ou formas amastigotas livres. Não foram encontrados parasitos no plexo mientérico nas amostras analisadas. Focos de infiltrado inflamatório estavam presentes ao redor de alguns gânglios mioentéricos.

O infiltrado inflamatório da camada submucosa do grupo IFC variou de discreto à moderado (Figura 11 D), sendo sobretudo perivascular, com predomínio de células mononucleares na sua maioria linfócitos e macrófagos residuais. Houve aumento da espessura da parede dos vasos e hipertrofia do endotélio sem sinais de congestão, o que sugere vasculite crônica. Houve espessamento da camada submucosa, devido ao aumento da celularidade e do tecido conjuntivo.

Na camada muscular, os infiltrados inflamatórios foram, na maioria dos casos, focais, especialmente cruzando a camada muscular interna (Figura 11 D), entre as camadas musculares interna e externa e nas áreas de substituição por fibrose. Houve hipertrofia das células musculares lisas comprovada por morfometria (Figura 17 B) e deposição de tecido conjuntivo ao redor das fibras musculares (Figura 30 B). Todavia o padrão das fibras reticulares foi similar ao do grupo controle.

FIGURA 11: Avaliação histopatológica das fases aguda e crônica da Doença de Chagas em camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A e C representam aspectos da fase aguda (11 d.p.i.). B e D representam aspectos da fase crônica (15 m.p.i.). O cólon de animais dos grupos controle de fase aguda (CFA) (A) e controle de fase crônica (CFC) (B) apresentaram celularidade e espessura normais.

(C) Nos animais infectados de fase aguda (IFA), infiltrado inflamatório mononuclear foi observado nas camadas submucosa e muscular (seta espessa). No plexo mioentérico (cabeça de seta) e na camada muscular interna, houve evidência de necrose de fibra muscular (seta fina). Esse padrão transmural de acometimento foi intercalado com áreas não inflamadas (não demonstrado). (D) No grupo infectado de fase crônica (IFC), infiltrado mononuclear foi focal e mais intenso na camada muscular externa nas regiões periganglionares e perivascularres (seta). Os resultados representam dois experimentos independentes. A, B, C e D com aumento da objetiva de 20x e técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de escala corresponde a 20 µm.

4.6. Parasitismo tecidual

Houve menor imunomarcção anti-*T. cruzi* no cólon dos camundongos do grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado com o grupo infectado de fase aguda (IFA) ($p = 0,018$; EPM = 0,3753) (figura 12).

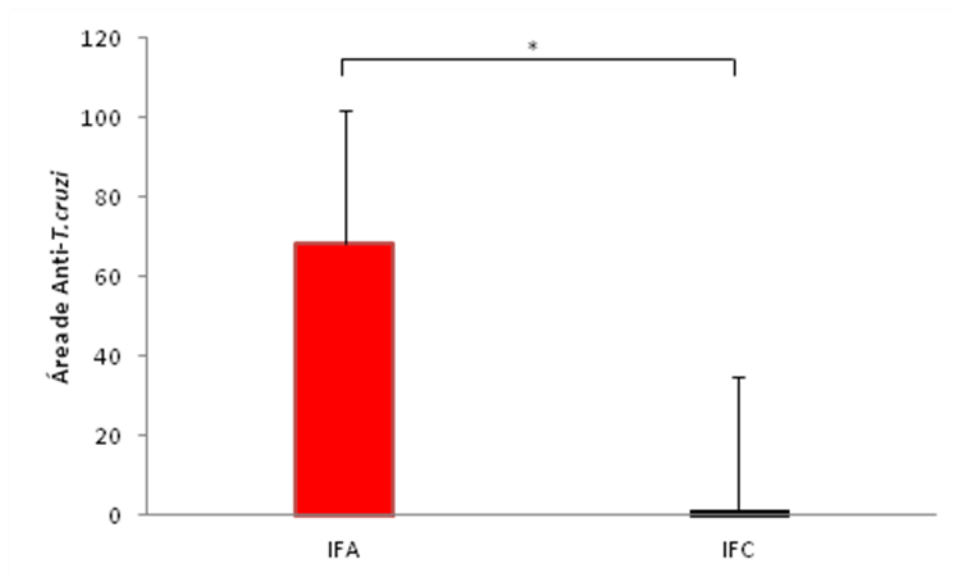


FIGURA 12: Área imunomarcada por anti-*T. cruzi*: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados os grupos infectados de fase aguda (n=10) e de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

FIGURA 13: Parasitismo tecidual em camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y. (A) e inserto de (A) Infectado de fase aguda (IFA) com intensa imunomarcção para *T. cruzi*, tanto de formas isoladas como de ninhos de amastigotas (setas pretas). (B) Infectado de fase crônica (IFC) com diminuição importante da imunomarcção. Os resultados representam dois experimentos independentes. A e B com aumento da objetiva de 10x e insertos com aumento de objetiva de 20x. Técnica imunohistoquímica para anti-*T. cruzi*.

4.7. Concentração de anticorpo IgG anti-*T. cruzi* por ELISA

Observamos positividade para a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* nos animais infectados de fase crônica (IFC), o que confirma a infecção mesmo após 15 meses do início do experimento (Figura 14).

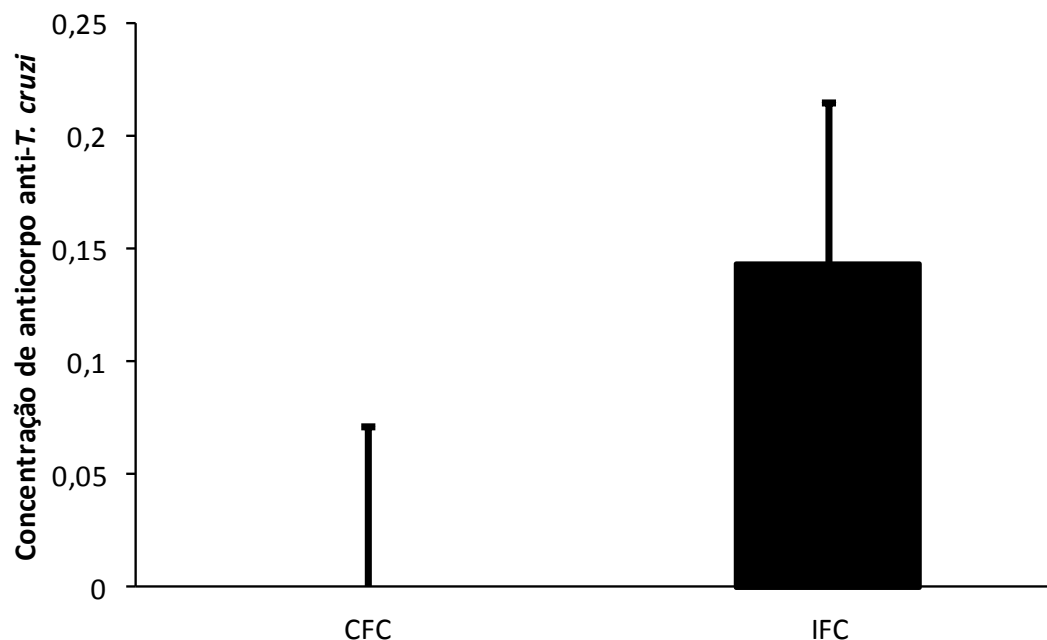


FIGURA 14: Concentração de anticorpo IgG anti-*T. cruzi* detectados por ELISA em camundongos Swiss infectados com *T. cruzi* na fase crônica (IFC) (n=6) e seu grupo controle (CFC) (n=10), confirmando a infecção mesmo após 15 meses pós tratamento.

4.8. Celularidade tecidual

Observou-se maior número de células na camada muscular interna do cólon de camundongos do grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,001; EPM = 4,02) quando comparados ao seu controle (CFA) (figura 15), o que reflete a presença de intenso infiltrado inflamatório durante essa fase da doença.

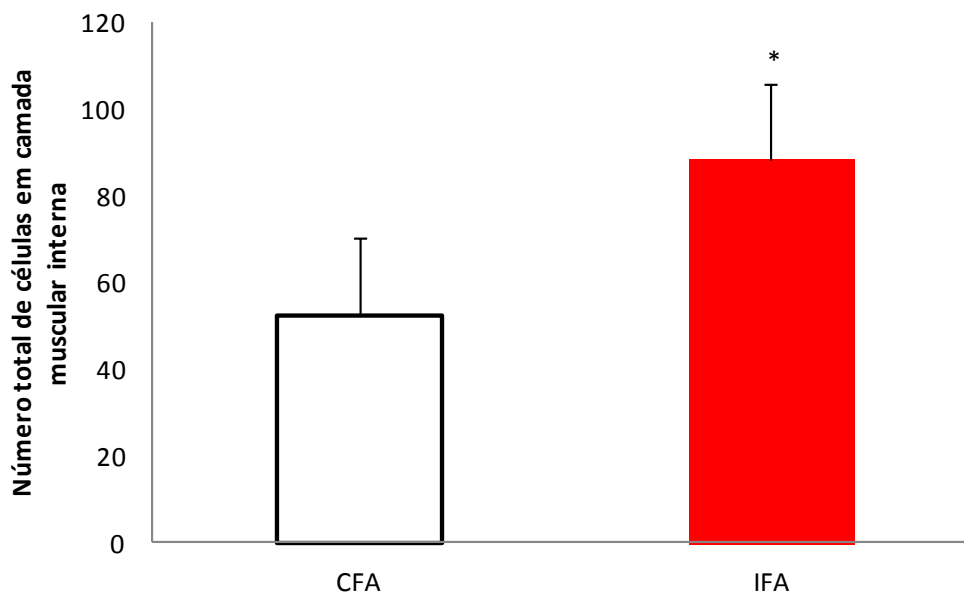


FIGURA 15: Número total de células na camada muscular interna do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, sendo avaliados 2 grupos: controle de fase aguda (n=5) e infectado de fase aguda (n=10). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística Teste T de Student.

4.9. Hipertrofia das células musculares lisas

O grupo de camundongos infectados de fase crônica (IFC) apresentou maior área ocupada (aumento de 51,86%) por células musculares lisas da camada muscular circular interna do cólon, em relação ao número total de células, quando comparado com seu grupo controle (CFC) (*p = 0,0001; EPM = 44,6) (figuras 16, 17A e 17B).

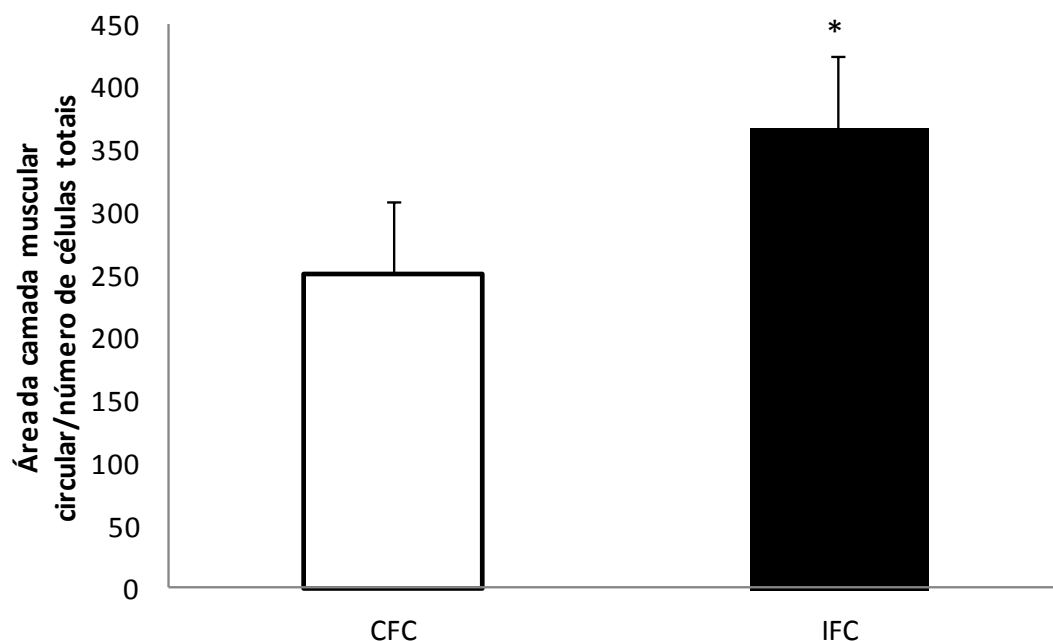


FIGURA 16: Área da camada muscular interna do cólon em comparação ao número total de células: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 2 grupos: controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

Figura 17: Hipertrofia em colons de camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, evidenciando maior volume das células musculares no grupo infectado de fase crônica (IFC) (seta preta) (B) quando comparado ao seu grupo controle pareado (CFC) (A). Os resultados representam dois experimentos independentes. A e B com aumento da objetiva de 10x e insertos com aumento de objetiva de 20x. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina.

4.10. Inervação do plexo mioentérico

4.10.1. Área imunomarcada para PGP 9.5

Houve menor imunomarcção para PGP 9.5 no plexo mioentérico no cólon do grupo infectado de fase aguda (IFA) em comparação com seu grupo controle (CFA) (* $p = 0,0001$; EPM = 0,06406) (Figura 18,*). Além disso, observou-se também menor marcação no grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado a seu grupo controle pareado (CFC) (** $p = 0,0001$; EPM = 0,06406) (Figura 18, **).

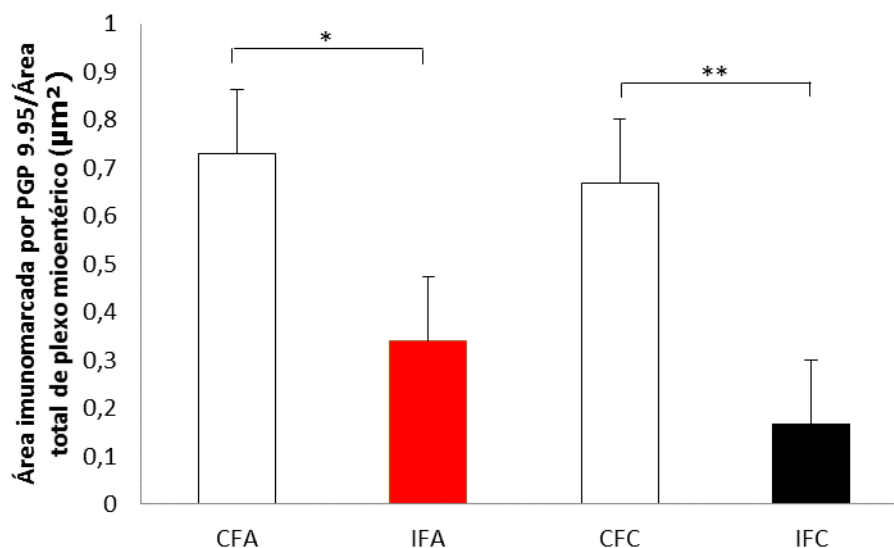


FIGURA 18: Área imunomarcada para PGP 9.5 no plexo mioentérico: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.10.2. Número de neurônios imunomarcados para PGP 9.5

Notou-se menor número de neurônios imunomarcados no plexo mioentérico para PGP 9.5 no grupo infectado de fase aguda (IFA) em comparação a seu grupo controle (CFA) (*p = 0,0001; EPM = 0,000215) (Figura 19,*). Observou-se ainda menor número de neurônios no grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado a seu grupo controle pareado (CFC) (**p = 0,0001; EPM = 0,000215) (Figura 19, **).

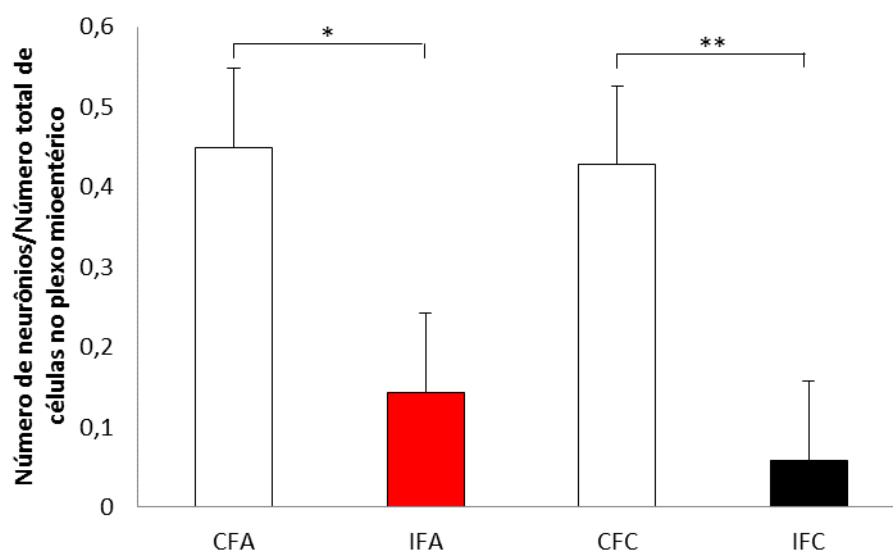


FIGURA 19: Número de neurônios imunomarcados para PGP 9.5 no plexo mioentérico: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.11. Inervação intramuscular

Notou-se menor imunomarcação para PGP 9.5 de fibras nervosas na camada muscular interna no cólon do grupo infectado de fase aguda (IFA) em comparação com seu grupo controle (CFA) (*p = 0,0001; EPM = 0,1917) (Figura 20,*). Além disso, observou-se menor marcação de fibras nervosas no grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado a grupo infectado de fase aguda (IFA) (**p = 0,0001; EPM = 0,1917) (Figura 20, **, e 21).

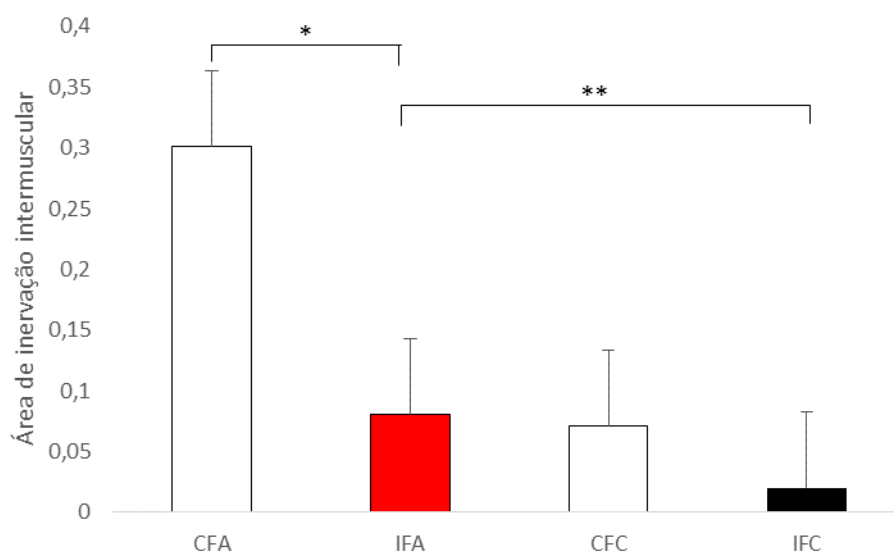


FIGURA 20: Imunomarcação para PGP 9.5 intramuscular: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

Figura 21. Inervação do cólon em camundongos Swiss controles e infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. (B) O plexo mioentérico no grupo infectado de fase crônica (IFC) apresentou menor imunomarcção para PGP 9.5, tanto quando na análise de área marcada por PGP 9.5 em relação a área total do plexo como na análise de neurônios imunomarcados para PGP 9.5 em relação ao número total de células do gânglio, quando comparado a seu grupo controle (CFC) (A). Além disso, no grupo infectado de fase crônica (IFC) (D), houve diminuição da inervação intramuscular comparado ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (C) (setas no inserto). Os resultados representam dois experimentos independentes. A e B Aumento da objetiva de 40× e barra de escala representa 10 µm; C e D Aumento da objetiva de 20x e barra de escala representa 20 µm. Técnica de imunohistoquímica para anti-PGP 9.5.

4.12. Tipagem de células imunes

4.12.1 Células CD3+

Houve maior número de células CD3+ em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon no grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado com seu controle (CFC) (**p = 0,0264) e em comparação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,0247) (Figura 22). Não houve diferença significativa entre os grupos controle de fase aguda (CFA) e infectado de fase aguda (IFA), e entre os grupos controles (CFA e CFC) (Figura 22).

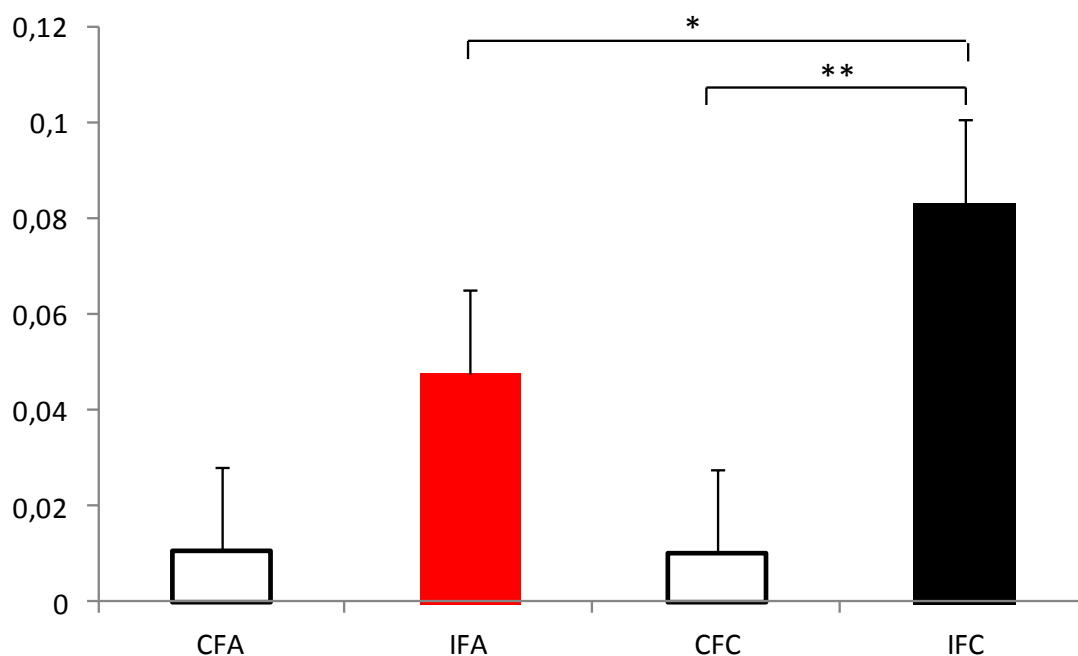


FIGURA 22: Número de células CD3+ imuno-marcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística Kruskal Wallis.

4.12.2. Células CD4+

Observou-se maior no número de células CD4+ em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon, tanto no grupo infectado de fase aguda (IFA) quando comparado ao seu controle (CFA) (*p = 0,05), como no grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado ao seu controle (CFC) (**p = 0,019) (Figuras 23 e 27). Não foram observadas diferenças significativas no número de células CD4+ quando comparados os grupos controles entre si (CFA e CFC) e infectados entre si (IFA e IFC) (Figura 23).

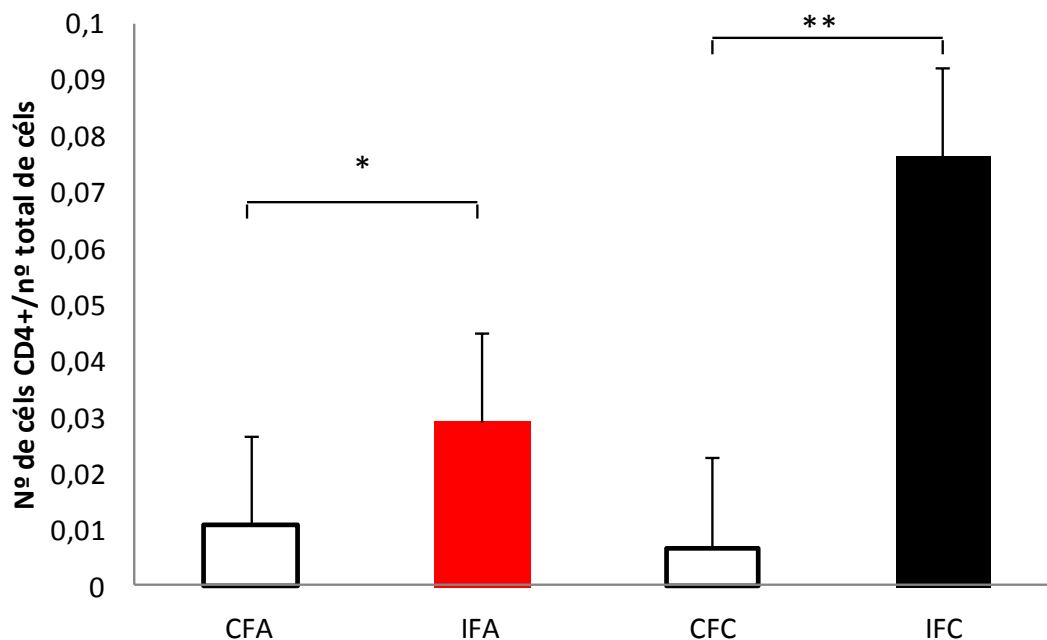


FIGURA 23: Número de células CD4+ imunomarcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística Kruskal Wallis.

4.12.3. Células CD8+

Observou-se maior número de células CD8+ em relação ao número total de células da submucosa do cólon no grupo de camundongos infectados de fase crônica (IFC), quando comparado ao seu controle (CFC) (** $p = 0,034$), e em comparação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (* $p = 0,014$) (Figuras 24 e 27). Não houve diferença significativa entre os grupos controles (CFA e CFC) (figura 24).

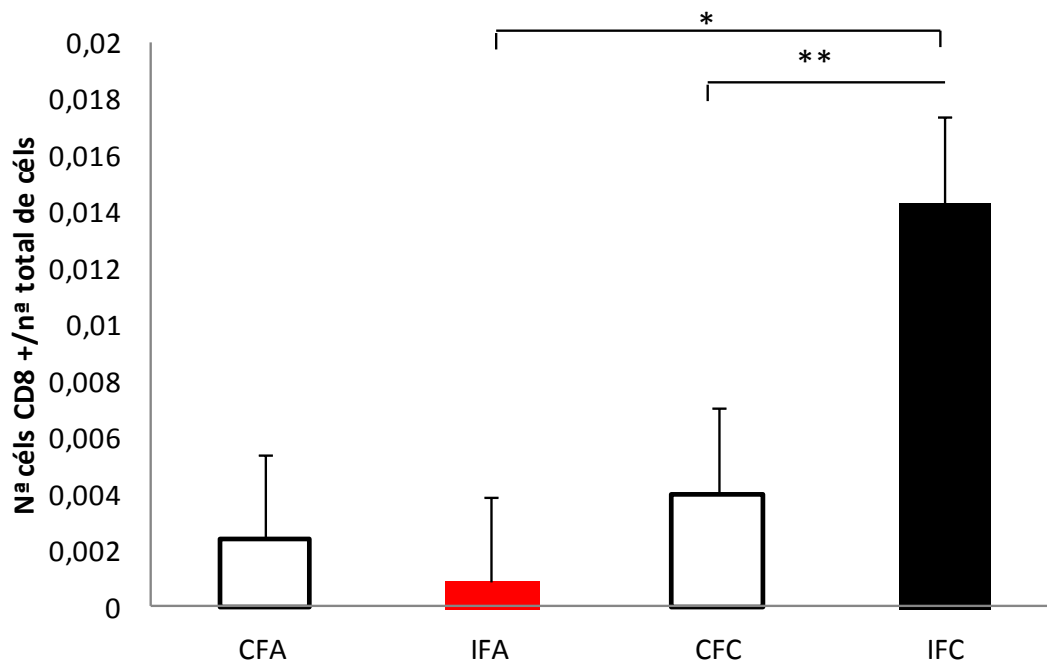


FIGURA 24: Número de células CD8+ imunomarcadas em relação ao número total de células da submucosa do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística Kruskal Wallis.

4.12.4. Células CD20+

Houve maior número de células CD20+ em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon no grupo infectado de fase crônica (IFC) em comparação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,009) (Figuras 25 e 27). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos infectados de fase aguda (IFA) ou crônica (IFC) com seus controles (CFA e CFC, respectivamente). Da mesma forma, não houve diferença significativa no número de células CD20+ quando comparados os grupos controles de fase aguda (CFA) e de fase crônica (CFC) (Figura 25).

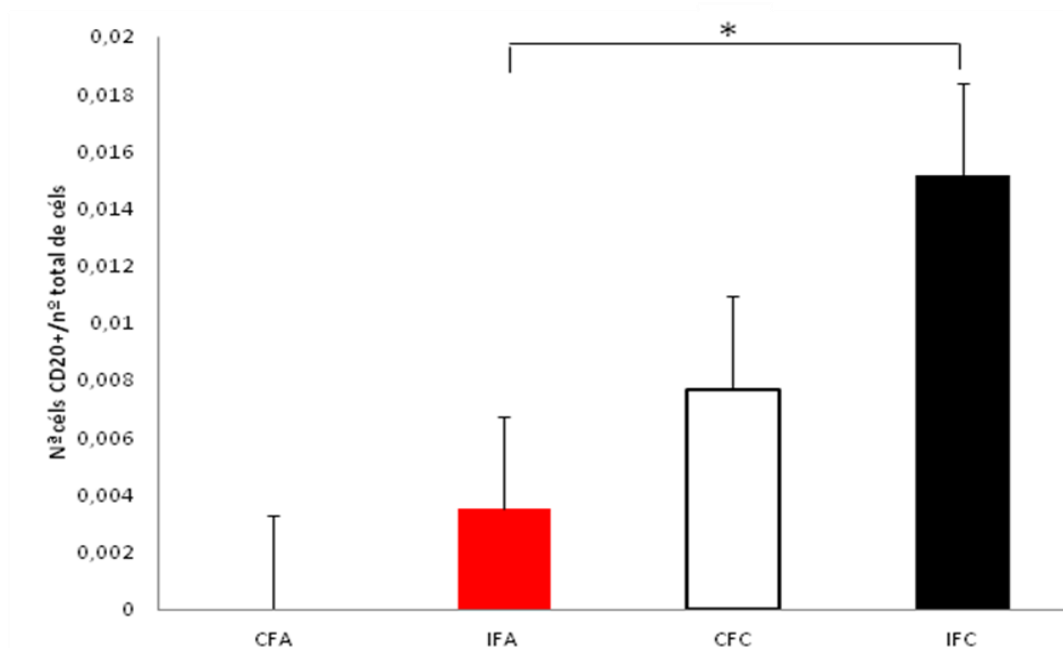


FIGURA 25: Número de células CD20+ imunomarcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística Kruskal Wallis.

4.12.5. Células CD68+

A análise da imunomarcção para CD68+ em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon de camundongos dos grupos controle e infectado com a cepa do *T. cruzi*, durante as fases aguda (CFA e IFA) e crônica (CFC e IFC), não detectou diferença significativa entre nenhum dos grupos avaliados, porém houve tendência de maior marcação do grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (Figura 26).

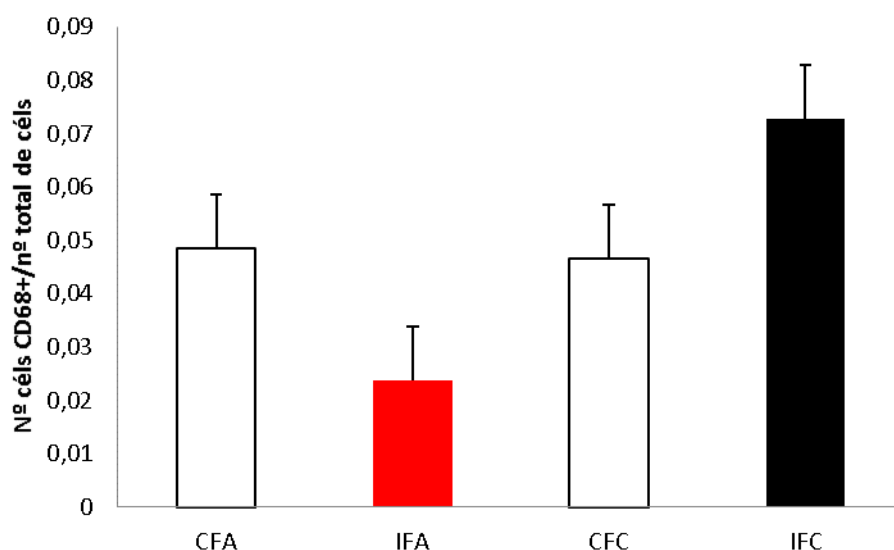


FIGURA 26: Número de células CD68+ imunomarcadas em relação ao número total de células da camada submucosa do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística Kruskal Wallis.

FIGURA 27: Perfil de células inflamatórias (células CD4+, CD8+ e CD20+) na camada submucosa em cólons de camundongos *Swiss* infectados com 50.000 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. O cólon do grupo controle de animais com idade pareada na fase aguda (CFA) (A) apresentou menor número de células CD4+ imunomarcadas quando comparado ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (B). Os animais do grupo infectado de fase crônica (IFC) apresentaram maior marcação para células CD8+ (D) e CD20+ (F) quando comparados aos do grupo infectado de fase aguda (IFA) (C e E, respectivamente). Os resultados representam dois experimentos independentes. A, B, C, D, E e F são imagens representativas com aumento da objetiva de 40x e técnica imuno-histoquímica. A e B, anti-CD4+. C e D, anti-CD8+. E e F, anti-CD20+.

4.13. Espessura da parede muscular do cólon

Detectamos maior espessura total da parede do cólon de camundongos do grupo infectado de fase crônica (IFC) tanto em relação a seu controle (CFC) (*p = 0,0088; EPM = -260,6) quanto em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (**p = 0,0040; EPM = -247,3) (Figura 28).

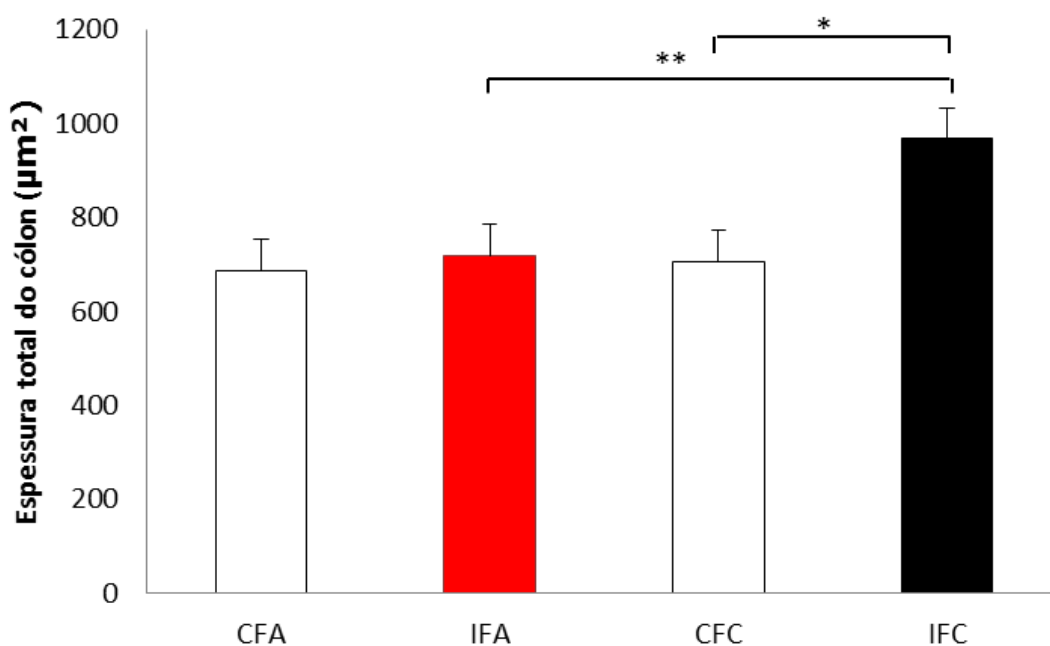


FIGURA 28: Espessura total do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.14. Tecido conjuntivo

Durante a fase crônica da DC observou-se maior área ocupada por tecido conjuntivo na camada muscular interna no cólon de camundongos *Swiss* do grupo infectado (IFC) em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,018; EPM = -174,7) (Figura 29).

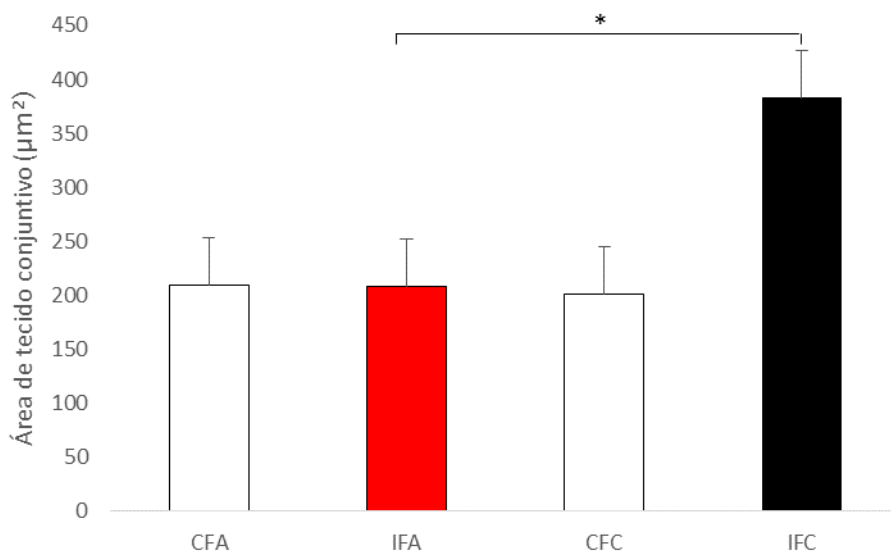


FIGURA 29: Área ocupada por tecido conjuntivo na camada muscular interna do cólon: camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

FIGURA 30. Fibrose no cólon de camundongos *Swiss* de fase crônica da infecção com 50.000 formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. A quantidade de fibras colágenas localizadas entre as fibras musculares aumentou no grupo infectado de fase crônica (IFC) (B) comparado ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (A). Os resultados representam dois experimentos independentes. A e B Aumento da objetiva de 20×. Coloração Tricrômico de Gomori.

4.15. Fibra reticular

Durante a fase aguda da DC observou-se maior área ocupada por fibras reticulares na camada muscular interna no cólon de camundongos Swiss do grupo infectado (IFA) em relação a seu controle (CFA) (*p = 0,0115; EPM = -934,6) (Figura 31).

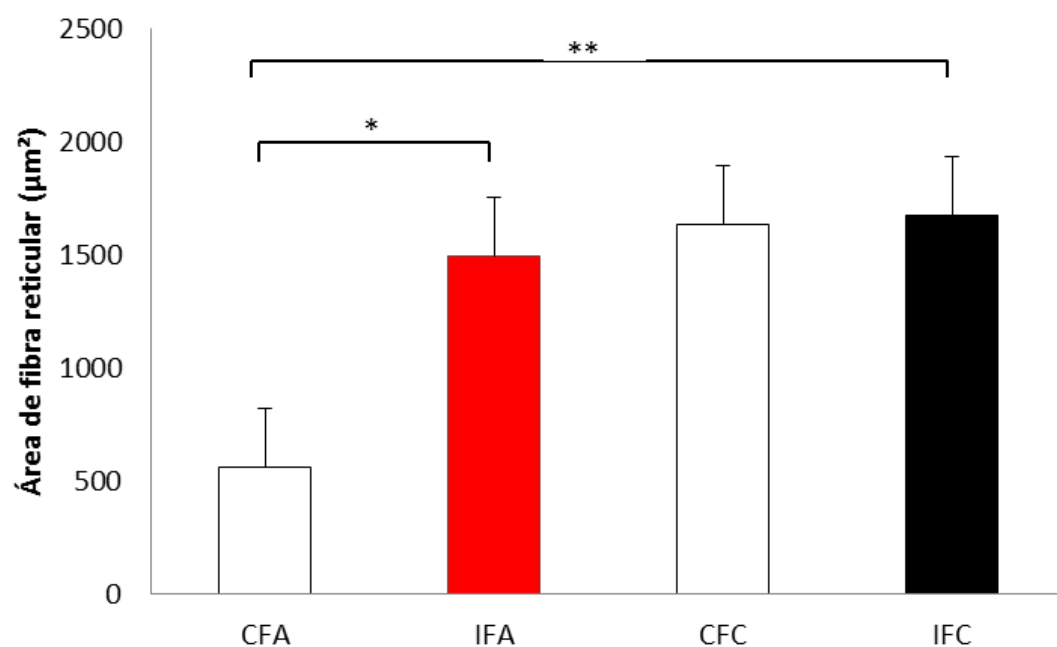


FIGURA 31: Área ocupada por fibras reticulares na camada muscular interna no cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.16. GAP 43

Foi observada a área imunomarcada por GAP43 no plexo mioentérico do cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica (Figura 32). Observou-se menor área ocupada por células GAP 43 no grupo infectado de fase aguda (IFA) em relação a seu controle (CFA) (*, $p = 0,0001$; EPM = 0,02596) (Figura 32,*). Notou-se ainda que o grupo infectado de fase aguda (IFA) apresenta maior imunomarcção em relação ao infectado de fase crônica (IFC) (**, $p = 0,0001$; EPM = 0,02596) (Figura 32, **). Finalmente, foi demonstrado que o grupo infectado de fase crônica (IFC) apresentou menor marcação que seu grupo controle pareado (CFC) (***, $p = 0,0001$; EPM = 0,02596) (Figura 32, ***).

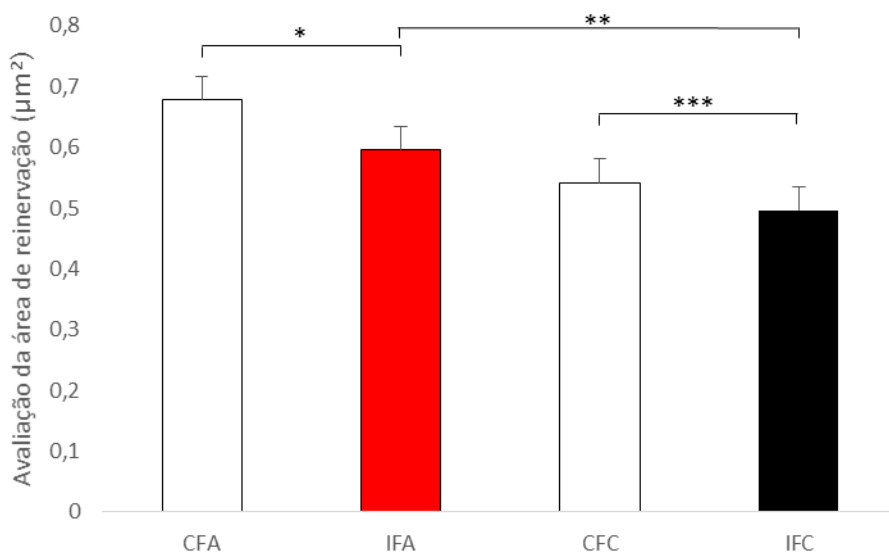


FIGURA 32: Área ocupada por GAP43 no plexo mioentérico do cólon: camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.17. Dosagem de citocinas inflamatórias

4.17.1. IL-6

A análise da dosagem da citocina IL-6 em cólon de camundongos dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda (CFA e IFA) e crônica (CFC e IFC), não detectou diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 33).

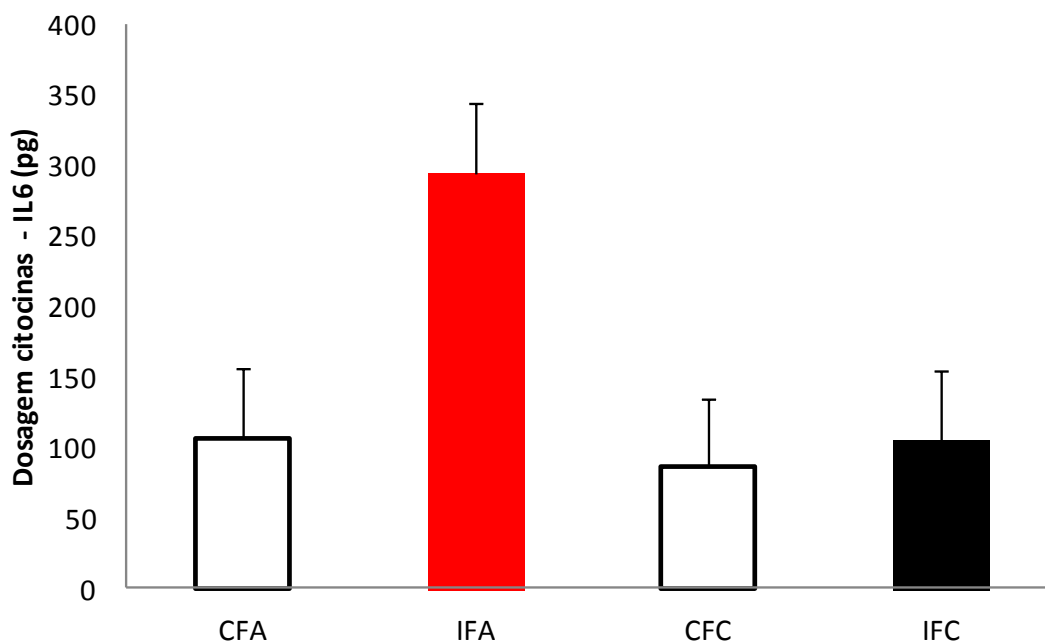


FIGURA 33: Dosagem de IL-6 em cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.17.2. TNF- α

Foi dosada a quantidade da citocina TNF- α em cólon de camundongos Swiss dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda e crônica da infecção (Figura 34). Observou-se menor quantidade da citocina TNF- α no grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,0459; EPM = 675,8) (Figura 34, *).

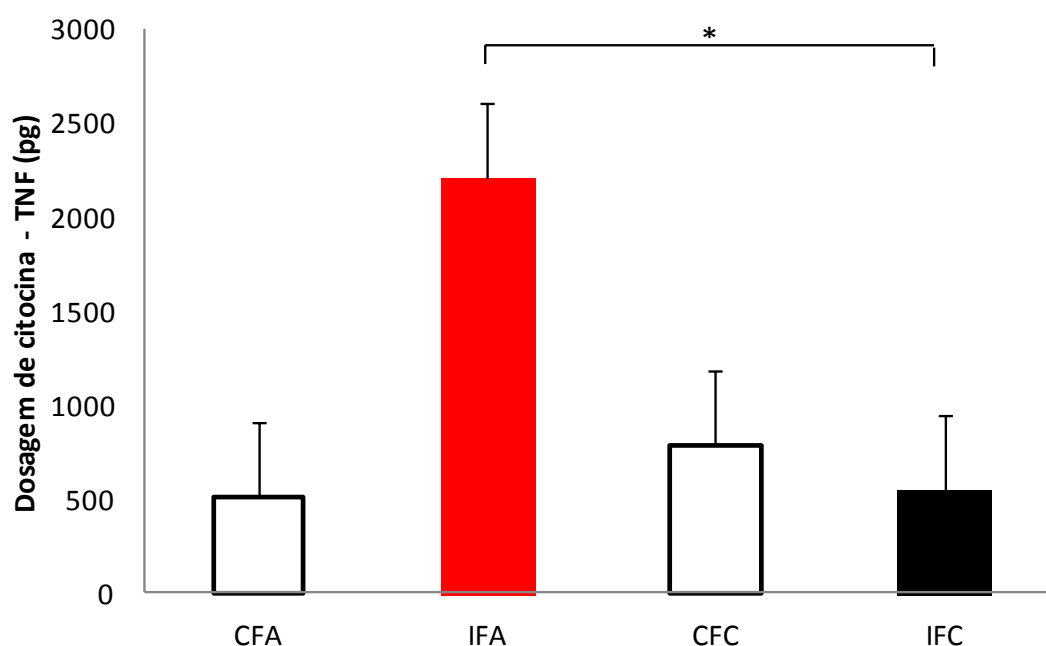


FIGURA 34: Dosagem de TNF- α em cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.17.3. TGF- β

A dosagem da citocina TGF- β em cólon de camundongos Swiss dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica, mostrou menor quantidade no grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,0050; EPM = 483,0) (Figura 35, *).

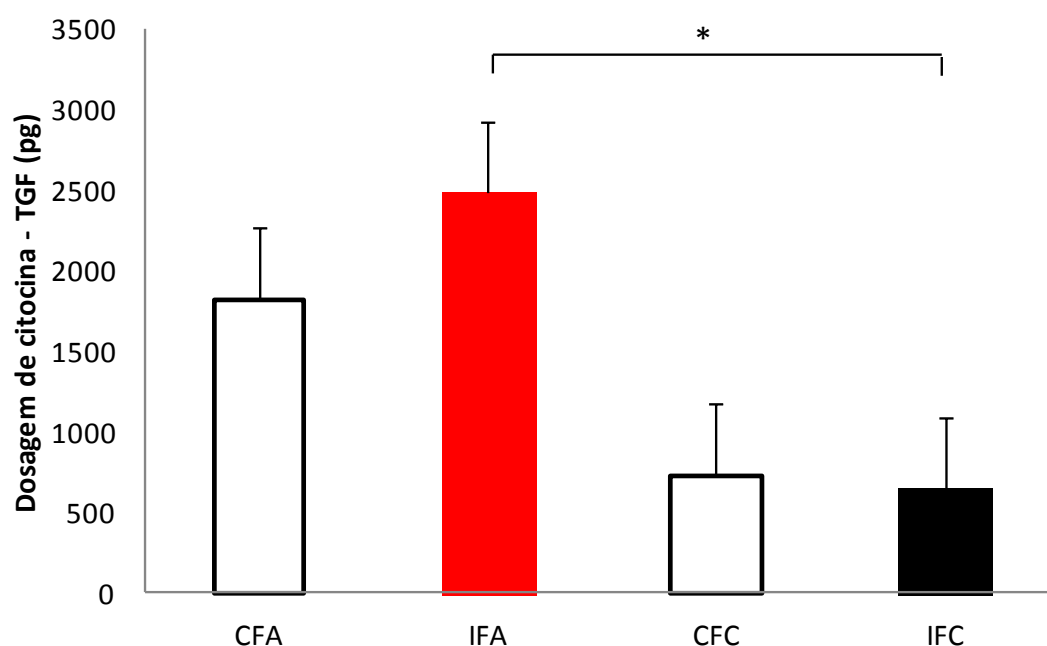


FIGURA 35: Dosagem de TGF- β em cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.17.4. IFN- γ

A dosagem da citocina IFN- γ em cólon de camundongos Swiss dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica, mostrou menor quantidade no grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,0244; EPM = 275,8) (Figura 36, *).

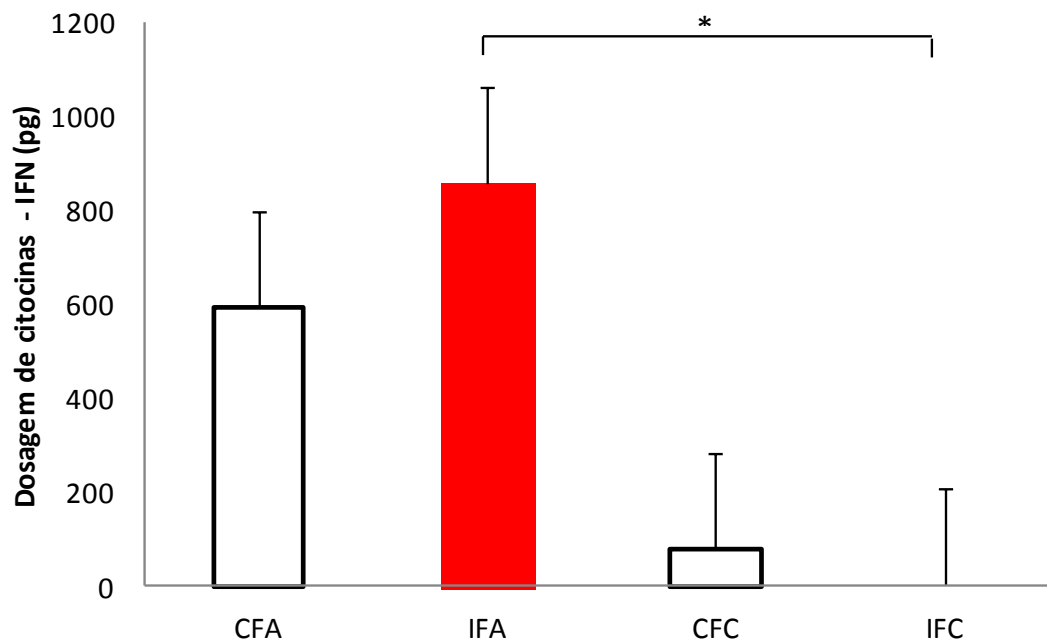


FIGURA 36: Dosagem de IFN- γ em cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.17.5. IL-10

A dosagem da citocina IL-10 em cólon de camundongos *Swiss* dos grupos controle e infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante a fase crônica da doença, não mostrou diferença significativa entre eles, apesar de haver tendência de maior quantidade no grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação ao seu grupo controle pareado (CFC) ($p=0,983$) (Figura 37).

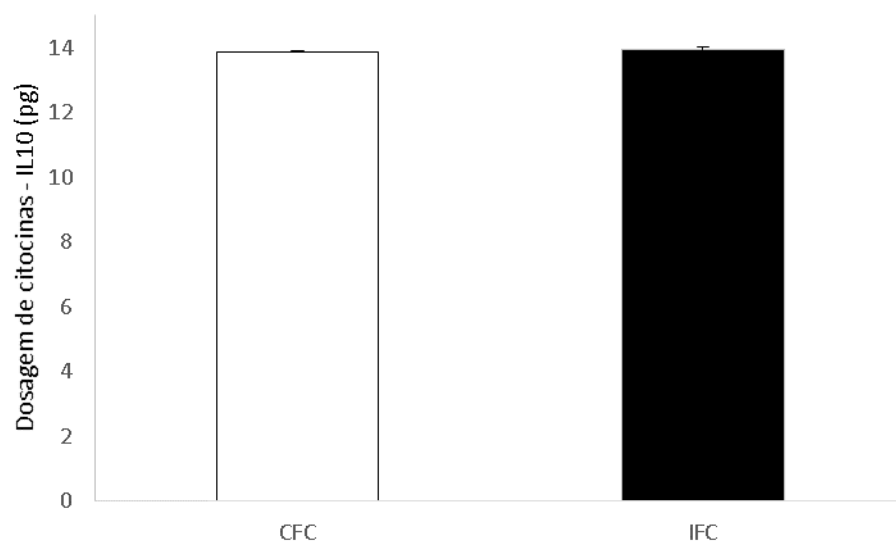


FIGURA 37: Dosagem de IL-10 em cólon: camundongos *Swiss* infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística Teste T two-sample.

4.18. CGRP

Houve menor área imunomarcada para CGRP no plexo mioentérico do cólon de camundongos, em relação à área total do plexo, no grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado com seu grupo controle pareado (CFC) (*p = 0,042; EPM = 0,06114). Não houve diferença significativa ao compararmos o grupo controle de fase aguda (CFA) com o infectado de fase aguda (IFA), e nem mesmo entre os grupos controles (CFA e CFC) (Figura 38).

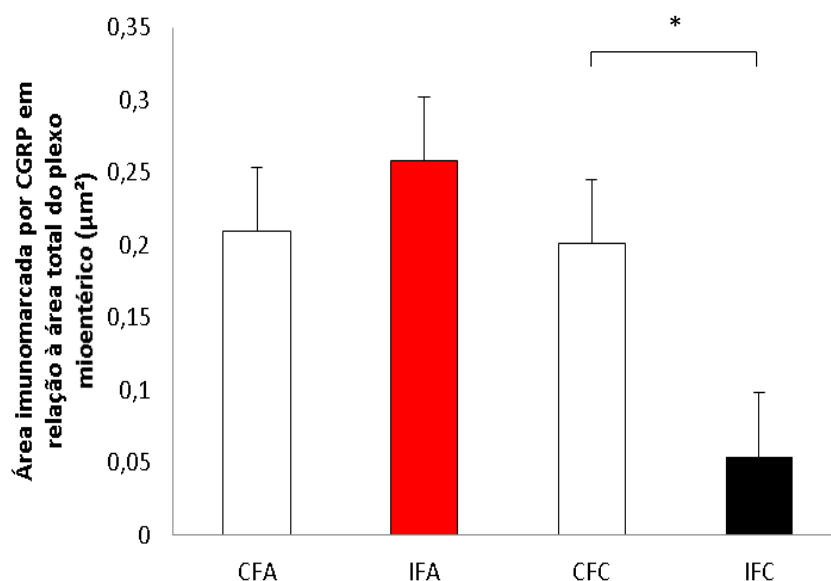


FIGURA 38: Avaliação da área imunomarcada por CGRP no plexo mioentérico do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.19. nNOS

Houve maior área imunomarcada para nNOS no plexo mioentérico do cólon de camundongos, em relação à área total do plexo, no grupo infectado de fase crônica (IFC) quando comparado com o grupo infectado de fase aguda (IFA) (*p = 0,0004; EPM = 0,007520). Além disso, a marcação no IFC foi maior em relação a seu grupo controle (CFC) (**p = 0,0087; EPM = 0,007520). Não houve diferença estatisticamente significativa ao compararmos o grupo controle de fase aguda (CFA) com o infectado de fase aguda (IFA), e nem mesmo entre os grupos controles (CFA e CFC) (Figura 39).

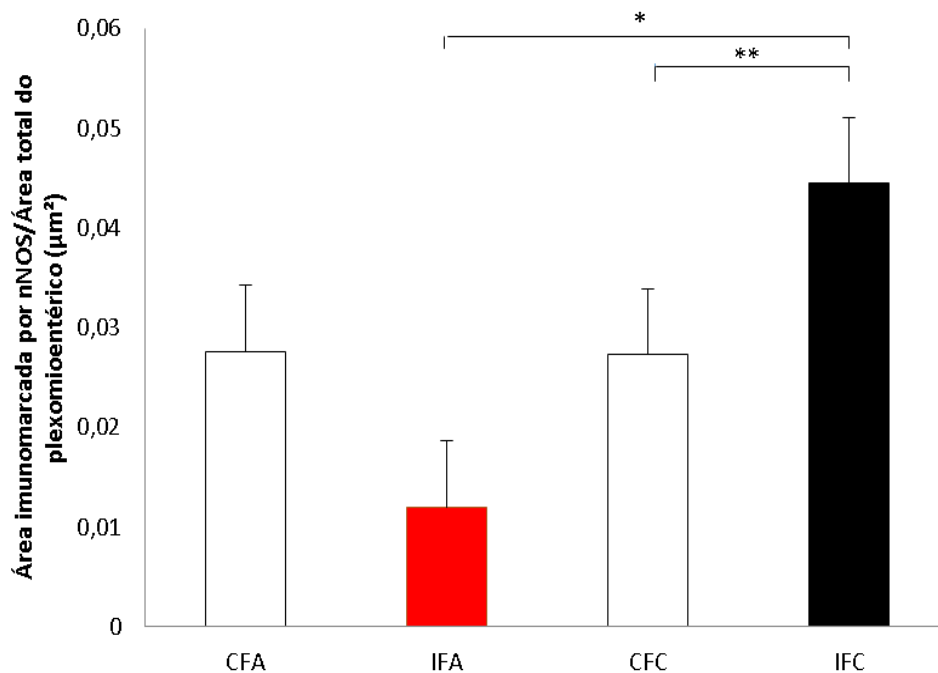


FIGURA 39: Avaliação da área imunomarcada por nNOS no plexo mioentérico do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.20. Sinaptotagmina I/II

A área imunomarcada para sinaptotagmina I/II no plexo mioentérico do cólon de camundongos foi menor, em relação à área total do plexo, no grupo infectado de fase aguda (IFA) quando comparado com o grupo infectado de fase crônica (IFC) (*p = 0,0166; EPM = 0,001624). Não houve diferença significativa ao compararmos o grupos controle (CFA e CFC) com os respectivos infectados (IFA e IFC), e nem mesmo entre os grupos controles (CFA e CFC) (Figura 41).

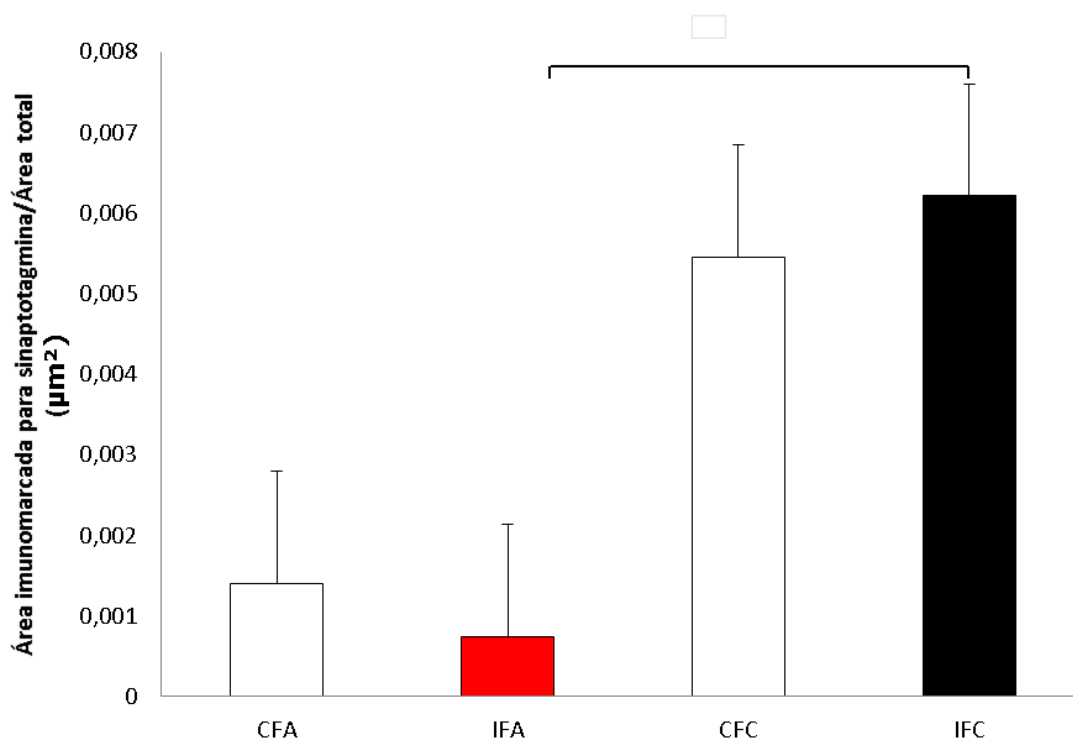


FIGURA 41: Avaliação da área imunomarcada por sinaptotagmina I/II no plexo mioentérico do cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

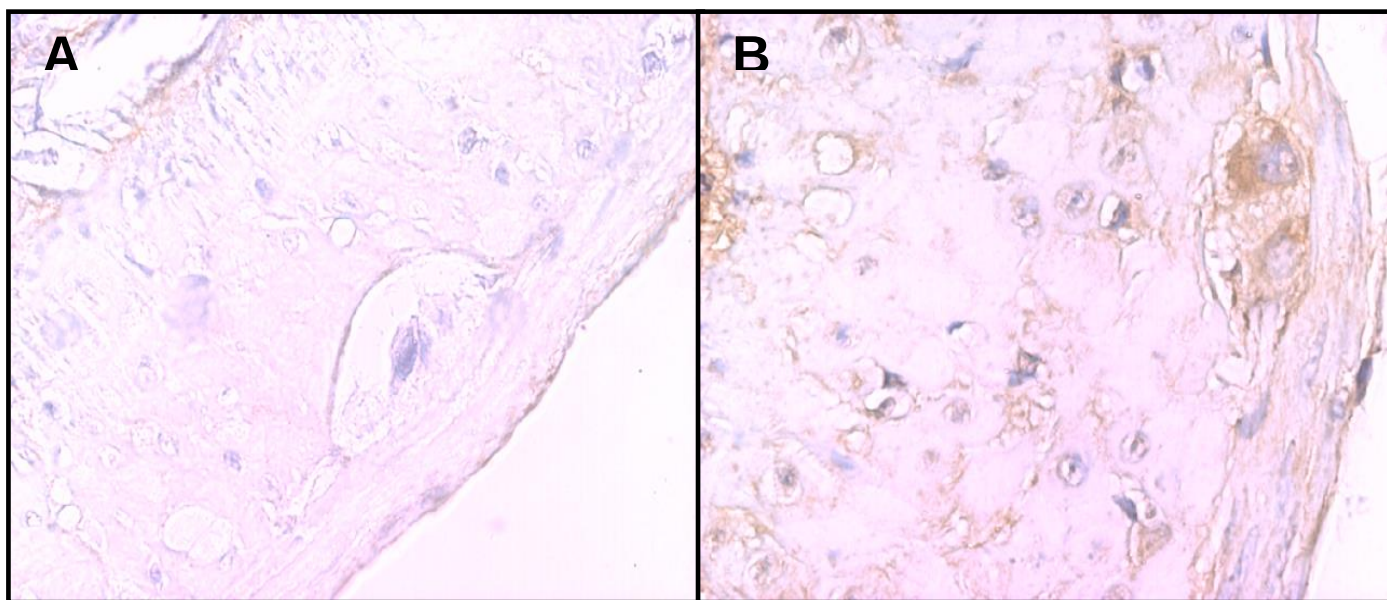


Figura 42: Aumento de sinaptotagmina I/II em animais infectados de fase crônica. Animais infectados de fase crônica (IFC) apresentaram aumento na imunomarcacão para sinaptotagmina I/II (B) quando comparado com o grupo infectado de fase aguda (IFA) (A). Os resultados representam dois experimentos independentes. A e B são imagens representativas com objetiva de 40x e técnica imuno-histoquímica anti-sinaptotagmina I/II.

4.21. Alfa actina de músculo liso (α -actina)

A análise da imunomarcção para alfa actina de músculo liso na camada muscular interna do cólon de camundongos dos grupos controle e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, durante as fases aguda (CFA e IFA) e crônica (CFC e IFC), não detectou diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 43).

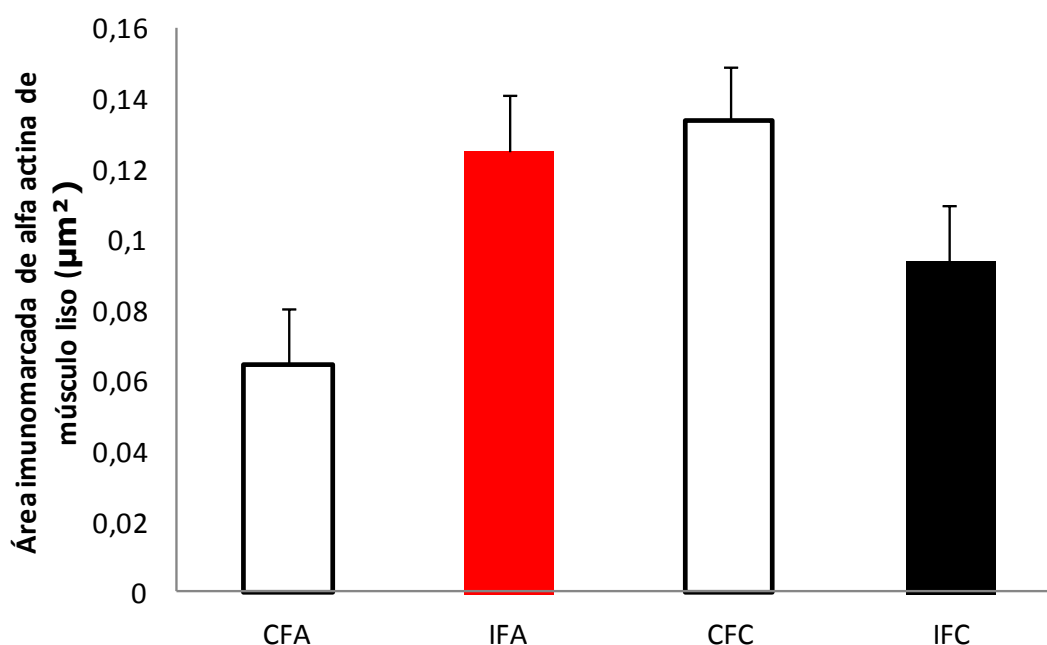


FIGURA 43: Área imunomarcada de alfa actina de músculo liso em cólon: camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benzonidazol com dose única de 500 mg/kg de peso corporal, sendo avaliados 4 grupos: controle de fase aguda (n=5), infectado de fase aguda (n=10), controle de fase crônica (n=5) e infectado de fase crônica (n=6). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Análise estatística ANOVA one-way.

4.22. Microscopia Eletrônica

4.22.1. Fase aguda

Ao avaliar o cólon de camundongos dos grupos controle e infectado por cepa Y de *T. cruzi*, tanto de fase aguda (11 d.p.i.) como de fase crônica (15 m.p.i.) da Doença de Chagas, por meio de análise ultraestrutural (Microscopia Eletrônica), obtivemos os achados abaixo:

Quando avaliadas as células neuronais do plexo mioentérico, nos animais do grupo controle de fase aguda (CFA), foi observada quantidade discreta de inclusões lipídicas do metabolismo, com padrão regular/homogêneo, no citoplasma dos neurônios. Observou-se ainda preservação do perfil nuclear neuronal e citosol com aspecto claro (Figuras 44 A e B). Em contrapartida, nos animais do grupo controle de fase crônica (CFC), houve aumento tanto da quantidade como do tamanho das inclusões lipídicas intracitoplasmáticas. Além disso, essas inclusões se apresentaram com aspecto irregular/heterogêneo (Figuras 44 C e D). Em ambos os grupos as organelas típicas permaneceram proeminentes e houve preservação de sinapses neuronais com fibras musculares lisas.

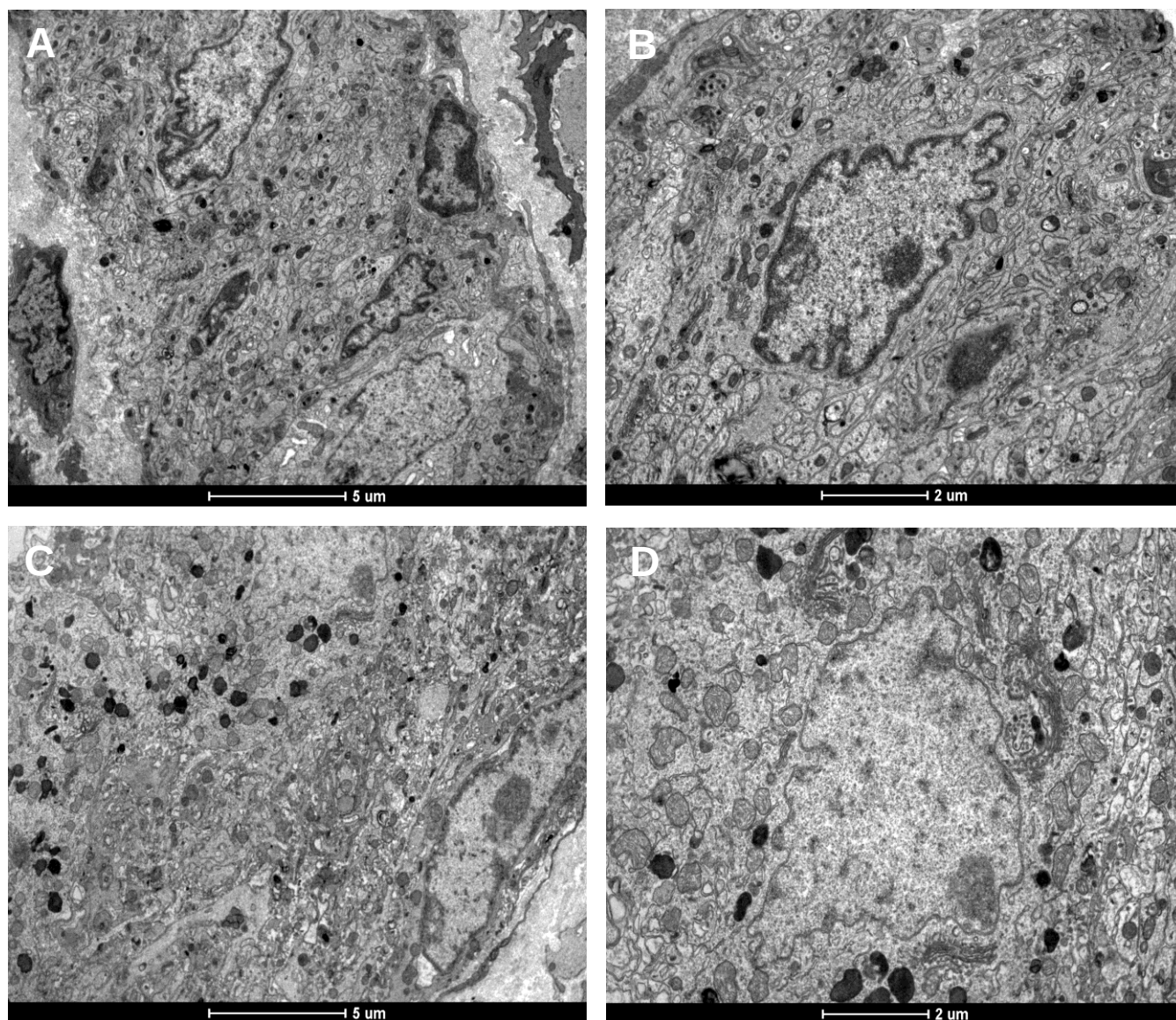


Figura 44: Comparação das idades dos animais em análise ultraestrutural. (A) e (B) Células neuronais do plexo mioentérico em animais do grupo controle de fase aguda (CFA) apresentaram preservação do perfil nuclear neuronal e citosol de aspecto claro. **(C) e (D)** Em animais do grupo controle de fase crônica (CFC), houve aumento tanto da quantidade como do tamanho de inclusões lipídicas intracitoplasmáticas e membrana nuclear com aspecto irregular. Os resultados representam dois experimentos independentes. Barra de escala: (A) 5μm, (B) 2 μm, (C) 5μm, (D) 2μm.

Nos animais do grupo infectado de fase aguda (IFA), observamos neurônios com núcleo apresentando aumento moderado e difuso da heterocromatina e alteração acentuada do perfil da membrana nuclear (aspecto irregular, “enrugado”) (Figura 45 A) associada a cisterna do envelope nuclear dilatada. O citosol dessas células se apresentou mais eletrodenso em dois dos animais avaliados. No plexo mioentérico, associado a esses neurônios alterados, foram observadas células inflamatórias (eosinófilos, plasmócitos, linfócitos e macrófagos) (Figura 45 B). Nesses mesmos animais, houve ainda outro plexo mioentérico com células inflamatórias e célula com perfil de glia (com núcleo triangular) - *glia-like* - reativa, sem visualização de célula com padrão neuronal. Observamos também capilares com endotélio ativado (colunar), inclusive com pericito (Figura 45 C). Houve ainda estrutura semelhante a célula muscular lisa (presença de cavéolas e as organelas se concentrando ao redor do núcleo) com citoplasma mais claro que o habitual (Figura 45 D).

Não houve alteração da quantidade, tamanho ou aspecto das inclusões lipídicas do metabolismo no grupo IFA quando comparado a seu grupo controle (CFA).

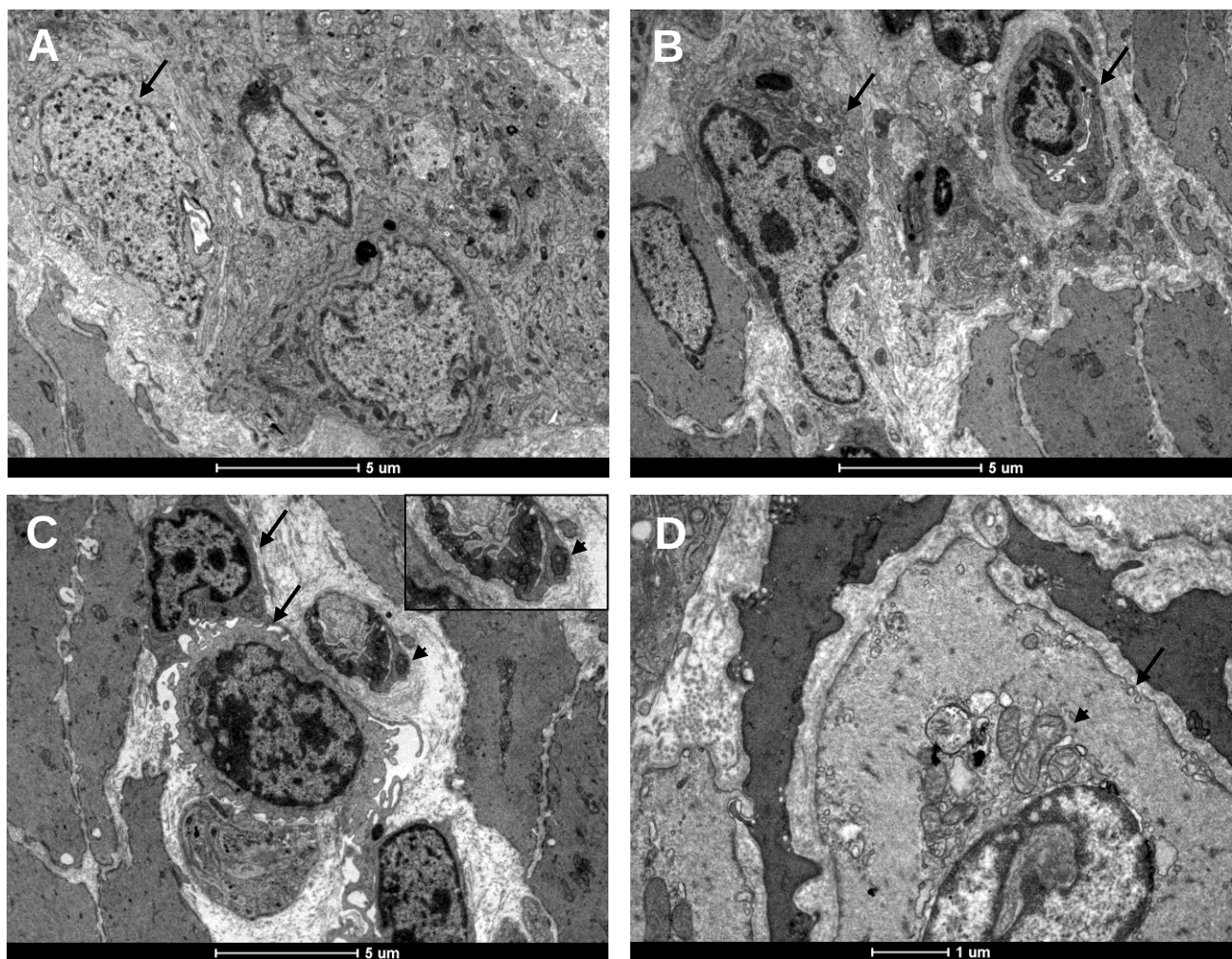


Figura 45: Animais infectados de Fase Aguda (IFA) em análise ultraestrutural. **(A)** Núcleo de neurônios do plexo mioentérico com aumento moderado e difuso da heterocromatina e alteração do perfil da membrana nuclear (aspecto irregular, “enrugado”) (seta). Há Algumas células inflamatórias (linfócitos e macrófagos) e associação a alterações neuronais (setas) **(B)**. **(C) e inserto (C)** Capilares com endotélio ativado (células colunares), incluindo pericitos associados (cabeças de seta). **(D)** Célula com morfologia similar a célula muscular lisa (presença de cavéola – seta– e organelas concentradas ao redor do núcleo – cabeça de seta) com citoplasma mais claro que o usual. Os resultados representam dois experimentos independentes. Barra de escala: (A) 5μm, (B) 5μm, (C) 5μm, (D) 1μm.

4.22.2. Fase crônica

Nos animais do grupo infectado de fase crônica (IFC), observamos neurônios com citosol mais eletrodenso e perfil nuclear alterado (membrana nuclear irregular, “enrugada”). O citoplasma dessas células se apresentou escasso e pobre em organelas (Figuras 46 A e B). Em alguns animais, houve aumento discreto e focal da heterocromatina. Quando comparado ao CFC, observamos aumento acentuado do número de inclusões intracitoplasmáticas em neurônios, apresentando inclusive aspecto lamelar (Figura 46 C). No grupo IFC, o acometimento neuronal foi segmentar, já que houve alguns neurônios com preservação de suas características habituais (citosol mais claro, membrana nuclear em formato oval, menos heterocromatina, citoplasma amplo e rico em organelas).

Nesse grupo, observamos ainda célula de Cajal sem alterações evidentes, com aspecto habitual, mantendo contato íntimo com célula muscular lisa (Figura 46 D).

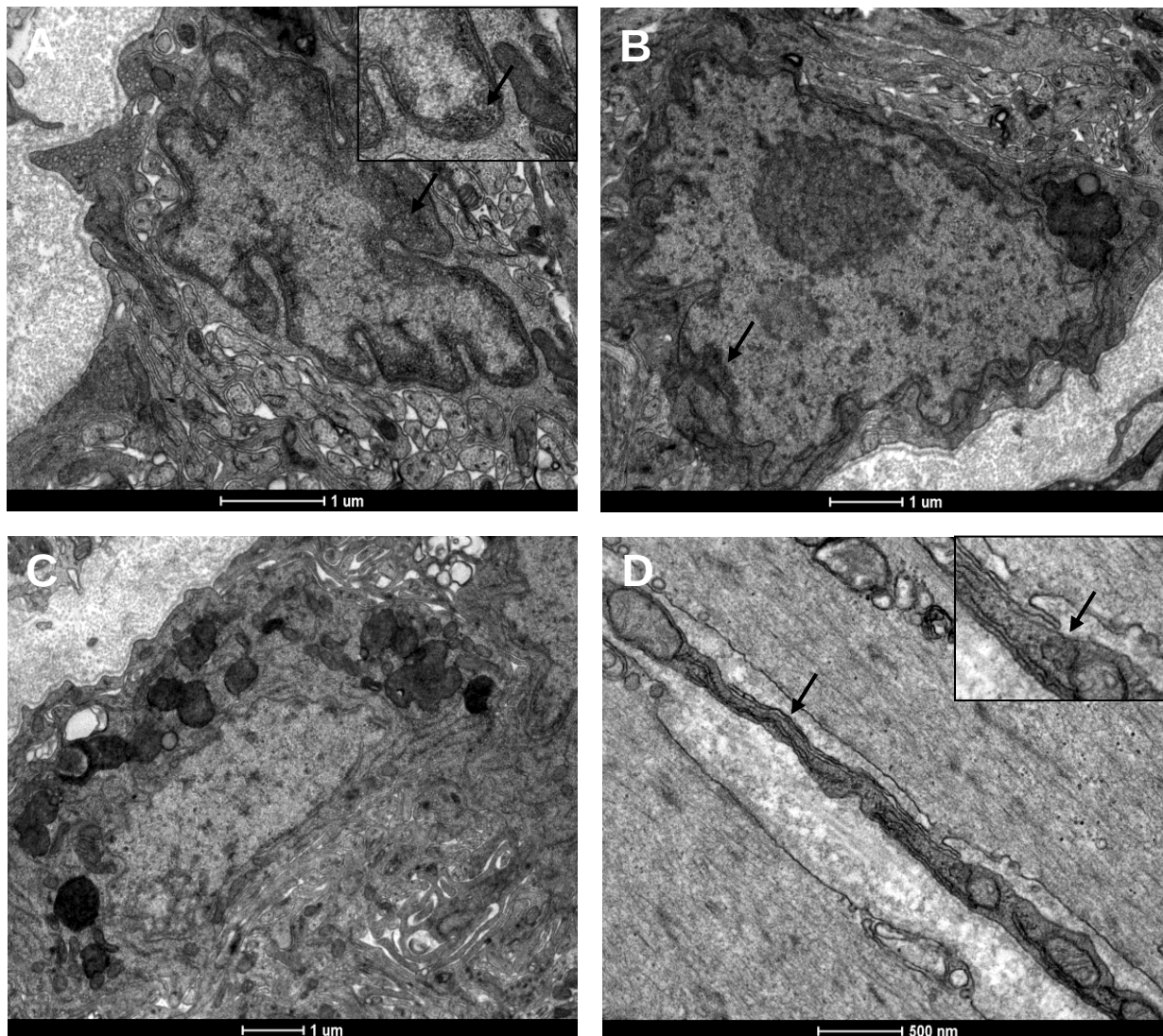


Figura 46: Animais infectados de Fase Crônica em análise ultraestrutural. **(A)**, **inserto (A)** e **(B)** Neurônios com citosol eletrodenso e perfil nuclear alterado (membrana nuclear “enrugada”) (setas). O citoplasma apresentou-se escasso e pobre em organelas. **(C)** Aumento marcante do número e aspecto lamelar de inclusões intracitoplasmáticas em neurônios mioentéricos. **(D)** e **inserto (D)** Células intersticiais de Cajal sem alterações evidentes, mantendo seu aspecto usual (setas). Os resultados representam dois experimentos independentes. Barra de escala: (A) 1 μm , (B) 1 μm , (C) 1 μm , (D) 500 nm.

5- DISCUSSÃO

Neste trabalho o pico de parasitemia ocorreu no 8º d.p.i. Após três dias (11º d.p.i.), os animais foram sacrificados para coleta de material histopatológico. Experimentos preliminares indicavam que ocorria migração das formas tripomastigotas para o órgão de interesse, o cólon, quando o animal já se apresentava clinicamente debilitado e, na maioria das vezes, evoluía para óbito. Dessa forma, por meio de estudos piloto, observamos que o sacrifício no dia do pico de parasitemia não permitia detectar parasitismo tecidual significativo. Por outro lado, todos os animais morrem até o 28º d.p.i. em função do intenso parasitismo. Tal constatação explica porque em grande parte das vezes acredita-se que o parasitismo intestinal não é significativo e tem sido pouco explorado no modelo murino.

Em função das altas taxas de parasitemia e de mortalidade da cepa Y, optamos por tratar os animais pertencentes ao grupo de fase crônica com Benzonidazol no 11º d.p.i., a fim de controlar a parasitemia e, conseqüentemente, aumentar a sobrevida (Guedes, Veloso *et al.*, 2002; Caldas, Talvani *et al.*, 2008). A cepa Y utilizada em nossos experimentos é parcialmente resistente ao Benzonidazol (Filardi *et al.*, 1987), cuja principal ação é produzir espécies reativas deletérias responsáveis por danos celulares e indução de estresse oxidativo, tanto no hospedeiro como no parasito (Pedrosa *et al.*, 2001; Hannel *et al.*, 2003). Essa droga atua diretamente contra tripomastigotas circulantes e amastigotas intracelulares, mas sua eficácia depende do tempo e da dose empregada, assim como da fase da doença (Marin-Neto *et al.*, 2008).

Observou-se maior massa corporal dos camundongos do grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA), o que possivelmente é oriundo do crescimento e aumento da idade dos animais. Ao contrário, observou-se menor massa corporal dos camundongos do grupo infectado de fase crônica (IFC) em relação a seu controle (CFC) (figura 8), o que pode ser devido ao caráter espoliativo da doença de Chagas. Além disto, macroscopicamente o grupo infectado de fase crônica (IFC) apresentou maior comprimento longitudinal do cólon em relação ao seu controle (CFC) e em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA), indicando surgimento de dolíco cólon durante a fase crônica da doença de Chagas (figura 9).

Histologicamente, no 11º d.p.i. observamos parasitos em toda a extensão das camadas musculares do cólon, especialmente na muscular interna em torno de vasos e predominantemente em áreas perivasculares na camada submucosa, possivelmente devido a entrada dos parasitos no intestino ser primeiramente por meio de contato do *T. cruzi* com as células endoteliais, segundo Mukherjee *et al.* (2004).

Em decorrência de distúrbios vasculares, houve necrose das fibras musculares, e conseqüentemente, a formação do tecido de granulação composto por colágeno tipo III, o que explica o aumento da área de fibra reticular na fase aguda da doença (Sirica, 1996). Todavia, com o passar do tempo, esse tecido de granulação inicial com finas fibrilas foi progressivamente substituído por tecido de cicatrização com neoformação de colágeno tipo I, que pode levar à formação de áreas de fibrose e interrupção da fibra muscular, quadro observado na fase avançada da doença em nossos animais. Nas áreas livres de lesão o padrão da trama reticular nos animais IFC não diferia dos seus controles. Durante a fase aguda da doença, salienta-se que houve diminuição da espessura da camada mucosa,

possivelmente devido à descamação do epitélio por necrose ou apoptose, além de aparente diminuição do tamanho e/ou do número de células caliciformes.

Os neurônios dos gânglios mientérico e submucoso aparentavam-se íntegros na fase aguda da doença, apesar da rara presença de células inflamatórias e/ou pseudocistos no interior e ao redor do plexo mientérico, assim como descrito por outros autores que estudaram o intestino na fase aguda experimental (Camargos, Franco *et al.*, 2000). Trabalhos com ratos Wistar infectados com 200.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, inóculo quatro vezes maior que o utilizado por nosso grupo, apontam na fase aguda (18º d.p.i.), diminuição significativa do número de neurônios do plexo mientérico no cólon e coração, todavia sem parasitos nos neurônios, além de infiltrado inflamatório intenso e focal de leucócitos e linfócitos na camada muscular (Garcia, Paula *et al.*, 1999).

A DC constitui um verdadeiro modelo intrínseco de desnervação do trato gastrointestinal humano devido a importantes alterações da motilidade no cólon e reto, perda do relaxamento do esfíncter anal e resposta anômala do estímulo colinérgico da bexiga (Meneghelli, 1985), apontando para a perda de integridade e função neuronal como causas principais, o que ainda precisa ser validado no modelo murino. Em nosso estudo, os neurônios imunomarcados pela PGP 9.5 estavam diminuídos nos gânglios de animais infectados na fase aguda em comparação com o seu grupo controle, além de diminuição significativa da densidade da inervação intermuscular da camada muscular interna, em especial nos locais de intenso infiltrado inflamatório. Devido às dificuldades metodológicas e amostrais inerentes à doença humana, até o momento não foi levantada a hipótese de que os mecanismos responsáveis pelas alterações estruturais da parede colônica se devam além da perda de neurônios entéricos ganglionares na fase aguda, a uma alteração importante na densidade e no padrão de fibras intramusculares intestinais durante o processo inflamatório

crônico prolongado que caracteriza a evolução do megacolon chagásico. Nossos achados dão ênfase à questão da denervação intramuscular, especialmente se considerada em conjunto com a presença continuada de inflamação e alteração morfológica (fenotípica) da fibra muscular lisa que torna-se hipertrofiada. Esses achados poderiam explicar alteração funcional da coordenação motora do cólon que caracteriza a instalação do megacólon ou apontar o início de uma lesão pós-gangliônica à qual neurônios motores são susceptíveis. Além disso, acredita-se que considerável proporção de neurônios sensoriais morrem após lesão distal (Hart, Terenghi *et al.*, 2008). Dessa forma, nossas evidências indicam que as lesões neuronais já se iniciariam na fase aguda da doença e progrediria ao longo da fase crônica, culminando com a formação do megacólon chagásico.

Um padrão que indica comprometimento de fibras intramusculares, após imunomarcagem por PGP 9.5, foi observado em pacientes chagásicos crônicos com megacólon, nos quais as fibras eram mais delgadas quando comparadas aos pacientes do grupo controle. Essa diminuição foi interpretada como perda axonal relacionada ao quadro de megacólon, visto que pacientes chagásicos sem megacólon não apresentavam diferenças significativas na distribuição de fibras intramusculares em relação ao grupo controle (Da Silveira, Lemos *et al.*, 2007a). O carácter extremamente segmentar das lesões caracterizadas por perda de densidade nervosa que pudemos demonstrar em nosso modelo, poderia sugerir porque na doença humana diversos graus de acometimento em extensão pelo processo respondem por apresentações clínicas com e sem mega, nos pacientes crônicos infectados. Além disto, nossa hipótese é de que a perda ou o remodelamento axonal seria contínua e relacionada com o processo inflamatório e não apenas secundária à perda de neurônios nos gânglios intramurais.

Nosso trabalho é original por examinar sistematicamente o intestino em animais mantidos por longos períodos (15 meses de infecção), os quais atestadamente apresentaram parasitismo intestinal na fase aguda. Na fase crônica da doença, através do método da imuno-histoquímica, observamos parasitos na camada muscular de alguns animais, apesar de escassos, e realizamos sorologia anti-IgG para DC pelo método ELISA, confirmando a permanência da infecção, mesmo após tratamento, e sua associação com as alterações inflamatórias crônicas da parede intestinal bem como suas alterações estruturais.

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

Nos animais infectados de fase crônica, ainda observamos aumento do depósito de tecido conjuntivo entre as fibras musculares quando comparado com o seu grupo controle. Em tese, a lesão ocorrida durante a fase aguda causa degeneração e necrose das fibras musculares, e, apesar de haver certo grau de regeneração e aumento do número de mitoses, o tecido muscular não consegue se regenerar completamente; com consequente ocupação dessas áreas por tecido conjuntivo, formando fibrose entre as fibras musculares, quadro também descrito em pacientes chagásicos com megacólon (Pinheiro, Rua *et al.*, 2003). Para outros autores, no final da fase aguda em camundongos, observou-se presença de laminina, colágeno IV e fibronectina relacionada ao infiltrado inflamatório e colágeno III em depósitos periarteriais (Andrade, Grimaud *et al.*, 1989), onde durante a fibrogênese, fibrilas de colágeno são formadas a partir da fusão de fibrilas finas e curtas (Ushiki, 2002).

Nos animais infectados de fase crônica, as fibras musculares da camada circular interna apresentaram-se hipertrofiadas em relação ao grupo controle e houve aumento da espessura de todas as camadas do cólon. Esse mesmo quadro foi observado em pacientes com megareto e megasigmóide idiopático, no qual havia marcante hipertrofia da musculatura longitudinal e em menor intensidade da musculatura circular. Também, nesse sentido, nossas observações estão de acordo com a discreta/moderada fibrose e menor imunomarcção por actina e miosina das fibras musculares externas, observadas por Gattuso, Smith *et al.*, (1998), além de diminuição da densidade nervosa entre as fibras musculares, observada por Lourenssen, Wells *et al.*, (2005) em modelo de colite.

Alguns pacientes chagásicos crônicos apresentam, anatomicamente, sigmóide e reto dilatados e atônicos com espessamento da muscular, infiltrado inflamatório na camada submucosa e com presença de infiltrados inflamatórios focais particularmente no plexo mientérico que apresenta perda neuronal (Todd, Porter *et al.*, 1969). Na fase crônica, diferentemente da fase aguda, observamos espessamento da mucosa. Tal como em ratos Wistar infectados com *T. cruzi* 10 m.p.i., a hiperplasia do epitélio possivelmente decorrente da maior renovação das células da cripta aumenta a absorção e secreção no cólon e pode ter participação na enteromegalia chagásica (Fernandes, Zucoloto *et al.*, 1991).

Quando avaliamos o perfil inflamatório do cólon de animais infectados tanto na fase aguda como na crônica da doença, observamos que a imunomarcção para CD3+ apresentou aumento significativo no grupo infectado de fase crônica, tanto quando comparado com o grupo infectado de fase aguda como quando com o seu controle. Esses achados corroboram com os resultados obtidos na contagem de células CD4+ e CD8+ que vamos discutir a seguir.

Estudo recente de Giraldo *et al.* (2013) apresentou resultados que confirmaram achados já encontrados por outros grupos (Piedras *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2002; Vitelli-Avelar *et al.*, 2005; Albareda *et al.*, 2010) em que células T de pacientes chagásicos crônicos estão superativadas. Esses mesmos estudos também demonstraram que a porcentagem de células CD4+, e possivelmente de CD8+, se correlaciona com a gravidade da doença. Ainda sobre esse assunto, também foram observadas em adultos com doença de Chagas crônica altas porcentagens de células CD4+ quando comparados a seus controles (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005). Além disso, somente aqueles com grave comprometimento cardíaco apresentaram altos níveis de células CD8+ (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005; Piedras *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2002; Albareda *et al.*, 2010; Vitelli-Avelar *et al.*, 2006).

Nossos resultados também indicaram aumento no número de células CD4+ nos grupos infectados, principalmente no de fase crônica, em relação a seus respectivos grupos controle.

Amostras histológicas de megaesôfago e megacólon humanos em estudo anterior (Correa-Oliveira *et al.*, 1999) apresentaram predomínio de linfócitos T CD3+ e células CD68+. Análise das subpopulações de linfócitos nesse mesmo material mostrou elevado número de células CD4+ quando comparado a população CD8+.

No grupo infectado de fase aguda, observamos aumento da celularidade na muscular proveniente do intenso infiltrado inflamatório típico dessa fase da doença, com predomínio de células CD4+ em comparação com células CD8+. Essas alterações observadas são segmentares, o que nos parece característico da DC e alerta quanto aos resultados obtidos de biopsias ou de fragmentos de tamanho limitado obtidos dos colons humanos.

Durante a fase crônica da doença, observamos no grupo infectado aumento do número de células CD8+, tanto em relação a seu grupo controle como em relação ao grupo

infectado de fase aguda que podem indicar, como citado anteriormente, que a presença acentuada desse subtipo de célula está relacionada a gravidade da doença, com intenso acometimento do TGI, levando a formação do megacólon chagásico.

Em estudo realizado por Da Silveira *et al.* (2007a), observou-se infiltrado inflamatório em pacientes chagásicos, com megacólon e sem megacólon, com predomínio de linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD20+. Porém, não houve aumento significativo de células CD20+ quando foram comparados os pacientes infectados com e sem megacólon chagásico, tanto no plexo submucoso como no mioentérico. Sabe-se da importância da resposta imune mediada por anticorpos em fases mais tardias da doença (Bermejo *et al.*, 2010). Numerosos modelos experimentais com animais apresentando deficiência de anticorpos ou de células B mostraram alta parasitemia e baixa taxa de sobrevivência nesse grupo (Kumar *et al.*, 1998). Nossos resultados corroboram essa hipótese, uma vez que observamos maior quantidade de células CD20+ no grupo infectado de fase crônica quando comparado ao grupo infectado de fase aguda, reiterando a importância desse tipo celular durante essa fase da doença. Uma abordagem mais dirigida para a alça humoral da resposta imunológica em nosso modelo é desejável na programação dos próximos experimentos.

Embora a nossa análise interpretativa sugira um aumento das células CD68+ no grupo infectado crônico, não houve diferença significativa ao compararmos com o grupo infectado agudo e com seu grupo controle. Análises prévias em megacólon chagásico humano também revelaram presença importante de células CD68+ no infiltrado inflamatório desses pacientes (Correa-Oliveira *et al.*, 1999).

A interação do *T. cruzi* com macrófagos e outras células envolvidas na resposta imune inata é mediada por receptores que reconhecem padrões específicos do antígeno, como Toll-like receptors (TLRs). Esses receptores são ativados por moléculas presentes na superfície

do patógeno que induzem a síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), e IL-12. Além disso, esses receptores ativam óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Kopp *et al.*, 2003; Flandin *et al.*, 2006). A infecção por *T. cruzi* pode ativar múltiplas vias do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro. Durante fases iniciais da doença, o contato com formas tripomastigotas favorece a síntese de moléculas efetoras e reguladoras do sistema imune, como citocinas, quimiocinas e nitrito (Hunter *et al.*, 1997; Baggiolini *et al.*, 2000). De acordo com Guinazu *et al.* (2007), antígenos de superfície do parasito (moléculas de superfície mucina tGPI) interagem com células do sistema imune inato, principalmente com macrófagos, e contribuem para os processos imunes reguladores observados na doença de Chagas (Campos *et al.*, 2001; Aliberti *et al.*, 1996; Talvani *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2002). Além disso, monócitos desempenham papel importante na ativação da resposta inata durante fases iniciais da infecção ao mediar uma conexão entre as respostas imunes inata e adaptativa (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008). Em face da mais recente modificação da classificação funcional dos macrófagos de acordo com fenótipos M Φ 1 (CD11b⁺CD14^{high}CD16^{low}), pró-inflamatório, e M Φ 2 (CD11b⁺CD14^{low}CD16^{high}), anti-inflamatório (Amara *et al.*, 2016; Koffel *et al.*, 2015), será importante investigar a cinética destes fenótipos ao longo do processo inflamatório subjacente aos megacólons chagásicos.

Os macrófagos podem passar por modificações adaptativas durante suas funções de resposta imunológica, de defesa contra microrganismos e de reparo tecidual. Há um espectro de plasticidade entre os macrófagos pró- inflamatórios clássicos (M1) e os macrófagos alternativamente ativados ou de reparo tecidual (M2). Os macrófagos M1 são estimulados por lipopolissacarídeos e pelo interferon-gama (INF- γ). Os macrófagos M2 são estimulados pela IL-4 (Gaetano, Massimo e Alberto, 2010). O macrófago M1 está relacionado a altos

níveis de IL-12 e baixos níveis de IL-10. São produtores de radicais livres derivados de nitrogênio e oxigênio, expressam altos níveis de complexo de histocompatibilidade de classe II e demonstram atividade microbicida. O macrófago M1 é fundamental na resistência contra microrganismos intracelulares (Gaetano, Massimo e Alberto, 2010). O macrófago M2 está relacionado a altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IL-12. Apresenta pronunciada atividade fagocítica e expressa altos níveis de receptores scavenger, sendo importantes na remoção de moléculas estranhas. São importantes para a contenção do processo inflamatório, promovem remodelamento tecidual e exercem funções imunoregulatórias (Gaetano, Massimo e Alberto, 2010).

O parasito é capaz de induzir a síntese de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-12) e anti-inflamatórios (IL-10 e TGF- β) que são responsáveis pela modulação da produção de nitrito, o que consequentemente acarreta efeitos tripanocida (Gazzinelli *et al.*, 1992; Abrahamsohn *et al.*, 1998). A significativa produção de IL-12 e TNF- α aponta para a importância dessas duas citocinas em fases iniciais da infecção, com IL-12 induzindo diferenciação de linfócitos Th1 e com TNF- α levando a produção de iNOS.

Em nosso estudo das citocinas inflamatórias, observamos aumento significativo da presença de TNF- α em amostras de animais infectados de fase aguda quando comparados com as amostras de animais infectados de fase crônica, o que ratifica o papel dessa citocina nas fases iniciais (fase aguda) da doença.

Em estudo prévio (Rezende-Oliveira *et al.*, 2012), níveis significativamente elevados de IL-10 foram observados em culturas de sangue após adição de tripomastigotas. IL-10 já é conhecida por exercer importante papel anti-inflamatório, inibindo a síntese de nitrito por macrófagos e a produção de IFN- γ por linfócitos CD4+. Seus efeitos incluem a inibição de reposta imune protetora e, dessa forma, permanência do parasito, contribuindo para o

estabelecimento da infecção (Hunter *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1994; Abrahamsohn *et al.*, 1996). A dosagem dessa citocina em nossas amostras não apresentou resultados com diferença estatística significativa, apesar de haver uma tendência de maior concentração de IL-10 no grupo IFC quando comparado com seu grupo controle pareado.

Em modelos animais de colite induzida por TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) (Shaheen *et al.*, 2010), observou-se resposta inflamatória Th1 predominante com produção excessiva de IFN- γ , TNF- α e IL-12. Esse modelo se assemelha a DC, uma vez que causa inflamação de mucosa associada a resposta Th1 (te Velde *et al.*, 2006). Esse perfil inflamatório também foi observado em nossos animais, com grande produção de TNF- α e IFN- γ no grupo infectado de fase aguda.

Ainda em fases iniciais da infecção por *T. cruzi*, há resposta inflamatória intensa, o que desempenha papel importante na patogenia da doença. Observou-se que antígenos do *T. cruzi* induzem ativação de células natural killer (NK) antes de ocorrer a expansão de linfócitos T (Brener *et al.*, 1997). Durante essa fase, macrófagos induzem a cascata de citocinas: inicialmente, produzem IL-12, que atua nas células NK (natural killer) e induzem a produção de IFN- γ , que por sua vez aumenta a produção de IL-12, TNF- α e NO pelos macrófagos, contribuindo para a eliminação do parasito (Camargo *et al.*, 1997).

Ao mesmo tempo, há síntese de citocinas reguladoras, como IL-10 e IL-4, para minimizar efeitos danosos associados a estimulação excessiva do sistema imune (Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Em estágios muito iniciais da infecção, componentes do *T. cruzi*, incluindo seu DNA e glicoconjugados da membrana, ativam a resposta inata por meio de sua interação com receptores Toll-like: TLR2, TLR4 e TLR9 em macrófagos e células dendríticas. Após essa ativação, ambas as células secretam citocinas e quimiocinas e aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras, induzindo endocitose e morte intracelular do *T.*

cruzi. A produção adequada de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-12, IL-6 e IL-18, seria essencial para o controle da infecção (Cunha-Neto *et al.*, 2009).

Alguns estudos mostraram que há associação entre a produção de citocinas e susceptibilidade a infecção aguda (Cardillo *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1991). Em camundongos “knockout” para citocinas, foi demonstrado que o bloqueio de citocinas tipo 1 (IFN γ e TNF α) está correlacionado com susceptibilidade aumentada à infecção por *T. cruzi* (Reed *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1997). Já a neutralização de IL-10 endógena acarreta em aumento da produção de IFN- γ induzida por *T. cruzi* e morte do parasito. Esse fato pode corroborar com a hipótese de que IL-10 seja um potente inibidor da produção de IFN γ durante a infecção em camundongos e que, portanto, a resistência à infecção seria o resultado do balanço entre a produção de IFN- γ e IL-10 (Cardillo *et al.*, 1996). De fato, a completa ausência de Th2 ou citocinas anti-inflamatórias acarreta efeitos negativos para o hospedeiro, como ocorre em camundongos infectados com *T. cruzi* deficientes em IL-10 que desenvolvem síndrome semelhante a do choque endotóxico devido a acentuada produção de TNF- α e IFN γ (Holscher *et al.*, 2000).

Em uma segunda etapa, a resposta imune mediada por anticorpos é muito importante para controlar a infecção. Estudos recentes mostraram que a maioria dos linfócitos B ativados não sintetizam anticorpos específicos durante os primeiros dias de infecção (Bermejo *et al.*, 2010), mas produzem resposta específica ao final da fase aguda da infecção. Entretanto, essa ativação policlonal pode ser importante causa de fenômeno autoimune mediado por anticorpos autorreativos. Além disso, a proliferação de populações de células B que respondem especificamente a antígenos com resposta policlonal escassa está associada a linhagens de camundongos resistentes (C57Bl/6), com produção de IFN γ e a prevalência de perfil Th1 (Bryan *et al.*, 2010).

Em relação ao perfil de citocinas inflamatórias, nossos achados encontraram embasamento na literatura analisada, conforme discutido acima. Em animais do grupo infectado de fase aguda, observamos um predomínio da resposta Th1, com produção de excessiva de IL-6 (Figura 33), TNF- α (Figura 34) e INF- γ (Figura 36), quando comparado ao grupo infectado de fase crônica, onde há regulação do processo inflamatório.

Em relação a modulação, a citocina anti-inflamatória TGF- β (Figura 35) também está aumentada no grupo infectado de fase aguda quando comparado ao grupo infectado de fase crônica, o que pode demonstrar que essa citocina é mais importante nos períodos iniciais da doença. Além disso, observamos uma tendência de aumento de IL-10 no grupo infectado de fase crônica quando comparado a seu grupo controle pareado (Figura 37).

Na tentativa de avaliar uma potencial perda seletiva de neurônios, optamos por realizar imunohistoquímica para os neurotransmissores CGRP e nNOS. Em nossos estudos, observamos diminuição quantitativa da imunomarcagem por CGRP no plexo mioentérico dos animais do grupo infectado crônico em relação a seu grupo controle, o que corrobora com os achados de estudos anteriores (Evangelista *et al.*, 1993) e ratifica a possível relação entre alterações da presença de CGRP e seu papel na motilidade intestinal durante os processos inflamatórios. No megacólon chagásico humano, ocorre diminuição da motilidade intestinal oriunda de disfunção neuronal no sistema nervoso entérico. O CGRP exerce múltiplos efeitos, tanto no sistema nervoso periférico como no central. No trato gastrointestinal, exerce função anti-inflamatória (Clifton *et al.*, 2007). Em pacientes com doença inflamatória intestinal, a imunorreatividade ao CGRP está diminuída (Eysselein *et al.*, 1992) ou inalterada (Renzi *et al.*, 1998). CGRP também regula o fluxo sanguíneo gástrico e mesentérico, controla a secreção de ácido gástrico e modula a motilidade intestinal. Ao contrário do efeito excitatório predominante da substância P e de outras neurocininas relacionadas, o efeito do

CGRP pode ser tanto excitatório como inibitório, dependendo da região do TGI e da camada muscular (por exemplo, longitudinal vs. circular). Ele também está envolvido no reflexo peristáltico estimulado pelo estiramento da camada muscular e estimulação da mucosa. CGRP produz relaxamento concentração-dependente na camada longitudinal e possui efeito inibitório leve no reflexo peristáltico de íleo de cobaias (Holzer *et al.*, 1989).

Estudos de colite induzida experimentalmente em coelhos demonstraram uma diminuição tempo-dependente da concentração de CGRP oriunda da liberação a partir de fibras nervosas entéricas intrínsecas e extrínsecas (Eysselein *et al.*, 1991). Outros experimentos demonstraram que essa liberação de CGRP exerceu efeito protetor quando liberado por neurônios sensoriais que modulam o fluxo sanguíneo da mucosa (Reinshagen *et al.*, 1994), o que nos leva a especular sobre o fato de que essas alterações no conteúdo de CGRP podem afetar a motilidade intestinal em um quadro de inflamação.

Outro neurotransmissor avaliado em nosso estudo foi o óxido nítrico (NO). Ele é produzido pela enzima óxido nítrico sintase neural (nNOS), sendo um neurotransmissor inibitório que regula a musculatura do trato gastrointestinal (Rivera *et al.*, 2011). A transmissão por esses neurônios causa relaxamento esfínteriano, permitindo a passagem de conteúdos intestinais, e também relaxamento muscular durante atividade propulsora no cólon. O NO regula o tônus muscular do esfíncter em esôfago inferior, piloro, esfíncter de Oddi e ânus. Além disso, também regula o reflexo de acomodação do fundo gástrico e o reflexo peristáltico do intestino (Takahashi *et al.*, 2003).

Estudos prévios demonstraram que inibidores de NOS atrasam o esvaziamento gástrico e o trânsito colônico. A redução de expressão de nNOS, associada a diminuição de produção local de NO, podem ser responsáveis por alterações de motilidade no TGI. Há evidências de que disfunção de neurônios nNOS no plexo mioentérico pode causar várias

doenças gastrointestinais (Ribeiro *et al.*, 1998; da Silveira *et al.*, 2007b). Diminuição na síntese de nNOS no plexo mioentérico parece ser fator contribuinte importante na patogênese de acalasia, gastroparesia diabética, estenose pilórica hipertrófica infantil, doença de Hirschsprung e Doença de Chagas (Ribeiro *et al.*, 1998; da Silveira *et al.*, 2007b).

Uma série de fatores pode contribuir para o envolvimento de neurônios NOS em neuropatias entéricas. Uma delas é a incapacidade do neurônio em manter a homeostase do Ca^{2+} . Em neurônios em geral, o stress pode aumentar a concentração de Ca^{2+} citoplasmático, causando toxicidade. Em neurônios nitrérgicos, esse fato é ainda agravado pelo fato de que essa substância é ativada por Ca^{2+} . Acredita-se que isso acarrete produção excessiva de NO e os radicais livres podem causar dano celular que é exacerbado pelo peroxinitrito formado quando o NO reage com radicais livres de oxigênio (Rivera *et al.*, 2011).

Em contrapartida, há estudos em que foi observado aumento relativo de neurônios mioentéricos nitrérgicos (NOS) em amostras de megacólon humano relacionados a diminuição significativa de neurônios colinérgicos (Jabari *et al.*, 2011). Aumento relativo de neurônios entéricos nitrérgicos como consequência de perda seletiva de neurônios colinérgicos também foi observado com o envelhecimento tanto em experimentos com animais como em estudos com amostras humanas (Santer, 1994; Phillips *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2009). Uma possível explicação para a resposta mais pronunciada de neurônios colinérgicos contra a invasão do parasito *T. cruzi* pode ser uma alteração na expressão do gene colinérgico em neurônios entéricos (Akpan *et al.*, 2008).

Em nossos resultados, observamos aumento significativo da expressão de nNOS no grupo infectado de fase crônica quando comparado com seu controle e com o grupo infectado de fase aguda.

Os estudos contraditórios aos nossos resultados que reportaram diminuição de neurônios nitrérgicos em amostras de megacólon chagásico humano (Ribeiro *et al.*, 1998; da Silveira *et al.*, 2007b), coraram neurônios nitrérgicos com reação histoquímica (Ribeiro *et al.*, 1998) sem realizar contracoloração com nenhuma outra população. Provavelmente, observaram bem menos elementos nitrérgicos nos espécimes megacolônicos *versus* controle, mas essa diminuição absoluta seria somente um aumento relativo (Jabari *et al.*, 2011). No outro estudo (da Silveira *et al.*, 2007b), foram analisadas seções e não peças inteiras, sendo analisado dessa forma um menor número de neurônios. Assim sendo, e considerando que tanto a nossa análise como a de Jabari *et al.* (2011) apresentou amostragem de maior número de neurônios, acreditamos que os nossos resultados sejam mais realísticos para avaliação da degeneração do plexo mioentérico.

Outro parâmetro avaliado foi a imunomarcacão para sinaptotagmina I/II. A exocitose de vesículas sinápticas é mediada por v-SNARE sinaptobrevina 2 (syb), e por t-SNAREs, syntaxina 1A(syx) e SNAP-25. Outro fator importante para a exocitose é a ligação do Ca^{2+} à proteína sinaptotagmina I (syt), sendo crucial para a rápida liberaçãõ de transmissor (Rizo *et al.*, 2008).

O *T. cruzi* penetra em grande número de tipos celulares por um mecanismo pouco usual que envolve liberaçãõ de Ca^{2+} e posterior fusão de lisossomos com a membrana plasmática. Sinaptotagmina VII está localizada nas membranas de vacúolos intracelulares contendo *T. cruzi*. Dessa forma, há indícios de que o *T. cruzi* explora a via exocítica lisossomal regulada por cálcio e dependente de sinaptotagmina VII para penetrar nas células hospedeiras (Caler *et al.*, 2001). Em relação ao papel da sinaptotagmina I/II na DC, ainda não há nada descrito na literatura até o presente momento.

A comunicação neuronal é mediada por fusão dependente de Ca^{2+} de vesículas sinápticas com a membrana plasmática pré-sináptica. Sinaptotagmina I funciona como um sensor de Ca^{2+} que regula exocitose, enquanto que receptores (SNARE) de soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) na vesícula e na membrana alvo se ligam formando complexos que catalisam diretamente a fusão da bicamada. Em estudo prévio (Chicka *et al.*, 2008), há relato de que, antes do gatilho disparado pelo Ca^{2+} , a sinaptotagmina interage com proteínas SNARE na membrana alvo para a interrupção da montagem do complexo SNARE em uma etapa que ocorre após as vesículas doadoras se encaixarem a membranas alvo. Isso resulta em complexos de fusão que, quando estimulados pelo Ca^{2+} , se movimentam rapidamente, com mistura altamente eficiente de lipídeos. Interações independentes de Ca^{2+} com SNAREs também permitem que a sinaptotagmina penetre seletivamente na membrana alvo em resposta a Ca^{2+} ; sendo demonstrado nesse mesmo estudo que sinaptotagmina- Ca^{2+} deve se inserir dentro da membrana alvo para acelerar a fusão catalisada por SNARE. Esses achados demonstram que Ca^{2+} converte sinaptotagmina de um estado inativo para ativo, acarretando exocitose.

Uma via extremamente especializada de fusão de membranas ocorre em terminais nervosos pré-sinápticos. Vesículas sinápticas são carregadas com neurotransmissores e ancoradas à membrana plasmática pré-sináptica. Após a despolarização, o influxo de Ca^{2+} através de canais ativados por voltagem desencadeia a fusão de vesículas sinápticas, liberando transmissores na fenda sináptica, onde se ligam e ativam receptores pós-sinápticos (Katz *et al.*, 1969). Essa via de fusão mostra duas características marcantes desse mecanismo: é estritamente regulada por Ca^{2+} e ocorre com cinética mais rápida do que qualquer outra fusão de membrana com evento conhecido. Estas propriedades são cruciais para a comunicação rápida entre dois pontos que constitui a base da função neuronal.

Em nosso modelo, observamos aumento da expressão de sinaptotagmina I/II no grupo infectado de fase crônica quando comparado ao grupo infectado de fase aguda. Esse achado indica indiretamente aumento da exocitose no plexo mioentérico durante a fase crônica da doença de Chagas, sendo possível inferir que está ocorrendo fenômeno de neuroplasticidade ao longo da infecção por *T. cruzi*. Estudos in vitro são mais indicados para avançar na compreensão do papel da infecção pelo *T. cruzi* na regulação ou interferência com os fenômenos sinápticos na musculatura lisa intestinal.

A fim de avaliar as células musculares lisas intestinais, utilizamos a imunomarcagem para alfa actina, de músculo liso. Na contração de músculo liso, há interação entre os filamentos finos e espessos. Os filamentos espessos consistem na miosina. Já os filamentos finos são compostos por tropomiosina, caldesmon ou filamina (Hartshorne *et al.*, 1987; Lehman *et al.*, 1987), mas o componente principal é a actina, que se apresenta em várias isoformas. O maior constituinte do músculo intestinal de adultos é a gama actina, mas quantidade significativa de alfa actina também está presente, e a mesma tem sido usada como marcador da musculatura lisa intestinal. A isoforma beta parece não apresentar papel direto na contração da musculatura lisa (Hartshorne *et al.*, 1987). Entretanto, alterações na distribuição das isoformas de actina parecem estar associadas com anormalidades na função da musculatura lisa. Também é possível que qualquer alteração na proporção de proteínas do músculo liso resulte em alterações na função do músculo, até mesmo se a proteína não for o componente principal dos elementos de contratilidade (Gattuso *et al.*, 1998).

A motilidade intestinal normal é dependente de músculo liso intestinal funcional, e qualquer alteração nos elementos de contratilidade resultaria em propulsão anormal.

A inflamação intestinal causa aumento na espessura da parede intestinal, em parte, devido à proliferação de células musculares lisas, o que altera o fenótipo de contratilidade em

algumas situações e locais do intestino. A inflamação intestinal causa alteração na motilidade tanto na doença aguda como na crônica. Na doença inflamatória intestinal, na qual são bem evidentes as dificuldades em se manter mecanismos reguladores das células musculares lisas e no sistema nervoso entérico quando se excede a capacidade de homeostase local. Entretanto, sintomas de dismotilidade podem persistir após resolução da inflamação, aumentando a possibilidade de alterações permanentes na estrutura celular do intestino. As inflamações repetidas e prolongadas podem causar graves alterações no funcionamento do órgão, como estenose na doença de Crohn, na qual intervenção cirúrgica é quase sempre necessária.

A análise das alterações em nível celular pode ser necessária para o entendimento da alteração da função do músculo liso que é característico do estado inflamatório. Por exemplo, espessamento da parede intestinal e proliferação de células musculares lisas ocorrem na inflamação intestinal tanto na doença de Chagas em humanos como em modelos animais, com conhecimento escasso das consequências (Blennerhassett *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 2009; Lourenssen *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 1993). Além disso, em estudos de células musculares lisas intestinais isoladas obtidas de modelos animais, observou-se que a inflamação causa alterações substanciais nas respostas contráteis ao estímulo nervoso, incluindo regulação alterada de cálcio intracelular (Nair *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2008), com evidência da persistência dessas alterações após resolução da inflamação (Wells *et al.*, 2004). Modelos em roedores de inflamação intestinal mostraram que o espessamento da parede do intestino devido a hiperplasia de células musculares lisas, com impressionante aumento no número de células, não é revertido após resolução da inflamação (Lourenssen *et al.*, 2005). Em estudo prévio, Nair *et al.* (2011) concluíram que estágios iniciais de colite induzida por TNBS causa proliferação em um subconjunto de

células que seletivamente diminuem sua expressão para marcadores de fenótipo de células musculares lisas (Nair *et al.*, 2011).

Em nossos resultados, observamos hipertrofia de células musculares lisas, mas com diminuição da expressão de alfa actina de músculo liso durante fase crônica da doença, indicando possível alteração no fenótipo dessas células, bem como alteração funcional relacionada com o megacolon.

Em relação à análise ultraestrutural (Microscopia Eletrônica) do plexo mioentérico e células musculares lisas intestinais de nossas amostras observamos alterações no grupo controle de fase crônica (CFC) quando comparado ao grupo controle de fase aguda (CFA), como aumento na quantidade, tamanho e aspecto de inclusões lipídicas intracitoplasmáticas de neurônios do plexo (Figuras 44 C e D). Além disso, houve discreta alteração no perfil nuclear e aumento focal da heterocromatina, assim como citosol mais eletrodenso (aspecto escuro). Essas alterações observadas no CFC são provavelmente causadas pela idade mais avançada desses animais (CFA com 5 semanas de idade X CFC com 16 meses de idade), uma vez que as mesmas são representativas de modificações do metabolismo celular.

Alterações morfológicas qualitativas e quantitativas já foram relatadas em fibras nervosas de nervos periféricos ao longo da vida de um camundongo. Estudo (Ceballos *et al.*, 1999) com nervos tibiais de camundongos com idade entre 6-33 meses demonstrou que, com o passar do tempo, ocorre acúmulo de colágeno no perineuro e inclusões lipídicas nas células perineurais. Há também aumento do número de macrófagos e mastócitos. No camundongo adulto com 10-12 meses de idade, observou-se características de degeneração progressivas e, acima de 20 meses, há desorganização generalizada e marcante do nervo devido a perda de fibras nervosas. Nossos animais do grupo controle de fase crônica foram

eutanasiados com 15 meses de idade e, portanto, provavelmente já apresentavam alterações relacionadas à idade, como relatado previamente.

A homeostase celular depende da utilização extremamente coordenada de lipídeos como combustível para produção de energia, essencial, por exemplo, para a biogênese de membranas celulares ou sinalizações químicas para comunicação intra ou intercelular. As inclusões lipídicas são universalmente preservadas em organelas dinâmicas que podem estocar e mobilizar ácidos graxos e outros lipídeos para desempenhar suas múltiplas funções dentro de uma célula. Algumas evidências sugerem que as zonas de contato entre essas inclusões e outras organelas desempenham papel importante no transporte de lipídeos e na regulação do metabolismo lipídico (Barbosa *et al.*, 2015). Essas estruturas são organelas complexas e dinâmicas cuja função é assimilar, estocar e fornecer lipídeos neutros, principalmente ester esteróis e triacilgliceróis (Fujimoto *et al.*, 2012; Walther *et al.*, 2012). Inicialmente encontradas em células especializadas, como adipócitos, hoje sabe-se que qualquer célula é capaz de formar inclusões lipídicas. Modelos atuais acreditam que elas sejam compartimentos especializados do retículo endoplasmático tubular (RE), do qual se origina por meio de processo gradual. Esse envolve a formação de glóbulo lipídico que cresce dentro da bicamada de membrana do RE via recrutamento controlado e sequencial de enzimas, que catalisam o acúmulo de lipídeos e estimula a formação da curvatura do folheto externo da membrana do RE (Pol *et al.*, 2014). Uma vez que essas inclusões são formadas, elas ainda permanecem aderidas a essa membrana (Kassan *et al.*, 2013). Disfunções de inclusões lipídicas foram relatadas em diversas condições patológicas, como obesidade, aterosclerose e lipodistrofias (Fujimoto *et al.*, 2012). As inclusões lipídicas são ocasionalmente encontradas em estudos ultraestruturais de neurônios (Ghadially *et al.*, 1988). Entretanto muito pouco se sabe a respeito do seu papel nessas células.

Notadamente, as inclusões estão aumentadas no cérebro de pacientes com Alzheimer (Gomez-Ramos *et al.*, 2007). Além disso, α -synuclein, a maior constituinte dos corpos de Lewy na doença de Parkinson, apresentou-se sob a forma de acúmulos na superfície de inclusões lipídicas em células carregadas de lipídeos (Cole *et al.*, 2002). Há portanto, que se considerar que a presença destas inclusões em células neuronais pode estar associada com processo neurodegenerativo.

Em animais infectados de fase aguda, observamos neurônios anormais no plexo mioentérico associados a células inflamatórias. As alterações neuronais observadas foram núcleo com perfil da membrana nuclear com contorno irregular e formação de pregueamentos, aumento da heterocromatina e citosol mais eletrodenso, sugerindo degeneração neuronal. Além disso, houve células com perfil glial reativo (glial-like). Os achados de possível degeneração associada a presença de células glial-like podem sinalizar que a despopulação neuronal no plexo mioentérico já se inicia durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Esse processo progrediria ao longo do curso da doença e ocorreria posterior desenvolvimento para a fase crônica com consequente formação de megacólon, uma vez que a despopulação neuronal é uma dos mais importantes e característicos achados dessa comorbidade em humanos.

Nos animais infectados de fase crônica, identificamos neurônios no plexo mioentérico com escassez de organelas citoplasmáticas, citosol eletrodenso, perfil nuclear alterado (membrana nuclear com contorno irregular), aumento na quantidade e no tamanho de inclusões intracitoplasmáticas e aumento de heterocromatina. Todos esses achados são evidência de alterações degenerativas mais intensas que o observado na fase aguda da doença, e bem mais específicas que aquelas relacionadas com o envelhecimento. Então, a destruição neuronal ocorreria gradual e progressivamente desde o início da infecção até a

fase crônica da doença. Além disso, essas alterações em neurônios mioentéricos não foram observadas em todas as amostras do grupo infectado de fase crônica, indicando preservação de alguns segmentos do cólon alternados com áreas de destruição neuronal, o que denota mais uma vez o envolvimento segmentar do cólon. Os neurônios encontrados no plexo mioentérico são geralmente responsáveis pelo controle da atividade peristáltica, enquanto que o plexo submucoso pela regulação da secreção e da absorção (Furness e Costa, 1987). Lesões do plexo nervoso com desnervação acarretam hipersensibilidade do órgão com presença de substâncias colinérgicas que exibem resposta motora atípica (Lopes, Chapadeiro et al., 1987).

Qualquer distúrbio no movimento peristáltico pode causar estagnação e retenção do conteúdo com consequente distensão da fibra muscular, o que é a principal causa de hipertrofia. Essas alterações levam à formação de mega, que é baseado na desordem da inervação intrínseca (Köberle, 1963), encontrada na fase crônica digestiva da DC. Microscopicamente, as lesões mais características são no plexo de Auerbach do Sistema Nervoso Entérico, que são inflamação nos gânglios (ganglionite e periganglionite) e nervos (neurite e perineurite) com intenso fenômeno degenerativo, causando completa destruição dos plexos.

As desordens motoras do trato digestivo na DC são principalmente relacionados à lesão do SNE e essas lesões podem incluir degeneração neuronal; desnervação, com redução de fibra nervosa ou neurônio (Köberle, 1957; Okumura, 1967; Tafuri, 1971; Tafuri *et al.*, 1979; Andrade & Andrade, 1980; Caliari *et al.*, 1996; Santos, 1998; da Silveira *et al.*, 2005, 2007a) e alterações de células da glia (da Silveira *et al.*, 2005, 2007a; Nascimento *et al.*, 2010). Essas alterações parecem estar diretamente associadas a resposta inflamatória e manutenção do parasitismo (Tafuri & Brener, 1967; Tafuri, 1970, 1971; Tafuri *et al.*,

1971; Vago *et al.*, 1996 , 2003; Lages-Silva *et al.*, 2001; da Silveira *et al.*, 2005; Manoel-Caetano *et al.*, 2008).

Em estudo ultraestrutural realizado por Tafuri *et al.* (1971) em amostras de pacientes com megacolon chagásico (porções proximal e distal do megacólon), houve lesões em neurônios, células de Schwann e componentes da cápsula do plexo mioentérico. Essas lesões não foram sistematizadas, mas sim focais. Dentre as alterações no núcleo neuronal, observaram membrana nuclear com contorno irregular com formação de pregueamento e digitações; encarquilhamento dos neurônios mais intensamente afetados; cromatina distribuída uniformemente com presença de massas densas geralmente próximas a membrana interna e nucléolo bem desenvolvido com zona central menos densa do que a periférica.

Tafuri *et al.* (1971) também observou alterações citoplasmáticas e em organelas, tais como, vacuolização; perda da membrana interna e de cristas da maioria das mitocôndrias; dilatação das cisternas do retículo; espessamento focal ou difuso de ribossomos no centro ou na periferia, podendo formar massas ou agrupamentos, como observado em nossos estudos. O complexo de Golgi estava extremamente desenvolvido e com grande número de lisossomos e lipossomos. Em relação à cápsula ganglionar, houve acentuado espessamento (neogênese de colágeno e fibras elásticas associada a presença de fibroblastos, histiócitos e mastócitos). O novo tecido fibroso formado por vezes penetrava na espessura do gânglio, entre nervos e neurônios, o que modificou sua estrutura. Além disso, eles também observaram que danos ao plexo de Auerbach foram intensos, porém não sistematizados, mas com distribuição irregular e imprevisível, variando de caso para caso e, no mesmo caso, de gânglio para gânglio avaliado. Esses achados concordam com os previamente descritos

nas análises de microscopia de luz durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental e em humanos (Tafuri *et al*, 1971; Tafuri,1971).

Zypen (1965) conduziu estudo sistemático das lesões nos plexos de Meissner e Auerbach na colite ulcerative crônica. Os achados de Tafuri (1971) em relação ao plexo de Auerbach no colon chagásico foram próximos aos descritos por Zypen (1965). Isso pode indicar que as lesões do plexo nervoso na colite ulcerativa e na DC não são específicas e podem ocorrer em qualquer processo inflamatório do trato gastrointestinal. No plexo de Auerbach, Tafuri (1971) ainda observou que há hipertrofia de mastócitos dentro ou próximo a gânglio no interstício intermuscular. Em nossa análise ultraestrutural do cólon, também observamos presença de mastócitos dentro de plexos mioentéricos com despopulação neuronal.

Em alguns animais do grupo infectado de fase crônica, observamos células musculares lisas com citoplasma de aspecto claro. Essa alteração pode indicar mudanças no fenótipo das proteínas presentes em seu citosol. Dessa forma, algumas dessas células provavelmente podem estar expressando mais proteínas que não apresentam função contrátil quando comparado com proteínas que apresentam função contrátil (como a actina, por exemplo), refletindo essa possível mudança de fenótipo com inversão na proporção dessas proteínas, causando desordens de motilidade do cólon, o que pode justificar a principal característica clínica da doença de Chagas crônica, constipação intestinal. Alterações na distribuição das isoformas de actina aparentemente estão associadas a anormalidades na função do músculo liso. Também é possível que qualquer mudança na proporção de proteínas da musculatura lisa resulte em disfunção da mesma, mesmo que a proteína alterada não seja o principal componente dos elementos contráteis (Gattuso *et al.*, 1998).

Além disso, em estudos de células musculares lisas intestinais obtidas em modelos animais, foi demonstrando que a inflamação causa alterações substanciais na resposta contrátil à estimulação nervosa, incluindo alteração da regulação de cálcio intracelular (Nair *et al*, 2011; Wells *et al*, 2005; Wells *et al*, 2008), o que evidencia a persistência dessas alterações mesmo após resolução da inflamação (Wells *et al*, 2004).

Modelos de inflamação intestinal em roedores demonstraram que houve aumento da espessura da parede intestinal devido a hiperplasia de células musculares lisas e, com aumento significativo no número de células, não ocorrendo reversão desse quadro após resolução da inflamação (Lourenssen *et al*, 2005). O aumento da massa tecidual pode afetar a contratilidade do tecido e, em nível de órgão, pouco se sabe a respeito da relação do efeito da hiperplasia *in vivo* no fenótipo dessas células. Espessamento da parede intestinal e proliferação de células musculares lisas intestinais ocorrem na doença inflamatória intestinal tanto em humanos como em modelos animais ainda com escasso conhecimento a respeito de suas consequências (Blennerhassett *et al*, 1992; Dietrich *et al*, 2009; Lourenssen *et al*, 2005; Owens *et al*, 1993). Como citado anteriormente, nossos estudos também observaram hipertrofia de células musculares lisas, mas com diminuição da expressão imunohistoquímica de alfa actina de músculo liso durante a fase crônica da doença, indicando possível alteração no fenótipo dessas células.

O aspecto ultraestrutural de célula muscular lisa degenerada é caracterizado por núcleo eletrodenso, citoplasma claro contendo lisossomos secundários e vacúolos citoplasmáticos confluentes. O espaço extracelular encontra-se expandido e ocupado por colágeno. Há ainda acúmulo isolado ou confluyente de inclusões intracitoplasmáticas lipídicas (Lu *et al*., 1997).

As células intersticiais de Cajal (CIC) apresentam íntima relação com as células musculares lisas da camada muscular interna. Elas se interconectam via “gap junctions” e contato íntimo por aposição com nervos e células musculares. A maioria das anormalidades estruturais das CIC são geralmente vistas em processos celulares, consistindo de vacuolização do citoplasma (Lu *et al.* 1997), “bolhas” na membrana plasmática e aspecto de múltiplas membranas nas zonas de contatos entre os processos de CIC (Lu *et al.* 1997). O dano irreversível é caracterizado por grande número de mitocôndrias rotas, depleção de filamentos finos e intermediários, presença de grandes acúmulos de lipídeos intracitoplasmáticos e vacúolos vazios envoltos por membrane (Lu *et al.* 1997). Contatos diretos e aposições íntimas entre as CIC e os nervos são raros no colon inflamado (Lu, 1997). Em estudo *in vitro* de inflamação com o intuito de verificar alterações na morfologia das CIC (Lu *et al.*, 1997), observou-se que essas células apresentaram dano irreversível como ruptura mitocondrial, depleção parcial de filamentos, vacúolos vazios e grandes inclusões lipídicas citoplasmáticas. Apesar dos nossos investimentos na padronização da imunoexpressão da c-Kit, proto-oncogene tirosina quinase, sendo Kit um receptor de fator de crescimento e tendo como premissa de que CIC necessita de sinalização por essa via para seu desenvolvimento (Sanders *et al.*, 1999), não conseguimos bons resultados. Acreditamos que o fato de nossos tecidos terem sido fixados com Bouin tenha interferido no funcionamento adequado do anticorpo.

Embora estudos prévios (Ward *et al.*, 2001; Takaki, 2003) sugiram funções importantes para as CIC na motilidade normal ainda não é claro porque ou como as CIC estão diminuídas em desordens motoras do TGI. Embora nossa amostragem não seja exaustiva, não há indicação de um distúrbio específico destas células no megacolon

experimental. Sabe-se, no entanto, que é de extrema importância estudos da fisiobiologia das CIC para o entendimento da etiologia da disfunção motora no TGI.

Nosso estudo ultraestrutural de amostras de animais infectados com *T. cruzi* foi pioneiro em modelos experimentais, sobretudo da fase crônica da DC em modelo de infecção prolongada (15 m.p.i.). Além disso, demonstramos alterações em nosso modelo que são similares às observadas na doença em humanos, incluindo aspectos que caracterizam o megacólon chagásico.

O modelo de megacolon chagásico experimental murino proposto nesta tese se sustenta com base em achados já consagrados na literatura em conjunto com achados inovadores.

Em relação aos consagrados, no grupo infectado de fase crônica da doença de Chagas, observamos aumento da espessura total da parede intestinal e do comprimento do cólon (dolicocólon), fibrose e hipertrofia das células musculares lisas, diminuição acentuada da densidade nervosa no plexo mioentérico. No grupo infectado de fase aguda, parasitemia patente; aumento de fibra reticular, indicando necrose de células musculares lisas; perfil de resposta inflamatória Th1; diminuição moderada da inervação no plexo mioentérico e intramuscular.

Em relação aos inovadores, podemos citar, no grupo infectado de fase crônica, diminuição acentuada da densidade nervosa na inervação intramuscular, iniciando-se ainda na fase aguda da infecção; diminuição difusa de neurônios positivos para CGRP; aumento da imunomarcção de neurônios nNOS positivos; aumento da imunomarcção para Syti/II como um indicador indireto de exocitose, o que pode sinalizar neuroplasticidade induzida pela infecção crônica; alteração no fenótipo de células musculares lisas intestinais por meio da imunomarcção por alfa-actina de músculo liso diminuída a despeito da documentada hiperplasia destas células.

À Microscopia Eletrônica, neurônios com aspecto de degeneração e escassez citoplasmática de organelas, além de célula muscular lisa com perfil de alteração de seu fenótipo no grupo infectado de fase crônica.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsohn IA. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res. 31:117-121, 1998.
- Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. Exp Parasitol. 84:231-244, 1996.
- Acosta AM, Santos-Buch CA. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. Circulation. 6:1255-1261, 1985.
- Adad SJ, E Silva GB, Jammal AA. The development of chagasic megacolon requires severe denervation and the reduction in interstitial cells of Cajal number might be a contributing factor. Virchows Arch. 462(1):127, 2013.
- Aigner L, Caroni P. Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43 depleted growth cones. J. Cell Biol. 128: 647-660, 1995.
- Akpan N, Caradonna K, Chuenkova MV, PereiraPerrin M. Chagas' disease parasite derived neurotrophic factor activates cholinergic gene expression in neuronal PC12 cells. Brain Res. 1217: 195-202, 2008.
- Albareda MC, Olivera GC, De Rissio AM, Postan M. Assessment of CD8(+) T cell differentiation in *Trypanosoma cruzi*-infected children. Am J Trop Med Hyg. 82: 861–864, 2010.
- Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. Infect Immun. 64:1961-1967, 1996.
- Almeida-Leite CM, Galvao LM, *et al.* Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. Neurobiol Dis. 1:170-178, 2007.
- Amara S, Whalen M, Tiriveedhi V. High salt induces anti-inflammatory MΦ2-like phenotype in peripheral macrophages. Biochem Biophys Rep. 7:1-9, 2016.
- Andrade SG, Pimentel AR, de Souza MM, Andrade ZA. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. Am J Trop Med Hyg. 63(1-2):64-70, 2000.
- Andrade SG, Grimaud JA, *et al.* Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 3:252-360, 1989.
- Andrade SG, Magalhaes JB, *et al.* Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. Bull World Health Organ. 4:721-726, 1985.
- Andrade ZA, Andrade SG. A patologia da doença de Chagas experimental no cão. Mem Inst Oswaldo Cruz. 75: 77-95, 1980.
- Anez N, Carrasco H, *et al.* Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg. 5: 726-732, 1999.
- Arantes RM, Andrews NW. A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. J Neurosci. 26(17) :4630-4637, 2006.
- Arantes RM, Marche HH, *et al.* Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Am J Pathol. 4:1361-1368, 2004.
- Arantes RM, Nogueira AM. Distribution of enteroglucagon and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. Cell Tissue Res. 1:61-69, 1997.
- Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. Immunol Today. 21:418-420, 2000.
- Barbosa AD, Savage DB, Siniossoglou S. Lipid droplet-organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. Curr Opin Cell Biol. 35: 91-97, 2015.
- Barbosa AJ. Immunocytochemical method for the identification of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in routine histological sections. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 6: 293-297, 1985.

Barreto ML, Andrade ME. Impact of Chagas' infection on some demographic characteristics: results of an ecological study. Cad Saude Publica. Suppl 2: 273-280, 1994.

Basso B, Cervetta L, Moretti E, Carlier Y, Truyens C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. Vaccine. 22: 1868-1872, 2004.

Bellotti G, Bocchi EA, *et al.* In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. Am Heart J. 2: 301-307, 1996.

Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. Trends Neurosci. 20: 84-91, 1997.

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

Bermejo DA, Amezcua-Vesely MC, Montes CL, Merino MC, Gehrau RC, Cejas H, Acosta-Rodríguez EV, Gruppi A. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 4:e67 9, 2010.

Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, Linden D, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Camilleri M, Zinsmeister AR, Pozo MJ, Hicks GA, Farrugia G. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. Neurogastroenterol Motil. 21: 746-754, 2009.

Blennerhassett MG, Vignjevic P, Vermillion DL, Collins SM. Inflammation causes hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 262:G1041-G1046,1992.

Bonfa E, Viana VS, *et al.* Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. J Immunol. 9: 3917-3923, 1993.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol. 114: 103-110, 1997.

Brener Z, Costa CA, *et al.* Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 6: 450-455, 1976.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 4: 389-396, 1962.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 88(1):171-2, 1993.

Bryan MA, Guyach SE, Norris KA. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. PLoS Negl Trop Dis. 4: e733, 2010.

Burns AJ, Lomax AEJ, Torihasi S, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. Proc Natl Acad Sci. 93: 12008-12013, 1996.

Burnstock G. Review lecture. Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. J Physiol. 313: 1-35, 1981.

Cajal SR. Histologie du syste`me nerveux de l'homme et des verte`bre´s. Paris: Maloine. 2: 891-942, 1911.

Caldas IS, Talvani A, *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. Parasitol Res. 2: 413-421, 2008.

Caler EV, Chakrabarti S, Fowler KT, Rao S, Andrews NW. The exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med. 193 (9): 1097-1104, 2001.

Caliari ER, Caliari MV, de Lana M, Tafuri WL. Estudo quantitativo e qualitativo dos plexos de Auerbach e Meissner do esôfago de cães inoculados com o *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 29: 17-20, 1996.

Calvert RJ, Otsuka M, *et al.* Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. J Nutr. 11: 1610-6, 1989.

- Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN γ -primed macrophages. J Immunol. 159: 6131-6139, 1997.
- Camargos ER, Franco DJ, *et al*. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. Am J Trop Med Hyg. 5: 604-612, 2000.
- Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, *et al*. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol. 167:416-423, 2001.
- Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8⁺ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology. 122: 584-595, 2007.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. Infect Immun. 64:128-134, 1996.
- Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. J Anat. 195 (Pt4): 563-576, 1999.
- Chagas, C. Über eine Trypanosomiasis des Menschen. v.Band XIII, p.5-7, 1909.
- Chagas, C. Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 8: 37-60, 1916.
- Chiari E, Dias JC, *et al*. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop. 1: 19-23, 1989.
- Chicka MC, Hui E, Liu H, Chapman ER. Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca²⁺. Nat Struct Mol Biol. 15(8): 827-835, 2008.
- Clifton MS, Hoy JJ *et al*. Role of calcitonin receptor-like receptor in colonic motility and inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 293, G36-44, 2007.
- Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, *et al*. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induced *in vivo* leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- γ -primed-macrophages. J Leuk Biol. 71:837-844, 2002.
- Cole NB, Murphy DD, Grider T, Rueter S, Brasaemle D, Nussbaum RL. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. J Biol Chem. 277 (8):6344-6352, 2002.
- Correa-Oliveira R, Gomes J, *et al*. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1: 253-255, 1999.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102 Suppl 1:113-22, 2007.
- Cunha-Neto E, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' heart disease. Sao Paulo Med J. 2: 757-766, 1995.
- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104 Suppl 1: 252-258, 2009.
- Cunha-Neto E, Coelho V, *et al*. Autoimmunity in Chagas' Disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in the heart lesion of chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 8: 1709-1712, 1996.
- Daniel EE, Posey-Daniel V. Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. Am J Physiol. 246:G305-315, 1984.
- Da Silveira AB, Lemos EM, *et al*. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. Hum.Pathol. 8: 1256-1264, 2007a.
- Da Silveira AB, D'Avila DR, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Poole D, Correa-Oliveira R, Furness JB. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. Dig Dis Sci. 52: 2877-2883, 2007b.

- Da Silveira ABM, Arantes RM, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Ávila Reis D. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. Hum Pathol. 40: 244-251, 2005.
- De Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet. 23;348(9039):1407-13, 1996.
- De Giorgio R, Barbara G, *et al*. The innervation of the digestive tract: its morphofunctional and neurochemical aspects. Minerva Gastroenterol Dietol. 2: 83-91, 1996.
- Dias JC. Chagas disease: still a challenge around the world. Rev Soc Bras Med Trop. 48(4):367-9, 2015.
- Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. Rev Soc Bras Med Trop. 3: 147-156, 1989.
- Dietrich CF. Significance of abdominal ultrasound in inflammatory bowel disease. Dig Dis. 27: 482-493, 2009.
- Elias FE, Vigliano CA, *et al*. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. Am J Trop Med Hyg. 2: 242-247, 2003.
- Evangelista S, Tramontana M. Involvement of calcitonin gene-related peptide in rat experimental colitis. J Physiol Paris. 87(4):277-80, 1993.
- Eysselein VE, Reinshagen M, Patel A, Davis W, Nast C, Sternini C. Calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease and experimentally induced colitis. Ann N Y Acad Sci. 30;657:319-27. Review, 1992.
- Eysselein VE, Reinshagen M *et al*. Calcitonin gene-related peptide and substance P decrease in the rabbit colon during colitis. A time study. Gastroenterology. 101: 1211-1219, 1991.
- Fernandes MI, Zucoloto S, *et al*. Morphometric investigations of the colon mucosa in chronic *Trypanosoma cruzi* infected rats. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 2: 119-122, 1991.
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 81: 755-759, 1987.
- Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. Eur J Immunol. 36:411-420, 2006.
- Freitas, JM, Lages-Silva E, *et al*. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. Int J Parasitol. 4: 411-417, 2005.
- Fujimoto T, Parton RG. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. Cold Spring Harb Perspect. Biol. 3(3), 2012.
- Furness JB, Costa M. The Enteric Nervous System. Churchill Livingstone, New York. 1987.
- Furness JB, Clerc N, *et al*. Memory in the enteric nervous system. Gut. 47 Suppl 4: iv60-62; discussion iv76, 2000.
- Gabella G. The structural relations between nerve fibres and muscle cells in the urinary bladder of the rat. Accid Anal Prev. 27(3):363-369, 1995.
- Gaetano C, Massimo L, Alberto M. Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. Haematologica. 95 (11): 1801-1803, 2010.
- Galli T, Haucke V. Teaching resources. A model for fast-track exocytosis of synaptic vesicles. Sci STKE. 267:tr2, 2005.
- Garcia SB, Paula JS, *et al*. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol. 4: 191-197, 1999.

- Gattuso JM, Smith VV, Kamm MA. Altered contractile proteins and neural innervation in idiopathic megarectum and megacolon. Histopathology. 33: 34–38, 1998.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon g-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . Eur J Immunol. 22:2501-2506, 1992.
- Ghadially FN. Ultrastructural Pathology Of the Cell and Matrix: Butterworths-Heinemann, Boston, 1988.
- Giraldo NA, Bolanos NI, Cuellar A, Roa N, Cucunuba Z, Rosas F, Velasco V, Puerta CJ, González JM. T Lymphocytes from Chagasic Patients Are Activated but Lack Proliferative Capacity and Down-Regulate CD28 and CD3 ζ . PLOS Neglected Tropical Diseases. 7:1-11, 2013.
- Goldberg JL. How does an axon grow? Genes Develop. 17: 941-958, 2013.
- Gomes ML, Macedo AM, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol. 1: 28-33, 1998.
- Gomez-Ramos P, Asuncion Moran M. Ultrastructural localization of intraneuronal Abeta-peptide in Alzheimer disease brains. J Alzheimers Dis. 11(1):53–59, 2007.
- Granziera C, D'Arceuil HD, Zai L, Magistretti PJ, Sorensen AG, de Crespigny AJ. Long-term Monitoring of Post-Stroke Plasticity After Transient Cerebral Ischemia in Mice Using *In Vivo* and *Ex Vivo* Diffusion Tensor MRI. The Open Neuroimaging Journal. 1: 10-17, 2007.
- Guedes PM, Veloso VM, *et al.* The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. Acta Trop. 84: 9-17, 2002.
- Guinazu N, Pellegrini A, Carrera EA, Aoki MP, Cabanillas AM, Girones N *et al.* Immunisation with a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes proinflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. Int J Parasitol. 37:1243-1254, 2007.
- Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunol. 31(11):673-685, 2009.
- Hannel H, Raether W. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitol Res. 90:S19–S39, 2003.
- Hansen, MB. The enteric nervous system I: organisation and classification. Pharmacol Toxicol. 92 (3):105-113, 2003.
- Hart AM, Terenghi G, *et al.* Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. Neurol Res. 30 (10) : 999-1011, 2008.
- Hartshorne DJ. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In Johnson LR ed. Physiology Gastrointestinal Tract. 1, 2nd edn. New York: Raven 423–482, 1987.
- Higuchi Mde L, Gutierrez PS *et al.* Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 423 (3): 157-160, 1993.
- Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. Infect Immun. 68:4075–4083, 2000.
- Holzer P, Barthó L, Matusák O, Bauer V. Calcitonin gene-related peptide action on intestinal circular muscle. Am J Physiol. 256(3 Pt 1):G546-552, 1989.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, and Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. Nature. 373: 347–349, 1995.
- Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, *et al.* IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 158:3311-3316, 1997.
- Jabari S, da Silveira ABM, de Oliveira EC, Neto SG, Quint K, Neuhuber W, Brehmer A. Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon. Histochem Cell Biol. 135: 47-57, 2011.

- Jones EM, Colley DG, *et al.* A *Trypanosoma cruzi* DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Trans Assoc Am Physicians. 105: 182-189, 1992.
- Junqueira LCU, Carneiro J. Histologia Básica. Guanabara Koogan. 2004. 540 p.
- Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? Parasitol Today. 12 (10): 396-399, 1996.
- Kassan A, Herms A, Fernandez-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJ, *et al.* Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. J Cell Biol. 203(6):985–1001, 2013.
- Katz B. The Release Of Neural Transmitter Substances. *Springfield: Thomas*; 1969.
- Kierszenbaum, F. Chronic chagasic tissue lesions in the absence of *Trypanosoma cruzi*: a proposed mechanism. Parasitol Today. 12 (11): 414-415, 1996.
- Köberle F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas Disease. Gut. 4: 399-405, 1963.
- Köberle F. Patogenia da Moléstia de Chagas. Estudos dos órgãos musculares ocos. Rev Goiana Med. 3: 155-180, 1957.
- Koffel R, Meshcheryakova A, Warszawska J, Hennig A, Wagner K, Jorgl A, Gubi D, Moser D, Hladik A, Hoffmann U, Fischer MB, van den Berg W, Koenders M, Scheinecker C, Gesslbauer B, Knapp S, Strobl H. Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation. Blood. 124(17): 2713-2724, 2015.
- Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal. J Physiol. 576.3: 653–658, 2006.
- Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Curr Opin Immunol. 15:396-401, 2003.
- Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 20: 207-216, 1998.
- Lages-Silva E, Crema E, *et al.* Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. Am J Trop Med Hyg. 65 (5): 435-441, 2001.
- Lehman W, Sheldon A, Madonia W. Diversity in smooth muscle thin filament composition. Biochim. Biophys. Acta 914; 35–39, 1987.
- Levin MJ. In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. Parasitol Today. 12 (11): 415-416, 1996.
- Lopes ER, Chapadeiro E, *et al.* Bogliolo Patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987
- Lourenssen S, Wells RW, Blennerhassett MG. Differential responses of intrinsic and extrinsic innervation of smooth muscle cells in rat colitis. Exp Neurol. 195: 497–507, 2005.
- Lourenssen S, Jeromin A, *et al.* Intestinal inflammation modulates expression of the synaptic vesicle protein neuronal calcium sensor-1. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 282 (6): G1097-1104, 2002.
- Lu G, Qian X, Berezin I, Telford GL, Huizinga JD, Sarna SK. Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 273:G1233-G1245, 1997.
- Luff SE, McLachlan EM, Hirst GD. An ultrastructural analysis of the sympathetic neuromuscular junctions on arterioles of the submucosa of the guinea pig ileum. J Comp Neurol. 257(4):578-594, 1987.
- Macedo AM, Machado CR, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99 (1): 1-12, 2004.
- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, and Nishikawa S. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. Development. 116:369–375, 1992.
- Maifrino LB, Amaral SO, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: preliminary investigation of NADH-positive and somatostatin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. Exp Parasitol. 111(4): 224-229, 2005.

- Maifrino LB, Liberti EA, *et al.* Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 60 (5): 721-725, 1999.
- Manoel-Caetano FS, Carareto CMA, Borim AA, Miyazaki K, Silva AE. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and esophageal mucosa from chronic chagasic patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 102: 1102-1107, 2008.
- Marin-Neto JA, Rassi JRA, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, *et al.* Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). Am Heart J. 37-42, 2008.
- Mazza S, Freire RS. Caso mortal de enfermedad de Chagas en lactante, con chagoma de inoculación. Sem Med. 56(27):pt. 2, 20-32, 1949.
- Meneghelli UG. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. Braz J Med Biol Res. 18 (3): 255-264, 1985.
- Miller MJ, Wrightsman RA, Stryker GA, Manning JE. Protection of mice against *Trypanosoma cruzi* by immunization with paraflagellar rod proteins requires T cell, but not B cell, function. J Immunol. 158:5330-5337, 1997.
- Mukherjee S, Huang H, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. Infect Immun. 72 (9): 5274-5282, 2004.
- Nair DG, Han TY, Lourenszen S, Blennerhassett MG. Proliferation modulates intestinal smooth muscle phenotype in vitro and in colitis in vivo. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 300: G903-G913, 2011.
- Nakamura M, Kishikawa H, Ishii H, Kumagai N, Tsuchimoto K. Autonomic nervous regeneration in acetic acid-induced ulcer from the viewpoint of synapse formation—effect of basic fibroblast growth factor and sofalcone in the rat. Aliment Pharmacol Ther. Suppl 1:50-57, 2000.
- Nascimento RD, Lisboa AS, Fujiwara RT, Freitas MAR, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Ávila-Reis D, da Silveira ABM. Characterization of enteroglial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. Hum Pathol. 41: 528-534, 2010.
- Nogueira AMMF. Megacólon chagásico: estudo histopatológico e do sistema nervoso entérico com ênfase na inervação colinérgica. Belo Horizonte 1996. (Tese de doutorado)
- Okumura M. Contribuição para o estudo das lesões dos neurônios do plexo mioentérico do cólon na moléstia de Chagas experimental no camundongo branco (*Mus musculus*). Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo. 22:192-203, 1967.
- Oliveira EC, Fujisawa MM, *et al.* Neuropathy of gastrointestinal Chagas' disease: immune response to myelin antigens. Neuroimmunomodulation. 16 (1): 54-62, 2009.
- Owens MW, Grisham MB. Cytokines increase proliferation of human intestinal smooth muscle cells: possible role in inflammation-induced stricture formation. Inflammation. 17: 481-487, 1993.
- Parada H, Carrasco HA, *et al.* Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. Int J Cardiol. 60 (1): 49-54, 1997.
- Pedrosa RC, De Bem AF, Locatelli C, Geremias R, Wilhelm Filho D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. Redox Report. 6: 265-270, 2001.
- Perrone-Bizzozero NI, Neve RL, Irwin N, Lewis S, Fischer I, Benowitz LI. Post-transcriptional regulation of GAP-43 mRNA levels during neuronal differentiation and nerve regeneration. Mol. Cell Neurosci. 2: 402-409, 1991.
- Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. Auton Neurosci. 106: 69-83, 2003.
- Piedras J, Gutierrez S, Reyes-Lopez PA, Reyes K, Lopez-Karpovitch X, *et al.* Circulating lymphocyte subpopulations and activated T and B cells in patients with chagasic and non-chagasic myocardiopathy. Cytometry. 30: 28-32, 1997.
- Pinheiro, S. W., A. M. Rua, *et al.* Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. Rev Soc Bras Med Trop. 36 (4): 461-466, 2003.

- Pol A, Gross SP, Parton RG. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. J Cell Biol. 204(5):635–46, 2014.
- Prata A, Dias JC, Coura JR. The beginning of the disease. Rev Soc Bras Med Trop. 44 Suppl 2:6-11, 2011.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 1(2): 92-100, 2001.
- Qu ZD, Thacker M, *et al*. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. Cell Tissue Res. 334 (2): 147-161, 2008.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 17;375(9723):1388-402, 2010.
- Reed SG, Browneell C E, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 153:3135-3140, 1994.
- Reed SG. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. J Immunol. 140:4342–4347, 1988.
- Reinshagen M, Patel A, Sottili M, Nast C, Davis W, Mueller K, Eysselein V. Protective function of extrinsic sensory neurons in acute rabbit experimental colitis. Gastroenterology. 106(5):1208-1214, 1994.
- Renzi D, Mantellini P, Calabrò A, Panerai C, Amorosi A, Paladini I, Salvadori G, Garcea MR, Surrenti C. Substance P and vasoactive intestinal polypeptide but not calcitonin gene-related peptide concentrations are reduced in patients with moderate and severe ulcerative colitis. Ital J Gastroenterol Hepatol. 30(1):62-70, 1998.
- Rezende-Oliveira K, Sarmiento RR, Junior VR. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 45(1):45-50, 2012.
- Ribeiro BM, Crema E, *et al*. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. Hum Immunol. 69 (8): 484-9, 2008.
- Ribeiro U, Safatle-Ribeiro AV, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues JJ, Sohn J, Reynolds JC. Effect of Chagas' disease on nitric oxide-containing neurons in severely affected and unaffected intestine. Dis Colon Rectum. 41: 1411-1417, 1998.
- Rivera LR, Poole DP, Thacker M, Furness JB. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. Neurogastroenterol Motil. 23(11):980-988, 2011.
- Rizo J, Rosenmund C. Synaptic vesicle fusion. Nat Struct Mol Biol. 15(7): 665–674, 2008.
- Romana C, Kirschbaum M. Chagas' disease; clinico-epidemiologic inquiry. Rev Asoc Med Argent. 15-30;67(759-760):422-3, 1953.
- Sánchez G, Zulantay I, Gajardo M, Venegas J, Villanueva R, *et al*. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes from Chilean chronic chagasic patients by flow cytometry. Rev Med Chil. 130: 363–367, 2002.
- Sanders KM, Torihashi S, Ordog T, Koh SD, and Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. Neurogastroenterol Motil. 11: 311–338, 1999.
- Sang Q, Williamson S, *et al*. Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. J Anat. 190 (Pt 2): 209-222, 1997.
- Sang Q, Young HM. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. Anat Rec. 251 (2): 185-199, 1998.
- Santer RM. Survival of population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine aged rats. J Auton Nerv Syst. 49: 115-121, 1994.

- Santos CAB. Estudo morfológico e morfométrico do esôfago do cão normal e na fase aguda da tripanosomíase cruzi experimental com referência especial ao plexo mioentérico, Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 74 pp, 1998.
- Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz. 104 Suppl 1: 246-251, 2009.
- Savidge TC, Sofroniew MV, *et al*. Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. Lab Invest. 87 (8): 731-736, 2007.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 115(1-2):14-21, 2010.
- Shaheen EL, Kirchgessner A. Neuroinflammation bowel disease. Journal of Neuroinflammation. 7:37, 2010.
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). J Exp Med. 174:539-545, 1991.
- Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. Biol. 20: 191-203, 1953.
- Sirica AE. Cellular and Molecular Pathogenesis. Lippincott-Raven, Philadelphia. New York, 1996.
- Sosa-Estani S, Colantonio L, Segura EL. Therapy of chagas disease: implications for levels of prevention. J Trop Med. 2012.
- Strittmatter SM, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC. Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. Cell. 80, 445-452, 1995.
- Tafuri WL, Lima-Pereira FE, Bogliolo L, Raso P. Lesões do Sistema nervosa autônomo e do tecido muscular estriado esquelético na fase crônica da tripanosomose cruzi experimental. Estudos aos microscópio óptico e eletrônico. Rev Goiana Med. 25: 61-67, 1979.
- Tafuri WL, Maria TA, *et al*. Electron microscopy of the myocardium in human trypanosomiasis cruzi. Rev Inst Med Trop São Paulo. 15 (6): 347-370, 1973.
- Tafuri WL. Light and electron microscopy studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. Virchows Arch A Pathol Pathol Anat. 354:136-149, 1971.
- Tafuri WL, Maria TA, Lopes ER. Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study. Rev Inst Med Trop São Paulo. 13: 76-91, 1971.
- Tafuri WL. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas disease: light and electron microscope studies. Am J Trop Med Hyg. 19: 405-417, 1970.
- Tafuri WL, Brener Z. Lesões dos plexos de Meissner e de Auerbach do intestino do camundongo albino na fase crônica da tripanosomíase cruzi experimental. Rev Inst Med Trop São Paulo. 9: 149-154, 1967.
- Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. J Gastroenterol. 38(5):421-430, 2003.
- Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). J Smooth Muscle Res. 39 (5): 137-161, 2003.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JCS, Michailowsky V, Santos PVA, Murta SMF, *et al*. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-g as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. Microbes Infect. 2:851-866, 2000.
- Taxi J. Contribution a l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. Ann Sci Nat Zool Biol Anim. 7: 413-674, 1965.
- Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells. Adv Anat Embryol Cell Biol. 71: 1-130, 1982.

- Todd IP, Porter NH, *et al.* Chagas disease of the colon and rectum. Gut. 12: 1009-1014, 1969.
- Torihashi S, Ward SM, Nishikawa SI, Nishi K, Kobayashi S, and Sanders KM. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. Cell Tissue Res. 280: 97–111, 1995.
- Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. Infect Immun. 74: 2477–2481, 2006.
- te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW: Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. Inflamm Bowel Dis. 12:995-999, 2006.
- Umezawa ES, Nascimento MS, *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 9: 2143-2147, 1996.
- Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. Arch Histol Cytol. 2: 109-126, 2002.
- Vago AR, Silva DM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Ávila Reis D. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in esophagus without megaesophagus. Trans R Soc Trop Med Hyg. 97: 308-309, 2003.
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DA, Côrrea-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic Chagas disease. Lancet. 348: 891-892, 1996.
- Veloso VM. Doença de Chagas experimental em cães da raça Beagle: avaliação clínica, parasitológica, histopatológica e molecular. Belo Horizonte. 2007. (Tese de doutorado)
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, *et al.* Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? Clin Exp Immunol. 145: 81–92, 2006.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, *et al.* Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD162CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. Scand J Immunol. 62: 297–308, 2005.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JE, Gontijo D, Faria AM, *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. Scand J Immunol. 68:516-525, 2008.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull World Health Organ. 53(1):55-65, 1976.
- Walther TC, Farese RV Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. Annu Rev Biochem. 81:687–714, 2012.
- Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 281 (3): G602-611, 2001.
- Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY, and Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. Gastroenterology. 115: 314–329, 1998.
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, and Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene *c-kit* blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. J Physiol (Lond). 480: 91–97, 1994.
- Wells RW, Lourenssen S, Blennerhassett MG. Impaired acetylcholine-induced smooth muscle contraction in colitis involves altered calcium mobilization and AKT phosphorylation. Pflügers Arch. 456: 507–517, 2008.
- Wells RW, Blennerhassett MG. Divergent changes to muscarinic and serotonergic signalling following colitis. Gut. 54: 1699–1706, 2005.
- Wells RW, Blennerhassett MG. Persistent and selective effects of inflammation on smooth muscle cell contractility in rat colitis. Pflügers Arch. 448: 515–524, 2004.
- World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet (Updated March 2017). 2014.

World Health Organization. Chagas Disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). Wkly Epidemiol Rec. 85: 334-336, 2010.

Zhang, L. e R. L. Tarleton. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis. 2 : 480-486, 1999.

Zypen E van der. Licht un elektronenmikroskopische Befunde am vegetativen Nervensystem des colon bei colitis ulcerosa des Menschen. Deutsche Zeitschr. 187: 787-836, 1965.
