

MAYRA FERNANDA RICCI

**Megacólon chagásico: contribuições à compreensão da patogênese a partir de estudos experimentais em modelo murino *in vivo* e *in vitro* do sistema nervoso entérico.**

BELO HORIZONTE

2020

MAYRA FERNANDA RICCI

**Megacólon chagásico: contribuições à compreensão da patogênese a partir de estudos experimentais em modelo murino *in vivo* e *in vitro* do sistema nervoso entérico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutora em Patologia, na área de concentração de Patologia Investigativa.

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

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Samantha Ribeiro Béla

BELO HORIZONTE

2020

043

Ricci, Mayra Fernanda.

Megacólon chagásico: contribuições à compreensão da patogênese a partir de estudos experimentais em modelo murino *in vivo* e *in vitro* do sistema nervoso entérico [manuscrito] / Mayra Fernanda Ricci. - 2020.

265 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rosa Maria Esteves Arantes. Coorientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Samantha Ribeiro Béla.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Doença de Chagas. 3. Megacolo. 4. Óxido Nítrico. 5. Espécies Reativas de Nitrogênio. 6. Neurônios Nitrérgicos. 7. Sistema Nervoso Entérico. I. Arantes, Rosa Maria Esteves. II. Béla, Samantha Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616

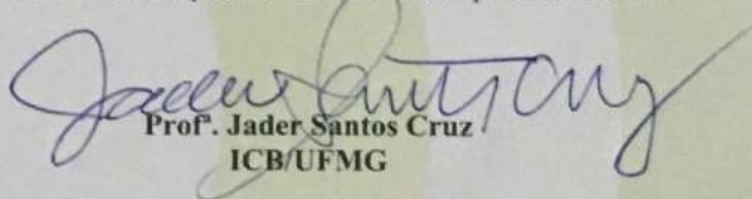
## FOLHA DE APROVAÇÃO

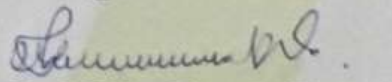
**"MEGACÓLON CHAGÁSICO: CONTRIBUIÇÕES À COMPREENSÃO DA PATOGÊNESE A PARTIR DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM MODELO MURINO IN VIVO E IN VITRO DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO"**

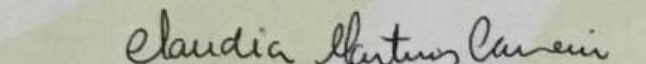
**MAYRA FERNANDA RICCI**


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de **Doutor em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

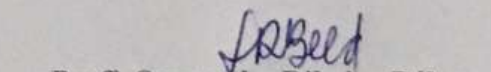
Aprovada em 16 de abril de 2020, pela banca constituída pelos membros:

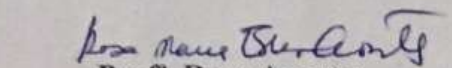
  
Prof. Jader Santos Cruz  
ICB/UFMG

  
Prof. Helen Lima Del Puerto  
ICB/UFMG

  
Prof. Claudia Martins Carneiro  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas/UFOP

  
Prof. Paulo Marcos da Matta Guedes  
Centro de Biociências - UFRN

  
Prof. Samantha Ribeiro Béla  
ICB/UFMG - COORIENTADORA

  
Prof. Rosa Arantes  
ICB/UFMG - ORIENTADORA

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho é fruto de um sonho que foi realizado não apenas por mim, mas por muitas pessoas, com as quais compartilho essa vitória.

Primeiramente agradeço às agências financiadoras CAPES, CNPq e Fapemig, pela infraestrutura do Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental - NIPE e pela bolsa de doutorado.

À minha orientadora Profa. Rosa Maria Esteves Arantes, você sempre será para mim um exemplo de educadora, sou grata pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada nesta trajetória. Seus conselhos serão sempre lembrados.

À minha co-orientadora Profa. Samantha Ribeiro Béla. Desenhamos juntas esse trabalho e você esteve comigo em todos os percalços diários do doutorado. Ensinou-me a sonhar alto e nunca desistir da ciência. Obrigada!

Aos Professores (as) Doutores (as) componentes da banca por aceitarem o convite para participar da minha defesa de tese.

Ao Departamento de Patologia, onde esse trabalho foi realizado. Aos professores da Pós-Graduação em Patologia, que auxiliaram na minha formação.

Aos técnicos do Departamento de Patologia Geral/UFMG, que realizaram o processamento histológico das amostras sempre com paciência e bom humor frente às demandas solicitadas.

Aos colaboradores, que foram de grande importância neste trabalho: Profa Lucía Piacenza e Prof. Rafael Radi do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidad de la Republica em Montevideú. À Profa. Luciana O. Andrade do departamento de Morfologia, ICB/UFMG, que sempre manteve seu laboratório de portas abertas. E à Profa. Maria Terezinha Bahia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), que auxiliou nas demandas burocráticas e laboratoriais mesmo antes do início deste projeto.

A todos os meus colegas do NIPE, onde pude ter a oportunidade de realizar minha iniciação científica e onde obtive muitos aprendizados que formaram a pesquisadora que sou hoje. E em especial à Joana, a quem agradeço a ajuda e força em todos esses anos.

Às meninas, Tamara, Gianne, Danielle e Quezya que vivenciaram e compartilharam comigo os momentos desta “roda-gigante” que é o doutorado. Nossas conversas e trocas de experiências foram fundamentais para a finalização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, irmãos e sobrinhos: vocês são a minha fortaleza. Agradeço o apoio incondicional frente às minhas escolhas que, por diversas vezes, me levaram por caminhos opostos ao de vocês. Esse trabalho é nosso!

Ao Júnior, meu amor sua compreensão é admirável. Agradeço seu companheirismo e apoio que me ajudaram a tornar esse sonho uma realidade.

À Deus e à minha fé, que sempre norteiam meus caminhos.

E a todos que me ajudaram de alguma forma. Obrigada!

## RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Uma das apresentações da DC crônica é a forma gastrointestinal. O megacólon foi descrito como manifestação tardia da DC por Koberle na década de 50, e desde então a participação do sistema nervoso entérico intrínseco no controle da função muscular da parede intestinal tem sido aventada como o mecanismo patogênico. No modelo murino de megacólon chagásico estabelecido por nosso grupo observamos perda de corpos neuronais nos gânglios do plexo mioentérico apenas na fase aguda, acompanhado de desnervação (axonal) intramuscular em todos os períodos a partir de 7 meses pós infecção (m.p.i.) com impacto no aumento da espessura da parede muscular a partir de 12 m.p.i. Padronizou-se uma cultura primária de neurônios mioentéricos que se desenvolve na presença de células musculares lisas. As culturas infectadas com as cepas Y e Dm28c de *T. cruzi* apresentaram grande número de neurônios nitrérgicos, os quais se encontravam parasitados, e exibiram maior oxidação pela sonda DAF-FM, que detecta espécies reativas de nitrogênio (ERN). Os mecanismos de morte neuronal *in vitro* na fase aguda envolveram danos à estrutura mitocondrial do neurônio (estresse oxidativo) e processo inflamatório agudo enquanto o mecanismo de desnervação axonal ocorre de forma progressiva na fase crônica em associação com a persistência do DNA do parasito e presença de infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos CD8+ e alterações fenotípicas das células musculares lisas. Em estudos de motilidade *in vivo* e ensaios eletrofisiológicos e farmacológicos *ex vivo* paralelos à cinética experimental observou-se alteração da amplitude de contração da musculatura lisa, bem como sua ritmicidade na infecção crônica (15 m.p.i.). Os ensaios farmacológicos sugerem alterações na resposta funcional do receptor muscarínico. Na fase aguda o bloqueio por atropina diminuiu a resposta contrátil, ocorrendo o contrário na fase crônica. Tais respostas em conjunto com a observação de diminuição da expressão do receptor muscarínico (WB) indica dano estrutural na fase crônica. Já o bloqueio dos receptores nicotínicos na fase aguda levou a aumento de amplitude de contração nos animais infectados, em correlação com aumento da expressão destes receptores. Esse estudo integra a história natural da doença de Chagas na fase aguda e crônica e abre perspectivas para o desenho de intervenções terapêuticas direcionadas aos mecanismos patogênicos da doença intestinal.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, Patogênese, Megacólon, Modelo experimental, Óxido nítrico (NO), Espécies reativas, Neurônios nitrérgicos, Sistema nervoso entérico (ENS), Músculo liso intestinal, Desordens de motilidade.

## ABSTRACT

Chaga's disease (CD) can be presented as a gastrointestinal alteration, called megacolon. Megacolon have been diagnosed since the 50s, and were described as a late manifestation of CD by Koberle in 50's decade. In the murine chagasic megacolon model established by our group, we observed loss of neuronal bodies in the myenteric plexus ganglia only in the acute phase, accompanied by intramuscular (axonal) denervation in all periods starting from 7 months post infection (m.p.i.) with an impact of increased muscle wall thickness on 12 m.p.i. murine model. We standardized a primary culture of myenteric neurons that develops in the presence of smooth muscle cells. Cultures infected with *T. cruzi* (strains Y and Dm28c) have a large number of nitrergic neurons, which were parasitized, and exhibited greater oxidation by the DAF-FM probe, which detects reactive nitrogen species (RNS). The mechanisms of neuronal death *in vitro* in the acute phase involved damage to the mitochondrial structure of the neuron (oxidative stress) and acute inflammatory process while the axonal denervation mechanism occurred progressively in the chronic phase in association with the persistence of the parasite's DNA and presence of mononuclear inflammatory infiltrate with a predominance of CD8+ lymphocytes and phenotypic changes in smooth muscle cells. In studies of motility *in vivo* and electrophysiological and pharmacological tests *ex vivo*, we observed changes in the amplitude of contraction of smooth muscles, as well as their rhythmicity in chronic infection (15 m.p.i.). The pharmacological tests suggest changes in the functional response of the muscarinic receptor. In the acute phase, atropine blockade decreased the contractile response, with the opposite occurring in the chronic phase. Such responses in conjunction with the observation of decreased muscarinic receptor (WB) expression indicates structural damage in the chronic phase. The blockade of nicotinic receptors in the acute phase, on the other hand, led to an increase in the amplitude of contraction in infected animals, in correlation with increased expression of these receptors. This study integrates the natural history of Chagas' disease in the acute and chronic phase and opens perspectives for the design of therapeutic interventions aimed at the pathogenic mechanisms of intestinal disease.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Pathogenesis, Megacolon, Experimental model, Nitric oxide (NO), Reactive Species, Nitrergic neurons, Enteric nervous system (ENS), Intestinal smooth muscle, Motility disorder.



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Neurotransmissores na DC	29
Tabela 2. Anticorpos utilizados	53
Tabela 3. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para RT-PCR no cólon dos camundongos controles e infectados	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental	47
Figura 2. Faixa de linearidade da PCR em tempo real quantitativa	57
Figura 3. Parâmetros de infecção e curva de mortalidade dos camundongos	68
Figura 4. Aspectos histopatológicos de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> indicam alterações estruturais na parede colônica	71
Figura 5. Análise semiquantitativa de focos inflamatórios nos cólons dos camundongos infectados	72
Figura 6. Subtipos de linfócitos no infiltrado inflamatório	73
Figura 7. Imuno-histoquímica para anti- <i>T. cruzi</i> no cólon dos camundongos infectados e análise quantitativa de DNA do parasito	74
Figura 8. Imunomarcção para PGP 9.5 nos cólons de camundongos Swiss infectados com 50.000 tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	76
Figura 9. Desnervação do sistema nervoso entérico ganglionar e intramuscular nos camundongos infectados ao longo do desenvolvimento do megacólon	77
Figura 10. Hipertrofia e aumento da espessura da camada de músculo liso interno ao longo do tempo nos camundongos infectados	78
Figura 11. Imunomarcção para anti- $\alpha$ -actina no músculo liso de camundongos Swiss controle e infectados com 50.000 tripomastigotas da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	79
Figura 12. Imunofluorescência para o marcador anti- $\alpha$ -actina de músculo liso. Análise da intensidade de fluorescência nos tempos de 24, 48 e 72 horas de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	81
Figura 13. Aspectos morfológicos descritivos nas culturas de neurônios entéricos controle e infectado pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	83
Figura 14. Análise da intensidade de fluorescência no tempo de 24 horas após a infecção pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	84
Figura 15. Imunomarcção para anti- $\beta$ -tubulina III e anti-nNOS nas culturas de neurônios entéricos controle e infectado pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	85
Figura 16. Quantificação de óxido nítrico através da sonda DAF-FM nos cultivos entéricos de células controle e infectadas com as cepas de <i>T. cruzi</i> Y e DM28c	87
Figura 17. Aumento da produção de nitrito nos cultivos ativados com IFN $\gamma$ e infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> pela reação de Griess	88

Figura 18. Perda da função mitocondrial nos cultivos entéricos infectados com as cepas de <i>T. cruzi</i> Y e DM28c	90
Figura 19. Aumento da intensidade de fluorescência na razão entre verde/vermelho nos cultivos infectados com as cepas Y e DM28c	91
Figura 20. Células neuronais infectadas com as cepas Y e DM28c apresentam maior expressão de MnSOD2	93
Figura 21. Imunofluorescência para os anticorpos anti-nNOS (verde) e anti-MnSOD2 (vermelho) nos cultivos de neurônios entéricos	94
Figura 22. Expressão de MnSOD2 por <i>Western Blot</i> em cultivos de neurônios entéricos controle e infectado	95
Figura 23. Imunofluorescência para os anticorpos anti-NO <sub>2</sub> -Tirosina (NO <sub>2</sub> -Tirosina) (verde) nos cultivos de neurônios entéricos controle e infectado	96
Figura 24. Aumento da nitrosilação através da medida quantitativa de intensidade de fluorescência nos cultivos infectados com a cepa Y e DM28c	97
Figura 25. Fluorescência relativas de CM-H2DCFDA oxidada presente em culturas primárias de neurônios entéricos de camundongos, 48 e 72 horas após a infecção com a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	98
Figura 26. Avaliação da motilidade colônica	99
Figura 27. Avaliação da motilidade total	100
Figura 28. Avaliação do trânsito colônico e motilidade total utilizando a piridostigmina	101
Figura 29. Padrões de respostas elétricas induzidas por estimulação (Hz) nos fragmentos de cólon de camundongos controle e infectado	103
Figura 30. Análise da contratilidade do cólon em banho de órgãos <i>ex vivo</i> para a ACh, L-NAME e L-NAME + ACh	105
Figura 31. Caracterização das respostas inibidas pela via muscarínica, neural e nicotínica em fragmentos de cólons mostrando as amplitudes nas fases aguda e crônica	107
Figura 32. Expressão de receptores nicotínicos e muscarínicos nos cólons dos camundongos infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	108
Figura 33. Expressão de receptores excitatórios e inibitórios de neurônios saudáveis e neurônios aguda e cronicamente infectados por <i>T. cruzi</i>	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BH4</b>	Tetraidrobiopterina
<b>Bz</b>	benznidazol
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CFA</b>	Controle de fase aguda
<b>CFC</b>	Controle de fase crônica
<b>ChAT</b>	Colina acetiltransferase
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro
<b>DAF-FM</b>	4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>d.p.i</b>	Dia pós-infecção
<b>ERN</b>	Espécies Reativas de nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>FMRP</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<b>FAD</b>	Flavina adenina dinucleotídeo
<b>FMN</b>	Flavina mononucleotídeo
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HFF</b>	<i>Human Foreskin Fibroblasts</i>
<b>ICCs</b>	Células intersticiais de Cajal
<b>IFA</b>	Infectado de fase aguda
<b>IFC</b>	Infectado de fase crônica
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>iNOS</b>	Sintase de óxido nítrico induzida
<b>JC-1</b>	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio

<b>L-NMMA</b>	NG-monometil-L-arginina
<b>L-NIO</b>	N-imino-etil-Lornitina
<b>L-NAA</b>	NG-amino-L-arginina
<b>L-NA</b>	NG-nitroL-arginina
<b>L-NAME</b>	NG-nitro-L-arginina-metil-éster
<b>m.p.i.</b>	Meses pós-infecção
<b>NANC</b>	Não adrenérgico e não colinérgico
<b>MnSOD2</b>	Superóxido dismutase manganês do tipo 2
<b>NPY</b>	Neuropeptídeo Y
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>NHA</b>	NG-hidroxi-L-arginina
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>nNOS</b>	Sintase de óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b><i>p</i></b>	Valor de probabilidade
<b>PC12</b>	Linhagem derivada de feocromocitoma da supra renal de ratos
<b>PBS</b>	Solução salina de fosfato tampão
<b>PDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do parasito
<b>PGP 9.5</b>	Produto proteico do gene 9.5
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>SNA</b>	Sistema nervoso autônomo
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNE</b>	Sistema nervoso entérico
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TrKA</b>	Tirosina quinase A
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UFOP</b>	Universidade Federal de Ouro Preto
<b>VaChT</b>	Transportador vesicular de acetilcolina
<b>VIP</b>	Polipeptídeo intestinal vasoativo

<b>Kg</b>	Quilogramas
<b>μL</b>	Microlitros
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mg</b>	Miligramas
<b>μM</b>	Micromolar
<b>G</b>	Gravitacional
<b>°C</b>	Graus Celsius

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
SUMÁRIO .....	13
1.INTRODUÇÃO .....	18
1.1 A Doença de Chagas .....	18
1.1.1 Sistema nervoso e doença de Chagas .....	23
1.2 Neurotransmissores do Trato Gastrointestinal .....	28
1.3 Motilidade intestinal .....	34
2.OBJETIVO GERAL .....	43
Objetivo específico 2.2.1. ....	43
Objetivo específico 2.2.2. ....	43
Objetivo específico 2.2.3. ....	43
Objetivo específico 2.2.4. ....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
3.1. Cuidados éticos .....	45
3.2. Estudo <i>in vivo</i> – Megacólon chagásico experimental induzido por infecção crônica pelo <i>T. cruzi</i> .....	45
3.2.1. Amostra .....	45
3.2.2. Desenho experimental .....	45
3.2.3. Procedimentos experimentais .....	46
3.2.4. Curva de parasitemia e mortalidade .....	47
3.2.5. Ensaio da função intestinal - Motilidade colônica .....	48
3.2.6. Ensaio da função intestinal - Motilidade gastrointestinal total .....	48
3.2.7. Ensaios eletrofisiológicos – Banho de órgãos .....	48
3.2.8. Coleta e processamento histológico do cólon .....	51

3.2.9. Quantificação do infiltrado inflamatório .....	51
3.2.10. Imuno-histoquímica .....	52
3.2.11. Obtenção de imagens .....	53
3.2.12. Medida de espessura da parede muscular .....	54
3.2.13. Medida de plexo mioentérico e inervação muscular .....	54
3.2.14. Quantificação da área da célula muscular lisa intestinal da hipertrofia da célula muscular .....	54
3.2.15. Extração de DNA genômico .....	55
3.2.16. qPCR .....	56
3.2.17. Padronização da curva padrão da curva de diluição padrão para quantificação do DNA do parasito.....	56
3.2.19. Extração de RNA para análise da expressão de neurotransmissores .....	57
3.2.20. Síntese do cDNA .....	58
3.2.21. RT-PCR .....	58
3.3. Estudo <i>in vitro</i> - Cultivo de neurônios entéricos .....	59
3.3.1. Amostra .....	59
3.3.2. Obtenção e plaqueamento das células .....	59
3.3.3. Infecção por <i>Trypanosoma cruzi in vitro</i> .....	60
3.3.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por células infectadas ...	61
3.3.5. Avaliação da produção de oxidantes pelo cultivo de neurônios entéricos primários .....	61
3.3.6. Potencial de membrana mitocondrial em neurônios entéricos primários, glia e músculo liso infectados por <i>T. cruzi</i> .....	62
3.3.7. Imunofluorescência e documentação fotográfica .....	62
3.3.8. Medidas de intensidade de fluorescência .....	63
3.3.9. Avaliação da produção de nitrito nos cultivos entéricos .....	63
3.4. Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> – Western Blot .....	63
3.4.1. Avaliação da expressão de proteínas de receptores colinérgicos em fragmentos de cólon ( <i>in vivo</i> ).....	63
3.4.2. Avaliação da expressão de MnSOD2 em culturas entéricas ( <i>in vitro</i> ) .....	64
3.6. Análises estatísticas .....	65



4.RESULTADOS .....	67
4.1. Tratamento com benznidazol em dose subterapêutica na fase aguda diminui a taxa de mortalidade permitindo a cronificação da infecção e o desenvolvimento de lesões teciduais intestinais (megacólon) .....	68
4.1.2. O megacólon murino desenvolve-se ao longo do tempo e produz alterações estruturais na parede colônica .....	69
4.1.3. A inflamação da parede intestinal é difusa na fase aguda e permanece focal nas fases crônicas.....	71
4.1.4. A caracterização fenotípica parcial (CD4 e CD8) do infiltrado inflamatório na fase aguda e crônica da infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	72
4.1.5. DNA do parasito foi significativamente maior na fase aguda através de quantificação do PCR e por imuno-histoquímica para anti- <i>T. cruzi</i> .....	73
4.1.5.1. A padronização foi capaz de quantificar a presença do <i>T. cruzi</i> em uma faixa linear .....	73
4.1.6. Imuno-histoquímica anti- <i>T. cruzi</i> e quantificação de DNA do parasito por PCR..	73
4.1.7. Evidências de desnervação ganglionar e intramural dos grupos crônicos infectados.....	75
4.1.8. Quantificação da densidade de inervação intramural e da progressão da perda (despopulação) neuronal ganglionar do plexo mioentérico .....	77
4.1.9. Hipertrofia progressiva da camada muscular circular dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> associada à hipertrofia da célula muscular lisa.....	78
4.1.10. Alterações do padrão de expressão do biomarcador de músculo liso, $\alpha$ -actina indicando alterações induzidas no músculo liso ao longo do desenvolvimento do megacólon chagásico.....	79
4.1.11. Diminuição das fibras musculares marcadas para anti- $\alpha$ -actina <i>in vitro</i> nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	80
4.1.12. Caracterização das culturas de neurônios entéricos controle e infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	82
4.1.13. Diminuição da intensidade de fluorescência de corpo neuronal e de densidade neurítica nas culturas entéricas infectadas.....	84
4.1.14. Evidências de identificação de neurônios nNOS+ infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	84
4.1.15. Os neurônios entéricos são uma fonte de NO produzido pela ativação da nNOS pelo <i>T. cruzi</i> bem como por IFN $\gamma$ .....	85
4.1.16. Aumento da produção de NO nos cultivos ativados com IFN $\gamma$ e infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	88

4.1.17. Há evidências de dano mitocondrial em neurônios durante a infecção pelas cepas Y e DM28c de <i>T. cruzi</i> .....	88
4.1.18. Aumento da razão entre intensidade de fluorescência verde (monômeros)/fluorescência vermelha (agregados) de JC-1 nos cultivos infectados (Y e DM28c) indica maior despolarização mitocondrial nos neurônios infectados.....	91
4.1.19. A expressão de MnSOD2 é (principalmente) aumentada em células neuronais de culturas infectadas <i>in vitro</i> .....	92
4.1.20. Aumento da Intensidade de fluorescência de MnSOD2 em neurônios nNOS+ infectados com <i>T. cruzi</i> em comparação aos não infectados.....	94
4.1.21. Maior expressão de MnSOD2 em culturas infectadas e infectadas mais ativadas com IFN $\gamma$ .....	95
4.1.22. Aumento da intensidade de fluorescência anti-3-NO $_2$ -tirosina em células com morfologia neuronal infectadas por <i>T. cruzi</i> .....	95
4.1.23. Aumento da intensidade de fluorescência nos compostos neuronais nitrosilados nos cultivos infectados com a cepa Y e DM28c.....	96
4.1.24. Os cultivos infectados com a cepa Y não apresentaram aumento da produção de ROS detectável através da sonda CM-H $_2$ DCFDA.....	97
4.2. Ensaio de motilidade <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> .....	98
4.2.1. O tempo de trânsito colônico <i>in vivo</i> encontra-se aumentado a partir de 7 m.p.i. .	99
4.2.2. O tempo de trânsito intestinal total está aumentado, mas varia ao longo da cinética de infecção .....	99
4.2.3. O aumento da biodisponibilidade de ACh na junção neuromuscular não reverte o distúrbio de motilidade na fase crônica aos 15 m.p.i. ....	100
4.2.4. Ensaio de estímulos elétricos <i>ex vivo</i> (banho de órgãos do cólon de camundongos controle e infectados) .....	101
4.2.5. Avaliação de receptores colinérgicos na resposta contrátil <i>ex vivo</i> e sua modulação pela via do NO .....	104
4.2.6. Avaliação das respostas neural e muscular na contratilidade induzida pela ACh. .	106
4.2.7. Alteração na expressão receptores muscarínicos e nicotínicos, mAChR M3 e AChR $\alpha$ 7, respectivamente no decorrer da infecção aguda para crônica 15 m.p.i.....	107
4.2.8. Expressão de neurotransmissores excitatórios e inibitórios do cólon dos camundongos do grupo controle e infectado.....	108
DISCUSSÃO .....	110
CONCLUSÃO .....	127
PERSPECTIVAS .....	130

REFERÊNCIAS .....	131
ANEXOS .....	163
1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....	163
2. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....	164
3. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFOP) .....	165
4. Manuscrito 1 submetido a Journal of Experimental Medicine.....	166
6. Manuscrito submetido a Plos Neglected Tropical Diseases – Colaboração.....	221
5. Manuscrito 2 – Em preparação ( <i>Draft</i> ).....	222
7. Outras publicações 1.....	263
8. Outras publicações 2.....	264
9. Outras publicações 3.....	265

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical de grande abrangência que atinge 5,7 milhões de pessoas em 21 países - o que a torna uma das dez doenças tropicais prioritárias para controle e erradicação (OMS, 2015). Os custos globais anuais com assistência à saúde aos chagásicos são da ordem de 627 milhões de dólares, devido às incapacidades geradas pela alta morbidade da doença na forma crônica, o que poderia ser evitado se a patologia fosse tratada na fase aguda (PETERSON et al., 2015) ou se houvesse algum tratamento não cirúrgico para as manifestações crônicas.

A infecção do hospedeiro ocorre quando formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) presentes nas fezes do inseto vetor, o barbeiro, entram nas lesões de pele e/ou mucosa acidentalmente após o repasto sanguíneo do triatomíneo vetor e ganham o acesso sistêmico (MONTGOMERY et al., 2014).

A fase aguda dessa infecção é caracterizada pela alta parasitemia e parasitismo, o que induz uma importante resposta sistêmica pró-inflamatória que com o decorrer da infecção, apesar da redução substancial da parasitemia e do parasitismo, ainda apresenta algum grau de inflamação detectado em determinados tecidos como o miocárdio, sendo essa resposta inflamatória mantida por toda a vida do hospedeiro (TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002a; DUTRA et al., 2014).

Apesar da presença da resposta inflamatória na fase inicial da DC, os sintomas resultantes da infecção raramente são preocupantes (PITTELLA, 1991). Já na fase crônica, a despeito de os pacientes não apresentarem quaisquer sintomas associados à DC (fase indeterminada), em geral, 10 a 30 anos após a infecção, as manifestações patológicas resultam em alterações no funcionamento do coração, o que determina a forma cardíaca, e/ou em alterações gastrointestinais, o que caracteriza a forma digestiva da doença (ROMANA, 1956; KOBERLE, 1968; ALTSCHEH, 2010).

Células infectadas são capazes de responder à infecção ativando diversos genes, os quais poderiam interferir com o comportamento intracelular do parasito (VAENA DE AVALOS et al., 2002; COSTALES; DAILY; BURLEIGH, 2009; MANQUE et al.,

2011). Houston-Ludlam, Belew e El-Sayed (2016) analisaram os transcriptomas de células HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*) 24 horas após a infecção com populações distintas do *T. cruzi* pertencentes a DTU's (*discrete typing units*) do tipo TcI e TcII. Estas células apresentaram genes regulados positivamente para respostas do tipo I de IFN. O gene da superfamília de ligante do TNF associado com a indução de apoptose em células tumorais também mostrou uma maior expressão de 24 para 72 horas após infecção nestes fibroblastos. O transcriptoma das células HFF analisados nos momentos iniciais após a infecção com a cepa Y do *T. cruzi* apresentaram genes regulados positivamente para o ciclo celular da célula hospedeira e resposta imune (HOUSTON-LUDLAM; BELEW; EL-SAYED, 2016; LI et al., 2016). Estudos mostraram que cardiomiócitos, H9C2 (*American Type Culture Collection* (ATCC): CRL-1446) de uma linhagem de células ventriculares embrionárias de ratos, após a infecção com o *T. cruzi* apresentaram um aumento na produção de Interleucina 1 $\beta$ , bem como o aumento, já duas horas após a infecção, da expressão gênica da ciclooxigenase 2, importante na produção de mediadores inflamatórios (MORAES; DINIZ; BAHIA, 2015). Cardiomiócitos, além de um importante alvo da infecção pelo *T. cruzi*, são capazes de responder a esta infecção produzindo muitas citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), geradas devido à disfunção da mitocôndria. Tais substâncias são também importantes para o controle do *T. cruzi* e podem ser citotóxicas para componentes da célula hospedeira (MACHADO et al., 2000; GUPTA et al., 2009). Essas respostas não foram estudadas em neurônios entéricos ou em células musculares lisas.

A produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$  - *Tumor Necrosis Factor alpha*) e a Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), também foi detectada em cardiomiócitos primários infectados com *T. cruzi*; e estas citocinas, junto com Interferon gama (IFN $\gamma$ ), mostraram-se importantes para a indução de óxido nítrico e para o controle da infecção pelo parasito (MACHADO et al., 2000). A produção destas mesmas citocinas e a produção de Interleucina-6 (IL-6) também foram detectadas em fibroblastos em outras patologias cardíacas, e são importantes na remodelação do tecido cardíaco e na indução de fibrose(PORTER; TURNER, 2009)

Outra citocina importante no estabelecimento da infecção celular pelo *T. cruzi* é o Fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$  - *Transforming growth factor beta*). A inibição da via de sinalização de TGF- $\beta$  leva ao aumento da invasão celular, do número de parasitos por célula e da taxa de transformação das formas amastigotas em formas tripomastigotas (WAGHABI et al., 2007). Há também modelos nos quais fora, estudados a resposta neuronal simpática e entérica (ALMEIDA-LEITE et al., 2007) e a produção de citocinas em pacientes com megacólon (RIBEIRO; CREMA; RODRIGUES, 2008), bem como sua relação com o dano neuronal e sua produção de citocinas que culminam na lesão tecidual (DOS SANTOS et al., 2001; SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003; ARANTES et al., 2004; SILVA et al., 2015). O envolvimento dos neurotransmissores durante a infecção pelo *T. cruzi* demonstra a grande influência exercida durante a instauração dos processos patológicos, sendo numerosos estudos de diversos autores acerca do assunto (MAIFRINO; LIBERTI; DE SOUZA, 1999; AKPAN et al., 2008; MOREIRA et al., 2013; MARTINS et al., 2014), mas não na DC. As células musculares lisas também estão envolvidas em todo o processo patológico por compor a estrutura intestinal e também se comunicarem em um circuito músculo/fibras neurais permitindo a atuação funcional intestinal (DEFARIA; DE REZENDE; RASSI, 1988; RIBEIRO et al., 1998; CAMPOS et al., 2016). Foi descrito mecanismo neurogênico atuando na patogênese do dano ao músculo liso (GONZÁLEZ CAPPÀ et al., 1987). Estudos de infecção pelo *T. cruzi* de cultivos neuronais *in vitro* (ALMEIDA-LEITE et al., 2007) e também de músculo liso não-infectado (BLENNERHASSETT; LOURENSSEN, 2000) foram desenvolvidos, embora restem lacunas que este trabalho buscou elucidar na DC experimental.

Além de citocinas e outros fatores secretados pelas células, em resposta à infecção, a colonização celular pelo *T. cruzi* também pode gerar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS provêm da redução do oxigênio, gerando um grupo de íons, moléculas e radicais altamente reativos. Numerosas fontes intracelulares podem gerar ROS. Além da mitocôndria e da enzima NADPH oxidase, outras fontes celulares são geradoras de ROS, como flavoenzima ERO1, xantina oxidase, ciclooxigenases, citocromo P450, lipoxigenases, entre outras (KLAUNIG et al., 2011; KRUMOVA;

COSA, 2016). As espécies reativas vão atuar principalmente causando sérios danos em macromoléculas biológicas, tais como lipídios, ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* – DNA), ácido ribonucleico (*ribonucleic acid* – RNA) e proteínas (KLAUNIG et al., 2011). A maioria das espécies reativas de oxigênio são geradas na mitocôndria como subproduto da cadeia respiratória. O termo ROS engloba radicais livres de oxigênio, tal como o radical ânion superóxido ( $O^{2\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e oxidantes não radicais, tal como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). As espécies reativas de oxigênio participam também de muitos processos biológicos, tais como a biossíntese hormonal, sinalização celular e destruição de patógenos intracelulares (RADA; LETO, 2008; NÜSSE, 2011; LANDRY; COTTER, 2014; ZOROV; JUHASZOVA; SOLLOTT, 2014; ROMA et al., 2016). Essas moléculas estão também relacionadas com a ativação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B (PANTANO et al., 2006), MAP quinase/AP-1 (mitogen-activated) (BENHAR; ENGELBERG; LEVITZKI, 2002) e o fator de transcrição induzível de hipóxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) (RANKIN; GIACCIA, 2008). Trabalhos recentes em lesões pelo *T. cruzi* em cardiomiócitos também evidenciam a participação de ROS e ativação de diversas vias relacionadas ao estresse oxidativo (DIAS et al., 2017; ESTRADA et al., 2018).

A participação de ROS em neurônios entéricos necessita maiores investigações. Sabemos que a inflamação intestinal gera distúrbios de motilidade, em parte, por interromper a sobrevivência de neurônios entéricos por mecanismos de estresse oxidativo, entretanto é importante destacar que não se sabe como os mecanismos antioxidantes autônomos dos neurônios contribuem para a suscetibilidade dos neurônios entéricos ao estresse oxidativo nas doenças inflamatórias (BUBENHEIMER et al., 2016).

O comprometimento dos sistemas cardíaco e digestivo na DC pode variar de leve a grave, dependendo da extensão do dano tecidual e de acordo com a morbidade causada pela doença (PRATA, 2001). Uma das alterações presentes na forma gastrointestinal da DC é o megacólon. Os “megas” eram muito mais frequentes no Brasil nos anos 40-50, e foram descritos como manifestação tardia da DC por Koberle (KOBERLE, 1956a). O megacólon chagásico, uma das complicações da moléstia, é

relativamente frequente no Brasil e já foi considerada a doença cirúrgica mais comum do intestino grosso. No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, o megacólon chagásico ocupou o 5º lugar entre as doenças do tubo digestivo com maiores ocorrências de intervenção cirúrgica. Em 10 anos, de janeiro de 1985 a dezembro de 1994, foram operados 160 pacientes (76 na última metade da década de 80, e 84 na primeira metade da década de 90), devido ao megacólon, o que representa em média, 5,8% de todas as operações feitas, por ano, na especialidade de coloproctologia (SANTOS JÚNIOR, 2002). Conforme relatado na literatura médica em geral, também na Bolívia a principal causa de megacólon é a DC. Em uma investigação, 22% (98 pacientes) apresentaram sorologia positiva (SARAIVA; ACOSTA, 2015).

Koberle implicou a infecção pelo *T. cruzi* em duas manifestações distintas da doença, a saber: 1. doença de Chagas em sentido estrito (*strict sense*), isto é, infecções por tripanossomas induzindo uma fase “septicêmica” aguda, seguida por desenvolvimento de resistência específica com instalação à fase crônica e escassa parasitemia; 2. sequelas da DC, ou manifestações tardias, que se desenvolvem como resultado da extensa destruição de células ganglionares no sistema autonômico periférico e/ou no sistema nervoso central durante a fase aguda (KOEBERLE, 1959). Tanto o esôfago quanto o intestino grosso têm uma redução parcial ou total do número de neurônios que afeta toda a extensão desses órgãos. Além disso, a redução quantitativa no número dos plexos nervosos é observada em todos os segmentos do trato alimentar (CAMARA-LOPES, 1961). Os achados e as interpretações conflitantes das características histopatológicas que são a base da aperistalse têm uma explicação possível nos seguintes fatos: (1) A maioria dos patologistas concentra-se nas mudanças qualitativas dos plexos mioentéricos e não costuma dar ênfase à análise quantitativa ou (2) Os espécimes estudados microscopicamente podem não ser representativos. Via de regra, a amostra intestinal é coletada arbitrariamente de qualquer parte do espécime cirúrgico ou autópsia, ou é obtida como uma tira fina da camada muscular da cárdia ou da junção sigmóide retal em uma cirurgia não-excisional. No entanto, Koberle e seus colegas na faculdade de medicina de Ribeirão Preto (F.M.R.P.) realizaram uma análise quantitativa completa das alterações nas células ganglionares, onde sugeriram que a



intensa desnervação observada na fase aguda e na fase crônica poderia ser a responsável pelo desenvolvimento dos “megas” (megacólon e megaesôfago) observados na DC. (KOBERLE; DE ALCANTARA, 1960).

No megaesôfago e no megacólon aventa-se algum grau de destruição do sistema nervoso periférico, que supostamente precede as mudanças na motilidade. Pode haver, portanto, desnervação severa na presença de um calibre esofágico normal. Koberle descreveu, na década de 50, a existência de lesões nas camadas musculares, embora sem defini-las como primárias ou secundárias à desnervação. As lesões descritas pelo autor, foi realizada a partir de seus estudos em uma área endêmica, onde 15 a 20% dos pacientes chagásicos desenvolveram alterações de motilidade, secreção e absorção no trato digestivo, especialmente no esôfago e no cólon. As alterações na motilidade surgiam primeiramente com trânsito lento e dificuldade de esvaziamento, seguidas pelo aumento do calibre do órgão e aumento da dificuldade de esvaziamento, caracterizando a presença de megaesôfago (grau I a IV) ou megacólon (KOBERLE; NADOR, 1955a; KOBERLE, 1956b).

A colonopatia não ectásica foi demonstrada pela manometria e pela resposta a uma substância colinérgica (metacolina), mas os sintomas de dismotilidade surgiram apenas quando o megacólon estava já instalado, geralmente com sintomas de constipação (MARTINS; MORAIS; CUNHA-MELO, 1993; PRATA, 2001; MARTINS et al., 2018).

### **1.1.1. Sistema nervoso e doença de Chagas**

Os esforços para descrever as lesões do sistema nervoso periférico, atribuídas ao sistema nervoso autônomo (SNA), iniciaram-se com os trabalhos de Tafuri e outros na década de 60 (TAFURI; BRENER, 1966), no contexto da teoria proposta por Bayliss e Starling (1901) sobre peristaltismo associado à inervação intestinal (BAYLISS; STARLING, 1901). No entanto, chama a atenção como os trabalhos posteriores contribuíram pouco para o entendimento e a discussão da patogênese das manifestações intrínsecas gastrointestinais. Em revisões, como a de Prata (2001), publicada na revista *Lancet*, há referência à desnervação do sistema nervoso autonômico e central como

sendo responsável pelo megacólon, e nenhuma menção ao papel da lesão do sistema nervoso entérico (SNE) de fato, e embora o trabalho tenha 45 referências, quando se trata do envolvimento do trato digestivo não existem referências associadas às afirmações do autor (PRATA, 2001). É provável que o autor estivesse usando as nomenclaturas antigas para as divisões do sistema nervoso, no entanto, em 2001 o SNE já era citado como protagonista em várias doenças intestinais (BROOKES, 2001; CAMILLERI, 2001; GARIEPY, 2001).

Um dos fatores de dificuldade para a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos no desenvolvimento do megacólon chagásico é o desconhecimento a respeito dos elementos estruturais e funcionais do intestino e do SNE. A complexidade SNE já se faz notar pelo seu histórico. Nos últimos 25 anos avanços significativos foram feitos nos detalhes operacionais e estruturais do circuito no SNE. Somente no final de 1980 um livro dedicado ao SNE foi escrito pela primeira vez (FURNESS; COSTA, 1987). Em meados da década de 90 uma descrição definitiva das maiores classes de neurônios entéricos foi publicada (COSTA et al., 1996). Mais recentemente uma atualização do livro citado de 1987 (FURNESS, 2006), assim como artigos de revisão com ênfases estruturais e funcionais vem sendo publicados (BAYLISS; STARLING, 1899; BROOKES; COSTA, 2002, 2006; BORNSTEIN; COSTA; GRIDER, 2004a).

Langley foi o autor que invocou três razões para definir o SNE como a terceira divisão do SNA. Suas evidências apontavam em primeiro lugar para aspectos histológicos distintos dos neurônios entéricos em relação aos neurônios de outros gânglios autonômicos (LANGLEY, 1903, 1921). Além disto, as conexões dos neurônios entéricos com fibras nervosas extrínsecas eram muito mais escassas comparadas com as conexões autonômicas entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e os gânglios autonômicos em geral. Por fim, o autor apontou as vias reflexas, capazes de operar sem conexão com o SNC, e seus argumentos têm sido reforçados por estudos recentes em fisiologia e organização estrutural (FURNESS, 2006). A relativa autonomia do SNE provavelmente só não foi descrita completamente naquela época devido à morte prematura de John Newport Langley, em 1925. Em termos de números

de neurônios, o SNE é a maior divisão do sistema nervoso periférico, contendo em humanos entre 200-600 milhões de células.

O SNA tem, segundo a maioria dos autores, os componentes simpático, parassimpático e o entérico. O trato gastrointestinal (TGI) é autorregulado a partir da transição entre músculo estriado esquelético da entrada da faringe para musculatura lisa. A partir daí uma rede organizada em duas camadas abriga 200-600 milhões de neurônios (JÄNIG, 2006), algumas vezes referida como '*little brains*' (ARMOUR, 2008), e constituída por uma rede de fibras parassimpáticas pré-ganglionares e neurônios pós-ganglionares, que recebem fibras nervosas simpáticas, e fazem sinapses com axônios sensoriais formando um "circuito local". Este cenário é bastante complexo e até hoje difícil de discernir em nível morfológico e funcional. Estas conexões suprem tecidos efetores, como músculo liso da parede intestinal, revestimento epitelial, vasos sanguíneos intrínsecos e células endócrinas gástricas e entero-pancreáticas. A inervação muscular se dá através de vários contatos íntimos entre as terminações nervosas e o músculo liso intestinal (COSTA, 2006; COSTA; BROOKES, 2008). As camadas musculares do TGI que direcionam a propulsão e a mistura dos conteúdos têm função de reservatório (principalmente no estômago) e também promovem a expulsão de patógenos e agentes nocivos.

A participação do sistema nervoso entérico intrínseco no controle da função muscular coordenada bem como o papel de vias nervosas originadas fora do trato alimentar varia de acordo com a região do TGI e com as circunstâncias fisiológicas. Enquanto circuitos tronco-cerebrais localizados na medula oblonga (SNC) são determinantes no controle dos movimentos do esôfago, os movimentos gástricos propulsivos são primariamente miogênicos, embora monitorados centralmente. Por outro lado, o SNE é dominante no controle da motilidade dos intestinos delgado e grosso, com exceção para a defecação na qual a medula espinhal lombo sacral age sob controle central (DE GROAT et al., 1981; HASLER, 2003; FURNESS, 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). Dessa forma, neuropatias entéricas entre as quais se insere o megacólon chagásico, no qual o controle neural da contratilidade muscular ou

controle dos movimentos de fluidos transmuralis falham, podem ser altamente mórbidas e mesmo fatais (FURNESS, 2012).

O megacólon vem sendo considerado uma alteração funcional decorrente das respostas inflamatórias agudas e crônicas, induzidas pela infecção por *T. cruzi* em humanos (CÔBO et al., 2012), e suas conseqüentes alterações estruturais associadas não são completamente explicadas. Os estudos sistematizados dos aspectos histopatológicos dos “megas” foram iniciados por Koberle e Nador (KOBERLE; NADOR, 1955b) nos quais as investigações das alterações da inervação limitavam-se a contagens neuronais em chagásicos crônicos, com e sem “megas” (KOBERLE; NADOR, 1955b; KOBERLE, 1957, 1958, 1968; KOBERLE; DE ALCANTARA, 1960; KOERBELE, 1963), e às pesquisas sobre aspectos ultraestruturais do SNE por Tafuri (TAFURI; MARIA; LOPES, 1970; TAFURI, 1971). Alguns destes estudos foram reproduzidos na última década (NASCIMENTO et al., 2010; JABARI et al., 2011, 2012, 2014) confirmando a desnervação em fragmentos intestinais e em biópsias de pacientes com megacólon e megaesôfago, bem como alterações na proporção de fibras nervosas intrínsecas inibitórias e excitatórias e de células enterogliais. Apesar das evidências encontradas serem importantes para complementar os achados histopatológicos da doença, nesses experimentos a limitação da amostragem total do colón e a fragmentação de resultados, que apenas indicam pontualmente a provável causa do distúrbio, sem levar em consideração a sua natureza multifatorial, apontam a necessidade de investigações mais completas e integradas a fim de explicar o fenômeno do megacólon desde seu início até sua instauração definitiva. Além disso, os achados descritivos não permitem avançar na compreensão de mecanismos envolvidos.

O tropismo e a patologia resultantes da localização do parasito têm sido fortemente ligados às cepas do *T. cruzi* (MCCALL; MCKERROW, 2014). A infecção por *T. cruzi* está associada ao recrutamento de células inflamatórias dependente da dose do parasito e ao dano no colón (VAZQUEZ et al., 2015), o que pode perturbar também a microbiota intestinal, como atualmente tem sido proposto (MCCALL et al., 2018). Há um grande caminho a percorrer neste contexto ao se revisar os modelos experimentais.

No estudo (MCCALL et al., 2018), foram realizadas coletas fecais e obtenção de imagens nos estágios agudo e subagudo da doença (as coletas foram realizadas quinzenalmente, ao longo de 3 meses). A avaliação histopatológica não mostrou nenhum dano tecidual aparente ou infiltrado inflamatório em camundongos infectados em comparação com camundongos não infectados (MCCALL et al., 2018). No trabalho de Lewis e colaboradores observou-se que distribuição do parasito através do TGI é altamente localizada durante o estágio crônico de infecção com a cepa CL Brener, não podendo ser descartada a possibilidade de outras regiões do cólon estarem alteradas pela infecção (LEWIS et al., 2014). Portanto MCCALL e colaboradores (2018) ao integrarem o microbioma com dados do metaboloma, mostraram que alterações microbianas estão associadas a alterações funcionais no ambiente químico intestinal que podem estar afetando as respostas inflamatórias do hospedeiro, sugerindo espaço para investigação adicional sobre a conexão do *T. cruzi*-microbiota e seu papel na patogênese da DC intestinal.

Entre os mecanismos propostos, a persistência do parasito (TEIXEIRA et al., 2011) têm sido considerada como um papel direto na manutenção da inflamação crônica, com consequente dano tecidual (ROMAN-CAMPOS et al., 2016). No entanto, a escassez ou ausência de parasitismo de órgãos na fase crônica dificulta a conciliação dessa explicação (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). Portanto, existe um consenso crescente de que o equilíbrio entre persistência da infecção e resposta imune do hospedeiro é crucial para o estabelecimento e progressão da cardiomiopatia chagásica (MACHADO et al., 2012; DUTRA et al., 2014).

Os resultados do nosso grupo, nos quais o cólon em toda sua extensão foi amostrado e analisado em modelo experimental murino, estão revistos abaixo, e implicam a presença da inflamação e a presença do DNA do parasito de forma correlacionável. Em um estudo prévio de nosso laboratório, desenvolvemos um modelo de megacólon chagásico murino (CAMPOS et al., 2016), que resultou em redução dos neurônios entéricos excitatórios e aumento relativo dos inibitórios (RICCI et al., 2016). Estas respostas foram concomitantes com observação de alterações fenotípicas das células musculares lisas da parede intestinal que estava espessada à custa de fibrose

relativamente discreta e focal. As respostas foram observadas pontualmente aos 11 dias e aos 15 meses após a inoculação, apontando o nosso interesse em obter dados nos intervalos de tempo intermediários entre a infecção e o aparecimento das alterações da parede muscular. Esses dados fornecerão bases para a compreensão dos diversos fenômenos biológicos ao longo do processo de instalação das alterações no animal infectado visando um melhor entendimento do desenvolvimento do megacólon.

Uma vez que a inervação entérica é um importante fator para a manutenção da contratilidade gastrointestinal (BLENNERHASSETT; LOURENSSEN, 2000), hipotetizamos que o envolvimento do SNE nessa doença, em resposta à inflamação, desnervação e alteração do perfil funcional neuronal, interfere no controle da proliferação e hipertrofia de células musculares lisas intestinais e na motilidade gastrointestinal, o que pretendemos testar em nosso modelo.

Nesse sentido, estudos anteriores, principalmente publicados por pesquisadores brasileiros, sugerem que os processos inflamatórios no intestino humano com megacólon levam à lesão neuronal no plexo mioentérico, com consequente diminuição do número de neurônios, o que pode estar relacionado com as alterações da função digestiva descritas em pacientes chagásicos (KOBERLE, 1968; DE OLIVEIRA et al., 1998). Além disso, a perda de células ganglionares no cólon está também associada à constipação intestinal em modelos de colite e envelhecimento (TAKAHASHI et al., 2000; PELLETIER et al., 2010).

Além da importância dos neurônios diretamente envolvidos na patologia, os principais neurotransmissores (NT) responsáveis pela homeostase e manutenção das funções intestinais também parecem afetados no desenvolvimento do megacólon (JABARI et al., 2011, 2012; RICCI et al., 2016).

## **1.2. Neurotransmissores do Trato Gastrointestinal**

Os dois principais neurotransmissores encontrados no TGI são a acetilcolina (ACh) e o óxido nítrico (NO). No entanto, há inúmeros neurotransmissores cuja as

modificações já foram sugeridas na DC humana (H) e experimental (E), como descrito a seguir e resumido na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais neurotransmissores envolvidos na DC intestinal

Neurotransmissores na DC		
Neurotransmissor	Função	NT+DC
ACh	Excitatória	↓ (JABARI et al., 2011) (H)
NO	Inibitória	-(JABARI et al., 2012) (H); (RICCI et al., 2016) (E)
CGRP	Sensorial	↓ (BURNSTOCK; GRIFFITH, 1988) (H)
NPY	Inibitória	-(DA SILVEIRA et al., 2007) (H) ↓ (DEFARIA; DE REZENDE; RASSI, 1988) (H); (BURNSTOCK; GRIFFITH, 1988) (H)
Sub P	Excitatória	↑ (RENZI et al., 2000) (H); (DA SILVEIRA et al., 2007) (H); (DA SILVEIRA et al., 2008) (H) ↓ (MAIFRINO; LIBERTI; DE SOUZA, 1999) (E)
NK1R	Excitatória	↓ (RENZI et al., 2000) (H); (DA SILVEIRA et al., 2007) (H); (DA SILVEIRA et al., 2008) (H)
VIP	Inibitória	- (JABARI et al., 2012) (H) ↓ (MAIFRINO; LIBERTI; DE SOUZA, 1999) (E)

**ACh** – acetilcolina; **NO** – óxido nítrico; **CGRP** – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; **NPY** – neuropeptídeo Y, **Sub P** – substância P, **NK1R** – receptor de neuroquinina 1, **VIP** – polipeptídeo intestinal vasoativo. Setas indicam aumento ou diminuição do neurotransmissor, e traço indicam que o neurotransmissor não se alterou na patologia. (H) indicam experimentos em humanos e (E) experimentos em animais.

A descoberta de que pequenos peptídeos estavam presentes em neurônios entéricos inaugurou várias descrições de populações de neurônios entéricos contendo neuropeptídeos específicos. A partir destes estudos, a natureza complexa dos circuitos entéricos altamente organizados começou a emergir. Por exemplo, a identificação de neurônios mioentéricos somatostatina-positivos que dão origem a processos que terminam apenas em outros gânglios entéricos os definiu como interneurônios e descartou sua função motora (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004).

Para outros peptídeos a situação não era tão simples pois a imunorreatividade da substância P estava presente em um grande número de fibras nervosas presentes na maioria dos tecidos alvo incluindo os gânglios mioentérico e submucoso, vasos sanguíneos, e todas as camadas musculares e mucosas.

Achados semelhantes aplicaram-se aos peptídeos VIP e opioides. Um dos maiores problemas associados com a abordagem imuno-histoquímica é que as terminações dos neurônios entéricos identificados não puderam ser prontamente estabelecidas. A proliferação de descrições por técnica imuno-histoquímica de peptídeos em cortes histológicos de intestino aumentou o problema, com muitos autores descrevendo estes aspectos, mas sem integrar as observações sobre a importância das funções dos neuropeptídeos no intestino (COSTA; FURNESS, 1982; COSTA; FURNESS; GIBBINS, 1986).

Apesar da promessa inicial de descobrir os papéis dos neuropeptídeos entéricos, uma série de problemas emergiu. Um estudo analítico completo requer inúmeras combinações e permutações de experimentos apenas para estabelecer quais formas moleculares estão realmente presentes nos neurônios entéricos e ainda quais os receptores estariam envolvidos. Métodos analíticos de purificação, separação e síntese são necessários para desvendar a complexidade das famílias de peptídeos. Poucos laboratórios desenvolveram a combinação necessária de métodos para uma investigação sistemática da crescente variedade de peptídeos descobertos. O processo de identificação molecular dos peptídeos entéricos está longe de ser completo e levanta a questão de quanto trabalho se justifica e como isso afeta a interpretação de resultados histoquímicos e farmacológicos, uma vez que focar em um único peptídeo implica em perder o contexto mais amplo da complexidade neuroquímica funcional. Se somarmos a estas dificuldades à questão de encontrar um modelo experimental apropriado para estudar a DC e a oportunidade escassa de obter amostras humanas fica ainda mais claro porque a maioria dos estudos em DC e neuropeptídeos intestinais e neuronais são fragmentários (ALMEIDA et al., 1977; DA SILVEIRA et al., 2008; MOREIRA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013).



Por sua vez a identificação de neurônios motores entéricos excitatórios e inibitórios foi bem estabelecida com bases funcionais, na década de 1970. Importante destacar que no final da década de 1960, neurônios inibitórios intrínsecos foram redescobertos e chamados não adrenérgicos-não colinérgicos (NANC) (LANGLEY, 1921; KOSTERLITZ; PIRIE; ROBINSON, 1956; CREMA; FRIGO; LECCHINI, 1970; BURNSTOCK; COSTA, 1973; BENNETT, 1997).

O simples experimento de remover o plexo mioentérico *in vivo* no intestino delgado de cobaia permitiu abordar este problema. Após “miectomia” todas as fibras nervosas desapareceram da camada circular do músculo, demonstrando que se originariam em, ou atravessariam gânglios mioentéricos (WILSON et al., 1987), localizando pois, neste plexo, a maioria dos neurônios motores. Já a questão de saber se apenas duas classes de axônios estão presentes no músculo e correspondem inequivocamente ao neurônio excitatório e inibitório ainda gera controvérsias. Dois bons marcadores histoquímicos para fibras nervosas no músculo circular, a Substância P (co-transmissor de neurônios motores excitatórios), e VIP (um importante transmissor de neurônios inibitórios entéricos (FAHRENKRUG, 1979) foram estudados, mas isto não exclui a possibilidade de outros neurotransmissores estarem presentes, de forma que esta visão dualista de uma inervação inibitória e excitatória (LLEWELLYN-SMITH et al., 1988) tem sido revista (WILSON et al., 1987; LLEWELLYN-SMITH et al., 1988; UEMURA et al., 1998), embora tenha aplicação em sistemas mais simplificados. Os neurônios poderiam co-localizar NT inibitórios e excitatórios no corpo neuronal e até mesmo nas fibras nervosas tornando ainda mais complexo o estudo da função via imuno-histoquímica e imunofluorescência (BROOKES; STEELE; COSTA, 1991; PELAYO et al., 2014).

Em estudos iniciais detalhados por imuno-histoquímica de subpopulações entéricas na década de 1980, ficou claro que certos marcadores foram associados a populações morfológicas específicas e que algumas combinações de marcadores identificam melhor um tipo neuronal. Isso deu origem ao conceito de “Codificação química” que propunha que todas as classes de neurônios entéricos com formas e combinações específicas de marcadores químicos eram provavelmente associadas com

uma função específica. Da mesma forma, uma única classe funcional de neurônio entérico compartilharia formas e combinações semelhantes de marcadores (COSTA; FURNESS; GIBBINS, 1986).

A ACh medeia a neurotransmissão no SNC e SNP. É essencial em diversas funções, mas em específico no SNP tem função importante na rapidez da neurotransmissão sináptica excitatória (GALLIGAN et al., 2000). No SNE os neurônios mioentéricos colinérgicos são imunorreativos para a ChAT e incluem neurônios aferentes primários e neurônios motores excitatórios em estudo realizado em cobaias (FURNESS, 2006).

Akpan e colaboradores (2008), mostraram que as formas tripomastigotas de *T. cruzi* extracelular, via fator neurotrófico derivado do parasito (PDNF) estimulam a expressão mRNA e proteínas da acetilcolina transferase (ChAT) e do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) em células neuronais colinérgicas da linhagem derivada de feocromocitoma da supra renal de ratos (PC12) através da ativação de tirosina quinase A (TrkA), enquanto que a infecção intracelular de *T. cruzi* tem o efeito oposto. Seus resultados sugerem que a invasão do *T. cruzi* no sistema nervoso desregula o metabolismo da ACh, que pode ser importante na neuropatologia que caracteriza a progressão da DC (AKPAN et al., 2008).

Em 1991 utilizando a marcação retrógrada, neurônios motores excitatórios foram identificados utilizando acetilcolina, o que foi detectado por imunorreatividade para a enzima ChAT (colina acetiltransferase). A distribuição imuno-histoquímica desta enzima confirmou o papel principal de acetilcolina como transmissor excitatório de neurônios entéricos motores (BROOKES; STEELE; COSTA, 1991). Entretanto, estimulação transmural provocou contrações mediadas por nervos que eram resistentes aos antagonistas do receptor de acetilcolina. Evidência inicial de que a substância P foi provavelmente responsável por estas contrações foi suportada pelo achado anatômico de que as taquicininas são co-localizadas com ChAT em neurônios entéricos projetando para o músculo.

A ideia de mecanismos envolvendo múltiplas transmissões agora amplamente aceitas para a maioria dos neurônios foi anatomicamente fundamentada por estas

observações. Já a identificação do sistema motor inibitório entérico para o músculo circular também foi concluída no início dos anos noventa, usando traçador retrógrado combinado com imuno-histoquímica para a enzima óxido nítrico sintase (NOS) (COSTA et al., 1992). A descoberta subsequente de que VIP extraído do tecido intestinal tinha uma ação relaxante no músculo intestinal (FAHRENKRUG, 1979; SAID, 2007) e sua localização nas terminações nervosas nas camadas musculares (LARSSON et al., 1976) levou a propor papel inibitório para este transmissor (GRIDER et al., 1985). Assim neurônios inibitórios podem utilizar mais de um mecanismo para relaxar o músculo.

A síntese de NO envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O<sub>2</sub>) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) são utilizados como co-fatores na reação (MARLETTA et al., 1988; MARLETTA, 1994).

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estéreos específicos da NOS (REES et al., 1990; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para i-NOS (SZABÓ, 1995). Vários destes inibidores têm sido utilizados em estudos da função do NO, tanto em células isoladas como *in vivo*.

A localização da enzima sintética, NOS, nos neurônios mioentéricos que se projetam para o músculo e sua localização sub-celular em neurônios mioentéricos (LLEWELLYN-SMITH et al., 1992), confirmou que o NO é um dos neurotransmissores dos neurônios motores inibitórios entéricos. A evidência que provavelmente há apenas uma classe de neurônios inibitórios que contêm e utilizam

uma combinação de VIP, NO e ATP parece convincente, mas há uma lacuna para estabelecer os mecanismos de ação dos transmissores em diferentes partes do intestino, em diferentes espécies e em diferentes condições fisiológicas ou patológicas.

O óxido nítrico (NO) atualmente é considerado o neurotransmissor inibitório predominante (RAJFER et al., 1992; SANDERS; WARD, 2019), e é acoplado via receptores pós-funcionais não tradicionais (ou seja, proteínas citoplasmáticas). Os mecanismos intracelulares envolvidos no relaxamento e na hiperpolarização da musculatura lisa do trato gastrointestinal resumidamente envolvem a ativação da guanilil ciclase que leva à produção de cGMP, ativando a proteína quinase G, que ativa os canais  $K^+$  diminuindo a sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  e assim provendo efeito funcional na musculatura lisa (KOH et al., 1995, 2001; SAUZEAU et al., 2000; KHROMOV et al., 2006).

Os critérios estabelecidos na década de 1950 para uma substância ser um transmissor exigiam as seguintes características: de se assemelhar, de presença, síntese, liberação, inativação. O mesmo transmissor pode estar presente em diferentes classes de neurônios. Da mesma forma, ausência de uma substância transmissora, demonstrada por imuno-histoquímica, pode não implicar a sua total ausência do neurônio (PORTER et al., 1997, 1998). Conclusões simplistas sobre a etiologia das doenças deduzidas da ausência de um único neuroquímico podem ser evitadas adotando o conceito de codificação química.

### **1.3. Motilidade intestinal**

Durante a última década, o campo da pesquisa do peristaltismo gastrointestinal tem sido dominado pela Lei do intestino, descrita pela primeira vez por Bayliss e Starling (BAYLISS; STARLING, 1901), onde observaram registros de alterações no comprimento e na pressão intraluminal de um segmento isolado de intestino estimulado, indicando atividade peristáltica ou reflexo mioentérico (CANNON, 1912; COSTA; FURNESS, 1976).

A motilidade do cólon é controlada por processos interativos complexos no intestino, envolvendo tanto a atividade das células nervosas (neurogênica) quanto à atividade muscular espontânea (miogênica).

A atividade dos vários neurônios mioentéricos aumenta ou diminui de maneira coordenada durante a peristalse. O reflexo consiste de dois componentes: relaxamento descendente (ex. relaxamento caudal para um bolo de comida) e contração ascendente (ex. contração oral para o mesmo bolo), que serve para propeler o bolo através do intestino. O mesmo reflexo permite a passagem do bolo através de esfíncteres relaxados. O conteúdo colônico, ao contrário do intestino delgado, requer horas ou dias para passar através do comprimento do cólon. A ingestão de comida é um estímulo fisiológico principal para a atividade motora colônica. As respostas motoras colônicas ao comer são dirigidas por um componente duplo, cerebral e gástrico e podem ser provocadas tanto pela alimentação como pela distensão gástrica. A defecação é frequentemente precedida por um aumento nas contrações de alta amplitude do cólon, contrações fortes do cólon que propagam em cerca de dois minutos do ceco para o colo distal e varrem os conteúdos luminares aboralmente (ALTAF; SOOD, 2008).

A motilidade gastrointestinal resulta de contrações coordenadas da *tunica muscularis*, das camadas internas e externas do trato gastrointestinal (TGI). Durante a maior parte do TGI, os músculos lisos são organizados em duas camadas de feixes musculares orientados circular ou longitudinalmente. As células do músculo liso formam junções elétricas e mecânicas entre as células facilitando a coordenação das contrações. O acoplamento excitação-contração ocorre pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por canais iônicos na membrana plasmática, levando a um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  à calmodulina ativa a quinase da cadeia leve da miosina; a fosforilação subsequente da miosina inicia a ciclagem cruzada. A fosfatase da miosina desfosforila a miosina para relaxar os músculos, sendo um processo conhecido como sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  regulando a atividade da fosfatase.

Muitos tecidos e órgãos do músculo liso gastrointestinal exibem atividade "autônoma". A atividade espontânea do marcapasso no estômago, intestino delgado e cólon (ondas elétricas lentas) que organiza os padrões contráteis em contrações fásicas

que são a base dos padrões de motilidade peristáltica ou segmentar (SZURSZEWSKI; MILLER, 1990). A atividade do marcapasso é intrínseca aos músculos gastrointestinais e não depende de estímulos neurais ou hormonais, embora o grau de acoplamento entre a atividade do marcapasso e as contrações seja altamente dependente de informações regulatórias e neurais. A atividade basal das ondas lentas gera contrações de baixa amplitude, e as entradas neurais inibitórias ou excitatórias modulam a amplitude das contrações durante cada ciclo (SANDERS et al., 2012).

Os músculos lisos gastrointestinais são "autônomos" e geram atividade elétrica espontânea (ondas lentas) que não dependem da entrada de nervos. A atividade intrínseca da musculatura lisa com função de marcapasso intestinal vem a partir de células intersticiais de Cajal, que estão eletricamente acopladas às células da musculatura lisa. Os padrões de atividade contrátil nos músculos gastrointestinais são determinados pelas entradas dos neurônios motores entéricos que inervam as células musculares lisas e as células intersticiais (SANDERS et al., 2012).

Os ritmos elétricos basais no intestino são bem constantes e caracterizados por ondas lentas. No entanto, células musculares lisas não têm o mesmo mecanismo iônico necessário para regenerar essas ondas. O mecanismo preciso que dispara e ajusta o passo das ondas lentas não é conhecido e somente poucos estímulos que afetam a frequência e a atividade de pico das ondas lentas, são conhecidos. A busca pela origem de ritmo na contração intestinal tem identificado regiões de marca-passo de ondas lentas, localizadas nas bordas mioentéricas e na submucosa de músculos circulares, que contém uma rede operacional de células conhecidas como células intersticiais de Cajal (ICC's) (HANSEN, 2003). Falaremos destas células com mais detalhes em um tópico específico porque seu potencial disfuncional na DC intestinal merece ser investigado.

A nomenclatura mais utilizada na literatura para as redes dessas células no cólon são: ICC-MY (mioentérico), localizada entre as camadas musculares circular (CM) e longitudinal (LM). ICC-IM (intramuscular), localizada dentro dos músculos circulares e longitudinais. ICC-SM (submucoso), localizada na superfície submucosa da camada muscular circular no cólon (TAKAKI, 2003; AL-SHBOUL, 2013). Os fenótipos de progenitores de ICC tem sido observados no intestino de camundongos e já foram

estudados em alguns modelos experimentais (LORINCZ et al., 2008; LI et al., 2019) e em patologias humanas como doença de Hirschsprung (CHEN et al., 2014) e DC (GERALDINO et al., 2006; DE LIMA et al., 2008; JABARI et al., 2013). As ICC's também apresentam três perfis distintos baseados na expressão de imunomarcadores: progenitoras (c-Kit<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>), ICC imatura (c-Kit<sup>hi</sup>CD34<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) e ICCs (maduras) (c-Kit<sup>hi</sup>CD34<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) (LORINCZ et al., 2008). As progenitoras e ICCs imaturas (comprometidas) também existem no cólon humano normal, mas as suas proporções em relação às células ICC maduras podem sofrer grandes variações em situações de injúria (FARRUGIA, 2008; CHEN et al., 2014).

A despolarização espontânea das ICCs em redes oscilatórias gera padrões espaço-temporais de excitação, que são então transmitidas para as células musculares lisas. As oscilações do potencial de membrana do músculo, originalmente chamado de "ondas lentas", podem gerar contração quando os mecanismos contráteis musculares são ativados (HENNIG et al., 2004) e os padrões de contração gerados correspondem à atividade motora miogênica, que vão variar de acordo com as regiões e condições do trato digestivo. As ICCs fornecem um caminho para a propagação ativa das ondas lentas fornecendo um meio de coordenação e propagação de contrações no intestino como base para os padrões de motilidade (SANDERS et al., 2012). A ligação direta de ACh nos receptores muscarínicos do músculo liso ativa o acoplamento excitação-contração em células musculares lisas. Especificamente, um sinal elétrico transmitido da ICC para as células musculares lisas não pode ativar a excitação-contração acoplamento e, portanto, não estimularia contrações do músculo liso. A ICC gera correntes de marca-passo espontaneamente ativas, essas correntes conduzem as atividades elétricas e mecânicas espontâneas das células musculares lisas. A contribuição do plexo neural entérico e das redes de ICC à atividade rítmica espontânea no intestino são descritos, mas seu papel ainda necessita de maiores esclarecimentos (YAMADA et al., 2002), especialmente na DC.

O NO derivado de neurônios modula os números e o volume de ICC no corpo gástrico de um modelo experimental em ratos. O NO parece ser um fator de sobrevivência para a ICC (CHOI et al., 2007). Nervos entéricos e ICC são

frequentemente encontrados próximos e suas interações parecem ser necessárias para manter a função normal do TGI (DANIEL; POSEY-DANIEL, 1984). Em quase todos os distúrbios de motilidade em humanos associados à perda de ICC, há uma perda concomitante de neurônios entéricos (VANDERWINDEN et al., 1996; HORISAWA; WATANABE; TORIHASHI, 1998; HE et al., 2001; WEDEL et al., 2002).

Uma das abordagens utilizadas para estudos de motilidade em modelos experimentais *in vivo* é a medida do tempo necessário para que um conteúdo ingerido alcance um determinado ponto, o tem sido denominado “estudos de trânsito”. Nestes, um material corado é introduzido e o tempo para alcançar outro ponto do trato digestivo pode ser mensurado e, embora seja uma medida objetiva e comparável, não elucida o modo pelo qual o progresso do material é realizado. Nesse trabalho foi utilizada a variação do tempo de trânsito total (ingestão do corante até a sua eliminação) e o trânsito colônico (tempo de expulsão de esferas de vidro introduzidas por via retal), para estudar comparativamente e em diversos momentos do desenvolvimento da doença o trânsito intestinal de animais infectados e controle.

Em paralelo, investigações do real comportamento fisiológico do intestino durante a atividade motora avançaram com o desenvolvimento de análises espaço-temporal a partir de gravações de vídeo. A relação entre as vias neurais, suas atividades, e a geração de padrões de atividade motoras, no entanto, permanecem pouco compreendidas. Para estudar a motilidade são utilizados ensaios de função intestinal, entre os quais o modelo descrito (LEMOS et al., 2005; CAPETTINI et al., 2008) no qual fragmentos de cólon são dispostos em um sistema de banho de órgãos e são feitas interferências farmacológicas com diversos fármacos (ACh, tetrodotoxina (TTX), Atropina e L-NAME, no nosso caso). Em geral os resultados obtidos permitem inferir sobre interferências no sistema de condução nervosa e contração muscular que são subjacentes aos fenômenos da motilidade colônica.

Conforme descrito anteriormente, foram os neuroanatomistas alemães, que na segunda metade do Século XIX ao darem evidência à trama de neurônios embebidos dentro da parede intestinal (plexos de Meissner e de Auerbach), inauguraram a história da neurociência do sistema digestório, associando os movimentos do intestino a este



sistema nervoso entérico ao longo dos últimos 140 anos de pesquisas (hipótese neurogênica). Quando na primeira metade do século XX a descrição de atividade motora rítmica do intestino, mesmo na ausência ou paralisação da inervação intrínseca, levou a uma interpretação divergente atribuindo os movimentos intestinais apenas aos músculos lisos intestinais apareceu a hipótese miogênica. Ainda hoje há uma controvérsia envolvendo estas hipóteses, embora saibamos que nenhuma das hipóteses isoladamente é adequada para explicar todos os padrões motores descritos.

Deve-se ressaltar que outro obstáculo importante para a descrição dos padrões motores intestinais diz respeito às suas variações ao longo do trato digestivo. Sabe-se, por exemplo, que o estômago se movimenta de forma diferente do reto, que a natureza físico-química de seus conteúdos varia não só na mesma espécie, mas também em diferentes espécies herbívoras, carnívoras e onívoras, tornando qualquer generalização muito problemática.

As observações mais recentes permitem afirmar que os circuitos neurais entéricos não são rigidamente programados, mas se adaptam a diferentes demandas (hipótese neuro-mecânica). Assim, os repertórios complexos e os variados padrões motores resultariam de uma interação dos mecanismos neurogênicos e miogênicos com mecanismos de geração espontânea de atividade motora migratória pelos circuitos entéricos. O presente trabalho pretende contribuir para o entendimento das relações entre os processos estruturais e as consequências funcionais que resultam no desenvolvimento do megacólon através destas abordagens funcionais.

O músculo liso do TGI é ativo espontaneamente, mesmo na ausência de qualquer estímulo exógeno através de mecanismos de como: regulação neural- presença dos neurônios motores (excitatórios e inibitórios), que inervam as camadas de músculo liso e regulam a força e o padrão das contrações musculares lisas; regulação hormonal - através de diversos agentes circulantes que afetam a contratilidade dos músculos lisos TGI e regulação humoral ou parácrina - onde muitas substâncias produzidas nas células neuroendócrinas nas imediações das células musculares lisas GI afetam sua contratilidade.

Os tecidos que formam o aparato muscular gastrointestinal incluem as múltiplas camadas de células musculares lisas ligadas para formar um sincício funcional que inclui também redes de ICCs. Estes circuitos mantêm o músculo em um estado de excitabilidade oscilante como descrito em uma série de revisões abrangentes (SANDERS, 2006; SANDERS; KOH; WARD, 2006).

Embora o marcapasso-músculo seja capaz de gerar padrões motores complexos está claro que seriam insuficientes para gerar todos os padrões de enchimento e esvaziamento necessários para funções digestivas. O papel essencial do sistema nervoso entérico é interagir com a parede muscular e garantir a progressão do conteúdo ao longo do intestino. Embora extensa análise de circuitos neurais entéricos esteja avançada, a integração entre os diversos componentes motores entéricos, circulatório e da mucosa ainda é pobre e difícil de estudar em modelos experimentais.

Os corpos celulares dos neurônios entéricos são principalmente localizados nos gânglios mioentéricos (Auerbach) e nos gânglios do plexo submucoso (Meissner), formando redes neurais contínuas do esôfago ao canal anal. Com a identificação de classes funcionais de neurônios entéricos, seus perfis neuroquímicos e suas projeções nervosas, avanços importantes nos últimos 30 anos se somaram com o advento da eletrofisiologia *ex-vivo* e intracelular.

A fisiopatologia de distúrbio de motilidade específicos associados a diversas condições experimentais (GOYAL; CHAUDHURY, 2010) reforça o potencial de modelos animais em acrescentar informação em investigação dos mecanismos moleculares para a contração do músculo liso induzida por agonistas (SANDERS et al., 2012). O modelo desenvolvido por nosso grupo tem a vantagem de permitir estudos eletrofisiológicos voltados para a explicação dos eventos e mecanismos que estão na base do aparecimento do megacólon chagásico experimental.

As anormalidades do peristaltismo na DC são de grande interesse do nosso grupo. O segmento dilatado, bem como as áreas adjacentes apresentam alterações fisiopatológicas decorrentes de alterações degenerativas da parede intestinal e do SNE que podem afetar as células musculares lisas e as ICCs desde a fase aguda da doença.

Avançar da compreensão de circuitos neurais para o comportamento fisiológico é um desafio em todos os campos da neurociência. Usar informação de estudos de vias reflexas entéricas talvez seja um começo, para uma explicação de comportamento motor intestinal. Mas estudar doenças complexas como as manifestações tardias da DC no intestino é difícil devido à necessidade de manutenção de um modelo experimental crônico e da avaliação do circuito intestinal ser complexa e com diversos padrões de resposta e atividade. A maioria dos padrões de atividade motora intestinal usam mecanismos vulneráveis ao *T. cruzi* e a respostas induzidas no tecido pelo *T. cruzi*, os quais incluem (1) atividade mio gênica (músculo liso impulsionado pelo marcapasso celular gera propagação regular ou irregular de ondas de contrações); (2) acomodação neural (inibição reflexa dependente da distensão de músculo circular); (3) propulsão neural do peristaltismo (iniciado e mantido por estímulos químicos ou mecânicos intraluminais); (4) complexos motores migratórios (atividade neural entérica espontânea aparentemente independente do conteúdo luminal que varre o intestino em intervalos regulares; pode gerar contrações segmentares quando incompletas durante a fase irregular) (SANDERS et al., 2012).

Considerando os trabalhos prévios, de Ricci (2016) e França (2016) e seus colaboradores, bem como os trabalhos citados que associam a redução dos neurônios à alteração da função digestiva de chagásicos e de idosos (TAKAHASHI et al., 2000; PELLETIER et al., 2010), é plausível supor que os distúrbios de motilidade gastrointestinal, bem como a dilatação colônica, frequentemente observados em pacientes chagásicos, tem seu substrato anatomopatológico, pelo menos em parte, nas alterações da inervação intestinal, e não apenas na desnervação ganglionar. Por outro lado, as relações intrínsecas entre a inervação intestinal e as alterações funcionais e estruturais do megacólon ainda não foram explicadas, exceto pela constatação de uma redução do número de neurônios nos plexos mioentéricos quando o megacólon já está instalado. Assim, consideramos relevante o entendimento da progressiva instalação do megacólon ao longo da cronificação da doença que poderá contribuir no desenvolvimento de estratégias e tratamentos visando à interrupção do processo bem como a melhoria da qualidade de vida desses pacientes, cujas queixas frequentes

englobam meteorismo, irregularidade no peristaltismo e dificuldade de defecar (KOBBERLE, 1968).

Não há dúvidas que um melhor conhecimento dos mecanismos fundamentais da motilidade intestinal pode levar a uma compreensão dos padrões motores na saúde e nas doenças. Em conjunto com a complexidade dos fenômenos envolvidos no desenvolvimento do megacólon chagásico a ser desvendado este se torna um desafio ainda maior.

Além da relevância do entendimento e documentação sistemática do processo de formação do megacólon associado à DC - o que, no nosso modelo será obtido através de avaliações de diversos aspectos histológicos intestinais durante a evolução da infecção em camundongos em vários intervalos de tempo entre a fase aguda, 11 dias após a infecção (d.p.i.) e a fase crônica, 3, 7, 12 e 15 meses após a infecção (m.p.i.), é nosso interesse elucidar o mecanismo por trás das progressivas mudanças estruturais intestinais que levam aos “megas”, bem como as alterações na síntese de neurotransmissores e plasticidade sináptica. Outro importante passo é a compreensão dos mecanismos celulares associados a essas alterações e, para isso, paralelamente, cultivamos neurônios entéricos de camundongos e células musculares lisas *in vitro*, a fim de avaliar os efeitos da infecção e os possíveis mecanismos de dano e proteção neuronal e indicá-los como evidências dos fenômenos observados na fase aguda da DC. A nossa abordagem concomitante dos processos de motilidade intestinal por estudos de trânsito, e banhos de órgãos também nos permitirá avaliar as consequências do processo inflamatório na resposta adaptativa funcional dos neurônios e das células musculares.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a cinética de desenvolvimento e patogênese das alterações estruturais e funcionais do megacólon chagásico em modelo murino de longa duração e perscrutar os mecanismos de dano neuronal *in vitro*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

**2.2.1.** Estudar os aspectos parasitológicos, anatomopatológicos e bioquímicos ao longo da cinética do desenvolvimento do megacólon.

**2.2.2.** Avaliar o efeito da interação de formas tripomastigotas do *T. cruzi* em cultura de neurônios do plexo mioentérico sobre a função e mortalidade de células musculares lisas e neurônios.

**2.2.3.** Avaliar a participação de mecanismos oxidativos no dano neuronal em cultura de neurônios do plexo mioentérico infectadas com *T. cruzi*.

**2.2.4.** Avaliar as alterações de motilidade e do balanço inibitórios e excitatórios correlacionando estes achados com os aspectos morfológicos e bioquímicos encontrados ao longo da cinética do desenvolvimento do megacólon através de ensaios *in vivo* (motilidade colônica e total), *ex vivo* (resposta contrátil do músculo liso intestinal) e expressão dos neurotransmissores.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Aspectos éticos

Este estudo, envolvendo procedimentos com animais, respeitou os princípios estabelecidos pela Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBPA (Edital MCTI nº1 – CONCEA/MCTI) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo de número 262/2016, 25/2018 e ofício Universidade Federal de Ouro Preto 031/2017 (Anexo 1, 2 e 3 respectivamente).

#### **3.2. Estudo *in vivo* – Megacolon chagásico experimental induzido por infecção crônica pelo *T. cruzi*** (CAMPOS et al., 2016)

##### 3.2.1. Amostra

A amostra deste estudo foi composta por camundongos fêmeas Swiss de, aproximadamente, 4 semanas de idade. Os camundongos utilizados, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO/UFMG), foram mantidos no Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em gaiolas plásticas coletivas, em uma sala com temperatura seca controlada (24°C) e sob um ciclo claro/escuro de 14/10h, com acesso livre à ração convencional para camundongos (Nuvilab® Nuvital, Curitiba, Brasil) e água.

##### 3.2.2. Desenho experimental

Os animais infectados foram divididos em dois subgrupos: (1) camundongos infectados destinados para a eutanásia foram acompanhados até o pico de parasitemia, que ocorreu no 8º dia pós infecção (d.p.i.), e eutanasiados no 11 d.p.i de acordo com o modelo anteriormente descrito pelo nosso grupo (CAMPOS et al., 2016), sendo este denominado: **grupo infectado de fase aguda**; (2) camundongos infectados no mesmo dia do grupo anterior foram tratados com Benznidazol (Lafepe, Pernambuco, Brasil), em uma única dose de 500mg/kg de peso corporal via oral no 11 d.p.i. Estes

camundongos foram mantidos por 15 meses pós infecção (m.p.i.), em um grupo denominado: **grupo infectado de fase crônica**. Dentro desse grupo realizamos eutanásias nos 3º, 7º, 12º e 15º meses de infecção para análises de desenvolvimento do megacólon. Os animais foram então divididos nos seguintes grupos: controle de fase aguda (CFA); infectado de fase aguda (IFA); controle de fase crônica 3 meses (CFC3); infectado de fase crônica 3 meses (IFC3); controle de fase crônica 7 meses (CFC7); infectado de fase crônica 7 meses (IFC7); controle de fase crônica 12 meses (CFC12); infectado de fase crônica 12 meses (IFC12); controle de fase crônica 15 meses (CFC15); infectado de fase crônica 15 meses (IFC15).

### 3.2.3. Procedimentos experimentais

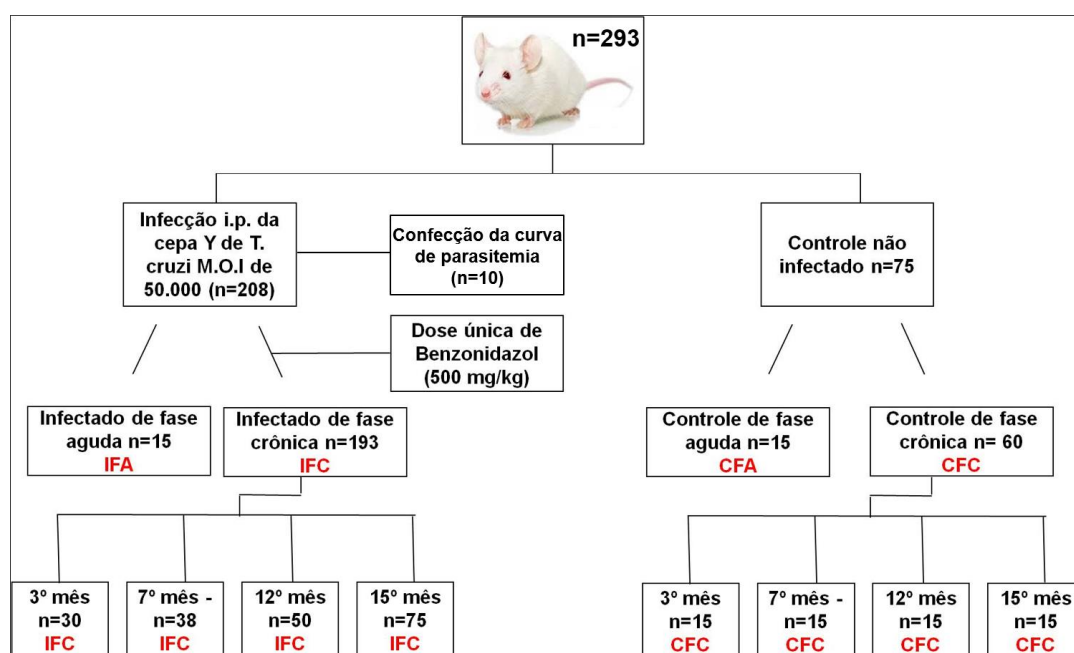
Para a infecção dos animais a preparação do inóculo foi feita de acordo com a técnica descrita anteriormente por Brener (BRENER, 1962). A infecção dos animais foi feita via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, no Laboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Medicina, UFOP. A confirmação da infecção de todos os animais inoculados foi feita pelo exame de sangue a fresco 24 horas após a inoculação. Dois experimentos independentes foram realizados.

Um total de 293 camundongos Swiss fêmeas foram utilizados neste estudo, onde 218 foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y – *T. cruzi* (TcII). Setenta e cinco animais foram utilizados como grupo controle não infectado, sendo 15 de fase aguda e 60 para compor o grupo de fase crônica nos devidos tempos citados acima.

Dos animais infectados, 15 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo infectado de fase aguda); 193 foram tratados com Benznidazol e eutanasiados na fase crônica, nos tempos (3º, 7º, 12º e 15º mês). O grupo controle não infectado foi mantido nas mesmas condições de biotério, e eutanasiado como controle de fase aguda, e controle de fase crônica nos devidos tempos indicados.

Do total de animais utilizados 201 foram usados para histopatologia: fase aguda (10 controles e 10 infectados); Fase crônica (40 controles e 141 infectados). Para os ensaios *ex vivo* (estímulos elétricos, farmacológicos e Western Blot para receptores do

tipo muscarínico e nicotínico) utilizamos 82 camundongos, sendo 25 camundongos como controle não infectado, e 57 infectados foram distribuídos nos seguintes grupos (5, IFA; 10 IFC3; 12 IFC7; 14 IFC12; 16 IFC15). A amostragem foi calculada de acordo com a mortalidade neste modelo experimental para garantir no mínimo 5 camundongos por grupo. Usamos adicionalmente 10 animais infectados para a confecção da curva de parasitemia (**Figura 1**).



**FIGURA 1: Delineamento experimental.** O total de 293 camundongos Swiss fêmeas foram utilizados neste estudo, onde 208 foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y – *T. cruzi* (TcII) e 75 animais foram utilizados como grupo controle não infectado, sendo quinze de fase aguda e sessenta para compor o grupo de fase crônica nos devidos tempos citados acima. Dos animais infectados, 15 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo infectado de fase aguda); 193 foram tratados com Benznidazol e nos tempos (3º, 7º, 12º e 15º mês) foram eutanasiados na fase crônica. Um grupo de 10 animais infectados foram destinados a avaliação da parasitemia para a determinação do exato momento do tratamento (no 11º d.p.i). O total de camundongos foi representativo de dois experimentos independentes.

### 3.2.4. Curva de parasitemia e mortalidade

A parasitemia foi verificada diariamente a partir do 4º (d.p.i.) até a morte dos 10 camundongos destinados à curva de parasitemia, e avaliados conforme descrito por Brener (1962). Para isso, foram coletados 5µl de sangue da cauda dos camundongos para pesquisa de formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* em 50 campos de 400x.



A curva de sobrevivência foi obtida através do acompanhamento diário dos camundongos infectados ao longo de todo o experimento, conforme descrito por Campos e seus colaboradores (2016).

### **3.2.5. Ensaio da função intestinal - Motilidade colônica**

Para avaliar preservação ou alteração da motilidade intestinal no segmento cólon, utilizamos protocolo previamente padronizado (LI et al., 2011). Resumidamente, os animais do grupo controle e infectado foram submetidos à privação somente de ração por no máximo 24 horas e então anestesiados com Isoflurano (BioChimico®, Rio de Janeiro, Brasil) para a inserção via retal de uma esfera de vidro (3 mm de diâmetro) a uma distância de 2 cm do limite anal. O momento exato da expulsão da esfera de vidro a partir da sua completa inserção foi cronometrada e tomada como estimativa da motilidade do cólon.

### **3.2.6. Ensaio da função intestinal - Motilidade gastrointestinal total**

Para estudar o tempo total de trânsito gastrointestinal foi utilizado o corante *vermelho carmim* (Merck, EUA), que não pode ser absorvido pelo lúmen intestinal. Uma solução de 300 µl de vermelho carmim a 6% suspenso em 0,5% de metilcelulose (Merck, EUA) foi administrado por gavagem aos camundongos. O tempo em que ocorreu a gavagem foi registrado. Após a gavagem, os grânulos fecais foram monitorados em intervalos de 10 min para a presença do vermelho carmim. O tempo total de trânsito GI foi considerado em minutos como o intervalo entre a gavagem e o tempo da primeira visualização do corante vermelho carmim nas fezes.

Utilizando o inibidor da colinesterase denominando piridostigmina (1mg/kg, Sigma-Aldrich, EUA) foi avaliada a motilidade colônica e total dos camundongos previamente tratados com este fármaco a fim de analisar a resposta contrátil global *in vivo* frente a ausência da enzima que atua na resposta colinérgica.

### **3.2.7. Ensaios eletrofisiológicos – Banho de órgãos**

Após a eutanásia do animal, o cólon foi cuidadosamente retirado, cortado em anéis de aproximadamente 3 mm de comprimento e colocado em placa de Petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit que continha (em mM): glicose 10,1; NaCl 115,48; NaHCO<sub>3</sub> 21,9; KCl 4,61; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,14; CaCl<sub>2</sub> 2,50 e MgSO<sub>4</sub> 1,16. Todos os experimentos foram realizados com no mínimo 4 anéis para cada um dos 5 animais usados por grupo (CFA, IFA, CFC, IFC) em todos os tempos analisados (11d.p.i, 3, 7, 12, 15m.p.i.).

Duas hastes metálicas foram transpassadas nas extremidades do fragmento do cólon, sendo que uma destas hastes metálicas foi afixada a um transdutor de tensão isométrica. Para obtenção do registro de tensão, estes anéis foram acondicionados em cubas contendo solução de Krebs, constantemente aerada com mistura carbogênica, (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) mantida à temperatura de 37 °C e pH de 7,4. Após a montagem dos anéis no equipamento, estes foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g, constantemente regulada durante um período de uma hora para estabilização da preparação. Após o período de estabilização, as preparações foram desafiadas elétrica ou farmacologicamente para registros de contratilidade.

**Estímulos elétricos:** Os estímulos elétricos (*Electric-field stimulation*, EFS) foram aplicados utilizando um equipamento estimulador (Grass Technologies, Astro-Med, Inc. Modelo SD9) da seguinte forma: os cólons dos camundongos dos grupos controle, agudo e crônico de todos os tempos foram submetidos a um estímulo elétrico em ordem crescente de frequência 0,5, 1, 5, 10 e 20 Hz (AULÍ et al., 2008). Cada estímulo foi aplicado pelo posicionamento de eletrodos de prata acoplados ao banho de órgãos por 10 segundos, seguido de intervalos de 1 minuto e 30 segundos a 2 minutos antes da aplicação do próximo estímulo de maior intensidade. Foram registradas as ondas *on e off-contraction*. As ondas *on-contraction* foram caracterizadas como as respostas contráteis desenvolvidas durante a aplicação do estímulo elétrico. Já as ondas *off-contraction* foram caracterizadas como as respostas contráteis após o término do estímulo elétrico (Figura 29 G, ver representação gráfica). Foi medida a latência (tempo em segundos entre a aplicação dos estímulos elétricos e o início da resposta contrátil) das ondas *on- e off-contraction* e a amplitude para as ondas *off-contraction*

caracterizada pela diferença entre o estado de tensão basal e o pico de contração da mesma (g/mg).

**Estímulos farmacológicos:** Para os ensaios farmacológicos na ausência de inibição da atividade nervosa os anéis de cólon foram submetidos à contração com agonista muscarínico acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ M, Sigma A6625, EUA). As preparações foram então lavadas e estabilizadas por 15 minutos. Em seguida, procedeu-se a incubação com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME 300  $\mu$ M, Sigma N5751, EUA) por mais 15 minutos. Ainda na presença do L-NAME as preparações foram novamente estimuladas com acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ M). A atividade contrátil dos estímulos relacionados acima foi medida e indicada como amplitude (g/mg).

A Tetrodotoxina (TTX, 100 nM, Sigma T8024, EUA), cedida gentilmente pelo Prof<sup>o</sup> Jader dos Santos Cruz, departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG, foi adicionada para bloquear o potencial de ação neural através do bloqueio dos canais de sódio. Desta forma o tratamento com a TTX exclui a participação da inervação entérica sobre a resposta contrátil induzida pela ACh. A fim de inibir a atividade de receptores nicotínicos utilizamos o cloreto d-tubocuranina (50  $\mu$ M, T-2379, Sigma, EUA). Também foi inibida a atividade da NOS utilizando o L-NAME (300  $\mu$ M). Em seguida, atropina foi adicionada (1  $\mu$ M, Sigma A0132, EUA) a fim de inibir a atividade de receptores muscarínicos e avaliar se o efeito contrátil da ACh deve-se a estimulação direta de receptores muscarínicos na musculatura lisa. Foram avaliadas as amplitudes relacionadas com os estímulos farmacológicos combinados descritos a seguir: ACh +TTX + atropina; ACh + TTX + Curare; ACh + TTX + L-NAME.

Após realização dos experimentos em banho de órgãos isolados, os cólons foram cuidadosamente retirados e deixados em ambiente arejado, para secagem por 48 h, seguido de pesagem. O peso seco do colón foi utilizado para normalização dos registros obtidos nos experimentos de contratilidade. Os valores de amplitude de contratilidade expressos em g foram normalizados pelo peso seco em mg.

Os registros dos experimentos executados foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., EUA) conectados a um amplificador (TBM4M, WPI), sendo este acoplado a um computador equipado com

uma placa conversora analógico-digital. Para aquisição dos dados foi utilizado o programa WinDaq Data Acquisition (Dataq® Instruments, EUA).

### **3.2.8. Coleta e processamento histológico do cólon**

O intestino dos camundongos foi separado a partir do mesentério e lavado em PBS (solução salina de fosfato tampão 0,01 M, pH 7,2). Foram retirados 0,5 cm de comprimento do cólon proximal e distal, que foram congelados em freezer -80 °C e posteriormente utilizados para técnicas de biologia molecular (extração do DNA do parasito e quantificação da expressão de neurotransmissores excitatórios e inibitórios por RT-PCR), sendo o restante destinado à confecção de rocamboles e submetidos ao processamento histológico de rotina. O cólon foi estendido com a serosa em contato com o papel filtro e todo o seu conteúdo foi removido delicadamente evitando a danificação da mucosa. Os segmentos teciduais foram transferidos para a solução aquosa saturada de ácido pícrico, acrescida de 10 volumes de formol a 25% e 2 volumes de ácido acético glacial a 1%, conhecida como fixador de Bouin, no qual foram mantidos por 5 minutos. O cólon pré-fixado foi enrolado em espiral com a mucosa virada para o interior de modo a formar rolos da porção distal (ânus) para a extremidade proximal (ceco) – como descrito por Arantes e Nogueira (ARANTES; NOGUEIRA, 1997). Os rolos foram mantidos em formol 10% por uma semana e em seguida seccionados ao meio para aparar as bordas de forma que após processamento rotineiro para inclusão em parafina a microtomia resultou em amostras de toda a extensão do cólon para posterior coloração por HE, Tricrômico de Masson, e para os ensaios de imuno-histoquímica.

### **3.2.9. Caracterização do infiltrado inflamatório**

Em microscópio de campo claro, sob a objetiva de 20 x, 30 campos de cada cólon (coloração HE) foram submetidos à análise do número absoluto de focos inflamatórios, os quais foram caracterizados pela presença de no mínimo 10 células inflamatórias na camada muscular do intestino. Foram avaliados todos os grupos

infectados, em todos os intervalos de tempo, através da amostragem de 3 animais representativos de cada grupo.

### **3.2.10. Imuno-histoquímica**

Cortes histológicos consecutivos de 4  $\mu\text{m}$  do cólon de animais infectados e não infectados foram desparafinados e reidratados em concentrações decrescentes de álcool. Posteriormente, os cortes foram submetidos aos bloqueios: peroxidase endógena - com solução de metanol e peróxido de hidrogênio 30 volumes na concentração de 5% e para ligações inespecíficas - com leite desnatado (Molico) 5% em PBS 1X, soro albumina bovina 2% (Inlab, Brasil) em PBS 10X e soro fetal bovino 10% em PBS 10X (SFB, 16140-071, Gibco, Invitrogen, EUA). O tempo de incubação foi de 30 minutos para cada bloqueio seguido de lavagens com PBS 1X entre cada solução. Os cortes foram incubados posteriormente, sem lavagens intermediárias, com os anticorpos primários, descritos na tabela 2, à 4°C overnight. Após banhos em PBS 1X, procedeu-se à incubação de ambos os anticorpos primários com o complexo estreptavidina-peroxidase pré-diluída (LSAB, K0675, Dako, EUA) e incubação por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. A revelação da reação foi feita por DAB (3,3'- diaminobenzidina tetrahidrocloro, Sigma, EUA) e os cortes foram contra-corados em Hematoxilina de Ferris. Em seguida, as lâminas foram novamente desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan (Merck, EUA).

**Tabela 2:** Descrição dos anticorpos primários e secundários e sistema de detecção utilizado nas reações de imuno-histoquímicas.

Nome do anticorpo	Marca e referência comercial	Origem	Sistema de detecção/anticorpo secundário	Diluição anticorpo secundário	Tipo celular
PGP 9.5 (produto gênico da proteína 9.5)	Cedarlane (CL95101)	Policlonal de coelho	Imunoglobulina anti-coelho e anti- camundongo biotinizada pré- diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) -Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	1:500	Neurônio
Anti- <i>T. cruzi</i>	Produzido pela Profª Maria Terezinha Bahia - UFOP	Policlonal de coelho		1:5000	<i>T. cruzi</i>
Anti- $\alpha$ -actina	Epitomics	Monoclonal de coelho		1500	Músculo liso

### 3.2.11. Obtenção de imagens

As lâminas foram fotografadas utilizando o microscópio óptico de luz direta Olympus BX51 equipado com o software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, EUA) com resolução de 1392 x 1040 pixels e transferidas via câmera de vídeo colorida Cool SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) para um

sistema de vídeo acoplado a um computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

### **3.2.12. Medida de espessura da parede muscular interna**

Foram obtidas 10 imagens por animal em objetiva de 4X amostrando toda a extensão do cólon dos camundongos de todos os grupos (5 animais por grupo) e em todos os tempos avaliados. Para cada imagem foram obtidas 3 medidas de espessura da camada muscular interna ( $\mu\text{m}$ ) pelo programa Image J 1.52 (NIH, Bethesda, EUA). A camada muscular interna foi definida pelos limites com a camada submucosa e a camada muscular externa.

### **3.2.13. Medida de plexo mioentérico e inervação muscular**

Foram adquiridas 15 imagens, em objetiva de 20X, nas lâminas submetidas a imuno-histoquímica para PGP 9.5, para amostragem dos neurônios ganglionares do plexo mioentérico e respectivos perfis de inervação intramuscular (muscular interna). Em cada campo, os gânglios foram delimitados manualmente para obtenção da área total do gânglio, e a área corada por PGP 9.5 dentro do gânglio, foi medida automaticamente. A área de perfis de nervos marcada por PGP 9.5 foi medida automaticamente e a área total da camada muscular interna foi delimitada e medida manualmente em cada campo. Expressamos os dados como média e desvio padrão da área imunomarcada para neurônios/área total do gânglio e da área imunomarcada para inervação/área total de músculo circular em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). O programa de morfometria programa KS300 (Departamento de Patologia ICB/UFMG) foi utilizado para as análises.

### **3.2.14. Quantificação da área da célula muscular lisa intestinal**

Foram adquiridas 10 imagens em campo claro, em objetiva de 40X, exclusivamente da camada muscular circular interna nas amostras imunocoradas para PGP 9.5. A área total ( $\mu\text{m}$ ) de músculo liso foi delimitada e medida. O número total núcleos de células musculares foi contado através do programa Image J 1.52 (NIH,

Bethesda, EUA). A razão entre número total de células musculares por área ( $\mu\text{m}$ ) de tecido indica o tamanho da célula muscular lisa intestinal e sua variação ao longo do estudo foi determinada.

### **3.2.15. Extração do DNA genômico**

Para o diagnóstico molecular do *T. cruzi*, o DNA genômico foi extraído de fragmentos de cólon coletados de camundongos. A extração do DNA foi realizada com o kit de purificação de DNA *Wizard Genomic* (Promega, EUA). Em microtubos, foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA 0,5 M (pH 8.0) e 500  $\mu\text{L}$  da solução de lise nucléica, com posterior resfriamento. Ao turvar-se, 600  $\mu\text{L}$  desta mistura e 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen<sup>TM</sup>, EUA) foram adicionados cerca de 20 mg de fragmento de tecido submetido a maceração mecânica, contido em outro microtubo, o qual foi incubado a 55°C em banho seco por 18 horas. Após este período, os microtubos foram agitados (vórtex) até a completa digestão. Posteriormente, foram acrescentados 3  $\mu\text{L}$  de *Rnase solution* seguido de incubação a 37°C por 15 minutos em banho seco. Em temperatura ambiente, 200  $\mu\text{L}$  de solução de precipitação proteica foram adicionados a cada amostra a qual foi levada ao vórtex por 20 segundos e logo em seguida resfriada em gelo por 5 minutos. Após este procedimento, foi realizada a centrifugação das amostras por 4 minutos a 13.000 g e o sobrenadante, contendo o DNA, era cuidadosamente transferido para outro microtubo de 1,5 mL contendo 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, o qual foi homogeneizado por inversão até a precipitação do DNA. Em seguida, os microtubos contendo DNA foram centrifugados por 1 minuto a 13.000 g, o sobrenadante foi descartado e 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foi adicionado a cada amostra. Uma nova centrifugação foi realizada por 1 minuto a 13.000 g, o sobrenadante foi descartado e microtubos foram invertidos sobre papel absorvente até a total evaporação do etanol. Finalmente, 100  $\mu\text{L}$  de solução de reidratação foram adicionados e os microtubos foram incubados a 4°C overnight para a completa reidratação do DNA. O DNA foi quantificado por espectrofotômetro (NanoDrop®, Thermo Scientific<sup>TM</sup>) e as concentrações foram ajustadas para 25 ng/ $\mu\text{l}$ .



### 3.2.16. qPCR

Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR continha 2 µl de DNA genômico (50 ng), 0,35 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação de 195 pares de bases (pb) do DNA de *T. cruzi*, TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', onde M = A ou C, e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', como descrito por Cummings & Tarleton (2003), 5 µl de Sybr®Green PCR Mastermix, e água Milli-Q para um volume final de reação de 10 µl. Separadamente, para cada amostra era também realizada uma reação em duplicata para o gene TNF- $\alpha$ , utilizado como controle endógeno normalizador nas mesmas condições utilizando inicializadores específicos com sequências TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTA GACCCC-3' (Cummings & Tarleton, 2003), o qual amplifica um produto de 170 pb. As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™), centrifugadas por 2 minutos a 200 g e levadas ao termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA). O programa de termociclagem consistia de aquecimento a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 62°C por 1 minuto, com aquisição da fluorescência a 62°C. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de *melting* com desnaturação inicial a 95°C por 15 segundos, resfriamento a 60°C por 1 minuto e aumento gradual de temperatura de 0,3°C /s até 95°C. Para geração da curva de dissociação, que garante a especificidade do primer e amplificação só do alvo, sem detecção de fragmentos inespecíficos que produzem sinal e entram na quantificação. Os valores médios de quantificação do DNA do *T. cruzi* foram normalizados pelos dados obtidos com os iniciadores específicos para camundongo (TNF $\alpha$ ) da seguinte forma: valor normalizado = (DNA médio do *T. cruzi* / DNA médio TNF $\alpha$ )  $\times$  1000, em que “1000” corresponde ao valor esperado para TNF $\alpha$  a partir de 20 mg de tecido intestinal. As eficiências de amplificação foram determinadas automaticamente pelo software StepOne™ v2.0, calculando: eficiência (E) =  $10^{(-1 / \text{inclinação})}$  (STORDEUR et al., 2002).

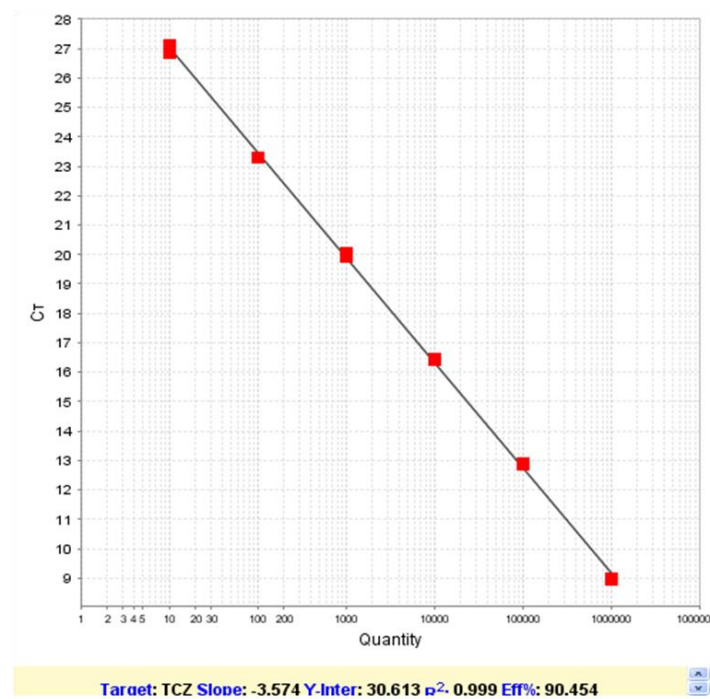
Para a quantificação, foram gerados padrões específicos do *T. cruzi* em amostras de intestino de camundongo. Assim, DNA proveniente de cultura com quantidade

conhecida de epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foi adicionado a DNA proveniente de amostra de intestino de camundongo não infectado. A concentração inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/25  $\mu\text{g}$  de DNA. Tais padrões foram submetidos a diluições seriadas nos respectivos DNA dos tecidos à 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para determinação da faixa linear onde o DNA do parasito podia ser quantificado em um gráfico do tipo XY (DNA versus ciclos de amplificação), em reações qPCR. A curva padrão foi gerada utilizando-se 5 pontos de diluição escolhidos a partir da faixa de linearidade.

### **3.2.17. Padronização da curva padrão da curva de diluição padrão para quantificação do DNA do parasito**

A PCR foi utilizada para quantificação da carga parasitária em dois fragmentos do cólon, porção proximal e distal, dos grupos de camundongos infectados.

Para observarmos a eficiência da reação geramos uma curva de calibração utilizando o DNA do parasito em diferentes diluições. Conforme pode ser observado na figura 6, a reação desenvolvida apresentou eficiência de amplificação e coeficiente de correlação de Pearson ( $R^2$ ) superiores a 90% e a 0,99, respectivamente. Nossa padronização demonstrou que a técnica utilizada foi capaz de quantificar o parasito numa faixa linear variando de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  parasitos/25 $\mu\text{g}$  de DNA em reações multiplex de PCR pelo sistema *Sybergreen*®, tendo sido o TNF- $\alpha$  utilizado como controle interno da reação.



**FIGURA 2: Faixa de linearidade da PCR em tempo real quantitativa.** Curvas de amplificação da cepa Y do *T. cruzi* geradas a partir de diluições seriadas 1:10 do DNA do parasito em 25 µg/mL do DNA partindo-se da concentração inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/25 µg de DNA, os quais foram submetidos à quantificação do parasito e detecção do controle endógeno (TNF- $\alpha$ ) em reações multiplex.

### 3.2.18. Extração de RNA para análise da expressão dos neurotransmissores

As amostras de cólon dos camundongos congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram inicialmente preparadas para a extração de RNA adicionando 500µl de trizol (15596, *Trizol Reagent*, Invitrogen, EUA) e, com o auxílio de um homogenizador, as amostras foram trituradas. Em seguida, foi adicionado 100 µl de clorofórmio seguido de homogeneização por 15 segundos, incubação por 3 minutos no gelo e centrifugação a 12000 xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram acrescentados isopropanol, com posterior incubação em gelo por 15 minutos e centrifugação a 12000 xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 75% gelado, seguido de homogeneização no vórtex e centrifugação a 7500 xg por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O pellet, seco por inversão, foi ressuspensão em 30µL de água livre de RNase e DNase e seguido de banho seco a  $55^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. A quantificação do RNA extraído foi realizada através do equipamento Nanodrop (Nano Vue Plus Spectrometer, GE Healthcare, EUA) em ng.

O material foi armazenado em freezer -80°C até sua utilização.

### 3.2.19. Síntese do cDNA

Para a transcrição de RNA em cDNA utilizou-se um mix de 0,5 µL de Oligo dT 15 primer (C1101, Promega, EUA), 1 µL de RNA e 3,5 µL de água livre de RNase completando o volume de 5 µl. Todas as amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e levadas ao aparelho termociclador (PTC-100, MJ *Research*, Inc, EUA). As amostras foram submetidas a ciclos de 70°C por 5 minutos e 40°C por 5 minutos. Em seguida o ciclo foi interrompido para adição de 5 µL do mix contendo: 0,3 µL de cada nucleotídeo, 3 µl de tampão, 0,5 µL de transcriptase reversa (M3682, M-MLV RT, Promega EUA,) e 0,25 µL de inibidor de ribonuclease e posterior continuação da transcrição a 42°C por 60 minutos seguidas de resfriamento a 4°C. O volume foi completado para 100 µl em água livre de RNase e armazenado no freezer -20°C para posterior amplificação pela técnica de RT-PCR.

### 3.2.20. RT-PCR

O cDNA sintetizado foi amplificado e utilizado para a realização da RT-PCR. Placas de 96 poços foram utilizadas onde 2 µL da amostra e 13 µL de mix contendo 7,5 µL *Power SYBR Green PCR Master Mix* (4267659, Life Technology, Inglaterra), 0,2 µL de *primer forward*, 0,2 µL de *primer reverse* e 5 µL de água livre de RNase (Tabela 3) foram pipetados. A amplificação foi realizada em sistema Applied Biosystems, StepOnePlus Real-Time PCR em 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 minutos e 60°C por 1 minuto seguido por uma fase final de dissociação. A análise foi realizada através do *software StepOne* v2.3. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e normalizadas pelo gene GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores,  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , foram expressos pela quantidade de gene amplificado em comparação ao gene controle.

**Tabela 3:** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para RT-PCR no cólon dos camundongos controles e infectados

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
GAPDH	GACACCTTTGGCATTGTGG	ATGCAGGGATGATGTTCTG
nNOS	ATGAAGTGACCAACCGCCTT	AGCTGAAAACCTCATCTGTGTC
ChAT	AGGGCAGCCTCTCTGTATGA	ATCCTCGTTGGACGCCATTT
VIP	GCAAGATGTGGGACAACCTC	CAGTCTGTTGCTGCTCATCC
NK1	GGTCTGACCGCAAAATCGAAC	AGAGCCTTTAACAGGGCCAC

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; **nNOS** – sintase de óxido nítrico neuronal; **ChAT** – colina acetil-transferase; **VIP** – polipeptídeo intestinal vasoativo; **NK1** – neuroquinina do tipo 1.

### **3.3. Estudos *in vitro* - Cultivo de neurônios entéricos**

#### **3.3.1. Amostra**

Um total de 36 camundongos da linhagem C57BL/6 de 6 a 8 semanas, foram eutanasiados para retirada de toda a extensão do intestino grosso. O segmento foi processado e as células isoladas da parede muscular do cólon foram utilizadas para os ensaios *in vitro*. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo de número 262/2016.

#### **3.3.2. Obtenção e plaqueamento das células**

Após a retirada do intestino grosso o tecido foi colocado em solução de Krebs como descrito por Wahba e colaboradores (WAHBA et al., 2016), que continha: 118 mM de NaCl; 4,6 mM KCl; 5,7 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O; 25 mM NaHCO<sub>3</sub> e 11 mM de glicose. O fragmento do intestino foi seccionado ao longo da borda mesentérica para obter um segmento plano de tecido, cujas bordas foram cuidadosamente distendidas e fixadas com alfinetes entomológicos, para a delaminação das camadas (mucosa, submucosa e serosa) expondo adequadamente a camada muscular onde estão os plexos mioentéricos de Auerbach (SMITH et al., 2013). O tecido foi incubado por 15 min em agitação a 37°C em solução enzimática de 1mg/ml de colagenase tipo II-S (Merck, EUA) e homogeneizando por

inversão a cada 5 min. Os fragmentos foram centrifugados a 200 xg por 5 min a 4°C, e em seguida lavados com solução tampão Hanks/Hepes por 5 min sob agitação, seguido de centrifugação a 200 xg por 5 min a 4°C. Após remoção do sobrenadante foi adicionada solução enzimática de 0,25% de tripsina (Merck, EUA) a 37°C por 10 minutos em banho-maria e 15 min em agitação, homogeneizando manualmente por inversão a cada 5 min. A preparação foi totalmente dissociada utilizando pipeta de Pasteur de vidro seguida de centrifugação a 200 xg por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e, ao *pellet*, foi adicionado 1 ml de meio de cultura estéril (*Minimum essencial medium*; MEM, 31095-029, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB, 16140-071, Gibco, Invitrogen, EUA) e antibióticos: penicilina (100 UI/ml, P4333, Sigma-Aldrich, EUA) e estreptomicina (10.000 µg/ml, P433336, Sigma-Aldrich, EUA). As células foram semeadas em placa de cultura de 48 poços sobre lamínulas de vidro de 9 mm previamente revestida com Matrigel (354234, Biosciences, EUA) na densidade mínima de  $2 \times 10^4$  células por poço (ARANTES et al., 2000).

### **3.3.3. Infecção por *Trypanosoma cruzi* in vitro**

As cepas Y e DM28c de *T. cruzi* foram utilizadas nos experimentos de infecção *in vitro*. As formas tripomastigotas foram cultivadas e purificadas através de células da linhagem epitelial de rim (VERO) como descrito por (BRAGA et al., 1993). Após seis dias de cultura, os parasitos foram coletados e foram centrifugados a 150 xg, por 10 min, em temperatura ambiente contados em câmara de Neubauer, centrifugados a 450 xg por 10 min a 4°C e suspensos 90% de meio DMEM em 10% de soro fetal bovino (SFB) para infecção em culturas. Estes experimentos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Luciana O. Andrade do departamento de Morfologia ICB/UFMG e a Profa. Dra. Lúcia Piacenza do departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Montevideo (UDELAR) – Uruguai. As formas tripomastigotas de ambas as cepas foram adicionadas à cultura primária de neurônios na proporção de 10:1 e as culturas incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> com 3 horas de interação célula-parasito, em seguida realizamos duas lavagens sucessivas com meio

incompleto e ao final adicionamos meio completo (DMEM, SFB e antibióticos) procedeu-se a análises nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas pós-infecção.

#### **3.3.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por células infectadas**

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi usada a sonda CM-H2DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester – Molecular Probes™), que se difunde dentro da célula, onde seus grupos acetatos são clivados por esterases intracelulares e o grupo reativo clorometil tiol reage com a glutatona e outros tióis intracelulares. A oxidação que se segue leva a um aduto fluorescente que permanece dentro da célula, indicando o estresse oxidativo. As culturas de entéricas primárias foram plaqueadas na proporção de  $2 \times 10^5$  células por poço e infectadas de acordo com protocolo descrito no item 3.3.2. Finalizado o tempo de infecção, a placa foi lavada com PBS<sup>+/+</sup> (PBS contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) para a retirada dos parasitos não internalizados e reincubada em meio de cultura com 2% de SFB por mais 48 horas. Depois deste período, as células foram lavadas 1 vez com PBS<sup>+/+</sup> e expostas a uma solução de 10  $\mu\text{M}$  de CM-H2DCFDA em PBS<sup>+/+</sup> por 30 minutos em estufa úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  à 37°C. A placa foi então levada para leitura no Synergy 2 (Biotek, EUA) do Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG) para o monitoramento da taxa de oxidação da sonda CM-H2DCFDA. Os valores foram gerados a partir das unidades de fluorescência relativas (UFR) obtidas após a leitura para cada amostra em triplicata.

#### **3.3.5. Avaliação da produção de oxidantes pelo cultivo de neurônios entéricos primários**

Uma medida geral da formação de oxidante foi realizada usando a sonda Diacetato DAF-FM (4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína) (Invitrogen, EUA), que fluoresce após a oxidação. Para isso, as culturas celulares, 48 e 72 horas após a infecção com Y ou DM28c, foram lavadas uma vez com PBS e expostas ao diacetato DAF-FM a uma concentração final de 2  $\mu\text{M}$  em PBS. Após a adição do diacetato DAF-FM, as células foram visualizadas por um microscópio de fluorescência

(Nikon Eclipse TE 200), equipado com uma câmera digital, em um tempo de exposição fixo. A fluorescência do diacetato DAF-FM foi observada usando um cubo de filtro de excitação (comprimento de onda/passagem de banda) de 540/25 nm, um filtro de emissão de 605/55 nm e um divisor de feixe a 565 nm.

### **3.3.6. Potencial de membrana mitocondrial em neurônios entéricos primários, glia e músculo liso infectados por *T. cruzi***

O potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) foi medido usando J-agregados formados por lipofílicos JC-1. A cultura primária de neurônios entéricos foi cultivada em placas de 96 poços (fundo de vidro) e infectada ou não com tripomastigotas *T. cruzi* Y ou DM28c por 72 h. A sonda JC-1 (0,5  $\mu$ M) foi adicionada aos poços, incubadas a 37°C por 1 h e lavadas com tampão Krebs. As células foram visualizadas por um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TE 200), equipado com uma câmera digital, em um tempo de exposição fixo. Uma fluorescência agregada de JC-1 foi observada usando um cubo de filtro com um filtro de excitação (comprimento de onda/passagem de banda) de 540/25 nm, um filtro de emissão de 605/55 nm e um divisor de 565 nm.

### **3.3.7. Imunofluorescência e documentação fotográfica**

As lamínulas contendo células cultivadas foram fixadas com paraformaldeído tamponado a 4%, à temperatura ambiente por uma hora. Para demonstração dos corpos neuronais utilizamos anticorpos anti-PGP 9.5 (Coelho, 1:500, Cedarlane, EUA) e anti  $\beta$ -tubulina III (Camundongo, 1:800, Millipore, EUA) facilitando a interpretação de lesões e a sua quantificação. Células musculares foram identificadas através do marcador anti- $\alpha$ -actina (Coelho, 1:400 Abcam, EUA). Para marcação de outras estruturas foram utilizados 3-NO<sub>2</sub>-tirosina (Coelho, 1:200; cedido pelo Dr. Rafael Radi; (BRITO et al., 1999); anti-MnSOD2 (camundongo, 1:200, Santa Cruz, EUA) e anti-*T. cruzi* (Coelho, 1:500, Cedido pela Profa. Dra. Maria T. Bahia, UFOP, Ouro Preto, Brasil). A visualização dos núcleos de células *in vitro* foi feita através de sondas que emitem fluorescência ao se ligar com o DNA nuclear (H-33342, *Hoechst*), permitindo ótima



visualização da morfologia nuclear. As lamínulas foram analisadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e as imagens foram obtidas para a documentação através do *software* Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, EUA).

### **3.3.8. Medidas de intensidade de fluorescência**

Paras os dados de quantificações da intensidade de fluorescência para densidade neurítica (24 horas pós-infecção), filamentos de  $\alpha$ -actina (24, 48, 72 horas pós-infecção) foram fotografados aleatoriamente entre 8 a 10 campos das lamínulas dos grupos controle e infectado em objetiva de 40X para densidade neurítica e objetiva de 20X para filamentos de  $\alpha$ -actina. As micrografias foram analisadas quanto à intensidade de fluorescência para os marcadores de interesse (unidades arbitrárias) através do programa Image J 1.52.

### **3.3.9. Avaliação da produção de nitrito nos cultivos entéricos**

Os sobrenadantes da cultura foram coletados 72 h.p.i., armazenados a -20 °C e testado quanto à concentração de nitrito por mistura 0,1 ml de sobrenadante da cultura com 0,1 ml de (naftiletileno a 0,1% dicloridrato de diamina e sulfanilamida a 1% mais fosfórico a 2,5% ácido) como descrito anteriormente (GREEN et al., 1981). A absorbância foi lida em 540 nm após 10 minutos de incubação, e a concentração de nitrito foi determinada por referência a uma curva padrão de 1 a 200  $\mu$ M de NaNO<sub>2</sub>.

## **3.4. Estudos *in vivo* e *in vitro* – Western Blot**

### **3.4.1. Avaliação da expressão de proteínas de receptores colinérgicos em fragmentos de cólon (*in vivo*)**

Foram avaliadas as expressões dos receptores mAChR M3 (sc-9108, Santa Cruz *Biotechnology*, EUA) e AChR $\alpha$ 7 (sc-5544, Santa Cruz *Biotechnology*, EUA) em lisado de cólons infectados e comparadas ao controle. O cólon foi lisado em tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de

proteases (*SigmaFast*®, Sigma). O lisado foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos para separação da fração proteica. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada através da medida da absorbância por espectrofotometria (260 nm em Nanodrop®). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X 0.25M tris HCl, pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, 0,25% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 60 µg de proteína em gel de SDS-PAGE (*sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida*) a 10% utilizando-se o sistema *Mini-Protean Tetra Cell* (Biorad). Após serem separadas no gel de poliácridamida (100V; 90 minutos), as proteínas foram transferidas (100V; 100 minutos) para uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 µm (Millipore, EUA). A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (3% de albumina e 0,1% de Tween-20, em TBS). Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário específico diluído em solução de bloqueio. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-mAChR M3 e anti-AChR $\alpha$ 7. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com os anticorpos secundários conjugados a sondas fluorescentes Alexa fluor 488 (1:1000) diluídos em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas foram detectadas por uma reação de fluorescência e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ 1.52 (CAPETTINI et al., 2008).

#### **3.4.2. Avaliação da expressão de MnSOD2 em culturas entéricas (*in vitro*).**

Os níveis de expressão proteica de anti-MnSOD2 mitocondrial foi avaliado por Western blot. Resumidamente, tanto as culturas controles quanto as infectadas após 72 horas de cultivo foram lisadas em tripsina (0,1% Sigma, EUA) a 37°C por 15 minutos com agitação a cada 5 minutos. Em seguida o *pool* de células foi homogeneizado e agregado ao tampão de amostra (4X 0.25M tris HCl, pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, 0,25% Azul de Bromofenol) onde as proteínas de cada amostra foram segregadas por tamanho através da técnica de eletroforese, SDS – PAGE (15%)

Em seguida, transferidas para a membrana de nitrocelulose e bloqueadas com leite seco desnatado (3% v/v) em PBS (pH 7,4) por 1 h. As membranas foram incubadas com anticorpo mouse monoclonal anti-MnSOD (1:200, Santa Cruz, EUA) diluído 1:1000 em Tween-20 (0,1%, v/v) em PBS (pH 7,4) e incubado *overnight* a 4°C. As membranas foram então lavadas em Tween-20 (0,1%, v/v) em PBS e foram incubadas por 1 h com IgG anti-*mouse* (conjugado com IR Dye-800) (Li-Cor Biosciences, EUA) diluído 1:15000. Após lavagem das membranas, as proteínas imunorreativas foram visualizadas com um sistema de detecção de fluorescência no infravermelho (Odyssey, Li-Cor Biosciences, EUA). O conteúdo de proteínas em relação ao total de proteínas carregadas (coloração de Ponceau-S) (KLEIN; KERN; SOKOL, 1995; MOORE; VISELLI, 2000) nos diferentes extratos analisados foi determinado por técnicas densitométricas usando ImageJ 1.52 (National Institute of Health, EUA). Os resultados são expressos como o teor relativo de enzimas em relação ao teor total de proteínas.

### 3.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism (v 7.0) (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). E todos os resultados obtidos foram classificados pela análise de distribuição normal (curva de Gauss), exceto o parasitismo, cujos dados foram submetidos a uma transformação logarítmica e analisados como dados normalmente distribuídos.

As comparações entre médias foram feitas usando testes *t* Student não pareados (ou seja, controle *vs* infectados). ANOVA *one-way* foi utilizada para comparações entre tratamentos múltiplos dos ensaios *in vitro* nas culturas primárias de neurônios entéricos, a saber: C, C + I, C + NAME, DM, DM + I, DM + NAME e C, C + I, C + NAME, Y, Y + I, Y + NAME); e para comparações *in vivo* nos tempos experimentais (agudos, 3, 7, 12 e 15 meses após a infecção). ANOVA *two-away* foi usada para comparações entre tratamentos (controle *vs*. infectado) e entre os tempos (agudos e meses 3, 7, 12, 15). Quando um valor F significativo foi encontrado, realizamos um teste post-hoc de acordo com o coeficiente de variação (CV): Tukey (CV  $\leq$  15%), Student Newman-Keuls (CV entre 15 - 30%) e Duncan (CV  $>$ 30%).

Os dados de contratilidade *ex vivo* foram representados como a diferença de contração entre o estado basal e em resposta à ACh. Os dados foram expressos em segundos (latência), e em g/mg de tecido seco (amplitude) e analisados através de ANOVA *two-away*, seguidas de testes de comparação do tipo Tukey.

Os dados estão apresentados com média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

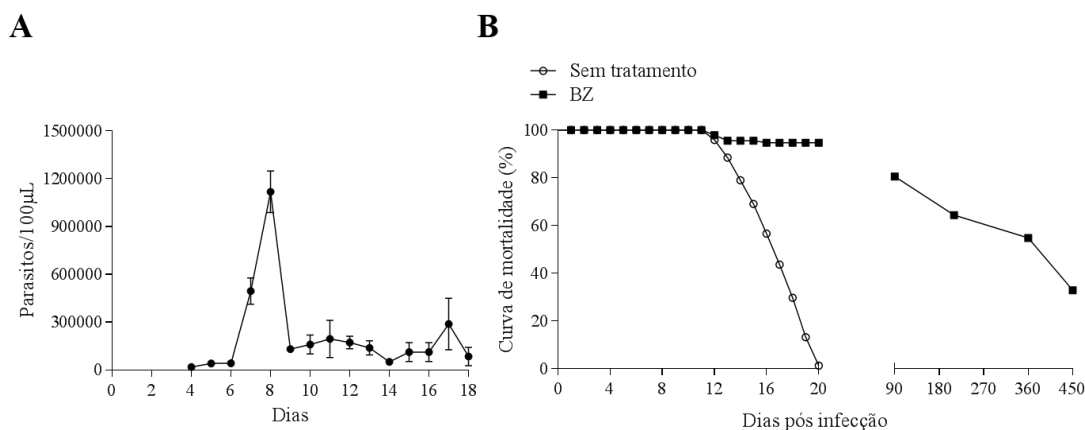
Os resultados estão apresentados de forma a delimitar 3 aspectos principais desta tese que serão abordados em 2 comunicações científicas (Anexo 4 e 6), que vão tratar de:

1. Proposição de uma explicação contextualizada na literatura e nos trabalhos do nosso grupo para a história natural do Megacólon Chagásico, sua caracterização e sua patogênese com base nos estudos de amostras obtidas sequencialmente em intervalos (11 d.pi., 3, 7, 12, 15 m.p.i). Estudo das lesões neuronais induzidas por *T. cruzi*, *in vitro*, e seus mecanismos a partir de observação e intervenções em culturas de neurônios entéricos infectadas. Trabalho submetido a *Plos Neglected and Tropical Disease* (de acordo com documento apresentado no Anexo 4), intitulado “*Early neuronal depopulation and continuous axonal network damage as underlying mechanisms of the experimental chagasic megacolon*”
2. Estudos de motilidade em ensaios *in vivo* e *ex vivo* (banho de órgãos) ao longo da cinética de desenvolvimento do megacólon experimental que propõem a correlação entre a instalação das alterações estruturais na parede (SNE e parede muscular lisa) e os mecanismos envolvidos nos distúrbios de motilidade associados a este modelo. Em preparação para a revista *British Journal of Pharmacology* (de acordo com documento apresentado no Anexo 6) intitulado: “*Role of defective ACh release on impaired colon motility related to Chagasic megacolon*”

Os resultados serão apresentados em duas partes, e discutidos em conjunto. O primeiro grupo de resultados diz respeito à documentação das mudanças estruturais que ocorrem ao longo da instalação das alterações do SNE e da parede muscular intestinal pós-infecção *in vivo*. Em paralelo, descrevemos a padronização de culturas de neurônios isolados do plexo mioentérico em co-cultura com células musculares lisas infectadas com *T. cruzi*.

#### 4.1. Tratamento com benznidazol em dose subterapêutica na fase aguda diminui a taxa de mortalidade permitindo a cronificação da infecção e o desenvolvimento de lesões teciduais intestinais (megacólon)

A infecção com 50.000 formas da cepa Y por via ip resultou nas curvas de parasitemia e sobrevida ao longo de perfil característico de infecção pela cepa Y, apresentando pico máximo de parasitemia no 8º d.p.i. (747 tripomastigotas por 0,1 mL de sangue). A mortalidade é de 100% durante a fase aguda, entre 15 e 18 d.p.i. (Figura 3). Para garantir a cronificação da doença é necessário tratar com o fármaco Benznidazol (500 mg/kg após 3 dias do pico de parasitemia) para garantir a sobrevida dos camundongos (CAMPOS et al; 2016) e sua disponibilidade nos tempos de 3, 7, 12 e 15 m.p.i. o que nos permitiu avaliar a progressão da doença até o desenvolvimento do megacólon. A despeito da prevenção da morte dos animais infectados e tratados na fase aguda, uma porcentagem dos camundongos que sobreviveram à fase aguda continuou indo a óbito entre 3 e 15 meses, conforme mostra a curva da figura 3 B, resultando em sobrevida de cerca de 30% dos camundongos ao final do experimento.



**FIGURA 3: Parâmetros de infecção e curva de mortalidade dos camundongos.** Fêmeas Swiss foram infectadas com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Dos animais infectados, 10 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo de fase aguda); 120 foram tratados com Benznidazol nos tempos (3º, 7º, 12º e 15º mês) e foram eutanasiados na fase crônica. (A) O pico de parasitemia foi no 8º d.p.i. (dia após a infecção) (B) Curva de mortalidade de 100% após 20 dias, na ausência do tratamento.

#### **4.1.2. O megacólon murino desenvolve-se ao longo do tempo e produz alterações estruturais na parede colônica**

A ênfase neste trabalho foi analisar pela primeira vez a instalação sequencial (história natural da doença) de alterações histopatológicas no cólon ao longo do processo de cronificação da DC, que resultam no megacólon. Dessa forma, foi possível a observação integrada e de longo alcance dos fenômenos biológicos que resultam nas modificações estruturais ao longo do tempo (11 d.p.i., 3, 7, 12 e 15 m.p.i.). Em nossa metodologia sistematicamente confeccionamos os rocamboles utilizando toda a extensão do cólon murino, e dispendo internamente ao rolo a região mais distal do cólon (anal). Desta forma o terço proximal do cólon fica disposto na região mais externa dos rocamboles facilitando a comparação e a análise morfométrica controlada.

Na fase aguda (Figura 4 B) o infiltrado inflamatório é expressivo, com a presença de células mono e polimorfonucleares, associado a evidência de morte celular e destruição de elementos teciduais da parede intestinal, incluindo os gânglios intramurais, e grandes áreas da camada muscular própria da parede intestinal. A inflamação não se restringe, mas é significativamente mais intensa ao longo do terço proximal do cólon. Observamos presença exuberante de ninhos de amastigota no tecido 11 d.p.i., que foram quantificados conforme a figura 8. Estes ninhos aparecem aleatoriamente dentro de células musculares lisas integras. Formas amastigotas isoladas são observadas próximo às células musculares rotas, em associação com o plexo mioentérico e as vezes dentro de células acessórias ganglionares.

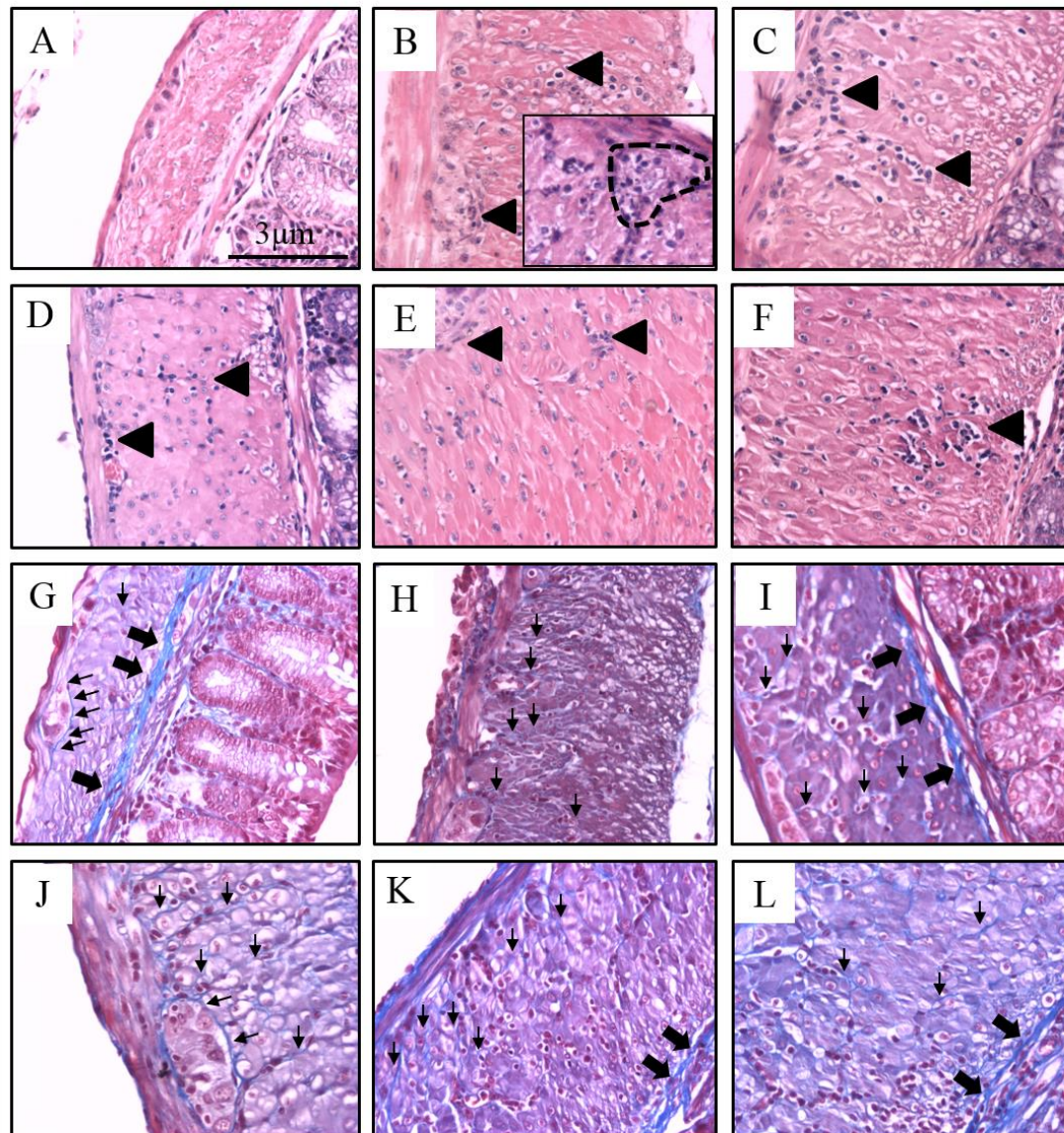
Aos 3 m.p.i o infiltrado preferencialmente composto por mononucleares é mais focal e ainda expressivo principalmente na porção proximal das nossas amostras totais do cólon.

A persistência dos focos de inflamação é visível aos 7 m.p.i., quando o infiltrado já é predominantemente de células mononucleares. Neste tempo já existem evidências de remodelamento do músculo liso circular, com hipertrofia da célula muscular, mas ainda sem repercussão estatisticamente significativa na espessura da parede, o que é visível morfologicamente, e confirmado quantitativamente a partir de 12 meses (Figura 11 B). Ao final da cinética experimental, aos 15 m.p.i., observamos que os focos de

inflamação são menores e pontuais, mas presentes ao longo de toda a extensão do cólon, evidenciando a persistência do fenômeno inflamatório (Figura 4 F).

Na coloração especial pelo tricômico de Masson, que cora em azul as fibras conectivas, observamos que ocorre reorganização e maior produção das fibras colágenas ao longo da infecção, sendo que fibras muito finas são depositadas entre as células musculares lisas e ao redor dos gânglios mioentéricos. Há também uma variação (não estudada neste trabalho) na deposição de fibras colágenas na submucosa colônica (Figura 4 H e I).

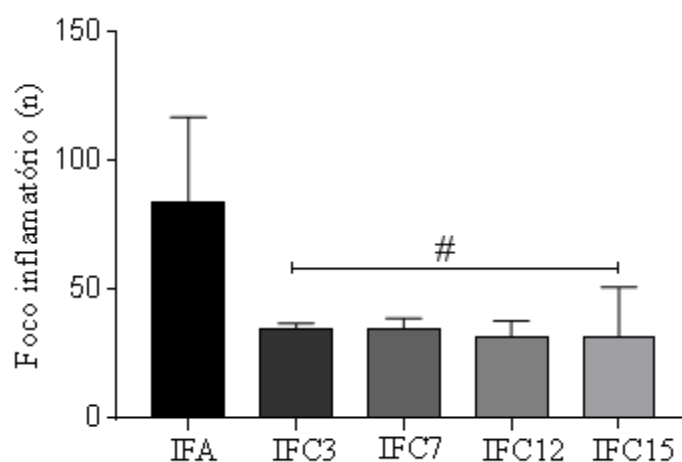




**FIGURA 4:** Aspectos histopatológicos de camundongos Swiss infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* indicam alterações estruturais na parede colônica. Fase aguda e crônicas (3, 7, 12 e 15 meses de infecção) com 50.000 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. (A) CFA (B) IFA (C) IFC 3 meses (D) IFC 7 meses (E) IFC 12 meses (F) IFC 15 meses na coloração por HE. (G) CFA (H) IFA (I) IFC 3 meses (J) IFC 7 meses (K) IFC 12 meses (L) IFC 15 meses na coloração de tricômico de Masson. Cabeça de seta indica infiltrado inflamatório. Setas finas pretas indicam coloração das fibras colágenas finas. Setas grossas pretas indicam a deposição de tecido conjuntivo na submucosa. Detalhe indica inflamação aguda com presença de intensa inflamação e destruição do plexo mioentérico com a presença de parasitismo. Objetiva 20X. Barra: 3 µm. CFA – controle de fase aguda; CFC – controle de fase crônica; IFA – infectado de fase aguda; IFC – infectado de fase crônica.

#### 4.1.3. A inflamação da parede intestinal é difusa na fase aguda e permanece focal nas fases crônicas

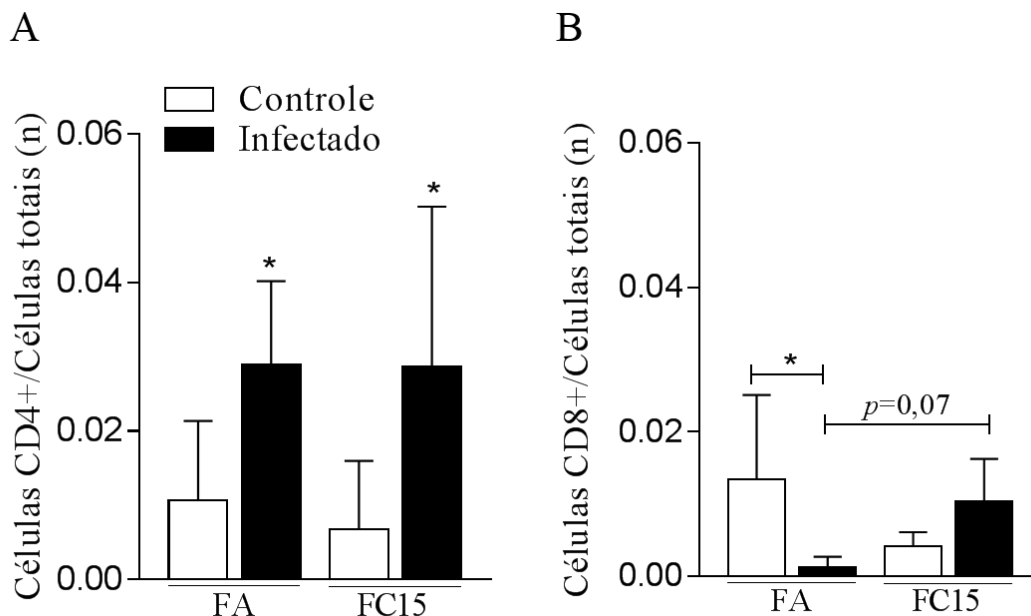
Na histopatologia da figura 5 observou-se a persistência da inflamação ao longo dos tempos analisados. Na avaliação semiquantitativa detectou-se a diminuição significativa dos focos de inflamação de todos os grupos IFC (3, 7, 12 e 15 m.p.i.) quando comparado ao grupo IFA ( $p \leq 0,05$ ), estes últimos mais difusos e mais frequentes ao longo da extensão do cólon (Figura 5).



**FIGURA 5: Análise semiquantitativa de focos inflamatórios nos cólons dos camundongos infectados.** Focos inflamatórios contados em 30 campos em HE através do microscópio óptico Olympus BX51 em objetiva de 20X, nos cólons dos camundongos infectados (11 d.p.i.; 3, 7, 12 e 15 m.p.i.). Os focos inflamatórios foram identificados quando contados grupos de 7 a 10 células na camada muscular do cólon. n=3 camundongos. Análise estatística ANOVA *one way* com pós-teste de Tukey após transformação logarítmica. #Diferença em relação aos demais tempos,  $p \leq 0,05$ . Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. IFA – infectado de fase aguda; IFC – infectado de fase crônica.

#### 4.1.4. A caracterização fenotípica parcial (CD4 e CD8) do infiltrado inflamatório na fase aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*

Observamos mudanças significativas no fenótipo das células inflamatórias da fase aguda e crônica 15 m.p.i. (Figura 6). Na fase aguda e crônica houve predomínio do infiltrado de células mononucleares (fenótipo CD4+) e polimorfonucleares; a partir de 3 m.p.i. havia também um perfil de células mononucleares (fenótipo CD8+) (Figura 6 A e B). Observou-se discreto aumento das células CD4+ e CD8+ da fase aguda para a fase crônica, mais significativa para as células CD8+ ( $p \leq 0,05$ ).



**FIGURA 6: Subtipos de linfócitos no infiltrado inflamatório.** (A e B) Razão entre as células CD4+ e CD8+ imunomarcadas/número total de células da camada submucosa do cólon dos camundongos Swiss infectados com cepa Y de *T. cruzi* dos grupos fase aguda e na fase crônica (15 m.p.i.). (A) CD4+. A razão entre as células CD4+ e quantidade total de células foi maior para os grupos infectados (IFA e IFC15) quando comparados aos grupos controle (CFA, CFC15). (B) CD8+. A razão entre as células CD8+ e quantidade total de células foi maior para o grupo controle de fase aguda (CFA) em relação ao grupo infectado de fase aguda (IFA) e apresentou uma tendência ao aumento de CD8+ ( $p=0,07$ ) no grupo IFC15 em comparação ao grupo IFA.  $n=5$  camundongos. Análise estatística ANOVA *one way* com pós-teste de Student Newman-Keuls. \*Diferença em relação ao grupo controle,  $p \leq 0.05$ .

#### 4.1.5. DNA do parasito foi significativamente maior na fase aguda através de quantificação do PCR e por imuno-histoquímica para anti-*T. cruzi*

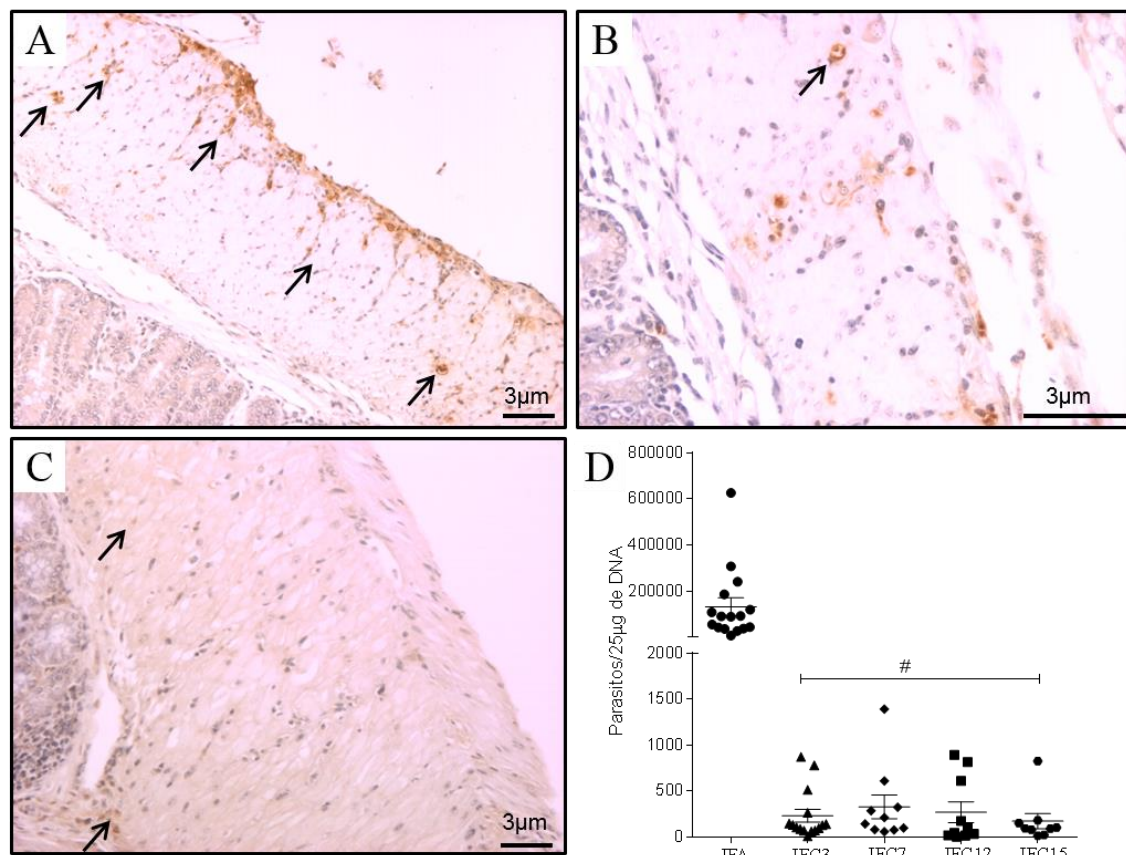
A fim de correlacionar o processo inflamatório com a presença do parasito ou DNA do parasito quantificamos o DNA por RT-PCR e por imuno-histoquímica.

#### 4.1.6 Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi* e quantificação de DNA do parasito por PCR

Além da análise quantitativa de DNA do parasito também realizamos imunomarcção com anticorpo anti-*T. cruzi* para evidenciar a presença dos parasitos no

tecido. Os resultados de fase aguda indicam presença maciça de parasitos, sem expressivo parasitismo na fase crônica (15 meses).

Os resultados quantitativos demonstraram uma redução do DNA parasitário presentes nos fragmentos analisados quando comparamos os camundongos infectados de todos os grupos de IFC (3, 7, 12 e 15 m.p.i) em relação ao grupo IFA ( $p < 0,001$ ) (Figura 7 D).



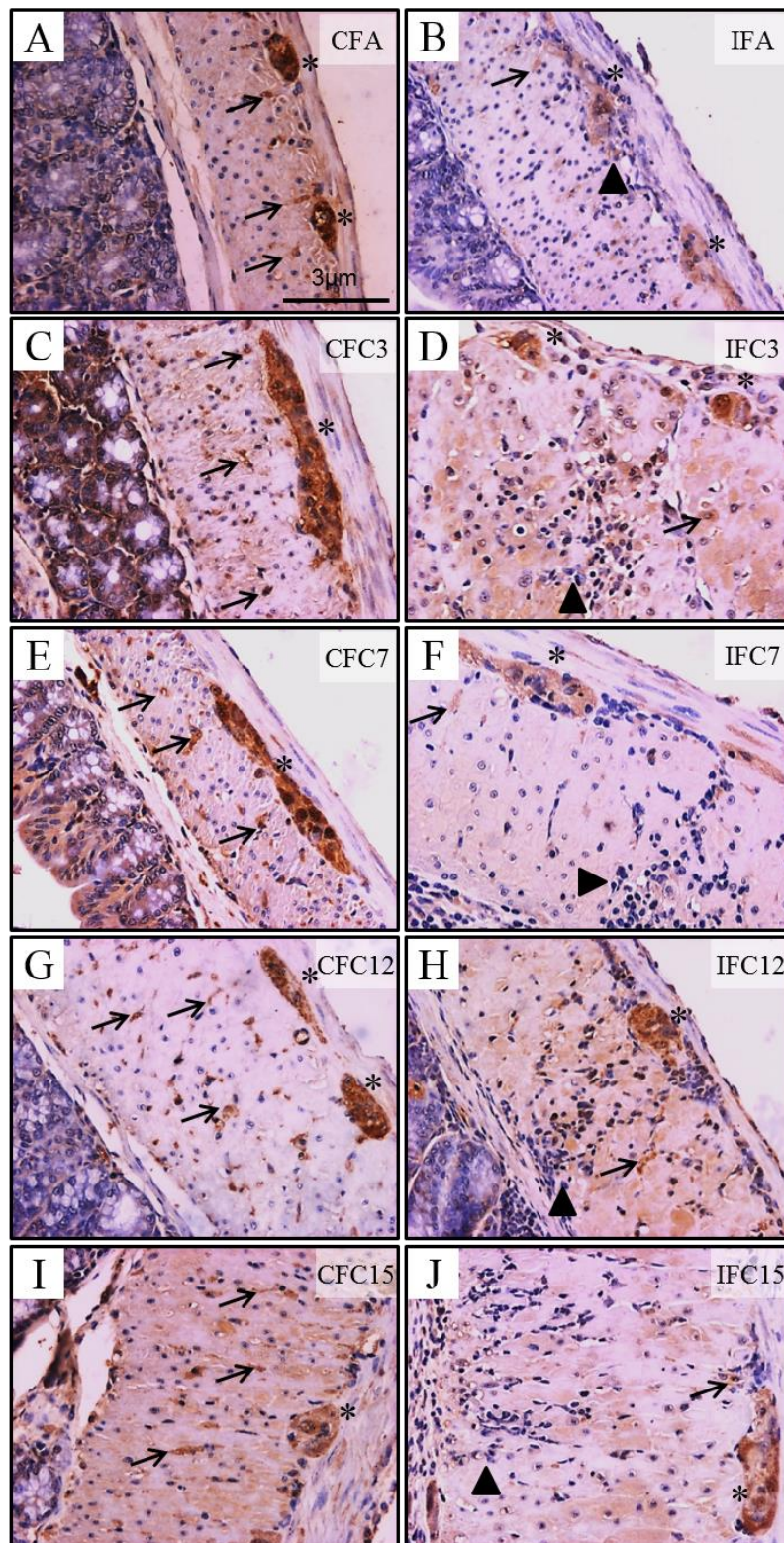
**FIGURA 7: Imuno-histoquímica para anti-*T. cruzi* no cólon dos camundongos infectados e análise quantitativa de DNA do parasito. (A)** Na fase aguda observa-se uma marcação para anti-*T. cruzi* intensa e extensa ao longo do cólon. **(B)** Presença de ninhos de amastigotas. **(C)** Na fase crônica (15 meses) o perfil de marcação diminui consideravelmente restando apenas raros focos com marcação menos intensa. Setas indicam a imunomarcção para anti-*T. cruzi* bem como ninhos de amastigotas. Objetiva 10X e Objetiva 20X. Barra=3 µm. **(D)** Foram retirados aproximadamente 0,5 cm do cólon proximal e distal dos camundongos infectados de fase aguda e crônica (3,7,12 e 15 meses), os tecidos foram macerados e procedeu-se com a extração, seguida de PCR para a amplificação do DNA do parasito. n=IFA: 16; IFC3:15; IFC7: 10; IFC12: 10; IFC15: 9. Análise estatística ANOVA *one way* com pós-teste de Student Newman-Keuls. Valores de  $p < 0,001$  (\*\*\*)

#### **4.1.7. Evidências de desnervação ganglionar e intramural dos grupos crônicos infectados**

A imunomarcção para PGP 9.5 no grupo CFA evidencia neurônios intraganglionares mioentéricos bem marcados e entrelaçados por uma extensa rede de inervação interganglionar (Figura 8 A). O grupo IFA apresentou diminuição da imunomarcção quando comparado ao seu controle. Aos 3 m.p.i. (Figura 8 C-D) observa-se importante diminuição da imunomarcção intraganglionar quando comparado com o grupo IFA. A diminuição da área ganglionar marcada se mantém ao longo dos tempos de 7, 12, e 15 m.p.i. em relação aos controles pareados. Nota-se ainda que aos 12 e 15 meses os animais controle também apresentam diminuição da imunomarcção, mesmo na ausência de infecção. Paralelamente, é visível a redução dos perfis transversais (camada circular interna) e longitudinais (camada circular externa) positivos para PGP9.5 (Figura 8 H e J).

Esses achados foram confirmados por quantificação morfométrica da área ganglionar imunomarcada para PGP 9.5, em relação à área ganglionar total (Figura 9).





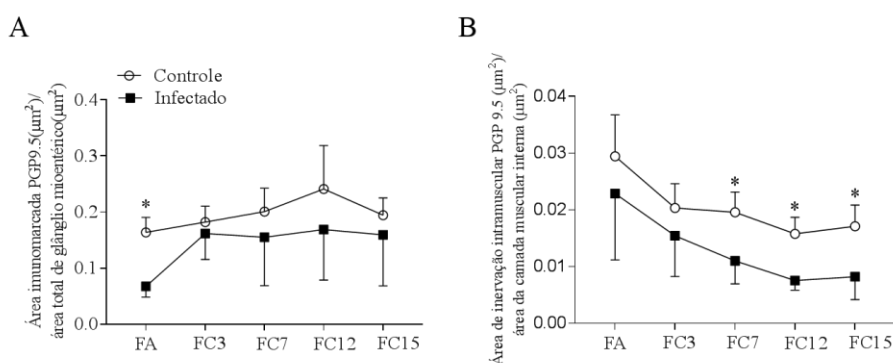
**FIGURA 8:** Imunomarcção para PGP 9.5 nos cólons de camundongos Swiss infectados com 50.000 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*.

**FIGURA 8: Imunomarcção para PGP 9.5 nos cólons de camundongos Swiss infectados com 50.000 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*.** (A – J) Imunomarcção para PGP 9.5 nos gânglios e inervação intramuscular intestinal nas fases aguda crônica (3, 7, 12 e 15 m.p.i). Setas indicam a imunomarcção para PGP 9.5 de fibras nervosas intramusculares. Asteriscos indicam imunomarcção dos corpos neuronais dentro do gânglio do plexo mioentérico. Cabeças de seta indicam a presença de infiltrado inflamatório. Objetiva 20X. Barra=3  $\mu$ m.

#### 4.1.8. Quantificação da densidade de inervação intramural e da progressão da perda (despopulação) neuronal ganglionar do plexo mioentérico

A avaliação quantitativa da razão entre a área imunomarcada para PGP9.5 por área total de gânglios mioentéricos (Figura 9 A) mostrou diminuição da área imunocorada dos componentes dos gânglios do grupo infectado de fase aguda em relação ao seu controle ( $p \leq 0,05$ ). Os tempos seguintes de 7, 12 e 15 m.p.i. não foram afetados significativamente, indicando que o dano neuronal importante, embora precoce, não foi progressivo, com consequências importantes para o manejo da desnervação intraganglionar mioentérica na DC.

Complementarmente, os perfis transversais positivos de PGP9.5, que representam a inervação intramuscular (a maioria sendo axônios de neurônios ganglionares) foram quantificados em função da área da camada muscular interna (Figura 9 B). A partir de 7 m.p.i os de camundongos infectados de fase aguda apresentaram menor razão entre a área de inervação intramuscular PGP9.5 e área da camada muscular interna nos momentos 7, 12 e 15 m.p.i. quando comparado ao seu respectivo grupo controle ( $p < 0,05$ ).



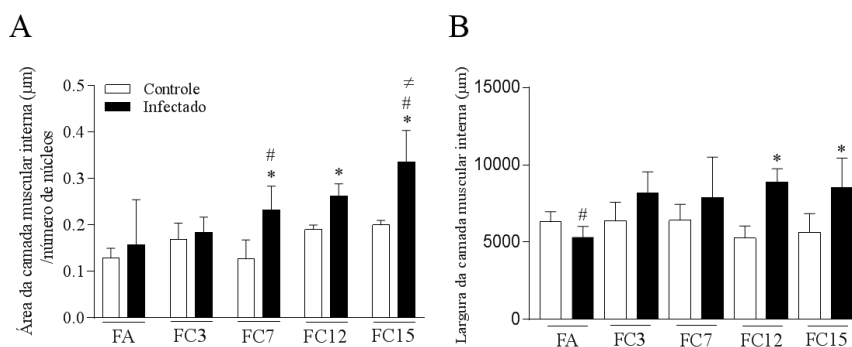
**FIGURA 9: Desnervação do sistema nervoso entérico ganglionar e intramuscular nos camundongos infectados ao longo do desenvolvimento do megacólon. (A e B)** Imunomarcagem para PGP 9.5 nos gânglios e inervação intramuscular em camundongos Swiss infectados com 50.000 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, na fase aguda e na fase crônica (3, 7, 12 e 15 m.p.i). Foram obtidas 10 imagens de cada grupo em objetiva de 40X para identificação dos gânglios e dos perfis de inervação sendo expressos como (A) área imunomarcada PGP 9.5/área total do gânglio do plexo mioentérico. (B) área de inervação intramuscular PGP 9.5/área da camada muscular interna ( $\mu\text{m}^2$ ). Análise estatística ANOVA *two away* com pós-teste de Student Newman-Keuls. \*Diferença em relação ao respectivo grupo controle,  $p \leq 0.05$ . Dados mostrados com média e desvio padrão (DP).  $n=4$  camundongos. Os resultados representam dois experimentos independentes.



#### 4.1.9. Hipertrofia progressiva da camada muscular circular dos camundongos infectados com *T. cruzi*

A plasticidade da camada muscular intestinal foi avaliada ao longo do experimento. A área média das células musculares lisas aumentou significativamente aos 7 ( $p=0,002$ ), 12 ( $p=0,0027$ ) e 15 ( $p=0,0001$ ) m.p.i. em comparação com seus controle não-infectados pareados. A área média da célula muscular lisa dos animais infectados aumentou ao longo do tempo, com valores significativos entre 7 m.p.i. e fase aguda ( $p=0,0037$ ), e entre 15 m.p.i. e todos os demais grupos infectados, 11 ( $p<0,001$ ), 3 ( $p<0,001$ ), 7 ( $p<0,001$ ) e 12 ( $p=0,004$ ) m.p.i. Portanto, a partir de 7 m.p.i. observa-se um aumento progressivo na área das células musculares lisas apenas nos animais infectados (Figura 10 A), indicando uma mudança progressiva ou cumulativa na área das células musculares lisas (hipertrofia celular).

A avaliação morfométrica da espessura da camada interna do músculo liso (Figura 10 B) mostrou um aumento no grupo infectado comparado ao seu controle a partir de 12 m.p.i. Houve aumento progressivo e significativo da espessura da parede muscular nos grupos infectados de 3 ( $p=0,0187$ ), 7 ( $p=0,0495$ ), 12 ( $p=0,0016$ ) e 15 ( $p=0,0056$ ) meses em relação ao grupo infectado de fase aguda, indicando que uma das alterações estruturais características do megacólon é estabelecida progressivamente, e associada com a manutenção da inflamação, com a desnervação e com hipertrofia celular, ficando estabelecida por volta de 12 m.p.i em um animal assintomático, de forma semelhante ao que ocorre na DC humana.

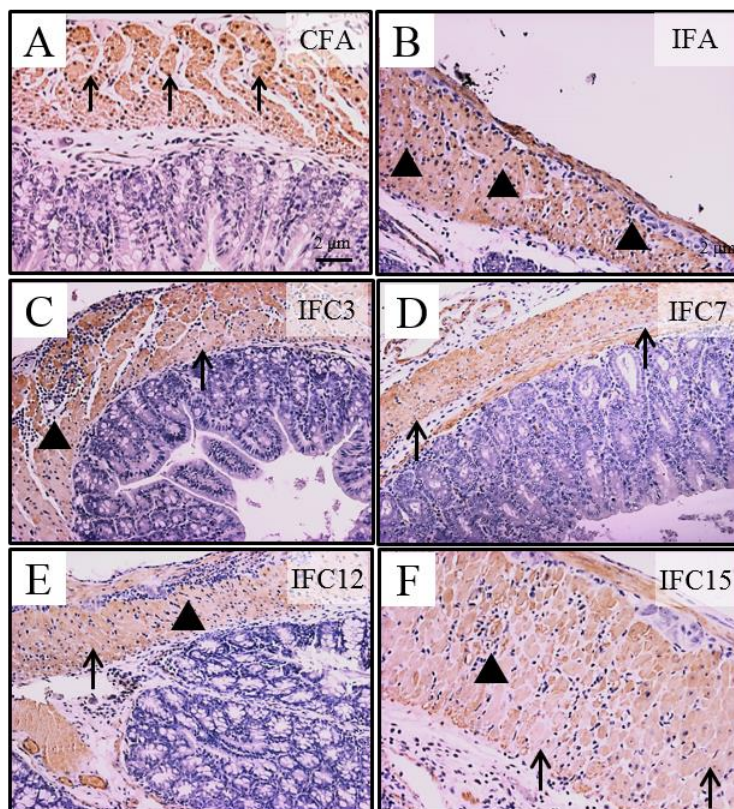


**FIGURA 10: Hipertrofia e aumento da espessura da camada de músculo liso interno ao longo do tempo nos camundongos infectados.**

**FIGURA 10: Hipertrofia e aumento da espessura da camada de músculo liso interno ao longo do tempo nos camundongos infectados.** (A) Relativização da área muscular interna em relação à quantidade total de núcleos. Foram adquiridas 10 imagens em campo claro, em objetiva de 40X da camada muscular circular interna nas amostras imunomarcadas para PGP 9.5. A área total ( $\mu\text{m}$ ) de músculo liso foi delimitada e medida. O número total núcleos de células musculares foi contado através do programa Image J 1.52.,  $n$  =CFA: 9; IFA:4; CFC3:6; IFC3: 7; CFC7: 3; IFC7: 6; CFC12: 3; IFC12: 7; CFC 15: 3; IFC15: 8 camundongos. (B) Espessura da camada muscular interna. Foram obtidas imagens aleatórias de toda a extensão do cólon em HE através do microscópio óptico Olympus BX51 em objetiva de 4X. Em seguida foram realizadas as quantificações da espessura (tamanho em  $\mu\text{m}$ ) da camada de músculo liso circular, que vai da lâmina própria do plexo submucoso a base da muscular longitudinal, obtidas através da média de 3 medidas da extensão para cada imagem pelo programa Image J. 1.52.  $n = 5$  camundongos. Análise estatística ANOVA *two away* com pós-teste de Student Newman-Keuls. (A) \*Diferença em relação ao respectivo grupo controle. #Diferença no tempo em relação ao tempo agudo e ao 3º mês apenas no grupo infectado. †Diferença no tempo em relação a todos os momentos nos grupos infectados. (B)\*Diferença em relação ao respectivo grupo controle. #Diferença no tempo em relação aos demais momentos para a mesma condição (infectado). Dados expressos por média e desvio padrão (DP). Os resultados representam dois experimentos independentes.

#### 4.1.10. Alterações do padrão de expressão do biomarcador de músculo liso, $\alpha$ -actina indicando alterações induzidas no músculo liso ao longo do desenvolvimento do megacólon chagásico

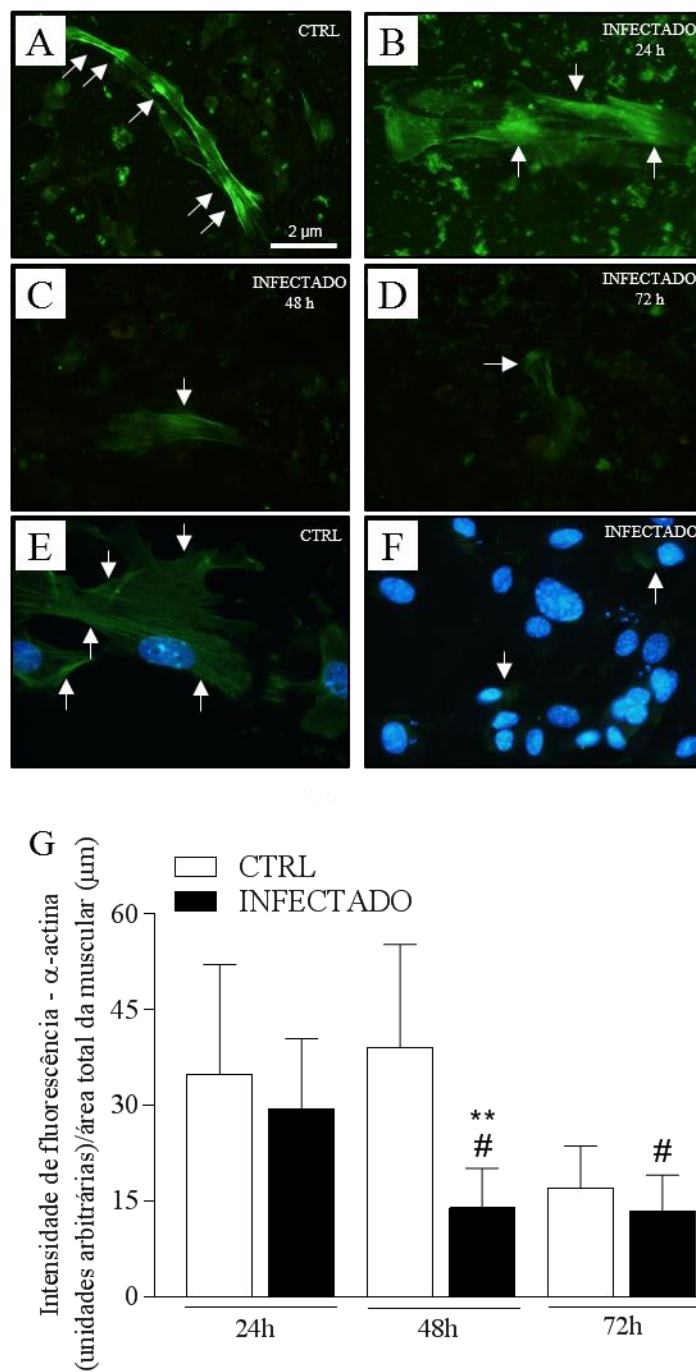
Para investigar a plasticidade a longo prazo das células musculares lisas da própria musculatura intestinal, estudamos os padrões de expressão da  $\alpha$ -actina, um biomarcador da musculatura lisa (GAMBA; CARR; BATEMAN, 2004; KNOWLES et al., 2004). Nossos achados indicam expressão irregular, coloração fraca ou ausente desse microfilamento em algumas células musculares lisas da camada interna (Figura 11 B-F). Essas anormalidades são mais frequentes nos momentos mais tardios da infecção e podem refletir em uma cumulativa interferência de vários fatores na função celular do músculo liso.



**FIGURA 11:** Imunomarcção com anti- $\alpha$ -actina no músculo liso de camundongos Swiss controle e infectados com 50.000 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Controle e infectado de fase aguda (11 dias) e fase crônica (3, 7, 12 e 15 mp.i.). (A) CFA - Controle de fase aguda. (B) IFA - Infectado de fase aguda. (C) IFC3 - Infectado de fase crônica 3 meses. (D) IFC7 - Infectado de fase crônica 7 meses. (E) IFC12 - Infectado de fase crônica 12 meses. (F) IFC15 - Infectado de fase crônica 15 meses. Setas indicam a imunomarcção irregular e microscopicamente diminuída para  $\alpha$ -actina. Cabeças de seta indicam a presença de infiltrado inflamatório. Objetiva 20X. Barra=2  $\mu$ m.

#### **4.1.11. Redução da expressão de alfa-actina em fibras musculares lisas *in vitro* nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção por *T. cruzi***

Ao estudar o efeito da infecção por *T. cruzi* em culturas neuronais entéricas primárias ao longo de 72h (Figura 12) observamos que o padrão de expressão normal mostrado na figura 12 A, mudou para a coloração irregular e fraca na cultura 72 horas após a infecção (Figura 12 D). Observou-se a presença de ninhos de parasitos pelo marcador nuclear nas células positivas para  $\alpha$ -actina já em 48 horas (Figura 12 F). A quantificação da intensidade de fluorescência da  $\alpha$ -actina indica diminuição significativa nas culturas infectadas de 48 horas quando comparado ao seu respectivo controle ( $p < 0,001$ ). A intensidade da imunofluorescência da  $\alpha$ -actina também diminuiu nas culturas infectadas ao longo do tempo, com diferenças significativas a partir de 48 horas ( $p = 0,005$ ) e 72 horas após a infecção ( $p = 0,008$ ).



**FIGURA 12:** Imunofluorescência para anti- $\alpha$ -actina de músculo liso. Análise da intensidade de fluorescência nos tempos de 24, 48 e 72 horas de infecção pelo *T. cruzi*.

**FIGURA 12: Imunofluorescência para o marcador anti- $\alpha$ -actina de músculo liso** **Análise da intensidade de fluorescência nos tempos de 24, 48 e 72 horas de infecção pelo *T. cruzi*.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo por 24, 48 e 72 horas. **(A-F)** Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4% as lamínulas foram marcadas com anti- $\alpha$ -actina, fotografadas e analisadas. Os núcleos das células foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). As lamínulas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 para micrografias e análise morfométrica. **(G)** A análise quantitativa da intensidade de fluorescência foi expressa pela intensidade de fluorescência para  $\alpha$ -actina/área total de célula muscular ao longo da infecção,  $n=4$  camundongos, em triplicata. Análise estatística ANOVA *two way* com pós-teste de Student Newman-Keuls. \*Diferença em relação ao respectivo grupo controle,  $p<0,001$  (\*\*). #Diferença no tempo em relação ao momento 24 horas para os grupos infectados. Dados mostrados com média e desvio padrão (DP). Setas brancas indicam a fluorescência para anti- $\alpha$ -actina. A marcação pelo Hoechst evidencia a presença de amastigotas dentro das células. CTRL: controle. Objetiva 20X. Barra=2  $\mu$ m.

#### **4.1.12. Caracterização das culturas de neurônios entéricos controle e infectados por *T. cruzi***

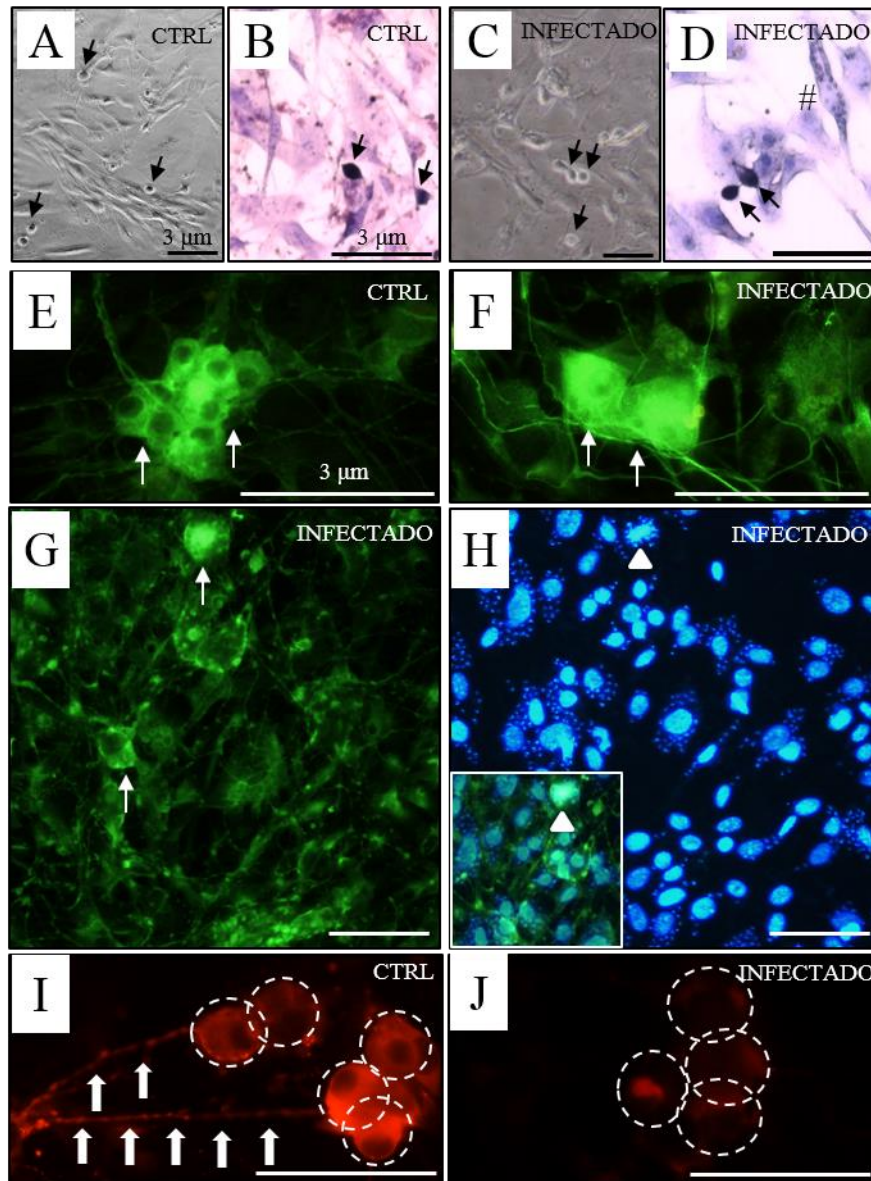
As observações morfológicas das culturas de neurônios entéricos estão representadas na figura 13.

A confirmação de que a cultura é mista foi feita em microscopia de campo claro que diferencia claramente células musculares lisas, células acessórias (glia) e neurônios (Figura 13 A). Na coloração com Giemsa, observou-se que as células musculares e da glia apresentam ninhos de amastigotas intracitoplasmáticos, mas também foi possível observar neurônios infectados (Figura 13 D).

As culturas indicam densidade celular homogênea a despeito de serem controles ou infectadas. Em ensaios de imunofluorescência para PGP 9.5 (Figura 13 E a H) é evidenciado, além do corpo neuronal, a presença dos neuritos que emitem prolongamentos a partir do corpo neuronal para estabelecer conexões com as outras células presentes na cultura. Essa inervação se dá de forma indiscriminada com vários tipos celulares presentes na cultura, e algumas vezes formando redes entre várias células que se acumulam em camadas. Nas culturas infectadas e imunomarcadas para PGP 9.5 foi possível observar uma célula PGP 9.5+ infectada (Figura 13 H), formando ninhos de amastigotas em células com morfologia e fenótipo neuronal. Também foi possível observar os ninhos de amastigotas em outros tipos de células (Figura 13 H).

A dupla marcação para  $\beta$ -tubulina III e anti-*T. cruzi* (Figura 13 I e J) mostrou que tanto os corpos neuronais quanto as terminações nervosas são diretamente afetados pela infecção. Essa evidência foi confirmada através da quantificação de intensidade de fluorescência para corpo neuronal e densidade neurítica no tempo de 24 horas devido à diminuição da intensidade de marcação das culturas infectadas em comparação aos seus controles (Figura 14).



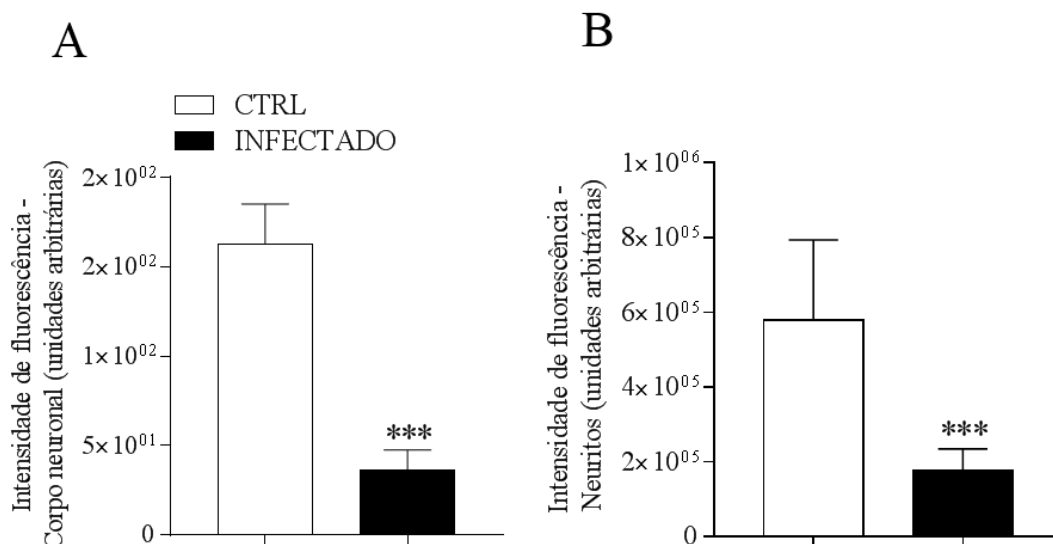


**FIGURA 13: Aspectos morfológicos descritivos nas culturas de neurônios entéricos controle e infectado pela cepa Y de *T. cruzi*.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4% as lamínulas foram fotografadas em (A e C) campo claro (B e D) coradas em Giemsa, (E – H) marcadas com anti-PGP 9.5 (verde) e (I e J) anti- $\beta$ -tubulina III (vermelho) Os núcleos das células foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). As setas pretas e brancas indicam corpos de neurônios, sustenido indica a presença do parasito dentro de outros tipos celulares, cabeça de seta indica neurônio infectado, e setas brancas largas indicam prolongamentos neuríticos. Nota-se os corpos neuronais circundados nos grupos controles e infectados. CTRL: controle. Aumentos de 10X (Fig. A, e C) 20X (Fig. B, D, G e H) e 40X (Fig. E, F, I e J). Barra=3  $\mu$ m.



#### 4.1.13. Diminuição da intensidade de fluorescência de corpo neuronal e de densidade neurítica nas culturas entéricas infectadas

Por análise morfométrica as culturas de neurônios entéricos no tempo inicial de 24 horas já apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência para corpo neuronal (Figura 14 A) e também para a densidade de inervação (Figura 14 B) quando comparados ao seu controle ( $p < 0,001$ ). Esses resultados mostram que ocorre uma destruição significativa da arquitetura e da organização neuronal nos momentos iniciais da infecção pelo *T. cruzi*. Este é um achado que complementa os resultados de perda neuronal na fase aguda observada *in vivo*.

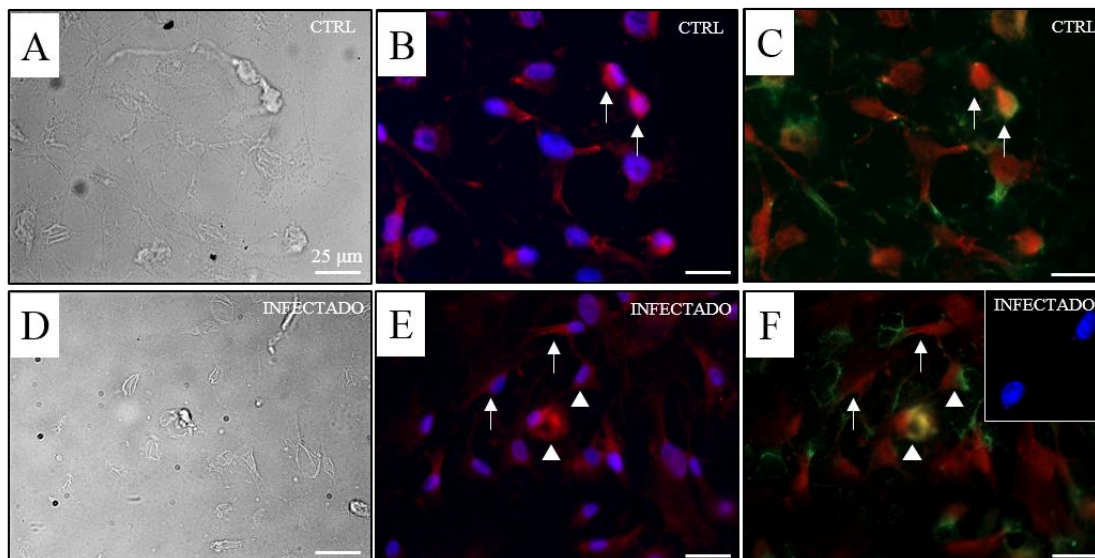


**FIGURA 14: Análise da intensidade de fluorescência no tempo de 24 horas após a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo por 24 horas. Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4% as lamínulas foram marcadas com anti- $\beta$ -Tubulina III (vermelho). As lamínulas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 para análise morfométrica. (A e B) A análise quantitativa da intensidade de fluorescência foi indicada pela intensidade de fluorescência de corpo neuronal e de neuritos,  $n=4$  camundongos, em duplicata. CTRL: controle. Análise estatística com o Teste de *t* Student. Dados mostrados com média e desvio padrão (DP). Valores de  $p < 0,001$  (\*\*\*)

#### 4.1.14. Evidências de identificação de neurônios nNOS+ infectados com a cepa Y de *T. cruzi*

Através da dupla imunomarcagem para  $\beta$ -tubulina III e nNOS de preparações não infectadas, observamos várias células neuronais duplamente coradas em paralelo com a

morfologia observada pela microscopia de contraste de fase (Figura 15 A-C). Alguns neurônios corados para nNOS apresentaram invasão pelo *T. cruzi* (Figura 15 F). Os parasitos que foram corados através do Hoechst são vistos no interior dos corpos celulares dos neurônios nitrérgicos, como indicado na figura 15 (Figura 15 F, detalhe).

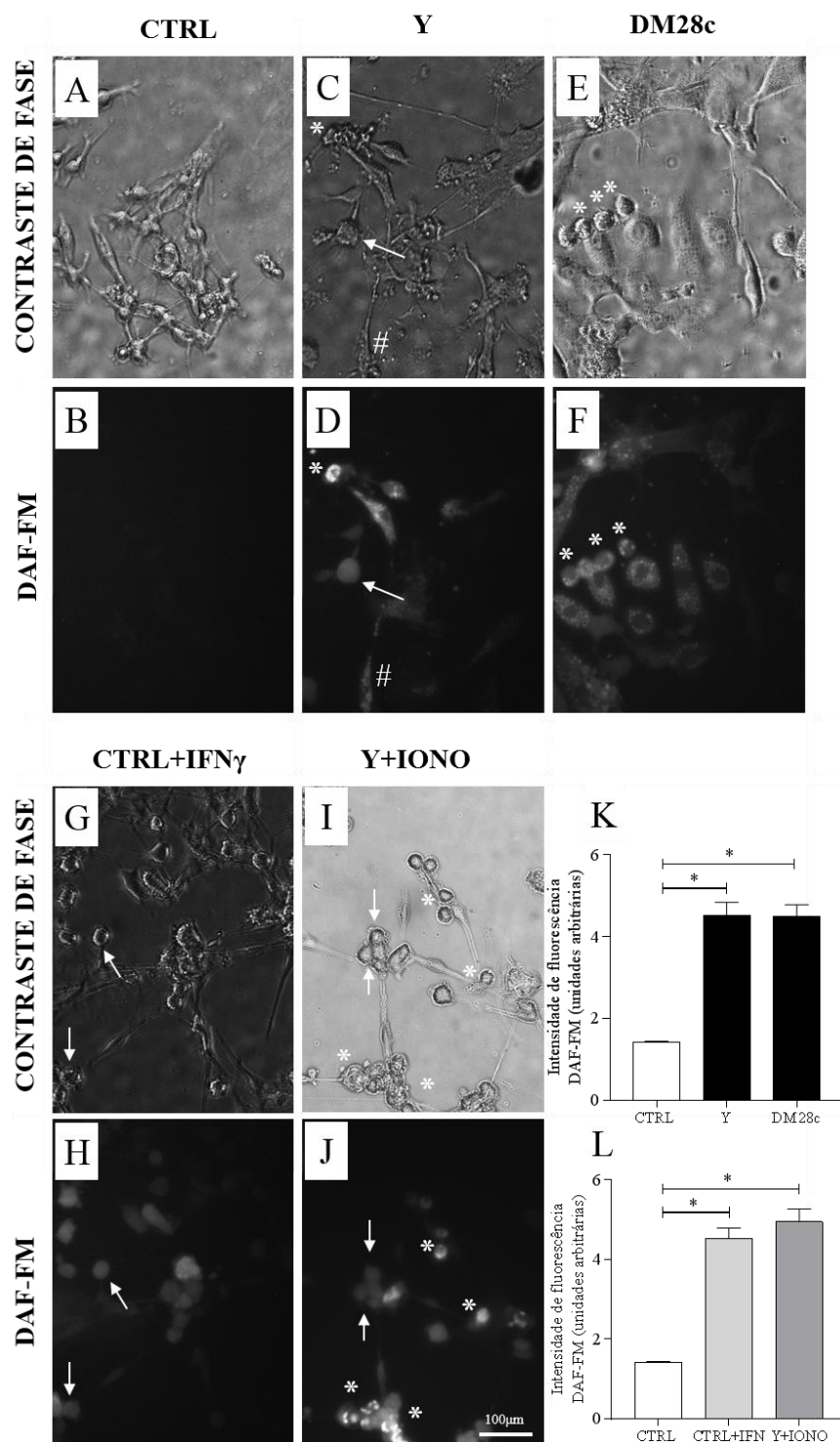


**FIGURA 15: Imunomarcção para anti- $\beta$ -tubulina III e anti-nNOS nas culturas de neurônios entéricos controle e infectado pela cepa Y de *T. cruzi*.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo 72 horas. Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4% as lamínulas foram fotografadas em (A e D) campo claro, (B e E) marcadas com anti- $\beta$ -tubulina III (vermelho) e (C e F) anti-nNOS (verde). Os núcleos das células e das formas amastigotas do *T. cruzi* foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). As setas brancas indicam neurônios marcados e as cabeças de seta indicam outros tipos neuronais. Objetiva 40X. Barra= 25 $\mu$ m.

#### 4.1.15. Os neurônios entéricos são uma fonte de NO produzido pela ativação da nNOS pelo *T. cruzi* bem como por IFN $\gamma$

A produção de NO foi detectada pelo uso do diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína permeável às células (DAF-FM, Invitrogen) que reage com o NO e espécies derivadas de NO relacionadas, produzindo um aduto altamente fluorescente (BALCERCZYK; SOSZYNSKI; BARTOSZ, 2005). As culturas foram infectadas com duas cepas diferentes de *T. cruzi* (Y e DM28c) e/ou tratadas apenas com IFN $\gamma$  por 4 horas. A produção de NO pelas células em cultura foi avaliada *in situ* por microscopia de fluorescência e pela quantificação de nitrito, um produto final de NO no sobrenadante das culturas. Ambos, a estimulação com IFN $\gamma$  das culturas

controle e a infecção com *T. cruzi* (cepa Y e DM28c) aumentam a fluorescência do DAF, indicando o aumento na produção de NO (Figura 16 D, F e H, respectivamente) em comparação com as condições controle. A morfologia das células DAF-positivas indica seu fenótipo de neurônios detectando pela primeira vez um aumento na produção de NO neuronal induzida por infecção por *T. cruzi* e por ativação do IFN $\gamma$ . Além disso, os neurônios infectados exibiram maior oxidação para a DAF-FM do que a glia e o músculo liso infectados nas mesmas culturas, reforçando uma produção neuronal de NO por neurônios neste modelo. Ao realizar a quantificação de intensidade de fluorescência para DAF-FM apenas nas células com morfologia neuronal confirmamos que os neurônios das culturas infectadas exibem maior oxidação pelo DAF-FM quando comparado aos neurônios controle (culturas não infectadas) (Figura 16 K). As culturas controles apenas ativadas com IFN $\gamma$  e as culturas infectadas e tratadas com ionomicina, um mobilizador de Ca<sup>2+</sup> nos processos intracelulares, também apresentaram aumento da intensidade de fluorescência quando comparadas aos seus controles (Figura 16 L).

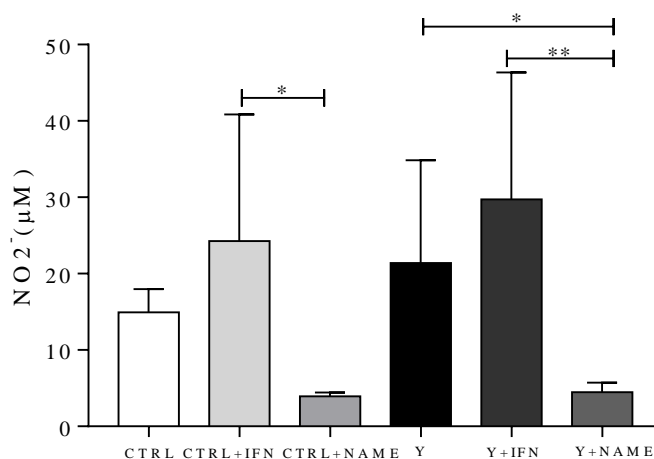


**FIGURA 16:** Quantificação de óxido nítrico através da sonda DAF-FM nos cultivos entéricos de células controle e infectadas com as cepas de *T. cruzi* Y e DM28c.

**FIGURA 16: Quantificação de óxido nítrico através da sonda DAF-FM nos cultivos entéricos de células controle e infectadas com as cepas de *T. cruzi* Y e DM28c.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 72 horas; em seguida, nos cultivos controle, controle + IFN $\gamma$  (CTRL, CTRL+IFN $\gamma$ ), nos cultivos infectados (Y, DM28c) e nos cultivos infectados com ionomicina (Y+IONO), o reagente DAF-FM foi adicionado por aproximadamente 1 hora, seguido de visualização em tempo real das células pelo microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 200 para a detecção do óxido nítrico (NO). **(A, C, E, G e I)** Fotomicrografias de contraste de fase. **(B, D, F, H e J)** Fotomicrografias de reação com DAF-FM. **(A e B)** No grupo controle não se observa a oxidação do DAF-FM. **(C, D, E e F)** A infecção produziu uma oxidação maior nas células com morfologia neuronal, e especialmente nos neurônios infectados (asterisco). **(G e H)** As células ativadas com IFN $\gamma$  evidenciaram aumento da oxidação quando reagiram com DAF-FM. **(I e J)** Nos cultivos com ionomicina, células com morfologia neuronal apresentaram maior oxidação pelo DAF-FM quando infectadas em comparação com células não infectadas no mesmo cultivo (setas brancas). **(K e L)** Quantificações de intensidade de fluorescência da sonda nos grupos CTRL, Y, DM28c, CTRL+IFN $\gamma$  e Y+IONO.  $n=4$  camundongos, em triplicata. Análise estatística com o Teste  $t$  Student. \*Diferença em relação ao grupo controle. Os dados são mostrados como média e desvio padrão (DP). Valores de  $p<0,05$ . Sustenido indica outras células infectadas. Setas indicam corpos neuronais. Objetiva 20X. Barra=100  $\mu$ m.

#### 4.1.16. Aumento da produção de NO nos cultivos ativados com IFN $\gamma$ e infectados com a cepa Y de *T. cruzi*

Os níveis de nitrito nos sobrenadantes da cultura foram medidos pelo teste de reação Griess sendo um indicador da produção de NO nos cultivos. Pode-se observar que a infecção pelo *T. cruzi* e a ativação pelo IFN $\gamma$  levou a um aumento nos níveis de nitrito que foi inibido pelo L-NAME ( $p < 0,05$   $p < 0,01$ , respectivamente). A ativação com IFN $\gamma$  nos cultivos controle aumentou a produção de nitrito pelas células ( $p < 0,05$ ).



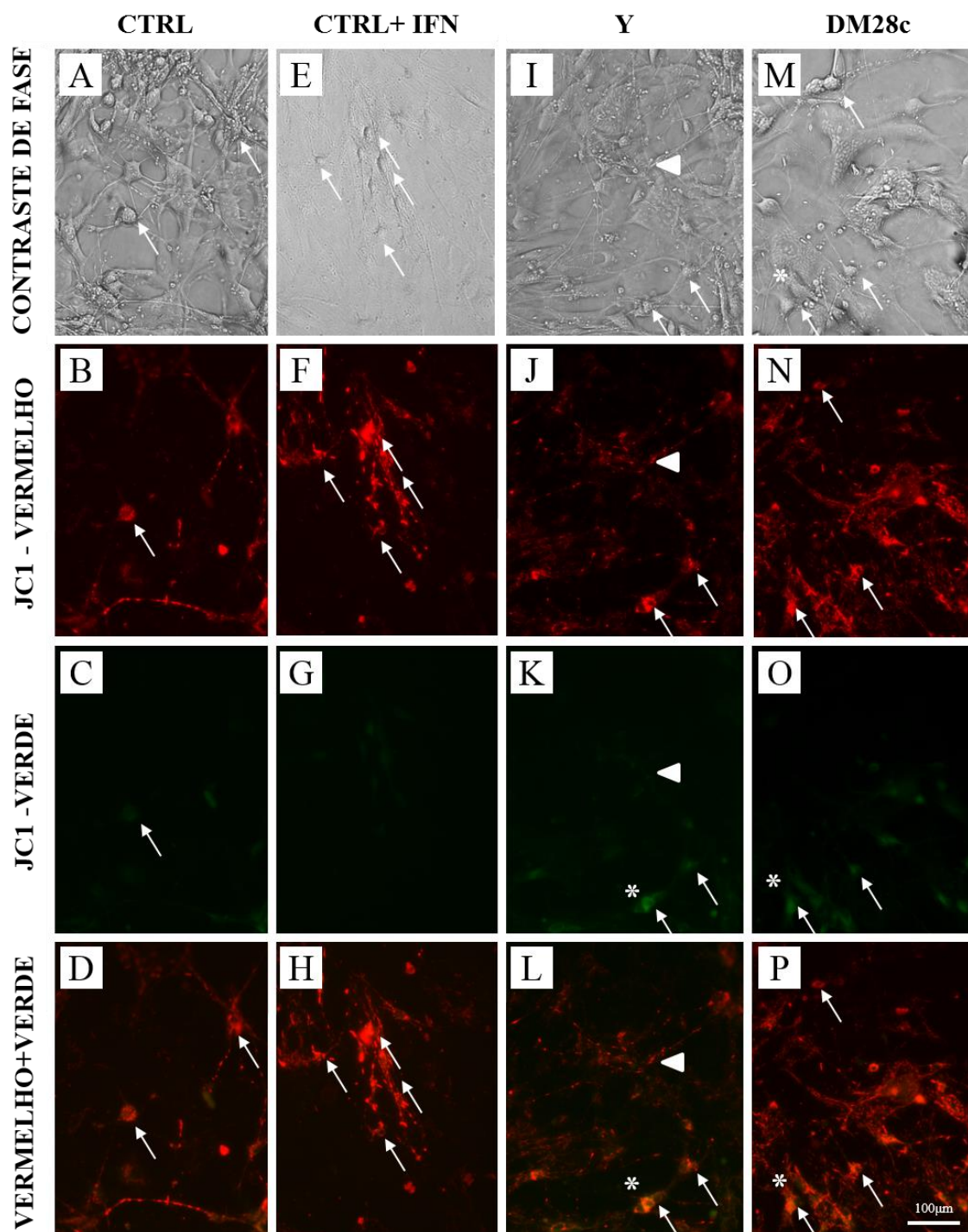
**FIGURA 17: Aumento da produção de nitrito nos cultivos ativados com IFN $\gamma$  e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* pela reação de Griess.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 72 horas. Após 72 horas o sobrenadante foi coletado dos cultivos controle, controle + IFN $\gamma$ , controle + L-NAME (CTRL, CTRL+IFN $\gamma$ , CTRL+NAME), nos cultivos infectados com Y, Y + IFN $\gamma$  e Y + L-NAME (Y, Y+IFN, Y+NAME) em seguida procedeu-se a análise da produção de nitrito através da reação de Griess. n=4 camundongos, em duplicata. Análise estatística ANOVA *one way* com pós-teste de Student Newman-Keuls. \*Diferença entre tratamentos,  $p \leq 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*). Dados mostrados com média e desvio padrão (DP).

#### 4.1.17. Há evidências de dano mitocondrial em neurônios durante a infecção pelas cepas Y e DM28c de *T. cruzi*

O iodeto de 5,59,6,69-tetracloro1,19,3,39-tetraetilbenzimidazolocarbo-cianina (JC-1) é um corante catiônico que se acumula na dependência da despolarização da membrana mitocondrial. Em baixas concentrações (devido ao baixo potencial da membrana), o JC-1 é predominantemente um monômero que fluoresce em verde (emissão de  $530 \pm 15$  nm). Em alta concentração (devido ao alto potencial da membrana)

o corante forma agregados que emitem cor vermelha ( $590\pm 17.5$  nm). Assim, a diminuição da fluorescência vermelha em relação a verde é um indicativo de despolarização, enquanto o contrário é indicativo de hiperpolarização da membrana mitocondrial. O JC-1 foi usado nos nossos ensaios como um indicador *in situ* do potencial mitocondrial dos neurônios em nossas preparações.

A infecção por *T. cruzi* está associada à despolarização da membrana interna mitocondrial, um indicativo de comprometimento da função mitocondrial, que foi detectado às 48 horas após infecção, quando também foram detectados parasitos no interior das células neuronais. As culturas não infectadas (Figura 18 A-D) e tratadas com  $\text{IFN}\gamma$  (Figura 18 E-H) não mostraram despolarização mitocondrial com maior intensidade de fluorescência vermelha. Ambas as linhagens Y (Figura 18 I-L) e DM28c (Figura 18 M-P) apresentaram a mudança de cor característica de despolarização da membrana mitocondrial.



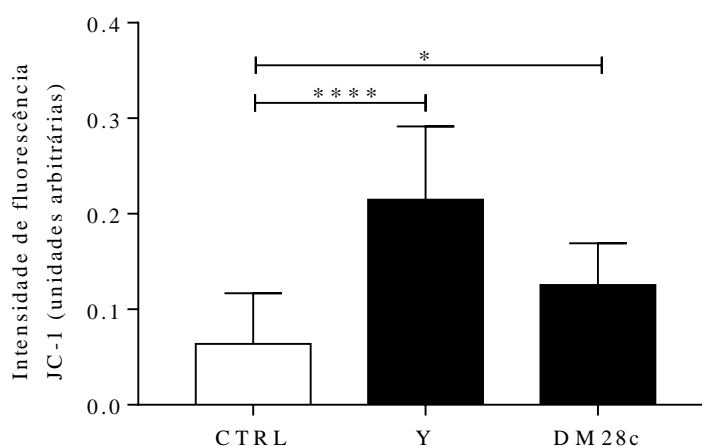
**FIGURA 18:** Perda da função mitocondrial nos cultivos entéricos infectados com as cepas de *T. cruzi* Y e DM28c.



**FIGURA 18: Perda da função mitocondrial nos cultivos entéricos infectados com as cepas de *T. cruzi* Y e DM28c.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 48 horas; em seguida, nos cultivos controle, controle + IFN (CTRL, CTRL+IFN $\gamma$ ) e nos cultivos infectados (Y, DM28c), o JC-1 foi adicionado por aproximadamente 1 hora seguido de visualização em tempo real das células pelo microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 200. (A, E, I, M) Fotomicrografias de contraste de fase, (B, F, J e N). Fotomicrografias da membrana mitocondrial do cultivo funcional (vermelho). (C, G, K e O) Fotomicrografias de perda do potencial de membrana da mitocôndria (verde). (D, H, L e P) Sobreposição dos filtros para identificar lesões nas mitocôndrias. (A – H) As células controles e as ativadas com IFN $\gamma$  apresentam as membranas da mitocôndria funcionais. (I – P) Nos cultivos infectados observamos um aumento na fluorescência verde indicando uma perda da função mitocondrial, em específico nas células neuronais (setas) e nas varicosidades (cabeça de seta). Asterisco indica célula infectada. Objetiva 20X Barra=100  $\mu$ m.

#### 4.1.18. Aumento da razão entre intensidade de fluorescência verde (monômeros)/fluorescência vermelha (Agregados) de JC-1 nos cultivos infectados (Y e DM28c) indica maior despolarização mitocondrial nos neurônios infectados

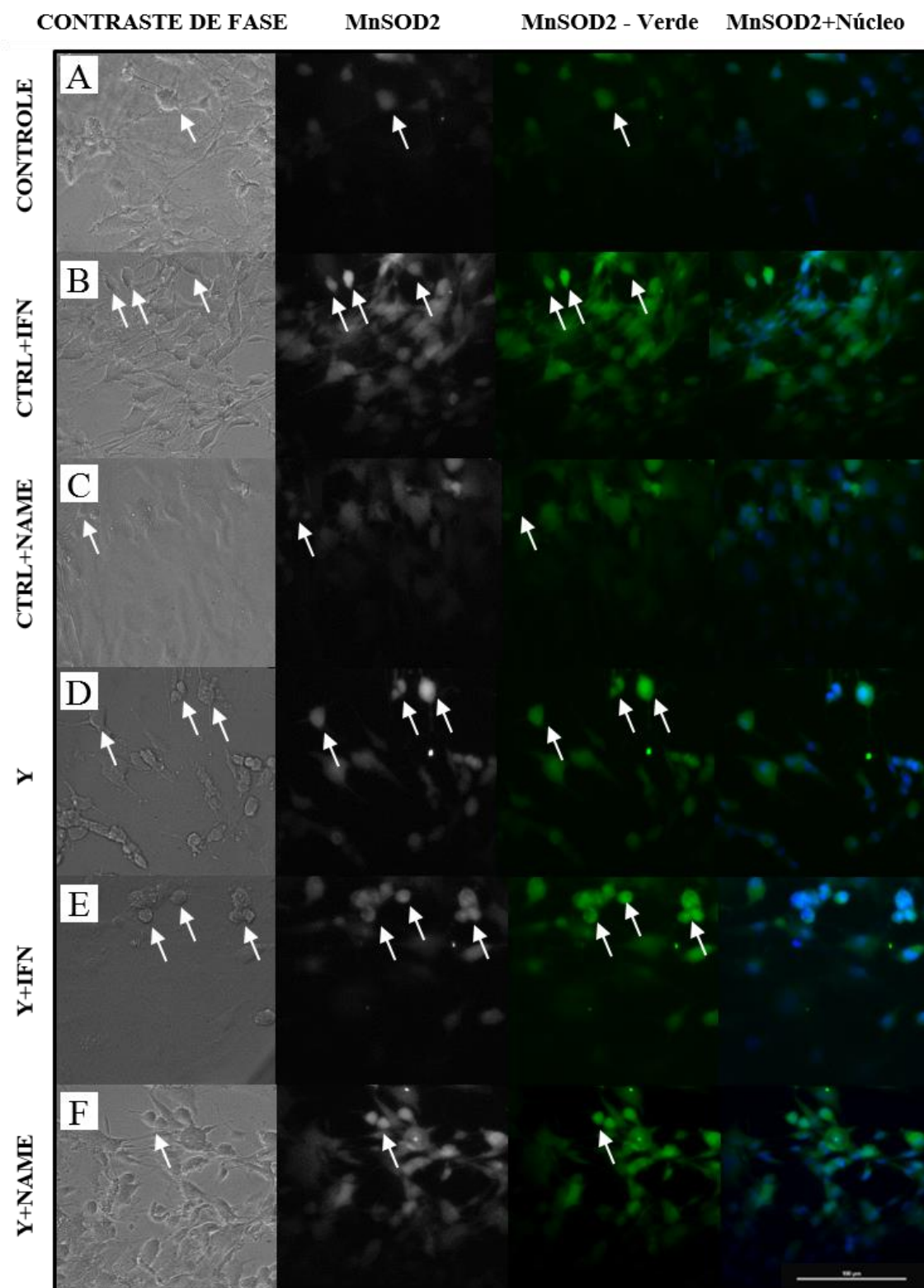
Como mostrado na figura 18, a despolarização mitocondrial é indicada por uma diminuição qualitativa na razão de intensidade de fluorescência verde/vermelho. As culturas não infectadas (Figura 18 A-D) e as culturas tratadas com IFN $\gamma$  (Figura 18 E-H) evidenciaram uma alteração da fluorescência verde, indicando despolarização mitocondrial discreta. Ambas as cepas Y (Figura 18 I-L) e DM28c (Figura 18 M-P) apresentaram um aumento da fluorescência verde (Figura 18 K e figura 18 O) sendo um indicativo de despolarização da membrana mitocondrial, que foi quantificada e apresentou um aumento significativo da intensidade de fluorescência da cepa Y ( $p < 0,0001$ ), e da cepa DM28c ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle, indicada como unidades arbitrárias expressando a razão fluorescência verde/vermelho na figura 19.



**FIGURA 19: Aumento da intensidade de fluorescência na razão entre verde/vermelho nos cultivos infectados com as cepas Y e DM28c.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 48 horas; em seguida, nos cultivos controle (CTRL) e nos cultivos infectados (Y, DM28c), o JC-1 foi adicionado por aproximadamente 1 hora seguido de visualização em tempo real das células pelo microscópio de fluorescência e documentação fotográfica em objetiva de 20X para quantificações da intensidade de fluorescência das sondas (verde e vermelha). Foram adquiridas aproximadamente 6-8 campos dos experimentos em duplicata, em seguida as medidas de intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) foram expressas pela razão entre fluorescência verde/vermelha. Análise estatística com o Teste de *t* Student. \*Diferença em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Dados mostrados com média e desvio padrão (DP).

#### **4.1.19. A expressão de MnSOD2 é (principalmente) aumentada em células neuronais de culturas infectadas *in vitro***

Na figura 20 A-F, as imagens de contraste de fase emparelhadas com as de fluorescência anti-MnSOD2 são mostradas para controles e culturas infectadas com a cepa Y. A expressão de MnSOD2 nos neurônios, indicada por setas e identificada por sua morfologia, foi intensa em culturas infectadas com a cepa Y e infectadas com Y + INF $\gamma$  (Figura 20 D e E), em comparação com as não infectadas (Figura 20 A-C) e com culturas infectadas e tratadas com L-NAME (Figura 20 F). O L-NAME inibiu parcialmente a expressão de MnSOD2 em culturas infectadas.

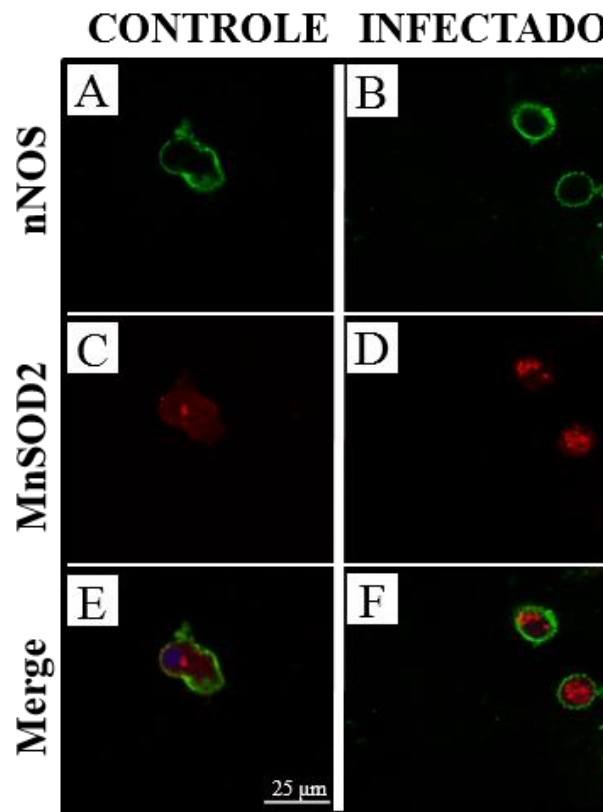


**FIGURA 20:** Células neuronais infectadas com as cepas Y e DM28c apresentam maior expressão de MnSOD2.

**FIGURA 20: Células neuronais infectadas com as cepas Y e DM28c apresentam maior expressão de MnSOD2.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 72 horas. **(A – F)** Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4% parte das lamínulas foram marcadas com anti-MnSOD2 (verde) fotografadas e analisadas. Os núcleos das células e dos foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). As lamínulas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 200. **(D e E)** As células com maior intensidade de fluorescência para o anti-MnSOD2 foram as neuronais infectadas e as ativadas com IFN $\gamma$ . Objetiva=20X. Barra=100  $\mu$ m.

#### 4.1.20. Aumento da Intensidade de fluorescência de MnSOD2 em neurônios nNOS+ infectados com *T. cruzi* em comparação aos não infectados

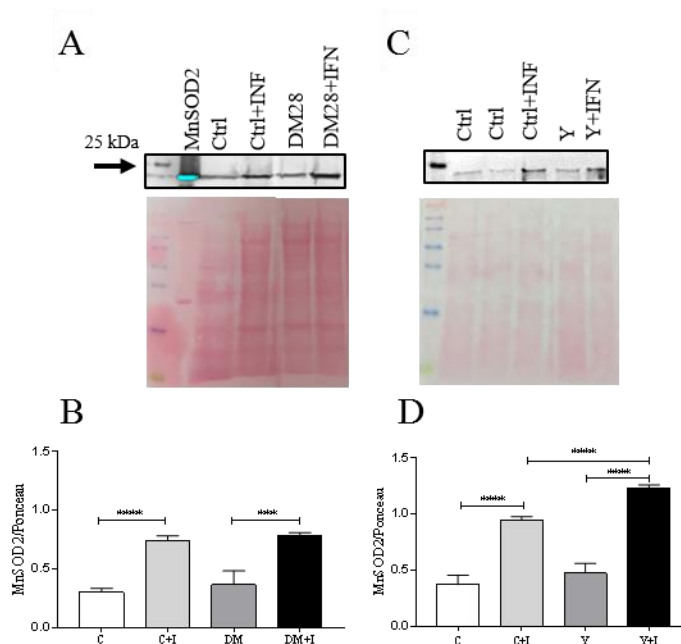
A microscopia confocal foi utilizada para confirmar o fenótipo nitrérgico dos neurônios entéricos por dupla imunofluorescência para nNOS (Verde, figura 21 A e B) e MnSOD2 (Vermelho, figura 21 C e D). Observou-se maior expressão nos corpos neuronais das culturas infectadas em comparação aos não infectados indicando que os neurônios nitrérgicos produzem MnSOD2 como um mecanismo de defesa frente à infecção.



**FIGURA 21: Imunofluorescência para os anticorpos anti-nNOS (verde) e anti-MnSOD2 (vermelho) nos cultivos de neurônios entéricos.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 72 horas. (A – F) Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4% parte das lamínulas foram marcadas com anti-nNOS (verde) e anti-MnSOD2 (vermelho). Os núcleos das células e dos foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). As lamínulas foram fotografadas em microscópio confocal LSM 880 (ZEISS, Alemanha). Os neurônios nNOS+ infectados apresentam maior intensidade de marcação para MnSOD2 quando comparado ao seu respectivo controle. Objetiva=20X. Barra=25 µm.

#### 4.1.21. Maior expressão de MnSOD2 em culturas infectadas e infectadas mais ativadas com IFN $\gamma$

A análise por Western blot dessas culturas também indicou maior expressão qualitativa (figura 22 A e C) e quantitativamente (figura 22 B e D) de MnSOD2 nas culturas infectadas e ativadas com IFN $\gamma$ , tanto pelas linhagens Y e DM28c ( $p < 0,0001$ ), confirmando os achados morfológicos descritos nos tópicos acima.



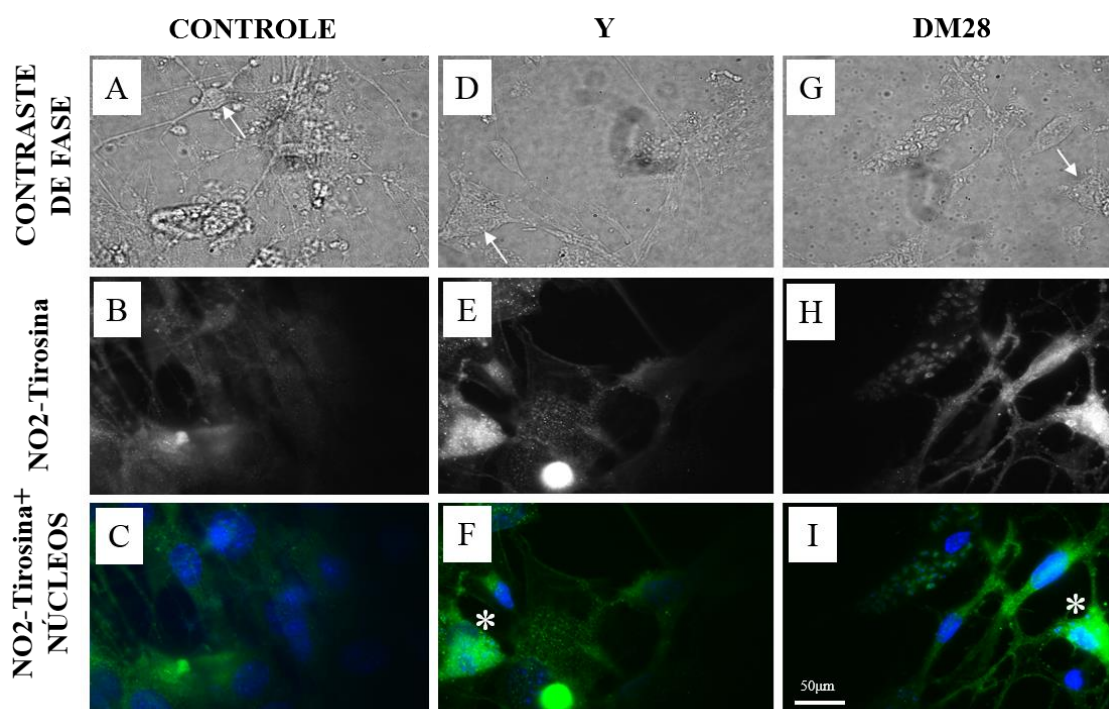
**FIGURA 22: Expressão de MnSOD2 por Western Blot em cultivos de neurônios entéricos controle e infectado.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 72 horas. As culturas de 72 horas foram novamente tripsinizadas e o *pool* de células foi destinado para a realização da técnica de Western Blot para avaliação da expressão da proteína MnSOD2, onde mostramos maior expressão desta proteína nos cultivos infectados pela cepa Y e DM28c, além de sua ativação com adição de IFN $\gamma$ . n=4 camundongos, em triplicata. **(B e D)** Análise estatística ANOVA *one way* com pós-teste de Tukey's. \*Diferença entre grupos,  $p < 0,001$  (\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*). Os dados demonstram média e desvio padrão (DP).

#### 4.1.22. Aumento da intensidade de fluorescência anti-3-NO $_2$ -tirosina em células com morfologia neuronal infectadas por *T. cruzi*

Outra evidência de dano neuronal em culturas de neurônios infectados foi a produção de anti-3-Nitrotirosina (anti-3-NO $_2$ -Tirosina), mostrada na figura X com 72 horas após a infecção. A produção celular de espécies reativas de nitrogênio derivadas

do óxido nítrico, como dióxido de nitrogênio, peroxinitrito e seus radicais derivados, levam a nitração de resíduos de tirosina nas proteínas.

Células danificadas, algumas das quais preservando a morfologia neuronal (asterisco) (Figura 23 H e I) foram intensamente coradas pelo anticorpo Anti-3-NO<sub>2</sub>-Tyr em comparação com os neurônios em culturas não infectadas. Algumas células alongadas na cultura também foram coradas em segundo plano, como esperado, uma vez que a morte de células musculares lisas infectadas já foi detectada nos experimentos *in vivo*.

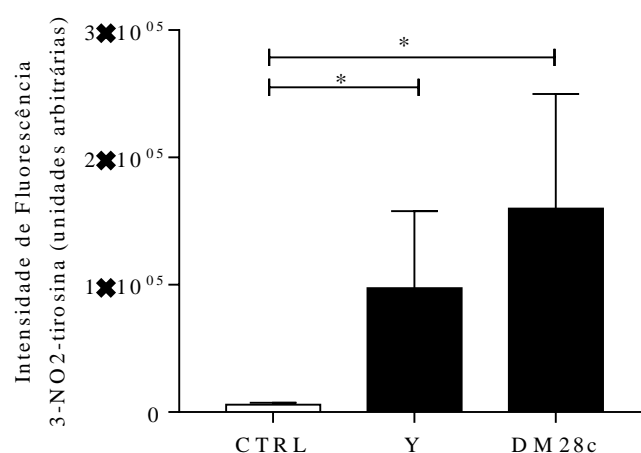


**FIGURA 23: Imunofluorescência para os anticorpos anti-NO<sub>2</sub>-Tirosina (NO<sub>2</sub>-Tirosina) (verde) nos cultivos de neurônios entéricos controle e infectado.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 72 horas. Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4% parte das lamínulas foram marcadas com anti-NO<sub>2</sub>-Tirosina (verde) fotografadas. Os núcleos das células e dos foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). As lamínulas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 200. (H e I) As células com maior intensidade de fluorescência para NO<sub>2</sub>-Tirosina foram as células neuronais infectadas. Objetiva=40X. Barra=50 µm.

#### 4.1.23. Aumento da intensidade de fluorescência nos compostos neuronais nitrosilados nos cultivos infectados com a cepa Y e DM28c



Evidências adicionais para morte neuronal em culturas de neurônios infectados são mostradas na figura 24, onde a intensidade da fluorescência foi medida em células com morfologia neuronal (reconhecida através da utilização do contraste de fase). A infecção com as cepas Y e DM28c foi capaz de induzir um aumento significativo nos níveis neuronais de nitrotirosina em comparação ao cultivo controle ( $p < 0,05$ ). Mostrando que esses neurônios geram compostos nitrados em função da infecção pelo *T. cruzi*.

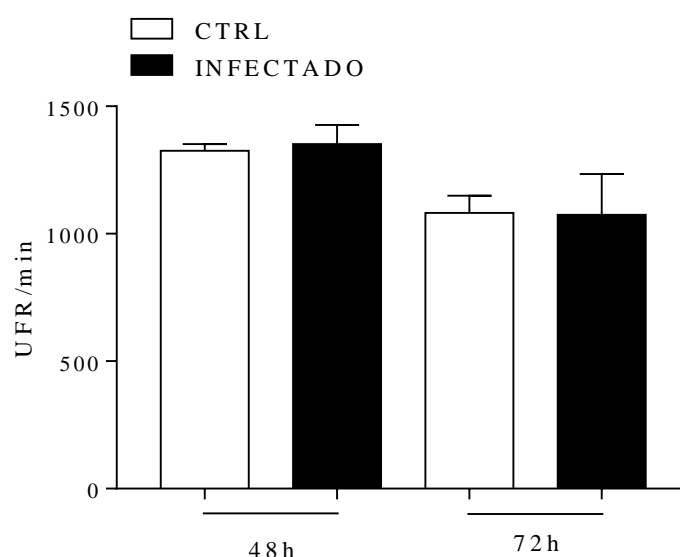


**FIGURA 24: Aumento da nitrosilação através da medida quantitativa de intensidade de fluorescência nos cultivos infectados com a cepa Y e DM28c.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 72 horas. Após fixação em solução de paraformaldeído tamponado a 4%, parte das lamínulas foram marcadas com anti-3-NO<sub>2</sub>-tyrosine (verde), fotografadas e analisadas. Os núcleos das células foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). As lamínulas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 200. Foram adquiridas aproximadamente 6-8 campos dos experimentos em duplicata, em seguida procedeu-se as quantificações da intensidade de fluorescência verde (unidades arbitrárias). Análise estatística com Teste de *t* Student. \*Diferença em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$  (\*). Dados mostrados com média e desvio padrão (DP).

#### 4.1.24. Os cultivos infectados com a cepa Y não apresentaram aumento da produção de ROS detectável através da sonda CM-H2DCFDA

Sabe-se que a infecção pelo parasito pode induzir a produção de ROS, a qual pode controlar negativa ou positivamente o desenvolvimento intracelular do parasito (ALVAREZ et al., 2011; PAIVA et al., 2012). E estudos recentes que utilizaram cultura primária de cardiomiócitos, foi observado um aumento da produção intracelular de ROS (DIAS et al., 2017). Portanto realizamos a análise da produção de ROS utilizando a

sonda CM-H2DCFDA, que foi adicionada às culturas controle ou infectadas, de acordo com o descrito na metodologia. Quando oxidada, CM-H2DCFDA emite fluorescência, sendo a intensidade de fluorescência produzida uma medida indireta da produção celular de espécies reativas de oxigênio (ROS). A medida dos níveis de fluorescência foi realizada no tempo 48 ou 72 horas após a infecção, tempo correspondente à fase de multiplicação intracelular do parasito. Não observamos diferença significativa na produção de ROS nos grupos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* em relação aos controles.



**FIGURA 25: Fluorescência relativas de CM-H2DCFDA oxidada presente em culturas primárias de neurônios entéricos de camundongos, 48 e 72 horas após a infecção com a cepa Y de *T. cruzi*.** Os neurônios retirados do plexo mioentérico foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel e meio completo no tempo de 48 e 72 horas, sendo posteriormente submetidos à incubação com a sonda. As medidas no equipamento Synergy 2 (Biotek) foram feitas em culturas vivas em 48 e 72 h após a infecção. Valores indicados em unidades de fluorescência relativas (UFR). Não se observa diferença estatística entre os grupos analisados. Dados apresentados com média e desvio padrão (DP).

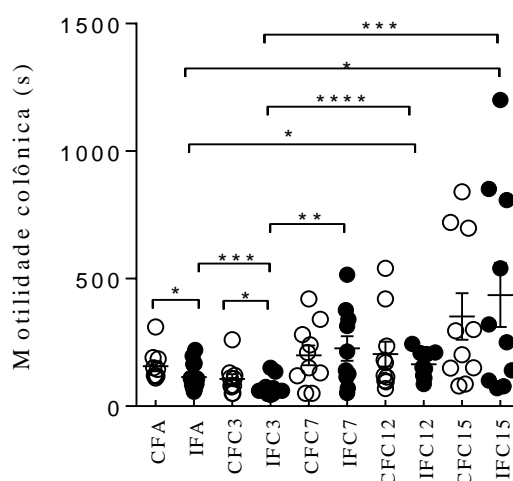
## 4.2. Ensaios de motilidade *in vivo* e *ex vivo*

Nesta parte serão apresentados os resultados dos ensaios de motilidade utilizados para caracterizar as repercussões funcionais que as alterações estruturais descritas na parte anterior acarretam.

### 4.2.1 Tempo de trânsito colônico *in vivo*

O cólon apresentou um aumento da peristalse nos camundongos infectados de fase aguda e do grupo IFC3 comparados com seus respectivos controles não infectados ( $p < 0,05$ ), identificado através da diminuição do tempo de trânsito colônico (tempo de liberação da esfera de vidro “*bead*”).

Quando analisamos os grupos IFA em relação ao grupo IFC12 ( $p < 0,05$ ) e IFC15 ( $p < 0,05$ ); IFC3 quando comparado a IFC7 ( $p < 0,01$ ), IFC12 ( $p < 0,0001$ ) e IFC15 ( $p < 0,001$ ), observa-se que as fases mais tardias apresentam um aumento significativo no tempo de liberação da *bead* (Figura 26), indicado uma diminuição da peristalse a partir de 7 m.p.i.

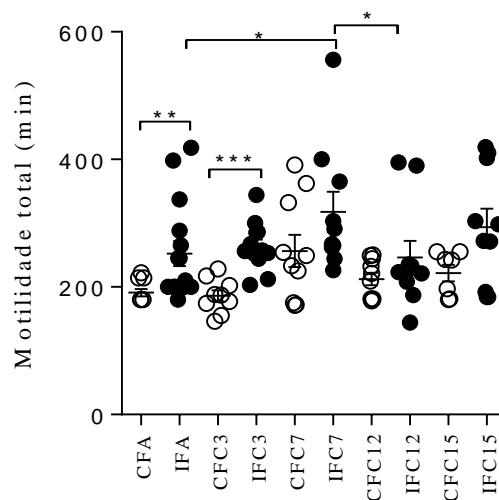


**FIGURA 26: Avaliação da motilidade colônica.** Camundongos Swiss fêmeas foram infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Dos animais, 10 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo de fase aguda); 120 foram tratados com Bz nos tempos 3º, 7º, 12º e 15º mês (grupo de fase crônica), em paralelo 50 foram eutanasiados para compor o grupo controle (fase aguda e crônica). A motilidade colônica foi avaliada através do tempo (segundos) da liberação da “*bead*” de vidro no cólon dos camundongos controle e infectado. Análise estatística com o Teste *t* Student. CFA (Controle de fase aguda); IFA (Infectado de fase aguda); CFC (Controle de fase crônica) e IFC (Infectado de fase crônica). Valores de  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,001$  (\*\*\*)  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

#### 4.2.2. O tempo de trânsito intestinal total está aumentado, mas varia ao longo da cinética de infecção

Quando avaliada a motilidade total através do ensaio com o corante *carmin red*, foi observado aumento no tempo em minutos de liberação do *carmin red* nas fezes dos camundongos IFA ( $p < 0,01$ ) e IFC3 ( $p < 0,001$ ) meses quando comparados aos seus

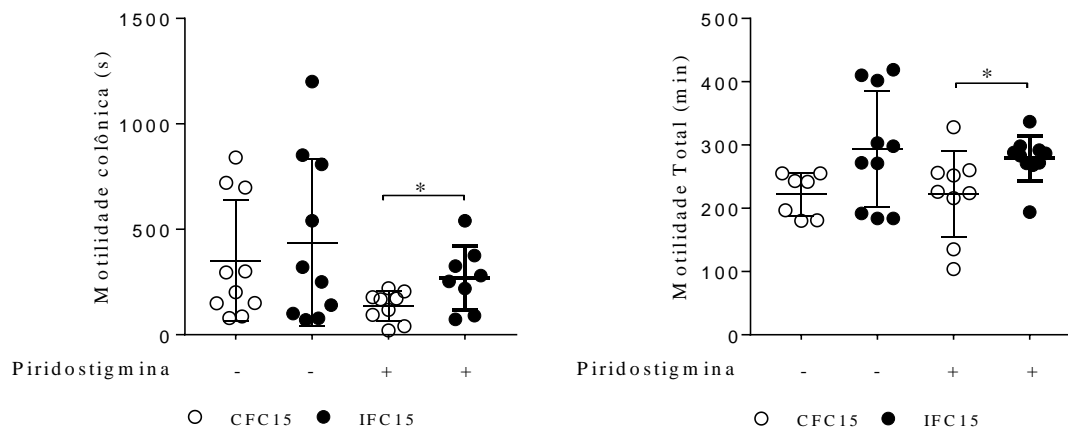
respectivos controles, indicando uma diminuição da peristalse do trato gastrointestinal. Nos grupos infectados IFA em comparação com o grupo IFC7 meses também há um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no tempo de motilidade total. Já nos grupos infectados IFC7 em comparação com o grupo IFC12 há uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na motilidade indicando um distúrbio na peristalse a partir dos 12 m.p.i.



**FIGURA 27: Avaliação da motilidade total.** Camundongos Swiss fêmeas foram infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Dos animais, 10 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo de fase aguda); 120 foram tratados com Bz nos tempos 3º, 7º, 12º e 15º mês (grupo de fase crônica), em paralelo 50 foram eutanasiados para compor o grupo controle (fase aguda e crônica). A motilidade total foi avaliada através do tempo (minutos) de liberação do *carmin red* nas fezes dos camundongos controle e infectado. Análise estatística com o Teste *t* Student. CFA (Controle de fase aguda); IFA (Infectado de fase aguda); CFC (Controle de fase crônica) e IFC (Infectado de fase crônica). Valores de  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,001$  (\*\*\*)

#### 4.2.3. O aumento da biodisponibilidade de ACh na junção neuromuscular não reverte o distúrbio de motilidade na fase crônica aos 15 m.p.i.

A piridostigmina, um inibidor da enzima acetil colinesterase, aumenta a disponibilidade da acetilcolina na junção neuromuscular, promovendo contrações intestinais (MANINI et al., 2018), desta forma, o tempo de trânsito colônico dos camundongos controle tratados com piridostigmina foi diminuído pelo aumento na biodisponibilidade de ACh. Tal efeito não foi visualizado nos camundongos infectados IFC15 ( $p < 0,05$ ), sugerindo que outros componentes da resposta excitatória podem estar comprometidos pela infecção.



**FIGURA 28: Avaliação do trânsito colônico e motilidade total utilizando a piridostigmina.** Camundongos Swiss fêmeas foram infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Dos animais, 10 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo de fase aguda); 120 foram tratados com Bz nos tempos 3º, 7º, 12º e 15º mês (grupo de fase crônica), em paralelo 50 foram eutanasiados para compor o grupo controle (fase aguda e crônica). Os camundongos de CFC e IFC15 meses foram tratados com uma dose de piridostigmina (1mg/kg) e o ensaio de motilidade colônica (*bead* de vidro) e total (*carmin red*) foram realizados. Análise estatística com o Teste *t* Student para dados paramétricos. CFC (Controle de fase crônica) e IFC (Infectado de fase crônica). Valores de  $p < 0,05$  (\*).

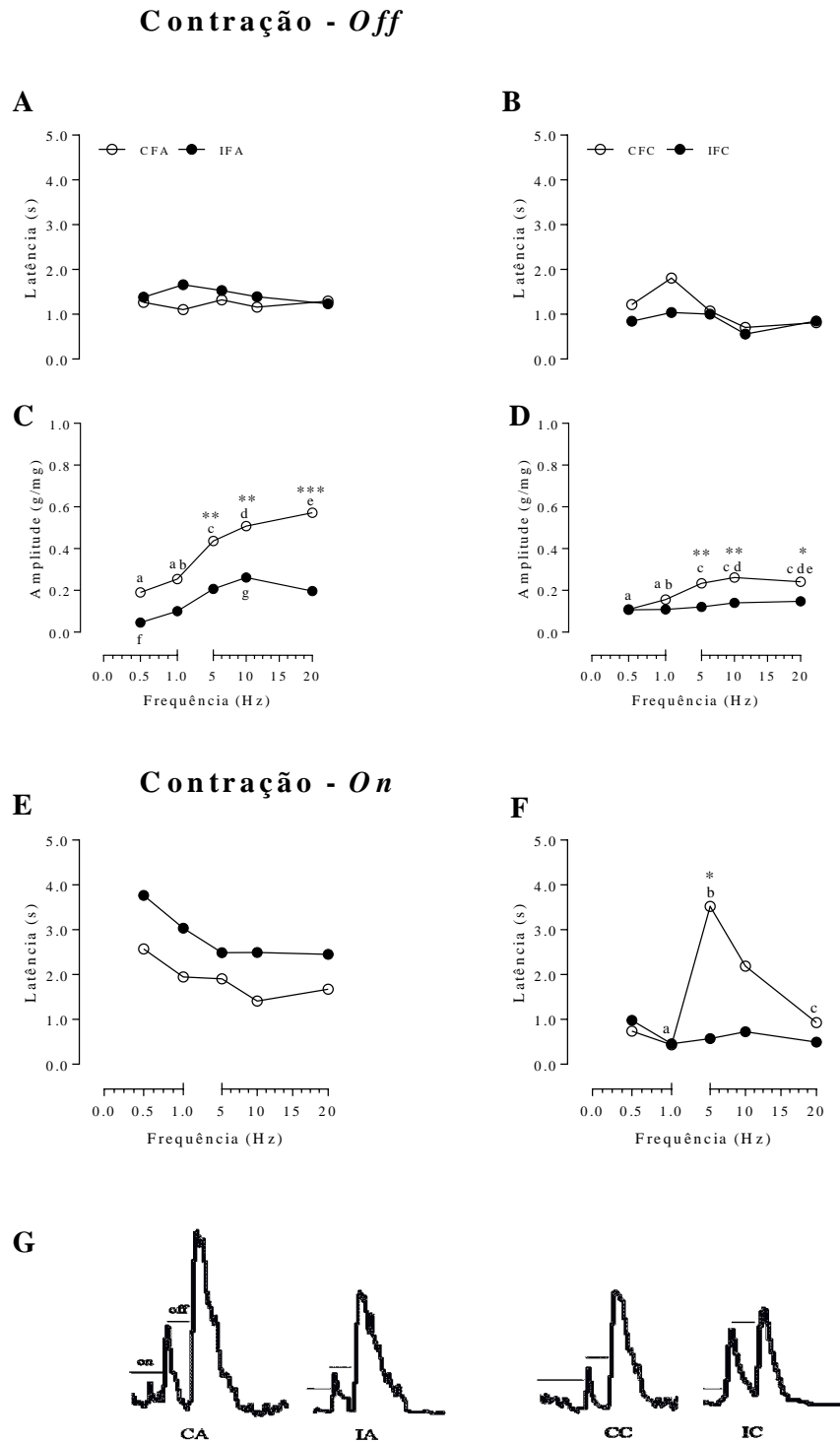
#### 4.2.4. Ensaios de estímulos elétricos *ex vivo* (banho de órgãos do cólon de camundongos controle e infectados)

Os fragmentos do cólon dos camundongos responderam a baixas frequências de estimulação elétrica (Figura 29 A-F). A amplitude da contração em animais controle de fase crônica foi significativamente menor em comparação aos animais controles de fase aguda ( $p < 0,0001$ ) (Figura 29 C e D). Não houve diferença na latência das contrações *off* frente aos estímulos elétricos crescentes em nenhum dos grupos (Figura 29 A e B).

A amplitude (ondas *off-contraction*) da resposta foi significativamente crescente a partir de 1 Hz no grupo controle da fase aguda indicando resposta proporcional aos estímulos elétricos aplicados ( $p < 0,05$ ). No grupo infectado da fase aguda a curva-resposta aos estímulos crescentes é menor em amplitude quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Na comparação entre os grupos há redução significativa a partir da aplicação do estímulo de 5 Hz ( $p < 0,01$ ). Note-se que mesmo com o aumento da frequência do estímulo para 10 e 20 Hz este quadro não se reverte (Figura 29 C).

Na fase crônica (15 meses) foi observado padrão de resposta contrátil de amplitude reduzida. Na fase crônica os valores da amplitude máxima caem pela metade (0,6 para 0,3 g/mg), provavelmente devido à idade do camundongo. Comparativamente as curvas de resposta dos camundongos infectados também tem amplitude significativamente diminuída à aplicação dos estímulos elétricos crescentes em comparação com a curva dos camundongos não infectados ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas entre grupos controle e infectado aparecem a partir da aplicação da frequência de 5 Hz ( $p < 0,05$ ), com amplitude diminuída mesmo em frequências maiores de estímulo elétrico (Figura 29 D).

Na fase aguda, para as respostas de latência nas contrações *on* os valores foram maiores para o grupo infectado, embora sem diferença estatística frente aos estímulos elétricos crescentes (Figura 29 E). Entretanto na fase crônica (15 meses) observamos que o período de latência nos camundongos infectados crônicos é significativamente menor quando comparado ao seu controle pareado na frequência de 5 Hz ( $p < 0,05$ ), indicando uma alteração também na ritmicidade contrátil intestinal (Figura 29 F).



**FIGURA 29:** Padrões de respostas elétricas induzidas por estimulação (Hz) nos fragmentos de cólon de camundongos controle e infectado.

**FIGURA 29: Padrões de respostas elétricas induzidas por estimulação (Hz) nos fragmentos de cólon de camundongos controle e infectado.** Camundongos Swiss fêmeas foram infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Dos animais, 10 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo de fase aguda; 5 controle e 5 infectado), 10 foram eutanasiados nas fases crônicas (grupo controle de fase crônica) e 62 foram tratados com Benznidazol e eutanasiados nos tempos 3º, 7º, 12º e 15º mês (grupo infectado de fase crônica). Em seguida, quatro fragmentos, sendo dois da região proximal e dois da região distal foram dispostos verticalmente no sistema de banho de órgãos contendo solução de Krebs e após a estabilização de 1h procedeu-se a realização dos experimentos, com a aplicação dos estímulos elétricos crescentes de 0,5, 1, 5, 10 e 20 Hz. **(A, B, C e D)** contrações *off*, onde observamos alteração na amplitude contração frente a sequência de estímulos aplicados. **(E e F)** contrações *on*, onde podemos observar que na fase crônica o período de latência dos camundongos cronicamente infectados é menor em relação ao seu controle. **(G)** Desenho esquemático indicando as latências *on e off* e o maior pico de amplitude da contração *off*. Análise estatística ANOVA *two away* seguida de pós-teste de Duncan. \*Diferença estatística entre os grupos controle e o infectado. Letras indicam a comparação entre os estímulos elétricos aplicados (Hz) no grupo controle e infectado. Letras iguais não há diferença e letras diferentes ocorrem diferenças estatísticas. Valores de  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,001$  (\*\*\*). CFA (Controle de fase aguda), IFA (Infectado de fase aguda), CFC (Controle de fase crônica 15 meses) e IFC (Infectado de fase crônica 15 meses).

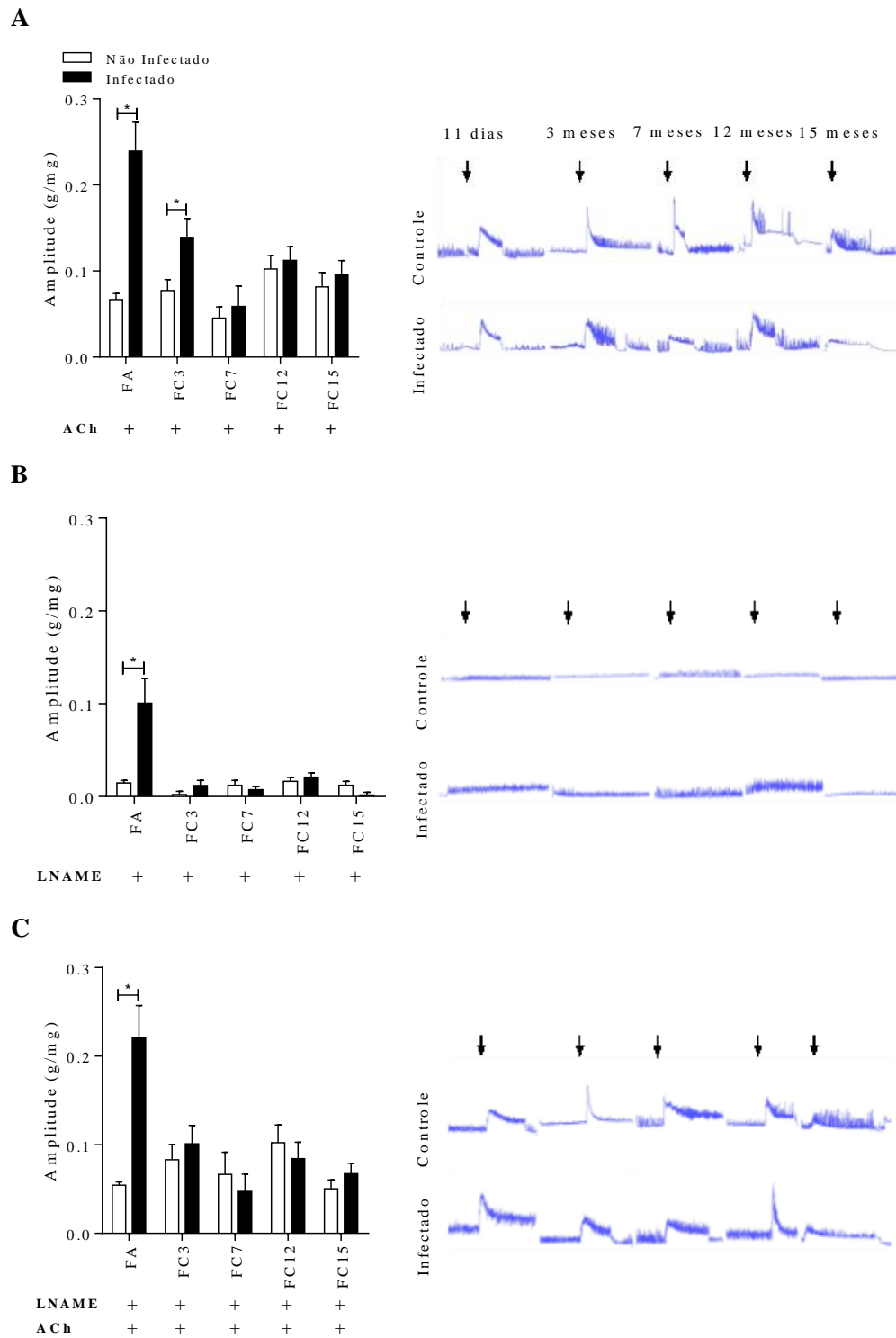


#### **4.2.5. Avaliação de receptores colinérgicos na resposta contrátil *ex vivo* e sua modulação pela via do NO.**

Os grupos IFA e IFC3 apresentaram maior amplitude contrátil quando comparado aos seus controles (Figura 30 A) após administração de ACh ( $p<0,05$ ).

O L-NAME, um fármaco inibidor estereoespecífico da NOS, produz diminuição dos valores de amplitude em todos os tempos analisados tanto em controle quanto infectados, quando comparado à administração de ACh apenas, exceto na fase aguda a onde a amplitude é significativamente maior nos animais infectados quando comparado aos seus controles ( $p<0,05$ , Figura 30 B).

Na presença de L-NAME (Figura 30 C) tratou-se a preparação com ACh e observou-se que na fase aguda a amplitude é significativamente maior nos animais infectados comparados aos seus controles pareados ( $p<0,05$ ). A administração de ACh anulou o efeito do bloqueador de NO em todos os tempos, produzindo resposta similar àquela representada na Figura 30 A (estímulo farmacológico apenas com ACh) sem diferença estatística significativa ( $p=0,999$ ).



**FIGURA 30:** Análise da contratilidade do cólon em banho de órgãos *ex vivo* para a ACh, L-NAME e L-NAME + ACh.

**FIGURA 30: Análise da contratilidade do cólon em banho de órgãos *ex vivo* para a ACh, L-NAME e L-NAME + ACh.** Camundongos Swiss fêmeas foram infectados com 50.000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Dos animais, 10 foram eutanasiados no 11º d.p.i (grupo de fase aguda; 5 controle e 5 infectado), 10 foram eutanasiados nas fases crônicas (grupo controle de fase crônica) e 62 foram tratados com Benznidazol e eutanasiados nos tempos 3º, 7º, 12º e 15º mês (grupo infectado de fase crônica). Logo após quatro fragmentos, sendo dois da região proximal e dois da região distal foram dispostos verticalmente no sistema de banho de órgãos contendo solução de Krebs e após a estabilização de 1h procedeu-se a realização dos experimentos, inicialmente com a adição do fármaco **(A)** ACh, seguido de inibição com **(B)** L-NAME e logo em seguida adição de **(C)** ACh. Análise estatística ANOVA *two away* seguida de pós-teste de Tukey. \*Diferença estatística entre o controle e o infectado. No desenho esquemático ao lado dos gráficos as setas indicam o momento da administração do fármaco ACh. Valores de  $p < 0,05$  (\*). Fase aguda (FA). Fase crônica (FC3, 7, 12 e 15 meses).

#### 4.2.6. Avaliação das respostas neural e muscular na contratilidade induzida pela ACh

Como já apresentado anteriormente a contração induzida pela ACh foi maior no grupo infectado de fase aguda, desta forma reproduzindo os ensaios anteriores (**Figura 30 A**). A amplitude foi significativamente maior no grupo IFA em comparação com seu controle e também em relação ao IFC15 ( $p < 0,001$ ) (Figura 31 A).

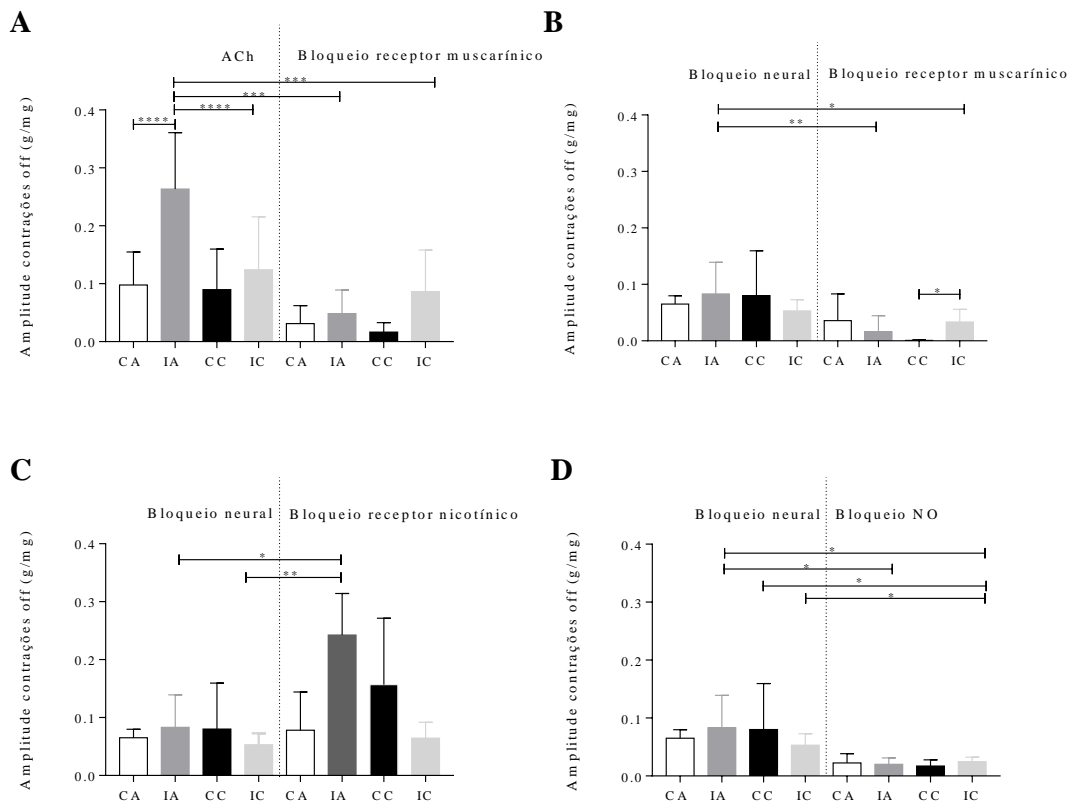
A administração de atropina, um antagonista muscarínico conhecido por inibir terminações nervosas parassimpáticas, diminuiu a amplitude da contração induzida anteriormente pela ACh no IFA ( $p < 0,0001$ ) e entre IFA e IFC15 ( $p < 0,001$ ) (Figura 31 A). Contudo, o bloqueio farmacológico destes receptores não interferiu na amplitude de contração entre infectados e controles em ambas as fases.

Como a ativação de neurônios colinérgicos pela ACh também pode aumentar a contração muscular utilizamos TTX (bloqueador de potenciais de ação nos nervos) A TTX não induziu diferença na contratilidade entre grupos controles e infectados sugerindo que o aumento da contratilidade observado na fase aguda se deve a ativação de neurônios colinérgicos (Figura 31 B).

Na presença de bloqueio neural a adição de atropina resultou em diminuição da amplitude nos animais IFA ( $p < 0,01$ ) e IFC ( $p < 0,005$ ) duplo bloqueados em relação ao bloqueio neural apenas. Na presença de duplo bloqueio houve aumento da amplitude na IFC15 em relação ao seu controle CFC15 ( $p < 0,05$ ).

Ainda sob o bloqueio neural da TTX, o bloqueio adicional do receptor nicotínico (cloreto d-tubocurarina) induziu aumento na resposta contrátil no grupo IFA ( $p < 0,05$ ) e IFC ( $p < 0,01$ ) (Figura 31 C) e anulou o aumento induzido pela atropina nos animais infectados crônicos demonstrado na figura 31 B.

A administração combinada TTX associado ao éster metílico da N ( $\omega$ )-nitro-L-arginina (L-NAME) promoveu diminuição das respostas contráteis em todos os grupos controle ou infectados (Figura 31 D) em relação ao grupo do bloqueio neural isolado.

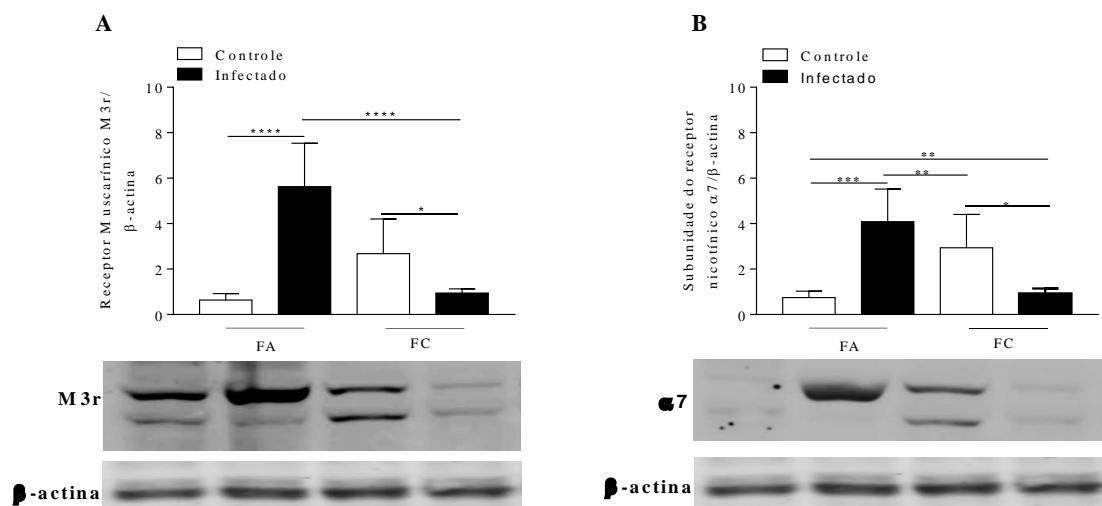


**FIGURA 31: Caracterização das respostas inibidas pela via muscarínica, neural e nicotínica em fragmentos de cólons mostrando as amplitudes nas fases aguda e crônica.** Os fragmentos de cólon foram incubados com acetilcolina (ACh; 10  $\mu$ M), atropina (bloqueador receptor muscarínico) (1  $\mu$ M), tetrodotoxina (bloqueador neural) (TTX; 100nM), cloreto d-tubocurarina (bloqueador receptor nicotínico) (50  $\mu$ M) éster metílico de N ( $\omega$ )-nitro-L-arginina (bloqueador do NO) (L-NAME; 300  $\mu$ M). **(A)** ACh + Bloqueio receptor muscarínico **(B)** Bloqueio neural + Bloqueio receptor muscarínico **(C)** Bloqueio neural + Bloqueio receptor nicotínico **(D)** Bloqueio neural + Bloqueio NO. n=4 camundongos. Análise estatística ANOVA *one way* com pós-teste de Tukey. Valores de  $p < 0,005$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

#### 4.2.7. Alteração na expressão receptores muscarínicos e nicotínicos, mAChR M3 e AChRa7, respectivamente no decorrer da infecção aguda para crônica 15 m.p.i.

Ao avaliar a expressão dos receptores M3r e  $\alpha$ -7 por Western Blot nos cólons de camundongos controle e infectado de FA e FC15 m.p.i., observamos que o grupo IFA apresentou maior expressão de ambos os receptores quando comparados aos seus respectivos controles não infectados ( $p < 0,0001$ ). Na fase aguda da infecção ocorre maior expressão do receptor M3r em relação a fase crônica da infecção ( $p < 0,0001$ ). Já

no grupo IFC15 observou-se diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da expressão de M3r e  $\alpha$ -7 quando comparamos ao seu controle (Figura 32 A e B).



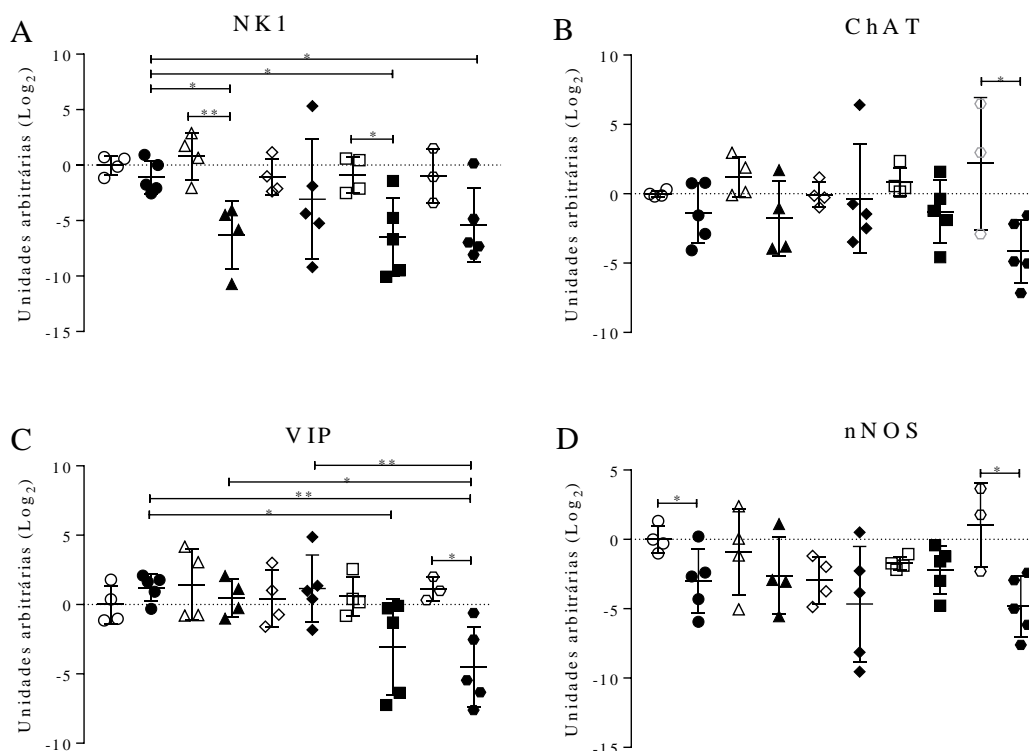
**FIGURA 32: Expressão de receptores nicotínicos e muscarínicos nos cólons dos camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.** Os cólons dos grupos controle e infectado das fases aguda e crônica 15 meses foram preparados para a realização da técnica de Western Blot para avaliar a expressão de proteínas através dos anticorpos anti-M3r (mAChR M3) e anti- $\alpha$ -7 (AChR $\alpha$ 7), onde mostramos a maior expressão desta proteína nos cultivos infectados pela cepa Y na fase aguda. Utilizamos a  $\beta$ -actina como proteína constitutiva para a realização da técnica. Análise estatística: ANOVA *one way* com pós-teste de Tukey. \*Diferença entre grupos,  $p \leq 0,05$  (\*);  $p < 0,001$  (\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). FA (Fase aguda) e FC (fase crônica).

#### 4.2.8. Expressão de neurotransmissores excitatórios e inibitórios do cólon dos camundongos do grupo controle e infectado

Através de técnica de RT-PCR para o receptor de substância P, denominado de neuroquinina do tipo 1 (NK1) observou-se uma redução significativa no grupo IFC3 ( $p < 0,01$ ) e IFC12 ( $p < 0,05$ ) em relação aos seus controles. Os grupos IFC3, 12 e 15 meses também reduziram a expressão de receptor de substância P quando comparado ao grupo IFA ( $p < 0,05$ ) (Figura 33 A). A expressão da enzima colina acetil-transferase (ChAT), responsável pela síntese do neurotransmissor ACh, diminuiu significativamente na comparação entre o grupo IFC15 e seu respectivo controle (Figura 33 B).

Para o receptor do neurotransmissor inibitório polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), houve diminuição significativa entre os grupos CFC15 e IFC15 ( $p < 0,05$ ). Os

grupos IFC12 e IFC15 apresentaram expressão de VIP reduzida em relação ao IFA. Também há redução de expressão de VIP do IFC15 em relação ao IFC3 ( $p < 0,05$ ) e IFC7 ( $p < 0,01$ ) (Figura 33 C). Para o nNOS houve diminuição significativa na expressão entre o grupo controle e o IFC15 ( $p < 0,05$ ) (Figura 33 D).



**FIGURA 33: Expressão de receptores excitatórios e inibitórios de neurônios saudáveis e neurônios aguda e cronicamente infectados por *T. cruzi*.** Os resultados apresentam a expressão gênica dos receptores de neurotransmissores mensurada através do ensaio de Real Time PCR. **(A)** NK1 - Neuroquinina do tipo 1 sendo um receptor de substância P. **(B)** ChAT - Colina Acetil-transferase. **(C)** VIP - Polipeptídeo Intestinal Vasoativo. **(D)** nNOS - Sintase de Óxido Nítrico Neuronal. Os grupos são representados pelos símbolos, CFA - Controle de fase aguda (O, 4); IFA - Infectado de fase aguda (●, 5); CFC3- Controle de fase crônica 3 meses (Δ, 4); IFC3- Infectado de fase crônica 3 meses (▲, 4); CFC7- Controle de fase crônica 7 meses (◇, 5); IFC7- Infectado de fase crônica 7 meses (◆, 5); CFC12- Controle de fase crônica 12 meses (□, 4); IFC12- Infectado de fase crônica 12 meses (■, 5); CFC15- Controle de fase crônica 15 meses (○, 4); IFC15- Infectado de fase crônica 15 meses (●, 5) e cada símbolo corresponde a um indivíduo. Análise estatística com o Teste *t* Student. Valores de  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0,01$  (\*\*).

## 5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas, hoje, tornou-se um problema global, uma doença debilitante, com tratamentos limitados e ausência do completo conhecimento sobre os seus mecanismos patofisiológicos. Uma das questões mais intrigantes é como uma doença progride para fase crônica, após décadas de infecção, apesar da escassez de parasitismo (ZHANG; TARLETON, 1999; TARLETON, 2001; BENVENUTI et al., 2008).

Em se tratando do megacólon chagásico, há necessidade de questionamentos acerca de como e quando ocorrem as alterações que resultam em um cólon que apresenta os aspectos histopatológicos descritos há mais de um século pela comunidade acadêmica. Pontos importantes ainda não foram bem esclarecidos. O grupo de Arantes e colaboradores, vem estudando alguns destes aspectos em modelos murinos *in vivo* e *in vitro* (ARANTES et al., 2004; DE ALMEIDA-LEITE et al., 2014; CAMPOS et al., 2016). No atual trabalho investigamos sistematicamente as alterações de motilidade em concomitância com as profundas alterações estruturais da parede intestinal e validamos mecanismos de lesão em culturas primárias de neurônios entéricos.

Os achados anatômicos patológicos reproduziram os aspectos já descritos neste modelo (CAMPOS et al., 2016) e confirmam sua reprodutibilidade. No entanto, pela primeira vez a cinética do desenvolvimento do megacólon foi avaliada. O intenso parasitismo e a inflamação destrutiva da fase aguda da infecção (Figura 3), que corrobora com os achados do nosso grupo (CAMPOS et al., 2016) foram seguidos por aumento da espessura progressiva da parede do cólon, que se tornou evidente histologicamente e quantitativamente a partir de 12 m.p.i. (Figura 10). Ao avaliar a presença de hiperplasia, já descrita por alguns autores em outros modelos animais e humanos (BLENNERHASSETT et al., 1999), não foi observada diferença estatística no número de células contadas na camada interna do cólon (dados não mostrados) embora seja observada hipertrofia (aumento da área) da célula lisa ao longo do tempo, que pode explicar o aumento da espessura da parede colônica já visível aos 12 m.p.i.

A progressão da inflamação diminuiu ao longo do experimento, mas um afluxo segmentar expressivo de células mononucleares foi encontrado em todos os momentos



examinados, bem como a análise quantitativa dos perfis de células do tipo TCD4+ e TCD8+ (Figura 5), sugerindo que a fase aguda exibe uma resposta inflamatória intensa devido à presença direta do parasito. Na fase crônica ocorre uma redução desta presença, mas ainda DNA do parasito detectável, o que poderia ser o estímulo para uma inflamação crônica mantida a longo prazo.

A distribuição de subtipos de células T foi estudada no miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi* (DOS SANTOS et al., 2001). Os fenótipos das células linfóides nos infiltrados de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica grave eram predominantemente células do tipo TCD8+, muitas das quais expressavam números mais elevados de granzima A, sendo correlacionados com a presença de antígenos parasitários (HIGUCHI et al., 1997). Relativamente poucas células *natural-killer* ou linfócitos B foram encontradas nas lesões (REIS et al., 1993). Pacientes com megacólon tinham significativamente mais células *natural-killer* CD57 e linfócitos citotóxicos TIA-1 em gânglios entéricos, mas o número de células imunorreativas a CD3 e CD20 não foi significativamente elevado (DA SILVEIRA et al., 2007). Além disso, mecanismos imunorreguladores podem desempenhar um papel no controle da produção de citocinas inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias em nosso modelo crônico, uma vez que a maioria das células mononucleares permaneceu sem imunomarcção para anticorpos os anticorpos por nós testados (anti-CD4 e anti-CD8) e podem representar células reguladoras.

É interessante notar que o infiltrado inflamatório crônico estava distribuído irregularmente na parede intestinal e afetou apenas de maneira segmentar os gânglios mioentéricos, estando principalmente localizado dentro das camadas musculares, o que pode explicar, juntamente com as alterações musculares lisas, a perda progressiva do nervo axonal intramuscular ao longo do desenvolvimento do megacólon observado em nesse trabalho (Figura 9), mesmo quando a perda neuronal ganglionar não aumentou ao longo do tempo. Mirkin e colaboradores realizaram ensaios proliferativos *in vitro* de linfócitos contra infecção pelo de *T. cruzi* evidenciaram células do tipo TCD8+ atuando em mecanismos dependentes de dano neuromiopático em preparações de músculo esquelético, nervo ciático e medula espinhal (MIRKIN et al., 1994, 1997), e que deve

ser melhor investigado em nosso modelo crônico *in vivo*. No entanto, a quantificação do parasitismo não se relaciona estatisticamente com o grau de inflamação nos tecidos na fase crônica, sugerindo que outros mecanismos podem também ampliar a produção de quimiocinas, a inflamação e a infecção pelo *T. cruzi* (LEON; ENGMAN, 2001; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002b).

A despopulação neuronal na fase aguda e a ausência de inervação no decorrer do desenvolvimento do megacólon demonstrados qualitativa e quantitativamente (Figura 4), acomodam parte da hipótese de Koberle, já que ele considerou, há quase 70 anos, que é razoável admitir que as lesões agudas do plexo seriam agravadas de acordo com a duração e a intensidade do “mega” (TAFURI; MARIA; LOPES, 1971), como se a inflamação fosse secundária à estase e à inflamação induzida pela destruição dos plexos e dos componentes intersticiais da parede. A hipótese do nosso trabalho, que foi comprovada pelos achados científicos é de que com base na cinética *in vivo* dos achados patológicos, a inflamação aguda e as consequências da invasão neuronal do parasito ao metabolismo oxidativo são determinantes para a morte neuronal e o despovoamento do plexo mioentérico. A longo prazo, na fase crônica, as lesões aqui descritas constituem o substrato das alterações na motilidade associadas à morbidade da doença.

A análise quantitativa da espessura da parede do intestino evidenciou o aumento significativo da parede intestinal após a fase aguda. Aos 12 e 15 m.p.i. a parede do cólon de animais infectados foi significativamente mais espessa, principalmente devido à hipertrofia celular, e algum grau de deposição de tecido conectivo, indicando que antes do aparecimento destas alterações estruturais, as quais são cruciais para a formação do megacólon, há uma potencial janela de tempo para intervenções terapêuticas e preventivas.

Os aspectos abordados em nosso modelo *in vivo* motivaram a investigar *in vitro* a interação célula-parasito, por espelhar ações diretas do *T. cruzi* nos elementos do sistema nervoso entérico e músculo liso intestinal durante as primeiras horas de interação, incluindo aspectos da invasão neuronal direta. Apesar dos grandes avanços moleculares no processo de infecção pelo *T. cruzi* em células de mamíferos e da importância dos neurônios entéricos na desnervação implícita na doença intestinal,

existem poucos trabalhos abordando a infecção neuronal e suas consequências (STERIN-BORDA; PASCUAL; BORDA, 1989; FERRARI et al., 1995).

Nas culturas de neurônios miontéricos utilizamos contraste de fase, coloração de Giemsa e pesquisa de imuno-marcadores específicos das células neuronais e musculares para caracterização das culturas. Os núcleos dos parasitos foram corados pela sonda Hoechst dentro de neurônios identificados por morfologia e imunomarcagem para PGP 9.5 e  $\beta$ -tubulina III. Identificamos invasão parasitária do citoplasma de neurônios (amastigotas de *T. cruzi*) *in vitro* de forma inédita. O parasitismo *in vivo* não havia sido previamente detectável em neurônios entéricos, tanto em investigação experimental *in vivo* aguda (ARANTES et al., 2004) e crônica (CAMPOS et al., 2016) do nosso próprio grupo, nem em outros animais (TAFURI; MARIA; LOPES, 1971; MENEGHELLI, 2004) ou mesmo em estudos com seres humanos (ADAD et al., 2001; MOREIRA et al., 2011). Os corpos neuronais e a rede de neuritos foram danificados e diminuíram significativamente nas culturas infectadas imunomarcadas por anti- $\beta$ -tubulina III (Figura 13). O aspecto da cultura infectada imitou as alterações agudas degenerativas induzidas *in vivo* pelo parasito nos gânglios entéricos e na musculatura *propria*.

Curiosamente, apesar da enorme quantidade de literatura referente a diversos aspectos da interação parasita-hospedeiro, em uma variedade de tipos de células de mamíferos e tipos de células transformadas (macrófagos, células musculares esqueléticas, cardiomiócitos, células endoteliais, fibroblastos primários, fibroblastos embrionários mesenquimais, VERO e LLC-MK2) (ANDREWS et al., 1987), existem informações escassas e não valorizadas sobre a invasão de células neuronais e as consequências para a patogênese (TAFURI, 1971). Mesmo na investigação sistemática por microscopia eletrônica, foi bastante frequente a presença de amastigotas na célula de Schwann, nos fibroblastos capsulares, no interstício do próprio gânglio e no tecido conjuntivo periganglionar (TAFURI, 1971), mas não nos neurônios entéricos. De acordo com Koberle (1968), a destruição dos neurônios é causada durante o estágio agudo da doença por liberação de uma “neurotoxina” ou enzimas das amastigotas degeneradas no foco inflamatório. Isto foi demonstrado nas últimas décadas por dosagem de citocinas e mediadores pró-inflamatórios em experimentos agudos *in vitro* e

*in vivo* (KOBBERLE, 1968; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002b). Lesões ganglionares, portanto, nunca foram atribuídas diretamente à invasão neuronal pelo *T. cruzi*, mas devido à inflamação aguda, que induz edema e alterações degenerativas nos componentes ganglionares. Esta é a primeira vez na literatura que a infecção foi investigada em culturas primárias de neurônios mioentéricos e que se detectou a invasão e proliferação do parasito não apenas nas células musculares lisas, mas também nos neurônios abrindo finalmente um novo caminho para estudar a interação parasito-neurônio.

A documentação simultânea do contraste de fase e dos campos microscópicos imunocorados para  $\beta$ -tubulina III e nNOS (Figura 15), indica que os neurônios nitrérgicos são muito abundantes nessas culturas. Embora alguns neurônios não-nitrérgicos estejam infectados, a maioria dos neurônios nNOS+ apresentou pequeno número de parasitos dentro do corpo neuronal às 72 h.p.i. Isso pode indicar que os neurônios não facilitaram a replicação do parasito em comparação com outras células e possivelmente não morrem apenas devido ao parasitismo direto. Estudos detalhados sobre os fenômenos da invasão e multiplicação celular em neurônios entéricos ainda não existem na literatura.

Reproduzindo aspectos *in vitro* descritos anteriormente pelo nosso grupo em neurônios simpáticos, a infecção das culturas entéricas pela cepa Y, bem como a ativação das células da cultura com  $\text{IFN}\gamma$  aumentou a produção de nitrito, a qual foi bloqueada pela administração de L-NAME. Esses resultados foram obtidos através de cultivos mistos nos quais sabemos que, além da NOS neuronal também a NOS induzida responde pela produção de NO, principalmente nas células da glia (ALMEIDA-LEITE et al., 2007), que estão presentes nos cultivos em maior quantidade quando comparada aos neurônios.

A morte neuronal aguda foi pelo menos parcialmente, a consequência da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN), nitro-tirosina e produção de peroxinitrito, especialmente em neurônios nitrérgicos. Enquanto o NO normalmente funciona como mediador neuronal fisiológico, a produção excessiva de NO medeia a lesão neuronal. A super ativação de neurônios por processos excitotóxicos resulta na

liberação maciça de NO. Sendo um radical livre, o NO é reativo e medeia a toxicidade celular, danificando enzimas metabólicas críticas e reagindo com superóxido para formar um oxidante ainda mais potente, o peroxinitrito (BREDT, 1999). Por meio desses mecanismos, o NO parece desempenhar um papel importante na fisiopatologia do trato intestinal associado à doença de Chagas em nosso modelo. A produção de NO foi detectada pelo uso da sonda DAF-FM, que reage com o NO e espécies relacionadas ao NO (BALCERCZYK; SOSZYNSKI; BARTOSZ, 2005). As células DAF-positivas são correlacionadas com a morfologia neuronal (Figura 16). Curiosamente, também observamos a oxidação do DAF em torno de amastigotas dentro das células, incluindo neurônios. O aumento da oxidação do DAF foi avaliado em um isolado de *T. cruzi in vitro*, indicando produção de ERN pelos parasitos quando tratados com componentes anti-*T. cruzi* e antitumorais (DESOTI et al., 2015; MARTINS et al., 2016) mas é a primeira vez que podemos sugerir a produção de ERN por parasitos dentro das células neuronais, o que precisa ser confirmado posteriormente.

Tanto os cultivos não infectados e estimulados com IFN $\gamma$ , quanto os infectados por *T. cruzi* (cepa Y e DM28c) aumentaram a fluorescência de DAF nas células neuronais, indicando que os neurônios são capazes de aumentar a produção de NO nessas condições. Isso pode implicar em neurônios nitrérgicos como alvos, não apenas para a invasão direta do *T. cruzi* (Figura 16 D e F), mas também por citocinas como IFN $\gamma$  (Figura 16 H) produzidas por células musculares lisas e da glia nas proximidades de neurônios ganglionares e de suas varicosidades. Além disso, os neurônios infectados exibiram maior oxidação do DAF em comparação ao músculo liso, células da glia e neurônios não infectados indicando um aumento na produção de NO desses neurônios provocado pela infecção pelo *T. cruzi* e ativação do IFN $\gamma$  (VOUKALI; SHOTTON; LINCOLN, 2011).

A ativação da nNOS depende da ligação do Ca<sup>2+</sup> e calmodulina e, portanto, a geração de NO é estimulada por um aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular (CHO et al., 1992; HEMMENS; MAYER, 1998). Durante o processo de invasão pelo *T. cruzi*, na maioria das células de mamíferos, ocorre mobilização de Ca<sup>2+</sup>, conforme descrito para outros tipos de cultivo celulares (BURLEIGH; ANDREWS, 1998). No caso de neurônios esta

mobilização de cálcio pode ocorrer no corpo e nas varicosidades das terminações nervosas. Utilizamos ionomicina, um ionóforo  $\text{Ca}^{2+}$ , em culturas infectadas, onde neurônios infectados e não infectados foram acessados simultaneamente. Os neurônios infectados com a cepa Y tratados com ionomicina aumentaram a oxidação de DAF em comparação com os neurônios não infectados das culturas de controle. Os neurônios não infectados foram utilizados como controles intra-experimentais nas mesmas culturas e também não expressaram a oxidação de DAF (Figura 16 I, J e L).

Nossos resultados sugerem que a concentração intracelular neuronal de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadeada pela infecção por *T. cruzi* e  $\text{IFN}\gamma$  liberado pela glia ou outras citocinas pró-inflamatórias induzidas por infecção na proximidade de neurônios ganglionares e suas varicosidades, podem levar ao aumento da produção de ERN. Em conjunto, nossos resultados reforçam que, entre todas as classes de neurônios, a nNOS+ pode ser mais suscetível a ativar a enzima nNOS durante a invasão com consequências neurotóxicas, ou citoprotetoras (SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003; VOUKALI; SHOTTON; LINCOLN, 2011).

O papel dos déficits mitocondriais na neurodegeneração do SNE e sua contribuição relativa à disfunção gastrointestinal não é claro. Para entender melhor como as anormalidades mitocondriais no SNE se relacionam com a neurodegeneração entérica e afetam a função intestinal na doença de Chagas, infectamos culturas entéricas primárias para ensaios com a sonda mitocondrial denominada JC-1. O JC-1 é mais específico e mais consistente para o potencial mitocondrial *versus* membrana plasmática, e em sua resposta à despolarização, do que outros corantes catiônicos (WHITE; REYNOLDS, 1996; VOUKALI; SHOTTON; LINCOLN, 2011). A aplicação mais amplamente implementada de JC-1 é para a detecção de despolarização mitocondrial que ocorre nos estágios iniciais da apoptose (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019). A proporção de intensidade de fluorescência verde para vermelha depende apenas do potencial de membrana e não de outros fatores que possam influenciar os sinais de fluorescência do componente único. O uso da detecção da razão de fluorescência, portanto, permite que os pesquisadores façam medições comparativas do potencial da membrana da mitocôndria da célula. A despolarização

mitocondrial é indicada por uma diminuição qualitativa na proporção de intensidade de fluorescência vermelha/verde. Demonstramos que a infecção por *T. cruzi* está associada à despolarização da membrana interna mitocondrial, como indicativo de comprometimento da sua função, tão cedo como 48 h.p.i, onde detectamos parasitos no interior das células, para ambas as linhagens (Y e DM28c). Curiosamente, White e Reynolds (1996) observaram que os defeitos mitocondriais em camundongos Tfam-ENSKO afetaram de forma diversa as subpopulações específicas de neurônios entéricos, tais como neurônios inibitórios nitrérgicos resultando em um desequilíbrio de neurônios inibitórios e excitatórios (WHITE; REYNOLDS, 1996), e provavelmente explicam as alterações neurodegenerativas (déficits mitocondriais) nos neurônios nNOS infectados em nossos ensaios.

Também estudamos evidências da produção de nitro-tirosina nas culturas infectadas (cepas Y e DM 28), implicando seu papel na morte neuronal aguda na DC. Utilizando anticorpos específicos criados contra essa modificação oxidativa, avaliamos a intensidade de fluorescência da proteína 3-NO<sub>2</sub>-tirosina nos cultivos primários, onde observamos que a intensidade aumentou significativamente em neurônios em comparação com culturas não infectados. Evidências da literatura apoiam a formação de 3-NO<sub>2</sub>-tirosina *in vivo* em diversas condições patológicas e acredita-se que a 3-NO<sub>2</sub>-tirosina seja um marcador relativamente específico do dano oxidativo mediado por peroxinitrito (AHSAN, 2013). A 3-NO<sub>2</sub>-tirosina constitui um rastro deixado pelas reações oxidantes dos derivados do NO (substituição de nitração de um átomo de hidrogênio por um grupo nitro, -NO<sub>2</sub>) nos resíduos de proteína tirosina para formar a 3-nitrotirosina. Além disso, a nitração da proteína tirosina pode causar alterações estruturais e funcionais, que podem ter relevâncias fisiopatológicas para as doenças humanas. Grande parte da patogenicidade mediada pelo NO depende da formação de intermediários secundários, como o ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que normalmente é mais reativo e tóxico do que o NO (BATTHYÁNY et al., 2017).

Reforçando que o estresse oxidativo opera no dano neuronal *in vitro* induzido pelo *T. cruzi*, investigamos a expressão da MnSOD2 em neurônios nitrérgicos. A maior expressão de MnSOD2 é uma resposta de defesa ativada por espécies reativas

(LINGAPPAN, 2018). Detectamos aumento da expressão de MnSOD2 em neurônios de culturas infectadas de ambas as linhagens (Y e DM28c) por imunofluorescência e ensaios de Western Blot. A microscopia confocal também evidenciou maior expressão de MnSOD2 em corpos neuronais nNOS+. Neste cenário, onde mediadores oxidantes derivados do hospedeiro são ativamente gerados, o arsenal antioxidante do *T. cruzi* pode se tornar decisivo para a sobrevivência e persistência do parasito (FERREIRA et al., 1997; PIACENZA et al., 2009b, 2009a; RADY, 2018). A hipótese de que as enzimas do arsenal antioxidante do parasito e o sistema imunológico do hospedeiro possam representar novos fatores de virulência envolvidos no estabelecimento da doença precisa ser mais explorada nos sistemas neuronais.

Assim, o NO, produzido pela NOS no citoplasma, e as ERO produzidas a partir de fontes intracelulares ou extracelulares, podem reagir dentro dos neurônios nNOS, resultando em uma maior exposição a danos citotóxicos nas células em comparação com outros neurônios. Em conjunto, propomos que a morte neuronal precoce *in vivo*, a geração de peroxinitrito e o equilíbrio entre os mecanismos de morte e neuroproteção devam ser levados em consideração quando se trata de propor estratégias para evitar o estresse oxidativo e tratar a DC em indivíduos recentemente infectados (fase aguda e subaguda). Os neurônios NOS enfrentam o problema adicional de que a NOS é ativada por  $Ca^{2+}$ . Supõe-se que isso produza um excesso de NO, cujas propriedades de radicais livres podem causar danos às células, que são exacerbadas pelo peroxinitrito formado quando o NO reage com os radicais livres de oxigênio. No intestino, NOS neuronal (nNOS) é seletivamente concentrada nas varicosidades axonais (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990; BREDT, 1999) e podem estar relacionadas à diminuição progressiva da densidade neurítica detectada *in vivo* e *in vitro*.

Importante destacar que apesar dos neurônios responderem à infecção, não necessariamente esses tipos neuronais estão em morte celular. O que nos parece é que este tipo específico consegue “suportar” maiores níveis de estresse oxidativo em comparação a outros tipos, por possuir constitutivamente o maquinário específico da via do NO. Nossa linha de raciocínio foi confirmada quando, ao avaliar a maior expressão de MnSOD2 (proteína que é expressa de forma protetiva frente à injúria celular), nos



neurônios nNOS+ bem como maior expressão nos cultivos infectados quando comparado aos seus controles.

Além disso, estudamos a produção de ROS em nossas culturas nos tempos de 48 e 72 h.p.i, utilizando a sonda CM-H2DCFDA conforme descrito em material e métodos. Não foi possível detectar diferenças na produção de ROS nas culturas infectadas quando comparadas aos controles (Figura 25). A irregularidade da monocamada da cultura neuronal e o limiar da produção detectável de ROS no fluorímetro foram limitações nos nossos ensaios. Provavelmente, a abordagem de imagem por fluorescência da célula isolada teria detectado a sonda dentro das células *in situ* (GONZALEZ; SALIDO, 2016).

Desde o início, consideramos a hipótese de que múltiplos fatores estariam envolvidos no desenvolvimento do megacólon. Para correlacionar aspectos estruturais e funcionais complexos será necessário elucidar lacunas existentes quanto às alterações peristálticas e eletrofisiológicas que ocorrem no cólon usando o potencial de nosso modelo de infecção de longo prazo.

O circuito intestinal é extremamente complexo e pode ser abordado por estudos de motilidade *in vivo* e complementados por preparações de anéis da parede muscular para o registro isométrico da tensão. A origem, os mecanismos reguladores e as características espaciais e temporais das contrações da parede intestinal não são totalmente compreendidos, limitando o desenvolvimento de medicamentos específicos para o tratamento de distúrbios motores do cólon (SARNA; SHI, 2006), e a compreensão do mecanismo intrínseco da lesão no megacólon chagásico.

Nossos estudos *in vivo* mostraram diminuição do “tempo de motilidade colônica” nos grupos IFA e IFC3, através do teste de liberação das esferas de vidro (*beads*) em comparação com seus controles, indicando uma hiper-responsividade da túnica muscular, provavelmente devido à intensa inflamação aguda associada à necrose observada nesses momentos. A partir de 7 meses houve um comprometimento progressivo da função de motilidade indicada pelo aumento do tempo de liberação das esferas de vidro. O “tempo de motilidade total” foi também acessado pelo *carmin red* e foi aumentado nos grupos IFA e IFC3. Nos últimos tempos, detectamos aumento no

tempo de motilidade total pelo IFC7, indicando o início do comprometimento funcional do peristaltismo, associado à mudança do perfil de infiltrado inflamatório e hipertrofia das células musculares lisas, mesmo que ainda não detectadas alterações estruturais significativas ou plasticidade da parede definidas por aumento da espessura da camada muscular interna que irá ocorrer a partir de 12 m.p.i.

A produção de neurotransmissores excitatórios e inibitórios é de grande importância para o equilíbrio da funcionalidade intestinal. ACh representa o neurotransmissor responsável por estimular a contração muscular lisa e o NO, por sua vez, o neurotransmissor responsável pelo relaxamento muscular (LI; FURNESS, 1998; GRIDER, 2003; BORNSTEIN; COSTA; GRIDER, 2004b). Alguns estudos em pacientes e animais com megacólon mostraram que a NOS neuronal é preservada (JABARI et al., 2011; RICCI et al., 2016) e que há evidências de perda de ACh (JABARI et al., 2011). Com base na importância do sistema colinérgico no controle da contratilidade colônica, avaliamos o efeito da inibição periférica da colinesterase com um inibidor reversível conhecido, a piridostigmina. Este medicamento é usado para melhorar a força muscular em pacientes com doença muscular, como a miastenia grave, impedindo a quebra da acetilcolina e aumentando a sua biodisponibilidade (MAGGI; MANTEGAZZA, 2011). Ao administrarmos por via oral a droga em nossos animais observamos um aumento significativo no tempo de motilidade colônica no grupo tratado IFC15 em comparação ao seu controle, indicando que, mesmo quando a biodisponibilidade da acetilcolina foi facilitada, o trânsito colônico de animais infectados não melhorou, sugerindo alterações, como um aprovável redução sensibilidade da resposta colinérgica em camundongos com megacólon. Esses dados reforçam estudos da literatura, que mesmo superficialmente, sugerem uma deficiência no sistema colinérgico intestinal na fase crônica da doença de Chagas (JABARI et al., 2011, 2012). Além disso, a contratilidade do músculo liso pode estar afetada pela hipertrofia e pelo aumento da espessura da parede, associada à diminuição estrutural das terminações nervosas intramurais. O tempo de motilidade total apresentou resposta similar ao medicamento reforçando nossa hipótese.

A transmissão neuromuscular excitatória parece ser principalmente colinérgica no trato gastrointestinal (SARNA; SHI, 2006) no entanto, alguns estudos sugeriram que as taquicininas podem ser os principais neurotransmissores excitatórios no cólon sigmóide humano (CAO et al., 2000; CAO; HARNETT; PRICOLO, 2006). Os receptores NK1 e NK2 são expressos no músculo liso do cólon humano (LECCI et al., 2006). Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos reguladores da transmissão neuromuscular excitatória e inibitória que controlam a motilidade no cólon sigmóide humano (GRIDER, 1989; HINDS; ULLRICH; SMID, 2006; CELLEK et al., 2007). Foi demonstrado que os neurônios parassimpáticos sacrais e os interneurônios fornecem entrada excitatória para os neurônios eletromotores (EMNs) no plexo mioentérico, realizando sinapses com os receptores nicotínicos de ACh (nAChRs) nos EMNs intrínsecos excitatórios e inibitórios (VENKOVA; GREENWOOD-VAN MEEVELD; KRIER, 2002; SARNA; SHI, 2006).

As ondas *on-contraction* foram caracterizadas como as respostas contráteis desenvolvidas durante a aplicação do estímulo elétrico. Já as ondas *off-contraction* foram caracterizadas como as respostas contráteis após o término do estímulo elétrico. A amplitude para as ondas *off-contraction* foram caracterizadas pela diferença entre o estado de tensão basal e o pico da contração da mesma. Observamos que a amplitude das respostas contráteis iniciadas após a aplicação do estímulo elétrico (contrações *on*), nos grupos infectados tanto de fase aguda quanto de fase crônica diminuíram em relação ao controle. A amplitude das contrações *on* e *off* induzidas por estímulos elétricos dependem da estimulação de neurônios motores entéricos excitatórios liberando ACh e taquicininas, atuando principalmente nos receptores muscarínicos e NK2 localizados nas células musculares lisas (AULÍ et al., 2008), indicando alterações funcionais no sistema colinérgico. A latência é o período em segundos que antecede os picos de amplitude observados logo após a aplicação das frequências crescentes em Hz, sendo denominado contração *on* (quando o estímulo está sendo aplicado). A latência das *on-contraction* no grupo IFC15 é menor em relação ao seu controle. As contrações *on* são causadas através do estímulo seletivo de neurônios motores entéricos e são praticamente abolidas através da adição de drogas como atropina e antagonistas de taquicininas

(ANAND; PATERSON, 1994). O componente excitatório colinérgico das contrações induzidas por estímulos elétricos que observamos no cólon camundongos já foi descrito antes por diversos autores em modelos humanos (VENKOVA; GREENWOOD-VAN MEEVELD; KRIER, 2002; HINDS; ULLRICH; SMID, 2006; CELLEK et al., 2007), portanto a ausência de resposta observada no IFC15 em nosso modelo murino pode estar relacionada a alterações no sistema excitatório colinérgico modificado pela instalação do megacólon. Importante destacar que a despeito das alterações na ritmicidade nos infectados crônicos 15 m.p.i., são de grande importância e também controladas pelas ICC's (TAKAKI, 2003; AL-SHBOUL, 2013; HUIZINGA; CHEN, 2014). Na literatura diversos trabalhos citam e acreditam que as ICC's também estão afetadas no megacólon chagásico (HAGGER et al., 2000; LEE et al., 2005; GERALDINO et al., 2006; FARRUGIA, 2008; BASSOTTI; VILLANACCI, 2013), onde nosso trabalho corrobora com esses autores.

Os ensaios de banho de órgãos, onde não houve inibição do componente neural, demonstraram que a infecção aguda pela cepa Y de *T. cruzi* causou hiperresponsividade a agentes contráteis da musculatura colônica lisa (ACh), o que pode estar associado à necrose induzida por resposta inflamatória e à destruição predominantemente do músculo liso circular. À medida que o processo inflamatório originalmente difuso na fase aguda se torna mais focal e ocorre o desenvolvimento gradual de hipertrofia da camada muscular, observamos uma redução gradual da hiperresponsividade muscular entre 3 e 15 m.p.i.; no entanto, os ensaios não detectaram diferenças com os animais controles. Assim, nossos dados em sistemas isolados de banho de órgãos sugerem que o cólon permanece responsivo à ACh mesmo 15 m.p.i. A aplicação exógena de ACh foi capaz de induzir contração nos mesmos níveis obtidos nos animais controle. A hiperresponsividade do cólon na fase aguda e subaguda, poderia estar relacionada com a excitotoxicidade de neurônios mionéricos associados à inflamação, sendo que entre 7 e 15 m.p.i possíveis mecanismos reguladores inerentes à adaptação do tecido à infecção podem normalizar a resposta contrátil à ACh.

A hiperresponsividade na fase aguda nos levou a questionar se o infiltrado inflamatório intenso e difuso poderia estar regulando a resposta contrátil à ACh. O NO é um importante neurotransmissor e mediador do processo inflamatório agudo, auxiliando no processo de defesa contra patógenos, incluindo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular local. Ao avaliar o papel do NO, devemos considerar o NO produzido em resposta à infecção e o NO constitutivo derivado da nNOS. Avaliamos farmacologicamente o padrão de resposta contrátil ao ACh em fragmentos de cólon pré-incubados com o inibidor da NOS e observamos um aumento na resposta contrátil basal à inibição da NOS. No entanto, a resposta contrátil à ACh foi preservada a partir de 3 m.p.i., após a inibição da NOS, indicando que a provável fonte de NO que foi bloqueada se originou da inflamação aguda já descrita anteriormente (ARANTES et al., 2004). Esses dados corroboram com os da literatura demonstrando que o aumento na produção de NO está diretamente associado à redução da contratilidade do músculo liso em várias condições inflamatórias intestinais, como colite inflamatória e doença de Chron (BOUGHTON-SMITH et al., 1993; RACHMILEWITZ et al., 1995). Além disso, a inibição da produção de NO não potencializou a contração induzida por ACh na fase aguda da infecção.

A administração de atropina, um antagonista muscarínico conhecido por inibir terminações nervosas parassimpáticas inibiu a amplitude de contração tanto no IFA quanto no IFC15. Na fase aguda receptores muscarínicos inibidos pela atropina tem importância no fenômeno contrátil, sendo que a hiperresponsividade pode se relacionar com a ativação de receptor muscarínico o qual tem sua expressão aumentada em ensaios de Western Blot.

Como descrito anteriormente o componente neural é importante no estímulo, inibição e controle das respostas contráteis intestinais. Os ensaios descritos até o momento evidenciaram de uma forma geral como a rede de neurônios juntamente com as células musculares lisas dos camundongos controle e infectados, respondem aos estímulos, sejam eles elétricos ou farmacológicos. A inibição do componente neural, utilizando fármacos específicos, foi utilizada a fim de avaliar as respostas de amplitude da musculatura lisa intestinal.

Ao excluir o componente neural nos fragmentos de cólon controle e infectado de fase aguda e crônica 15 m.p.i., utilizando a droga TTX confirmamos que existem outros componentes capazes de responder ao estímulo na ausência da via neural, potencialmente os componentes da musculatura lisa intestinal. A fim de analisar as respostas dos principais receptores responsáveis pela contração direta excitatória da musculatura, por exemplo os receptores muscarínicos, utilizamos a atropina logo após o bloqueio com a TTX e observamos em todos os grupos uma diminuição da amplitude. Em específico no grupo de fase crônica, os ensaios mostram que a amplitude das ondas contrateis foi quase nula no grupo controle, indicando que a contração observada provém dos receptores muscarínicos ativados pela ACh na musculatura, e que quando comparamos o infectado de fase crônica 15 m.p.i., o mesmo exibe uma amplitude estatisticamente significativa maior quando comparado ao seu controle. As amplitudes observadas no grupo infectado de fase crônica podem nos indicar que existem outras possíveis fontes possíveis de contração na musculatura lisa intestinal. O aumento da amplitude na fase crônica infectada poderia ser explicado pela perda das fibras intramusculares, o que foi constatado *in vivo* nos animais infectados de fase crônica. Associado a essa perda também observamos expressão diminuída de receptores M3 e  $\alpha$ -7 nos tecidos crônicos infectado quando comparados ao seu controle. Com a desnervação algum mecanismo de contração que era inibido periféricamente na sinapse ou na fibra, pode estar impedido, liberando a contração mesmo na presença dos receptores de ACh. Outro tipo de neurotransmissor, por exemplo, inibidor ou relaxador diferente da ACh também estaria ausente, liberando a inibição. Dessa forma, sugerimos que poderia também haver a participação de um outro tipo de receptor colinérgico na musculatura lisa colônica. Estudos nos anos 90 relataram que a neurotransmissão inibitória em EMNs do cólon humano envolve um neurotransmissor nitrérgico e não-nitrérgico e sensível à apamina, provavelmente ATP ou uma purina relacionada (BOECKXSTAENS et al., 1993; KEEF et al., 1993).

Fisiologistas ao estudarem os potenciais de ação nos neurônios do plexo mioentérico do duodeno e íleo de cobaias, identificaram dois tipos de neurônios, os do tipo 1 ou S e neurônios do tipo 2 ou AH. Denominaram classe de células sinápticas ou

S, uma vez que as mesmas receberam extensos estímulos sinápticos excitatórios rápidos. O neurônio tipo AH, por outro lado, exibiu uma pós-hiperpolarização prolongada após um único potencial de ação somático (NISHI; NORTH, 1973; HIRST; HOLMAN; SPENCE, 1974). Sabemos a partir de estudos em cobaias que a administração da TTX bloqueou por completo os neurônios do tipo S, sendo esses neurônios do tipo motores e interneurônios (COSTA et al., 1996; BROOKES, 2001). A perda neuronal na fase aguda associada a redução das respostas contráteis neuronais e periféricas é um indício funcional de que os componentes musculares e neuronais na fase crônica estão comprometidos a despeito da estrutura.

Ao administrar o fármaco d-tubocurarina, que atua como competidor da ACh pela ligação aos receptores nicotínicos, logo após o bloqueio com a TTX, observamos no grupo IFA um aumento estatisticamente significativo da amplitude. Estudos funcionais usando segmentos isolados de intestino de cobaia *in vitro* mostraram que os nAChRs participam nas vias ascendentes e descendentes do reflexo motor excitatório e também na musculatura longitudinal e circular (SPENCER; WALSH; SMITH, 2000). Esses estudos, demonstraram que as contrações provocadas pela estimulação da mucosa através do reflexo excitatório ascendente foram inibidos (mas não bloqueados) por um antagonista do nAChR, o hexametônio. Esses dados indicam que a ativação do nAChR é o mecanismo predominante da neurotransmissão em vias ascendentes no plexo mioentérico (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000; SPENCER; WALSH; SMITH, 2000). No entanto, a neurotransmissão para as camadas musculares em vias excitatórias descendentes foi amplamente resistente ao hexametônio, indicando que os nAChR dão uma contribuição menor à neurotransmissão em vias descendentes no intestino delgado de cobaias (MONRO; BERTRAND; BORNSTEIN, 2002). Em nossos resultados podemos concluir que de fato a infecção aguda altera as vias do reflexo motor excitatório, podemos sugerir que a via descendente seria a mais disfuncional de acordo com as contrações observadas mesmo após a utilização de um bloqueador dos receptores nicotínicos na musculatura lisa intestinal. No entanto, precisamos de ensaios mais específicos e isolados para caracterizar por completo a eletrofisiologia nos cólons dos camundongos em nosso modelo de megacólon.

A administração de TTX seguida de bloqueador da NOS, o LNAME, não mostrou diferenças nas amplitudes contráteis, provavelmente a inibição que o L-NAME produz pode mediar a via do NO neuronal que está inibida pelo bloqueio da TTX, não sendo possível observar diferenças nas amplitudes de contração.

Nossos experimentos *in vivo* mostraram comprometimento do peristaltismo relacionado aos mecanismos efetores, uma vez que o aumento da biodisponibilidade do neurotransmissor excitatório acetilcolina pela piridostigmina não melhorou o tempo de trânsito total e colônico.

Extrapolar experiências *in vivo* para *ex vivo* não é completamente possível. No entanto, com base na importante alteração estrutural e fisiológica da camada de músculo liso e nos experimentos *ex vivo* obtidos em 7, 12 e 15 meses, podemos afirmar que a infecção altera os padrões de resposta efetiva a contração (diminuição da amplitude), associados a períodos de latência (ritmicidade) maiores onde a resposta não é efetiva. Por sua vez a perda de receptores do tipo muscarínicos e nicotínicos na fase crônica podem sugerir a existência de outra via de resposta contrátil na infecção pelo *T. cruzi* que não seja totalmente funcional implicando em defeitos de contração. Não é possível ainda discernir o mecanismo adaptativo nos músculos contráteis, mas as alterações celulares e estruturais do cólon nos níveis celulares e a destruição intramuscular do nervo produzida pela doença (ALMEIDA-LEITE et al., 2007; JABARI et al., 2012; CAMPOS et al., 2016) pode estar afetando a biodisponibilidade de neurotransmissores (AULÍ et al., 2008).

A expressão do receptor para o neurotransmissor excitatório SPR (NK1) foi estudada em nossa cinética e pudemos detectar uma diminuição significativa em alguns momentos comparados aos seus controles. Além disso, com exceção dos 7 m.p.i, todos os grupos crônicos apresentaram redução na expressão do NK1 quando comparado ao grupo IFA (Figura 33 A). Como os receptores NK1 e NK2 são expressos no músculo liso do cólon humano (LECCI et al., 2006) poderíamos sugerir que além dos receptores muscarínicos do tipo M3 estar diminuído também a expressão do receptor da neuroquinina 1 é acometido no megacólon chagásico.



Também analisamos a curva de expressão de ChAT, a enzima responsável pela síntese da ACh a partir de acetil-coenzima A e colina. A, sendo um indicador indireto e funcional da atividade colinérgica. Observamos que a expressão de ChAT diminuiu significativamente no grupo IFC15 em comparação com seu controle não infectado (Figura 33 B), esse resultado é interessante, podendo relacionar-se com os nossos resultados de piridostigmina, onde observamos um atraso na motilidade colônica e total do grupo infectado crônico, mesmo quando a biodisponibilidade da ACh era maior. A diminuição da expressão da enzima ChAT corrobora com um papel deficitário desse marcador na via colinérgica em nosso modelo.<sup>2+</sup>

A expressão VIP, um neurotransmissor inibitório, foi significativamente reduzida em 15 m.p.i em comparação com os controles. Além disso, os animais infectados apresentaram redução progressiva da expressão VIP ao longo dos tempos experimentais a partir de 3 m.p.i. (Figura 33 C). A expressão da nNOS diminuiu significativamente em 15 m.p.i em comparação com os controles (Figura 33 D) e pode refletir o dano ou a modificação do sistema nitrérgico no plexo entérico submucoso (MONTEDONICO et al., 2006) diferentemente dos gânglios mioentéricos, onde encontramos aumento relativo desse subtipo de neurônio no megacólon chagásico (RICCI et al., 2016) por imuno-histoquímica. Na DC humana, a co-aplicação do marcador pan-neuronal HU ou PGP9.5 permitiu discriminar o aumento relativo da subpopulação nitrérgica/VIP-érgica da sua diminuição absoluta (RIBEIRO et al., 1998; JABARI et al., 2011) na presença de neurônios colinérgicos e fibras nervosas diminuídos.

Nossos resultados *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, validam o modelo experimental crônico intestinal abrindo espaço para investigações voltadas para intervenções terapêuticas e preventivas do megacólon chagásico. Além disso, esta plataforma de investigação pode lançar luz em diversos mecanismos básicos de lesões do SNE, circuito de células de Cajal e parede muscular intestinal em outras doenças.

## 6. CONCLUSÃO

Encontramos cerca de 30% de perda de neurônios mioentéricos restrita à fase aguda, indicando que os mecanismos mais importantes de dano neuronal operam nessa fase, uma vez que não encontramos aumento da morte neuronal nos últimos momentos, principalmente quando comparados aos camundongos controle do mesmo grupo. Por outro lado, o perfil axonal na camada muscular interna decai progressivamente de 3 m.p.i. (fase subaguda) a 15 m.p.i (fase crônica) e está associado ao processo flogístico mantido. Detectamos a remoção do parasitismo da parede intestinal em 3 m.p.i., com apenas permanência residual de baixos níveis de DNA do parasita ao longo da duração do experimento. Além disso, há uma modificação intersticial progressiva (fibrose) e hipertrofia das células do músculo liso com consequente aumento da espessura da parede intestinal que se torna aparente a partir das 7 m.p.i e 12 m.p.i., respectivamente. Na fase aguda *in vitro* pela primeira vez caracterizamos um cultivo de neurônios do plexo mioentérico contando grande número de neurônios do tipo nNOS+ sendo os mesmos os mais infectados pelo *T. cruzi*. Há eventos de produção de dano mitocondrial neuronal, bem como produção de espécies reativas de nitrogênio e compostos nitrosilados. Concluímos que no total, a morte neuronal precoce *in vivo*, a geração de nitro-tirosina e o equilíbrio entre os mecanismos de morte e neuro-proteção devem ser levados em consideração para prevenção e tratamento dessa condição altamente mórbida.

Observamos distúrbios de motilidade *in vivo* associados à evidência de alterações de biodisponibilidade da acetilcolina nas fendas sinápticas, expressão diminuída de ChAT e NK1 em animais infectados, principalmente nas fases posteriores. No grupo IFA, observa-se hiperresponsividade à administração de ACh, que não é afetada pelo bloqueio farmacológico do NO pelo L-NAME. Mas ao inibir o componente neural dos ensaios *ex vivo* evidenciamos que o componente excitatório está comprometido e que outras possíveis vias de resposta podem auxiliar nas contrações observadas. A infecção prolongada por *T. cruzi* não apenas induz alteração nos neurônios excitatórios mioentéricos, mas também afeta o mecanismo contrátil no

músculo liso. Houve também uma diminuição na expressão de VIP e nNOS em animais infectados, concluindo que outras estruturas do cólon podem estar alteradas, como o plexo submucoso.

As alterações na ritmicidade nos camundongos infectados crônicos 15 m.p.i., são de grande importância para a doença. Nosso trabalho conclui de maneira inédita que as alterações rítmicas, controladas pelas ICC's, também estão afetadas no megacólon chagásico.

Este trabalho contribui para uma melhor explicação da patogênese da DC intestinal, bem como para explorar aspectos importantes da neurogastroenterologia.

## 7. PERSPECTIVAS

Caracterizar as respostas de ritmicidade durante o desenvolvimento do megacólon, bem como a análise das ondas lentas atribuídas as ICC's que estão em andamento e serão de grande importância para auxiliar nas lacunas sobre o megacólon chagásico.

Caracterização do perfil fenotípico de expressão dos tipos de ICC's (ICC's progenitoras, ICC's imaturas e maduras) ao longo do desenvolvimento do megacólon. Estudos preliminares estão em realização em nosso modelo, e poderão contribuir para a explicação da patologia.

Estudar de maneira aprofundada através de novos ensaios eletrofisiológico as respostas contráteis específicas por isolamento do componente neural e inervação intramural.

Caracterizar todos os perfis fenotípicos das células inflamatórias envolvidas no desenvolvimento do megacólon.

Verificar qual a via de morte dos neurônios e das células musculares lisas afetadas no desenvolvimento do megacólon.

Realizar estudos *in vitro* aprofundados e detalhados sobre os mecanismos de invasão e multiplicação celular ainda não existentes na literatura através do nosso cultivo de neurônios do plexo mioentérico.

Estudar e avaliar os mecanismos de entrada e sinalização nos estágios iniciais da infecção no cultivo de neurônios do plexo mioentérico, que culminam nas alterações morfológicas descritas neste trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1929, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30197647>>.

ADAD, S. J. et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 438, n. 3, p. 254–8, mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315622>>.

AHSAN, H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. **Human immunology**, v. 74, n. 10, p. 1392–9, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777924>>.

AKPAN, N. et al. Chagas' disease parasite-derived neurotrophic factor activates cholinergic gene expression in neuronal PC12 cells. **Brain research**, v. 1217, p. 195–202, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502403>>.

AL-SHBOUL, O. A. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. **Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 19, n. 1, p. 3–15, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23319032>>.

ALMEIDA-LEITE, C. M. de et al. Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. **Neurobiology of disease**, v. 25, n. 1, p. 170–8, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056264>>.

ALMEIDA, H. O. et al. Studies on the vesicular component of the Auerbach's plexus and the substance P content of the mouse colon in the acute phase of the experimental Trypanosoma cruzi infection. **Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology**, v. 376, n. 4, p. 353–60, dez. 1977.

- ALTAF, M. A.; SOOD, M. R. The nervous system and gastrointestinal function. **Developmental disabilities research reviews**, v. 14, n. 2, p. 87–95, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18646012>>.
- ALTCHEH, J. Chagas disease, 100 years after its identification. **Archivos argentinos de pediatria**, v. 108, n. 1, p. 4–5, 2010.
- ALVAREZ, M. N. et al. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6627–40, 25 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098483>>.
- ANAND, N.; PATERSON, W. G. Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. **The American journal of physiology**, v. 266, n. 1 Pt 1, p. G123-31, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304451>>.
- ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 64, n. 3, p. 474–84, dez. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3315736>>.
- ARANTES, R. et al. Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro. **Neuroreport**, v. 11, n. 1, p. 177–81, 17 jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683853>>.
- ARANTES, R. M. E. et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 4, p. 1361–8, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039223>>.
- ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and tissue research**, v. 290, n. 1, p. 61–9, 1997. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377643>>.

ARMOUR, J. A. Potential clinical relevance of the “little brain” on the mammalian heart. **Experimental physiology**, v. 93, n. 2, p. 165–76, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981929>>.

AULÍ, M. et al. Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 7, p. 1043–55, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846038>>.

BALCERCZYK, A.; SOSZYNSKI, M.; BARTOSZ, G. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. **Free radical biology & medicine**, v. 39, n. 3, p. 327–35, 1 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993331>>.

BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V. The pathophysiology of chagasic megacolon: beyond ICC.... **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 462, n. 1, p. 125, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23179761>>.

BATTHYÁNY, C. et al. Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. **Antioxidants & redox signaling**, v. 26, n. 7, p. 313–328, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27324931>>.

BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. The movements and innervation of the small intestine. **The Journal of physiology**, v. 24, n. 2, p. 99–143, 11 maio 1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16992487>>.

BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. The movements and innervation of the small intestine. **The Journal of physiology**, v. 26, n. 3–4, p. 125–138, 1901.

BENHAR, M.; ENGELBERG, D.; LEVITZKI, A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. **EMBO reports**, v. 3, n. 5, p. 420–5, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991946>>.

BENNETT, M. R. Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on. **Progress in neurobiology**, v. 52, n. 3, p. 159–95, jun. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234452>>.

BENVENUTI, L. A. et al. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 102, n. 6, p. 481–7, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782487>>.

BLENNERHASSETT, M. G. et al. Characteristics of inflammation-induced hypertrophy of rat intestinal smooth muscle cell. **Digestive diseases and sciences**, v. 44, n. 7, p. 1265–72, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10489904>>.

BLENNERHASSETT, M. G.; LOURENSSEN, S. Neural regulation of intestinal smooth muscle growth in vitro. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 3, p. G511–G519, 2000.

BOECKXSTAENS, G. E. et al. Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. **Gastroenterology**, v. 104, n. 3, p. 690–7, mar. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8095033>>.

BORNSTEIN, J. C.; COSTA, M.; GRIDER, J. R. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. In: *Neurogastroenterology and Motility*, SUPPL. 1, **Anais...**2004a.

BORNSTEIN, J. C.; COSTA, M.; GRIDER, J. R. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Suppl 1, p. 34–8, abr. 2004b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066002>>.

BOUGHTON-SMITH, N. K. et al. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet (London, England)**, v. 342, n. 8867, p. 338–40, 7 ago. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7687730>>.



BRAGA, E. M. et al. Difference in susceptibility to lysis between clones of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 529–34, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139464>>.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free radical research**, v. 31, n. 6, p. 577–96, dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630682>>.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768–70, 25 out. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1700301>>.

BRENER, Z. B. Z. T. activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *T. cruzi*. R. I. M. T. S. P. [Internet]. 1962;4:389–96. A. from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1401523>. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389–96, 1962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14015230>>.

BRITO, C. et al. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 6, p. 3356–66, 15 mar. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092790>>.

BROOKES, S.; COSTA, M. **Cellular organisation of the mammalian enteric nervous system**. Taylor & F ed. [s.l: s.n.]

BROOKES, S.; COSTA, M. **Functional Histoanatomy of the Enteric Nervous System**. 4th Ed ed. [s.l: s.n.]

BROOKES, S. J. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **The Anatomical record**, v. 262, n. 1, p. 58–70, 1 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146429>>.

BROOKES, S.; STEELE, P.; COSTA, M. Identification and immunohistochemistry of

cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience**, v. 42, n. 3, p. 863–78, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720229>>.

BUBENHEIMER, R. K. et al. Sirtuin-3 Is Expressed by Enteric Neurons but It Does not Play a Major Role in Their Regulation of Oxidative Stress. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 10, p. 73, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047337>>.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 4, p. 461–5, ago. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066513>>.

BURNSTOCK, G.; COSTA, M. Inhibitory innervation of the gut. **Gastroenterology**, v. 64, n. 1, p. 141–4, jan. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4683851>>.

BURNSTOCK, G.; GRIFFITH, S. Nonadrenergic innervation of blood vessels. In: CRC, Boca ed. [s.l: s.n.]

CAMARA-LOPES, L. H. Carcinoma of the esophagus as a complication of megaesophagus. An analysis of seven cases. **The American journal of digestive diseases**, v. 6, p. 742–56, ago. 1961. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13690069>>.

CAMILLERI, M. Enteric nervous system disorders: genetic and molecular insights for the neurogastroenterologist. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 13, n. 4, p. 277–95, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11576388>>.

CAMPOS, C. F. et al. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153038, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27045678>>.

CANNON, W. B. Peristalsis, segmentation, and the myenteric reflex. **Am J Physiol**, v. 30, p. 114–28, 1912.

CAO, W. et al. Gq-linked NK2 receptors mediate neurally induced contraction of human sigmoid circular smooth muscle. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 51–61, 2000.

CAO, W.; HARNETT, K. M.; PRICOLO, V. E. NK2 receptor-mediated spontaneous phasic contractions in normal and ulcerative colitis human sigmoid colon. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 317, n. 3, p. 1349–55, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554357>>.

CAPETTINI, L. S. A. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 6, p. H2503-11, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952716>>.

CELLEK, S. et al. Demonstration of functional neuronal beta3-adrenoceptors within the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 133, n. 1, p. 175–83, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631141>>.

CHEN, Z.-H. et al. Characterization of Interstitial Cajal Progenitors Cells and Their Changes in Hirschsprung's Disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86100, 24 jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0086100>>.

CHO, H. J. et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 2, p. 599–604, 1 ago. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380065>>.

CHOI, K. M. et al. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 19, n. 7, p. 585–95, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593140>>.

CÔBO, E. de C. et al. Research on Trypanosoma cruzi and Analysis of Inflammatory

Infiltrate in Esophagus and Colon from Chronic Chagasic Patients with and without Mega. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, p. 232646, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131997>>.

COSTA, M. et al. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience letters**, v. 148, n. 1–2, p. 121–5, 14 dez. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1284439>>.

COSTA, M. et al. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 75, n. 3, p. 949–67, dez. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8951887>>.

COSTA, M. All together now: from pacemakers to gastric peristalsis. **The Journal of physiology**, v. 571, n. Pt 1, p. 1, 15 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410277>>.

COSTA, M.; BROOKES, S. Architecture of enteric neural circuits involved in intestinal motility. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 12 Suppl 1, p. 3–19, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18924440>>.

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 Suppl 4, p. iv15-9; discussion iv26, dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076898>>.

COSTA, M.; FURNESS, J. B. The peristaltic reflex: An analysis of the nerve pathways and their pharmacology. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 294, n. 1, p. 47–60, 1976.

COSTA, M.; FURNESS, J. B. Neuronal peptides in the intestine. **British medical bulletin**, v. 38, n. 3, p. 247–52, set. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6756540>>.

COSTA, M.; FURNESS, J. B.; GIBBINS, I. L. Chemical coding of enteric neurons. **Progress in brain research**, v. 68, p. 217–39, 1986. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2882553>>.

COSTALES, J. A.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells by comparative mRNA profiling. **BMC genomics**, v. 10, p. 252, 29 maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19480704>>.

CREMA, A.; FRIGO, G. M.; LECCHINI, S. A pharmacological analysis of the peristaltic reflex in the isolated colon of the guinea-pig or cat. **British journal of pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 334–45, jun. 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5425277>>.

DA SILVEIRA, A. et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 10, p. 2877–83, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17385032>>.

DA SILVEIRA, A. et al. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1154–6, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554673>>.

DANIEL, E. E.; POSEY-DANIEL, V. Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. **The American journal of physiology**, v. 246, n. 3 Pt 1, p. G305-15, mar. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6703058>>.

DE ALMEIDA-LEITE, C. M. et al. Sympathetic glial cells and macrophages develop different responses to *Trypanosoma cruzi* infection or lipopolysaccharide stimulation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 459–65, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075784>>.

DE GROAT, W. C. et al. Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 3, n. 2–4, p. 135–60, abr. 1981. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6268684>>.

DE LIMA, M. A. et al. Interstitial cells of Cajal in chagasic megaesophagus. **Annals of diagnostic pathology**, v. 12, n. 4, p. 271–4, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620994>>.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. **Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease** *American Journal of Gastroenterology*, 1998. .

DEFARIA, C. R.; DE REZENDE, J. M.; RASSI, A. [Peripheral denervation in the various clinical forms of Chagas' disease]. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 46, n. 3, p. 225–37, set. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2851967>>.

DESOTI, V. C. et al. The Combination of Vitamin K3 and Vitamin C Has Synergic Activity against Forms of *Trypanosoma cruzi* through a Redox Imbalance Process. **PLoS one**, v. 10, n. 12, p. e0144033, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26641473>>.

DIAS, P. P. et al. Cardiomyocyte oxidants production may signal to *T. cruzi* intracellular development. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005852, ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28832582>>.

DOS SANTOS, P. V et al. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes and infection**, v. 3, n. 12, p. 971–84, out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11580984>>.

DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 377–87, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611805>>.

ESTRADA, D. et al. Cardiomyocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. **The Biochemical journal**, v. 475, n. 7, p. 1235–1251, 5 abr. 2018. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29438066>>.

FAHRENKRUG, J. Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function. **Digestion**, v. 19, n. 3, p. 149–69, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39014>>.

FARRUGIA, G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 20 Suppl 1, p. 54–63, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402642>>.

FERRARI, I. et al. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 1, p. 59–65, 1995.

FERREIRA, M. S. et al. Reactivation of Chagas' Disease in Patients with AIDS: Report of Three New Cases and Review of the Literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 6, p. 1397–1400, dez. 1997. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/516130>>.

FURNESS, J. **The enteric nervous system**. [s.l: s.n.]

FURNESS, J. **The enteric nervous system and neurogastroenterology** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012. .

FURNESS, J.; COSTA, M. **The Enteric Nervous System**. Edinburgh: ed. [s.l: s.n.]

GALLIGAN, J. J. et al. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 81, n. 1–3, p. 97–103, 3 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869707>>.

GAMBA, E.; CARR, N. J.; BATEMAN, A. C. Deficient alpha smooth muscle actin expression as a cause of intestinal pseudo-obstruction: fact or fiction? **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 11, p. 1168–71, nov. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509678>>.

GARIEPY, C. E. Intestinal motility disorders and development of the enteric nervous system. **Pediatric research**, v. 49, n. 5, p. 605–13, maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328941>>.

GERALDINO, R. S. et al. Interstitial cells of Cajal in patients with chagasic megacolon originating from a region of old endemicity. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology**, v. 13, n. 2, p. 71–4, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500095>>.

GONZALEZ, A.; SALIDO, G. M. Determination of reactive oxygen species production in pancreatic acinar cells. **Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base**, v. 1, p. 9, 2016.

GONZÁLEZ CAPPA, S. M. et al. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 36, n. 1, p. 41–5, jan. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3101527>>.

GOYAL, R. K.; CHAUDHURY, A. Pathogenesis of achalasia: lessons from mutant mice. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1086–90, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800108>>.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7764–8, dez. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950416>>.

GRIDER, J. R. et al. Vasoactive intestinal peptide. Relaxant neurotransmitter in tenia coli of the guinea pig. **Gastroenterology**, v. 89, n. 1, p. 36–42, jul. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2861138>>.

GRIDER, J. R. Identification of neurotransmitters regulating intestinal peristaltic reflex in humans. **Gastroenterology**, v. 97, n. 6, p. 1414–9, dez. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2479588>>.



GRIDER, J. R. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 307, n. 2, p. 460–7, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12966154>>.

GUPTA, S. et al. Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 10, p. 1414–21, 15 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686837>>.

HAGGER, R. et al. A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 80, n. 1–2, p. 108–11, 12 abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742548>>.

HANSEN, M. B. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. **Pharmacology & toxicology**, v. 92, n. 6, p. 249–257, 2003.

HASLER, W. **Physiology of gastric motility and gastric emptying**. Lippincott ed. [s.l: s.n.]

HE, C. L. et al. Loss of interstitial cells of cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes. **Gastroenterology**, v. 121, n. 2, p. 427–34, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487552>>.

HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 100, p. 1–32, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906988>>.

HENNIG, G. W. et al. Propagation of pacemaker activity in the guinea-pig antrum. **The Journal of physiology**, v. 556, n. Pt 2, p. 585–99, 15 abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754999>>.

HIGUCHI, M. D. L. et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 5, p. 485–489, 1997.

HINDS, N. M.; ULLRICH, K.; SMID, S. D. Cannabinoid 1 (CB1) receptors coupled to cholinergic motorneurons inhibit neurogenic circular muscle contractility in the human colon. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 2, p. 191–9, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520743>>.

HIRST, G. D.; HOLMAN, M. E.; SPENCE, I. Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. **The Journal of physiology**, v. 236, n. 2, p. 303–26, jan. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16992436>>.

HORISAWA, M.; WATANABE, Y.; TORIHASHI, S. Distribution of c-Kit immunopositive cells in normal human colon and in Hirschsprung's disease. **Journal of pediatric surgery**, v. 33, n. 8, p. 1209–14, ago. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721988>>.

HOUSTON-LUDLAM, G. A.; BELEW, A. T.; EL-SAYED, N. M. Comparative Transcriptome Profiling of Human Foreskin Fibroblasts Infected with the Sylvio and Y Strains of *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0159197, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27505626>>.

HUIZINGA, J. D.; CHEN, J.-H. Interstitial cells of Cajal: update on basic and clinical science. **Current gastroenterology reports**, v. 16, n. 1, p. 363, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24408748>>.

JABARI, S. et al. Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon. **Histochemistry and cell biology**, v. 135, n. 1, p. 47–57, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21184236>>.

JABARI, S. et al. Preponderance of inhibitory versus excitatory intramuscular nerve fibres in human chagasic megacolon. Jabari, S., da Silveira, A. B. M., de Oliveira, E. C., Quint, K., Neuhuber, W., & Brehmer, A. (2012). Preponderance of inhibitory versus excitatory intram. **International journal of colorectal disease**, v. 27, n. 9, p. 1181–9, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729712>>.

JABARI, S. et al. Interstitial cells of Cajal: crucial for the development of megacolon in

human Chagas' disease? **Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland**, v. 15, n. 10, p. e592-8, 2013.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810202>>.

JABARI, S. et al. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures.

**Histochemistry and cell biology**, v. 142, n. 3, p. 235–44, set. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059649>>.

JÄNIG, W. **The Integrative Action of the Autonomic Nervous System.**

**Neurobiology of Homeostasis.** Cambridge: ed. [s.l: s.n.]

KEEF, K. D. et al. Enteric inhibitory neural regulation of human colonic circular muscle: role of nitric oxide. **Gastroenterology**, v. 105, n. 4, p. 1009–16, out. 1993.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8104837>>.

KHROMOV, A. S. et al. Smooth muscle of telokin-deficient mice exhibits increased sensitivity to Ca<sup>2+</sup> and decreased cGMP-induced relaxation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2440–5, 14 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461919>>.

KLAUNIG, J. E. et al. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 86–99, 15 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296097>>.

KLEIN, D.; KERN, R. M.; SOKOL, R. Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 36, n. 1, p. 59–66, maio 1995. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545052>>.

KNOWLES, C. H. et al. Deranged smooth muscle alpha-actin as a biomarker of intestinal pseudo-obstruction: a controlled multinational case series. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1583–9, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479676>>.

KOBERLE, F. Die Chagaskrankheit; eine Erkrankung der neurovegetativen peripherie. **Wien. klin. Wschr.**, v. 68, p. 333–339, 1956a.

KOBERLE, F. Pathologische Befunde an den muskularen Hohlorganen bei der experimentellen Chagaskrankheit. **Zbl. allg. Path. path. Anat.**, v. 95, p. 321–329, 1956b.

KOBERLE, F. Zur lehre von der Herzhypertrophie. **Munch. med. Wschr.**, v. 99, p. 247–249, and 296–298, 1957.

KOBERLE, F. Megacolon. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 1, p. 21–4, jan. 1958. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13502904>>.

KOBERLE, F. Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. **Advances in Parasitology**, v. 6, n. C, p. 63–116, 1968.

KOBERLE, F.; DE ALCANTARA, F. [Mechanism of destruction of the neurons of the peripheral nervous system in Chagas' disease]. **Hospital (Rio de Janeiro, Brazil)**, v. 57, p. 1057–62, jun. 1960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14410284>>.

KOBERLE, F.; NADOR, E. [Etiology and pathogenesis of megaesophagus in Brazil]. **Revista paulista de medicina**, v. 47, n. 6, p. 643–61, dez. 1955a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13323589>>.

KOBERLE, F.; NADOR, E. [Etiology and pathogenesis of megaesophagus in Brazil]. **Revista paulista de medicina**, v. 47, n. 6, p. 643–61, dez. 1955b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13323589>>.

KOBERLE, F. [Cardiopathia parasymphaticopriva]. **Munchener medizinische Wochenschrift (1950)**, v. 101, p. 1308–10, 31 jul. 1959. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14410379>>.

KOBERLE, F. ENTEROMEGALY AND CARDIOMEGALY IN CHAGAS DISEASE. **Gut**, v. 4, p. 399–405, dez. 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14084752>>.

KOH, S. D. et al. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic

smooth muscle. **The Journal of physiology**, v. 489 ( Pt 3, p. 735–43, 15 dez. 1995.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788938>>.

KOH, S. D. et al. TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 47, p. 44338–46, 23 nov. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560940>>.

KOSTERLITZ, H. W.; PIRIE, V. W.; ROBINSON, J. A. The mechanism of the peristaltic reflex in the isolated guinea-pig ileum. **The Journal of physiology**, v. 133, n. 3, p. 681–94, 27 set. 1956. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13368114>>.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Overview of Reactive Oxygen Species. In: NONELL, S.; FLORS, C. (Ed.). **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences.**, v. 1, n. Cap. 1, p. 1–21, 2016.

LANDRY, W. D.; COTTER, T. G. ROS signalling, NADPH oxidases and cancer.

**Biochemical Society transactions**, v. 42, n. 4, p. 934–8, ago. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109982>>.

LANGLEY, J. The autonomic nervous system. **Brain**, p. 1–26, 1903.

LANGLEY, J. **The autonomic nervous system.** [s.l.: s.n.]

LARSSON, L. I. et al. Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 9, p. 3197–200, set. 1976. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/787988>>.

LECCI, A. et al. Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 126–127, p. 232–49, 30 jun. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616700>>.

LEE, J. Il et al. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 20, n. 8, p. 1292–8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16048580>>.

LEMOS, V. S. et al. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 274–9, set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116331>>.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. Autoimmunity in Chagas heart disease. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 555–61, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334942>>.

LEWIS, M. D. et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1285–300, set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712539>>.

LI, L. et al. Phenotypic changes of interstitial cells of Cajal after intestinal obstruction in rat model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 10, 2019. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2019001000611&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2019001000611&tlng=en)>.

LI, Y. et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511, abr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27046031>>.

LI, Z. et al. Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 24, p. 8998–9009, 15 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677183>>.

LI, Z. S.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. **Cell and tissue research**, v. 294, n. 1, p. 35–43, out. 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724454>>.

LINGAPPAN, K. NF- $\kappa$ B in Oxidative Stress. **Current opinion in toxicology**, v. 7, p. 81–86, fev. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29862377>>.

LLEWELLYN-SMITH, I. J. et al. Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin-, substance P-, and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea pig small intestine. **The Journal of comparative neurology**, v. 272, n. 1, p. 139–48, 1 jun. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2454974>>.

LLEWELLYN-SMITH, I. J. et al. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in guinea-pig enteric neurons. **Brain research**, v. 577, n. 2, p. 337–42, 17 abr. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376636>>.

LORINCZ, A. et al. Progenitors of interstitial cells of cajal in the postnatal murine stomach. **Gastroenterology**, v. 134, n. 4, p. 1083–93, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395089>>.

MACHADO, F. S. et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003–8, 12 dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113053>>.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753–70, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076807>>.

MAGGI, L.; MANTEGAZZA, R. Treatment of Myasthenia Gravis. **Clinical Drug Investigation**, v. 31, n. 10, p. 691–701, out. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2165/11593300-000000000-00000>>.

MAIFRINO, L.; LIBERTI, E.; DE SOUZA, R. Vasoactive-intestinal-peptide- and substance-P-immunoreactive nerve fibres in the myenteric plexus of mouse colon during the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 93, n. 1, p. 49–56, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492671>>.

MANINI, M. L. et al. Application of Pyridostigmine in Pediatric Gastrointestinal Motility Disorders: A Case Series. **Paediatric drugs**, v. 20, n. 2, p. 173–180, abr. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29243034>>.

MANQUE, P. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1855–62, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343357>>.

MARLETTA, M. A. et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, n. 24, p. 8706–11, 29 nov. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3242600>>.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927–30, 23 set. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522970>>.

MARTINS, P. et al. Esophageal transit time in patients with chagasic megaesophagus: Lack of linear correlation between dysphagia and grade of dilatation. **Medicine**, v. 97, n. 10, p. e0084, mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29517674>>.

MARTINS, P.; MORAIS, B. B.; CUNHA-MELO, J. R. Postoperative complications in the treatment of chagasic megaesophagus. **International surgery**, v. 78, n. 2, p. 99–102, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8354622>>.

MARTINS, P. R. et al. Neuroimmunopathology of *Trypanosoma cruzi*-induced megaesophagus: Is there a role for mast cell proteases? **Human immunology**, v. 75, n. 4, p. 302–5, abr. 2014. Disponível em:



<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530752>>.

MARTINS, S. C. et al. 1,3,4-Thiadiazole derivatives of R-(+)-limonene benzaldehyde-thiosemicarbazones cause death in *Trypanosoma cruzi* through oxidative stress.

**Microbes and infection**, v. 18, n. 12, p. 787–797, dez. 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27484335>>.

MCCALL, L.-I. et al. Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p.

e0006344, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29529084>>.

MCCALL, L.-I.; MCKERROW, J. H. Determinants of disease phenotype in

trypanosomatid parasites. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 7, p. 342–9, jul. 2014.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24946952>>.

MENEGHELLI, U. G. Chagasic enteropathy. **Revista da Sociedade Brasileira de**

**Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 252–60, 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15330067>>.

MIRKIN, G. A. et al. Experimental Chagas' Disease: Electrophysiology and Cell

Composition of the Neuromyopathic Inflammatory Lesions in Mice Infected with a

Myotropic and a Pantropic Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Clinical Immunology and**

**Immunopathology**, v. 73, n. 1, p. 69–79, out. 1994. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090122984711718>>.

MIRKIN, G. A. et al. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic

damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. **Clinical and experimental**

**immunology**, v. 107, n. 2, p. 328–34, fev. 1997. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030871>>.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology,

pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–

142, 1991.

MONRO, R. L.; BERTRAND, P. P.; BORNSTEIN, J. C. ATP and 5-HT are the

principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 14, n. 3, p. 255–64, jun. 2002.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061910>>.

MONTEDONICO, S. et al. Developmental changes in submucosal nitrergic neurons in the porcine distal colon. **Journal of pediatric surgery**, v. 41, n. 5, p. 1029–35, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16677906>>.

MONTGOMERY, S. P. et al. Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 814–818, 7 maio 2014. Disponível em:

<<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.13-0726>>.

MOORE, M. K.; VISELLI, S. M. Staining and quantification of proteins transferred to polyvinylidene fluoride membranes. **Analytical biochemistry**, v. 279, n. 2, p. 241–2, 15 mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706793>>.

MORAES, K. C. M.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. Role of cyclooxygenase-2 in Trypanosoma cruzi survival in the early stages of parasite host-cell interaction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 181–91, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946241>>.

MOREIRA, M. D. et al. Regenerative process evaluation of neuronal subclasses in chagasic patients with megacolon. **Human immunology**, v. 74, n. 2, p. 181–8, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220499>>.

MOREIRA, N. M. et al. Neuronal changes caused by Trypanosoma cruzi: an experimental model. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 545–55, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670878>>.

NASCIMENTO, R. D. et al. Characterization of enteroglia cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. **Human pathology**, v. 41, n. 4, p. 528–34, abr. 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004942>>.

NASCIMENTO, R. D. et al. An imbalance between substance P and vasoactive intestinal polypeptide might contribute to the immunopathology of megaesophagus after *Trypanosoma cruzi* infection. **Human pathology**, v. 44, n. 2, p. 269–76, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995328>>.

NISHI, S.; NORTH, R. A. Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. **The Journal of physiology**, v. 231, n. 3, p. 471–91, jun. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4783093>>.

NÜSSE, O. Biochemistry of the phagosome: the challenge to study a transient organelle. **TheScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2364–81, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194668>>.

PAIVA, C. N. et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2531–42, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728935>>.

PANTANO, C. et al. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1791–806, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987032>>.

PELAYO, J.-C. et al. Localisation and activation of the neurokinin 1 receptor in the enteric nervous system of the mouse distal colon. **Cell and tissue research**, v. 356, n. 2, p. 319–32, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728885>>.

PELLETIER, A.-M. et al. Neuronal nitric oxide inhibits intestinal smooth muscle growth. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 298, n. 6, p. G896–G907, 2010.

PETERSON, J. K. et al. Broad patterns in domestic vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission dynamics: synanthropic animals and vector control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 537, 2015. Disponível em:

<<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/537>>.

PIACENZA, L. et al. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 415–421, ago. 2009a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527409000812>>.

PIACENZA, L. et al. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 13, p. 1455–1464, nov. 2009b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751909002240>>.

PITTELLA, J. E. **Central nervous system involvement in experimental Trypanosomiasis cruzi.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1991. .

PORTER, A. J. et al. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1916–23, dez. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394731>>.

PORTER, A. J. et al. Abnormalities of nerve fibers in the circular muscle of patients with slow transit constipation. **International journal of colorectal disease**, v. 13, n. 5–6, p. 208–16, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870163>>.

PORTER, K. E.; TURNER, N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology & therapeutics**, v. 123, n. 2, p. 255–78, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460403>>.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RACHMILEWITZ, D. et al. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gut**, v. 36, n. 5, p. 718–23, maio 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541008>>.

RADA, B.; LETO, T. L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. **Contributions to microbiology**, v. 15, p. 164–187, 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511861>>.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29802228>>.

RAJFER, J. et al. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. **The New England journal of medicine**, v. 326, n. 2, p. 90–4, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309211>>.

RANKIN, E. B.; GIACCIA, A. J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 4, p. 678–85, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18259193>>.

REES, D. D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 746–52, nov. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1706208>>.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$ + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 48, n. 5, p. 637–44, maio 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8517482>>.

RENZI, D. et al. Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 5, p. 1511–22, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073811>>.

RIBEIRO, B. M.; CREMA, E.; RODRIGUES, V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Human immunology**, v. 69, n. 8, p. 484–9, ago. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18582517>>.

RIBEIRO, U. et al. Effect of Chagas' disease on nitric oxide-containing neurons in severely affected and unaffected intestine. **Diseases of the colon and rectum**, v. 41, n. 11, p. 1411–7, nov. 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823808>>.

RICCI, M. F. et al. Nitrergic Myenteric Neurons are Spared in Experimental Chagasic Megacolon. **Journal of Neuroinfectious Diseases**, v. 07, n. 04, 2016. Disponível em:

<<http://www.omicsonline.com/open-access/nitrergic-myenteric-neurons-are-spared-in-experimental-chagasic-megacolon-2314-7326-1000235.php?aid=84323>>.

ROMA, E. H. et al. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. **Parasites & vectors**, v. 9, p. 193, 7 abr. 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056545>>.

ROMAN-CAMPOS, D. et al. Altered Cardiomyocyte Function and *Trypanosoma cruzi* Persistence in Chagas Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1028–1033, 4 maio 2016. Disponível em:

<<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.15-0255>>.

ROMANA, C. The developmental cycle of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas 1909. in its tissular and hematic phases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 1, p. 255–269, 1956.

SAID, S. I. The discovery of VIP: initially looked for in the lung, isolated from intestine, and identified as a neuropeptide. **Peptides**, v. 28, n. 9, p. 1620–1, set. 2007.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719695>>.

SANDERS, K. M. Interstitial cells of Cajal at the clinical and scientific interface. **The Journal of physiology**, v. 576, n. Pt 3, p. 683–7, 1 nov. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945970>>.

SANDERS, K. M. et al. Regulation of gastrointestinal motility--insights from smooth

muscle biology. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 11, p. 633–45, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965426>>.

SANDERS, K. M.; KOH, S. D.; WARD, S. M. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. **Annual review of physiology**, v. 68, p. 307–43, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460275>>.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 212–227, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30063800>>.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. MEGACÓLON - PARTE II: DOENÇA DE CHAGAS. **Rev bras Coloproct**, v. 4, p. 266–277, 2002. Disponível em: <[https://www.sbcop.org.br/revista/nbr224/P266\\_277.htm](https://www.sbcop.org.br/revista/nbr224/P266_277.htm)>.

SARAIVA, J. B.; ACOSTA, A. C. Megacolon y vólculo de sigmoides: incidencia y fisiopatología. **Rev. gastroenterol. Perú**, v. 35, n. 1, p. 38–44, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292015000100005&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292015000100005&script=sci_abstract)>.

SARNA, S.; SHI, X. **Function and regulation of colonic contractions in health and disease**. Fourth Edi ed. [s.l.] Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2006.

SAUZEAU, V. et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21722–9, 14 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783386>>.

SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Suppl 1, p. 55–59, 2004.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842–60, jun. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474247>>.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 8, p. s314–s325, 2003.

SILVA, R. R. et al. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by Trypanosoma cruzi. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0118600, 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25695249>>.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio-protocol**, v. 9, n. 1, 5 jan. 2019. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30687773>>.

SMITH, T. H. et al. An in-vitro preparation of isolated enteric neurons and glia from the myenteric plexus of the adult mouse. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 78, p. e50688, 2013. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/50688/an-vitro-preparation-isolated-enteric-neurons-glia-from-myenteric>>.

SPENCER, N. J.; WALSH, M.; SMITH, T. K. Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. **The Journal of physiology**, v. 522 Pt 2, p. 321–31, 15 jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639107>>.

STERIN-BORDA, L.; PASCUAL, J.; BORDA, E. [Interaction of antibodies with cardiac neurotransmitter receptors]. **Medicina**, v. 49, n. 2, p. 181–8, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2561795>>.

STORDEUR, P. et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **Journal of immunological methods**, v. 259, n. 1–2, p. 55–64, 1 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11730841>>.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. **New horizons (Baltimore, Md.)**, v. 3, n. 1, p. 2–32, fev. 1995. Disponível em:



<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535648>>.

SZURSZEWSKI, J.; MILLER, S. Physiology of prevertebral ganglia. Johnson LR, ed. Physiology of the gastrointestinal tract. **New York: Raven Press**, 1990.

TAFURI, W. L. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. **Virchows Archiv. A, Pathology. Pathologische Anatomie**, v. 354, n. 2, p. 136–49, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5000755>>.

TAFURI, W. L.; BRENER, Z. [Lesions of the autonomic nervous system of the white mouse in the chronic phase of experimental trypanosomiasis cruzi]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 8, n. 4, p. 177–83, 1966.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. [Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13, n. 2, p. 76–91, 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5005737>>.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. [Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 13, n. 2, p. 76–91, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5005737>>.

TAKAHASHI, T. et al. Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. **Brain research**, v. 883, n. 1, p. 15–21, 2000.

TAKAKI, M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). **Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi**, v. 39, n. 5, p. 137–61, out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695026>>.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 550–4, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334941>>.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, jul. 2011.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21734249>>.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262–265, jun.

2002a. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492202022833>>.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262–5, jun. 2002b.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036740>>.

UEMURA, S. et al. Distributions of substance P- and VIP-immunoreactive nerve fibres in the colonic circular muscle in children. **Pediatric surgery international**, v. 14, n. 1–2, p. 66–70, nov. 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880700>>.

VAENA DE AVALOS, S. et al. Immediate/early response to Trypanosoma cruzi infection involves minimal modulation of host cell transcription. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 1, p. 639–44, 4 jan. 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11668183>>.

VANDERWINDEN, J. M. et al. The pathology of infantile hypertrophic pyloric stenosis after healing. **Journal of pediatric surgery**, v. 31, n. 11, p. 1530–4, nov. 1996.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943116>>.

VAZQUEZ, B. P. et al. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute Trypanosoma cruzi infection are associated with the parasite load.

**Parasites & vectors**, v. 8, p. 206, 3 abr. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889515>>.

VENKOVA, K.; GREENWOOD-VAN MEEVELD, B.; KRIER, J. Neural Control of the Large Intestine. In: **Innervation of the Gastrointestinal Tract**. Taylor & F ed.

London: In: Brookes SJ and Costa M (eds)., 2002. p. 171–187.

VOUKALI, E.; SHOTTON, H. R.; LINCOLN, J. Selective responses of myenteric neurons to oxidative stress and diabetic stimuli. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 23, n. 10, p. 964-e411, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914042>>.

WAGHABI, M. C. et al. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs Trypanosoma cruzi infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2905–10, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526757>>.

WAHBA, G. et al. A rapid and efficient method for dissociated cultures of mouse myenteric neurons. **Journal of neuroscience methods**, v. 261, p. 110–6, 1 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26706461>>.

WEDEL, T. et al. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. **Gastroenterology**, v. 123, n. 5, p. 1459–67, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12404220>>.

WHITE, R. J.; REYNOLDS, I. J. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 18, p. 5688–97, 15 set. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8795624>>.

WILSON, A. J. et al. The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig. **Cell and tissue research**, v. 247, n. 3, p. 497–504, mar. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3568095>>.

YAMADA, T. et al. In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 20, n. 1, p. 41–9, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796921>>.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 2, p. 480–6, ago. 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395865>>.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 909–50, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24987008>>.

## ANEXOS

### 1. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 262/2016  
**Título do projeto:** Estudo morfológico e funcional do megacólon chagásico: do animal inoculado às células infectadas pelo Trypanosoma cruzi  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Rosa Maria Esteves Arantes  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Patologia

**Situação atual:** [Decisão Final](#)

Aprovado na reunião do dia 24/10/2016.

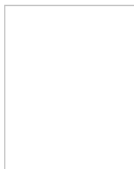
Belo Horizonte, 25/10/2016.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## 2. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

	<p style="text-align: center;"><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>Prezado(a):</p> <p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p> <p><b>Protocolo CEUA:</b> 25/2018 <b>Título do projeto:</b> Células Intersticiais de Cajal (ICC) como protagonista no desenvolvimento do megacólon chagásico experimental <b>Finalidade:</b> Pesquisa <b>Pesquisador responsável:</b> Rosa Maria Esteves Arantes <b>Unidade:</b> Instituto de Ciências Biológicas <b>Departamento:</b> Departamento de Patologia</p> <p><b>Situação atual:</b> <a href="#">Decisão Final - Aprovado</a></p> <p>Aprovado com recomendação na reunião do dia 07/05/2018. Validade: 07/05/2018 à 06/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.</p> <p>Belo Horizonte, 07/05/2018.</p> <p>Atenciosamente,</p> <p>Sistema Solicite CEUA UFMG <a href="https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/">https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</a></p> <p style="text-align: center;">Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>	

### 3. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UFOP)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
E-mail: [ceua@propp.ufop.br](mailto:ceua@propp.ufop.br)



**OFÍCIO CEUA Nº. 031/2017, de 03 de Março de 2017**

**Ilustríssimo(a) Senhor(a)**

**Professor(a) Doutor(a) Maria Terezinha Bahia**

**DECBI/ICEB**

Senhor(a) Pesquisador(a),

A solicitação de mudança no local de manutenção dos animais aprovados em projeto 262/2016 pela CEUA da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG foi aprovada pela CEUA da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP. Porém, a CEUA/UFOP recomenda que seja providenciada a guia de transporte animal (GTA), entretanto reforça que não será obrigatório a apresentação dessa Guia a CEUA/UFOP.

Atenciosamente,

**Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira**

**Coordenadora da CEUA/UFOP.**

## 4. MANUSCRITO 1 - SUBMETIDO A JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE

20/03/2020

Gmail - Fwd: JEM 20200527 Manuscript Passed Initial QC



Mayra Ricci &lt;riccimayra@gmail.com&gt;

---

### Fwd: JEM 20200527 Manuscript Passed Initial QC

---

Rosa Maria Esteves Arantes <rosa.esteves.arantes@gmail.com>  
Para: Mayra Ricci <riccimayra@gmail.com>

20 de março de 2020 09:47

Foi para o editor!

----- Forwarded message -----

De: <jem@msubmit.net>  
Date: sex, 20 de mar de 2020 09:41  
Subject: JEM 20200527 Manuscript Passed Initial QC  
To: <rosa@jcb.ufmg.br>  
Cc: <rosa.esteves.arantes@gmail.com>

Dear Prof. ARANTES,

On March 20, 2020, the manuscript entitled "Early neuronal depopulation and continuous axonal network damage as underlying mechanisms of the experimental chagasic megacolon" by Rosa ARANTES, Mayra Ricci, Samantha Béla, Michele Moraes, Maria Terezinha Bahia, Ana Mazzeti, Anny Silva Oliveira, Luciana Andrade, Rafael Radi, and Lucia Piacenza was approved for consideration at JEM. The editors will assess the manuscript and reach a decision as soon as possible.

The manuscript has been assigned the number: 20200527.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://jem.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A5Hh4VtW4A5CjuT3F6A9ftduZbRdhO0TqVFL0ISGEmAZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Currently, our records indicate that the ORCID for your account is 0000-0003-1428-9717.

If you need to modify it, please click on the link below.

ATTENTION: Only use this link if you are the original recipient of this email. You should not forward this email to prevent others from modifying, deleting, or overwriting your ORCID iD in our system.

<https://jem.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A5Hh1VtW1A2CjuT2Bh2B9ftdkPdBEWpv5pRrxfRr6OQZ>

Thank you for your interest in JEM.

Sincerely,

Sylvia Cuadrado  
Managing Editor  
Journal of Experimental Medicine  
tel: 212-327-8575  
[scuadrado@rockefeller.edu](mailto:scuadrado@rockefeller.edu)



**Journal of Experimental Medicine -**

**Title:** Early neuronal depopulation and continuous axonal network damage as underlying mechanisms of the experimental chagasic megacolon

Mayra Fernanda Ricci<sup>1</sup>, Samantha Ribeiro Béla<sup>1,2</sup>, Camila França Campos<sup>1</sup>, Michele Macedo Moraes<sup>1</sup>, Maria Terezinha Bahia<sup>2</sup>, Ana Lia Mazzeti<sup>2</sup>, Anny Caroline Silva Oliveira<sup>3</sup>, Luciana Oliveira Andrade<sup>3</sup>, Rafael Radí<sup>4</sup>, Lucía Piacenza<sup>4</sup>, Rosa Maria Esteves Arantes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Biological and Exact Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>3</sup> Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>4</sup> Center for Free Radical and Biomedical Research, Department of Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de La Republica Montevideo, Uruguay.

**Corresponding author**

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1428-9717>

Rosa Maria Esteves Arantes

+55 31 34092896/2878

[rosa.esteves.arantes@gmail.com](mailto:rosa.esteves.arantes@gmail.com); [rosa@icb.ufmg.br](mailto:rosa@icb.ufmg.br)

Full address:

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Patologia Geral

Universidade Federal de Minas Gerais,

Mail Box: 486

31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

**Runnig title:** The natural history of chagasic megacolon

**Summary:** This experimental study reproduces the natural history of chronic intestinal Chagas disease and unfolds its underlying pathogenic events in a timeline from acute to chronic phases. It sheds light on integrated mechanisms of enteric nervous system damage and neuromuscular plasticity in the megacolon.

**Abstract:**

There is a growing consensus that the balance between the persistence of infection and host immune response is crucial for chronification of Chagas heart disease. Extrapolation for chagasic megacolon is hampered because research in humans and animal models reproducing the intestinal pathology are lacking. Our model describes the temporal changes in the mice intestine wall throughout the development of megacolon, as well as presents a parallel with the consequences of *Trypanosoma cruzi* infection of primary myenteric neurons in culture. Oxidative neuronal damage, involving reactive nitrogen species induced by parasite infection and cytokine production, results in denervation of the myenteric ganglia in the acute phase. The long-term inflammation induced by the parasite's DNA causes intramuscular axonal damage, smooth muscle hypertrophy, and inconsistent innervation thus affecting contractility. Acute phase neuronal loss may be irreversible. However, the dynamics of the damages revealed herein indicate that neuroprotection interventions in acute and chronic phases may help eradicate the parasite and control the inflammatory-induced increase of the intestinal wall thickness. Our model is a powerful approach to integrate the acute and chronic events triggered by *T. cruzi* leading to megacolon.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Pathology, Pathogenesis, Mechanism of disease, Megacolon, Experimental model, Nitric oxide (NO), Reactive Nitrogen Species (RNS), Reactive oxygen species (ROS), Nitrergic neurons, Enteric nervous system (ENS)

## Introduction

Chagas' disease (CD) is a zoonotic long-term human infectious disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is naturally transmitted to animals and people by triatomine insects found only in the Americas. This neglected disease is also transmitted through blood transfusion, organ transplantation, consumption of parasite-contaminated food, and vertically from mother to child. It affects 8 million people worldwide, mostly in Latin America, presents high morbidity, and is associated with potentially life-threatening pathology of the heart and gastrointestinal tract (WHO, 2018).

The disease is divided into two phases. The acute phase, defined by high parasitemia, usually lasts up to three months and involves mild non-specific symptoms, after which patients enter the chronic phase. In this phase, infected individuals are initially asymptomatic and remain in this undetermined chronic form of the disease for decades. However, after this period, patients may develop clinical symptoms of the infection, characterized by the cardiac (30-50%), digestive (4.5-15%) or cardio-digestive (2-10%) forms of CD (Rassi et al., 2012; Pérez-Molina and Molina, 2018).

The digestive form of the disease presents as mega syndromes that affect the esophagus (megaesophagus) and the colon (megacolon). In humans, these alterations include hypertrophy of the circular muscular layer, focal inflammatory reactions in the vicinity of the myenteric plexus and the muscular layer, and fibrosis of the myenteric plexus (Koberle and de Alcantara, 1960; Koberle, 1968). The intestinal symptoms include dysphagia, regurgitation, severe constipation and alterations in barium enema (De Oliveira et al., 1998). Although the chronic digestive disease has been extensively documented in the literature, the mechanisms by which some patients develop these anatomic-pathological alterations remain unclear (De Oliveira et al., 1998; Teixeira et al., 2011) and much less investigated than chronic Chagas' heart disease (Brenner et al., 2000; Tarleton, 2001; Bonney and Engman, 2008; Burgos et al., 2010; Teixeira et al., 2011; Machado et al., 2012; Dutra et al., 2014). Moreover, the disease develops almost

silently in the indeterminate phase and it is practically impossible to follow its progression by imaging, barium enemas or manometry (Salvador et al., 2015).

In the acute phase of the disease, organ damage occurs as a direct consequence of the parasite's host cell invasion followed by an acute inflammatory response generated by the activation of the innate immune response, as well as by Th1 pro-inflammatory cytokines, such as IL-12, tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\gamma$  (Laranja et al., 1956; Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). These cytokines activate the production of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) by macrophages, which may contribute to the neurotoxic effects observed (Gazzinelli et al., 1992; Aliberti et al., 1999; Garcia et al., 1999; Pinto et al., 2002; Arantes et al., 2004).

The picture for the chronic digestive disease is less clear. Parasite-neuronal host cell interaction has been suggested to be involved in the death of enteric neurons (ganglionic denervation) (Arantes et al., 2004; Almeida-Leite et al., 2007) both *in vivo* and *in vitro* as a contributive factor to the chronic digestive disease. Neuronal cell death has been reported in human megavisceras syndromes previously (Koberle and de Alcantara, 1960; González Cappa et al., 1987; DeFaria et al., 1988; Adad et al., 2001; da Silveira et al., 2005; Nascimento et al., 2010; Adad et al., 2013), but studies of the mechanisms of neuronal death *in vivo* and *in vitro* are scarce (Tanowitz et al., 1992; Almeida-Leite et al., 2007). Production of reactive oxygen species (ROS) and other oxidative stress-related pathways have been described in cardiomyocytes (Dias et al., 2017; Estrada et al., 2018), and may have a role in cardiac CD (Gupta et al., 2009; Lopez et al., 2018). If these mechanisms operate in enteric neurons and how the neuronal anti-oxidant mechanism contributes to the susceptibility or even selective vulnerability of enteric neurons to oxidative stress-induced damage (Bubenheimer et al., 2016) remain unknown.

Importantly, discrimination between the experimental acute and chronic phases of the disease have not been appropriately made in the literature (Guillén-Pernía et al., 2001; Cruz et al., 2016), since most studies do not focus on disease progression and avoid specific age correlation between mice and humans (Dutta and Sengupta, 2016). This is

even more important when considering human CD's chronic manifestations as they depend on the long-term infection (decades), usually occurring at patients' midlife or later, which would correspond to around 15 months of age for mice (Flurkey et al., 2007). Several experimental reports investigated up to three months post-infection and, therefore, their conclusions should be only possibly applicable to the acute or subacute phase of the human disease (Guillén-Pernía et al., 2001; Moreira et al., 2011; Gupta and Garg, 2013; Massocatto et al., 2017).

Among the proposed mechanisms, parasite persistence (Teixeira et al., 2011) has been considered to have a direct role in the maintenance of chronic inflammation and the consequent tissue damage (Roman-Campos et al., 2016; Cruz et al., 2016). However, the scarcity or absence of organ parasitism in the chronic phase weakens this explanation (Acevedo et al., 2018). Nonetheless, there is a growing consensus that the balance between the persistence of infection and host immune response is crucial for the establishment and progression of Chagas cardiomyopathy (Dutra et al., 2014; Machado et al., 2012) and experimental megacolon (Campos et al., 2016). Despite the importance of the enteric neurons in the denervation implied in the intestinal disease, only few works dealt with the neuronal component of this form of CD (Machado et al., 1984; Mirkin et al., 1994, 1997; Labovsky et al., 2007; Akpan et al., 2008; Weinkauff et al., 2011).

In investigating the pathogenesis of the intestinal disease, factors such as the extremely long evolution in human patients, the gut length, the anatomic and functional complexity of the intestinal wall, and the scarce opportunities for accessing representative megavisceras samples have hampered research. In this sense, our group pioneered the establishment of a long-term animal model for reproducing the enlarged colon and its wall modifications (Campos et al., 2016), thus reproducing aspects of the human megacolon.

The intramural intestinal nervous system modifications and the consequences to the dynamics of neuromuscular plasticity, triggered by the inflammatory response elicited by *T. cruzi* infection, still need to be systematically studied in this experimental model.

To elucidate the mechanisms underlying the intestinal structural progressive changes that lead to the megaviscera, we evaluated herein diverse intestinal histological and molecular aspects during the evolution of the infection in mice at several time intervals between the acute (11 days post-infection - d.p.i.) and chronic phases (3, 7, 12 and 15 months post-infection - m.p.i.). We also performed *T. cruzi* infection in primary cultures of enteric neurons and smooth muscle cells in order to evaluate its effects and possible contribution to the acute phase of CD. The translational approach and the description of the time line of the anatomic pathological substrate brings light to the pathogenesis of this neglected disease and will support future development of tissue-damaging markers, effective eradicating drugs, as well as preventive and early interventions in infected and vulnerable individuals.

## RESULTS

### **Parasite-induced acute inflammation, persistence of *T. cruzi* DNA, and chronic inflammation of the intestinal wall are correlated to megacolon development**

Experimental infection with the *T. cruzi* Y strain led to a high acute mortality rate (100%) of infected animals initiating immediately after the parasitemia peak 8-9 d.p.i. until 18 d.p.i. (Fig. 1A and C). The infected animals did not show signal of sickness, pain distress, suffering or moribund conditions. Our model was designed to prevent the acute death of 30% of the infected mice by administering a single intra-peritoneal sub-therapeutic dose of Benznidazole (500mg/kg) at 11 d.p.i. (Fig. 1A), while concomitantly guaranteeing that the circulating parasites could reach the intestinal wall (Fig. 1B and D) and trigger local pathology. The surviving animals that followed through the chronic phase were monitored up to 15 m.p.i. and euthanized at 3, 7, 12 and 15 m.p.i. to study the sequential installation of the structural changes associated with the development of megacolon. Most Benznidazole-treated animals died between the first and the third month of infection (approximately 50%) and the rest of them died in the course of the experiment until 450 d.p.i. (Fig. 1A). Once the acute phase was over (absence of circulating blood parasites), all surviving animals remained asymptomatic.

All animals euthanized by 11 d.p.i. (acute phase) presented high parasitemia at 9 d.p.i. ( $1.2 \times 10^6$  trypomastigotes; Fig. 1C) and unequivocal tissue parasitism in the colonic segment (Fig. 1E and F), associated with intense and focal inflammatory infiltrate dispersed along the extension of the colon (Fig. 1B and D, arrowheads). We quantified the inflammatory foci from the distal (center of the intestine roll) to the proximal border of the colon from 11 d.p.i. to 15 m.p.i. Inflammation was distributed randomly in the intestinal wall, in foci detected in the serosa, the *muscularis* propria (inner and outer layers) and the myenteric ganglia (Auerbach plexus) (Fig. 1D). We observed a significant decrease in the inflammation score in the chronic phase in comparison with the acute phase time points (Fig. 1B), as well as changes in the phenotype of inflammatory cells. In the chronic phase, the infiltrate of mononuclear cells (CD4+) predominated whereas, in the acute phase, there were mostly mononuclear cells (CD8+) (Fig. S1A and B). There was an increase in CD4+ cells in both phases compared to their respective controls (Fig. S1C). In contrast, compared to their respective controls, CD8+ cells significantly decreased in infected animals at the acute phase and increased at the chronic phase ( $p < 0.09$ ). However, the number of inflammatory foci was maintained from 3 to 15 m.p.i., indicating the persistence of a chronic inflammatory process (Fig. 1B and C, inset).

At earlier time points (11 d.p.i. and 3 m.p.i.), there were degenerative changes of neuronal and glial cells inside the intramural ganglia, with integral or disrupted nests of parasites frequently observed inside the smooth muscle and glia cells, but not inside neurons. The inflammation and parasitism interrupted the normal circular and longitudinal layering of smooth muscle cells by depositing transudates and necrosis foci (Fig. 1D and Fig. S1-E, inset).

Treatment with Benznidazole induced a marked decrease of parasitemia, which was no longer detected in the surviving animals after 18 d.p.i. (Fig. 1C). The parasite was easily observed in the H&E stained sections and by immunohistochemistry of the intestinal wall collected at the acute phase (Fig. 1F), but not in samples obtained at the chronic phase (Fig. 1D, inset, and Fig. 1G). We also detected the parasite's DNA in samples

collected along the intestine wall. Although there was an abrupt decrease in parasite DNA at the chronic phase in relation to the acute phase, as quantified by PCR, small amounts were persistently detected until the last experimental time point evaluated (15m.p.i) (Fig. 1E). These animals underwent infection chronicity according to the parasite blood circulation criteria and presented substantial persistence of intestinal chronic inflammation (Fig. 1B, arrowheads), which we correlated with the progressive colonic structural changes observed in our model of megacolon development.

### **Early acute ganglionic neuronal death is accompanied by a progressive decrease of axonal profiles' density, increased intestinal wall thickness, and smooth muscle cell hypertrophy**

Pathological damage to the enteric nervous system (ENS) was studied throughout the development of the experimental megacolon by conventional H&E staining (Fig. S1). Immunohistochemistry of neuronal bodies of the myenteric ganglia and intramuscular nerve fibers (PGP 9.5-positive), in the muscle inner layer (Fig. 2A-J, arrows), were also evaluated.

Colonic samples at 11 d.p.i. and 3 m.p.i. showed an expressive loss of neuronal PGP 9.5 positive cells when compared to paired controls. We observed degenerative changes of ganglion cells (Fig. 2B and D, asterisk), associated with intense pan mural and frequent peri-ganglionic inflammation (polymorph and mononuclear cells) and edema (Fig. 2B and D, arrowheads). Transudate, congestion and necrotic-degenerative changes of smooth muscle were also observed at these time points (Fig. 2B and D). Chronic inflammation and smooth muscle cells vacuolar degenerative changes were noticed mostly in the internal muscle layer by 7 to 15 m.p.i. (Fig. 2F, H, and J).

We detected a decrease in neuronal PGP 9.5 positive staining in the myenteric ganglia of infected in comparison to non-infected animals ( $P < 0.001$ ), indicating neuronal damage as early as 11 d.p.i. (Fig. 2K). This decrease was maintained from 3 to 15 m.p.i. (two-way ANOVA,  $P = 0.003$ ) and the staining of the 7, 12, and 15 m.p.i. samples did



not differ from those evaluated at earlier time points (11 d.p.i and 3 m.p.i), suggesting that neuronal ganglionic damage occurs at the beginning of the infection and does not increase with time.

We also examined (Fig. 2A-H) and quantified (Fig. 2L) PGP 9.5 positive transverse profiles, representing the axonal intramuscular innervation. There was a marked decrease in the intramuscular PGP 9.5 immunolabeled area along time in both control and infected groups ( $P < 0.001$ ) and between control and infected group ( $P < 0.002$ ). This difference is explained by a trend at 7 m.p.i. ( $P = 0.052$ ), and significance at 12 m.p.i. ( $P = 0.0013$ ) and 15 m.p.i. ( $P = 0.049$ ).

To further explain the evolution and the mechanism of the post-infection modification of the colon, we also quantified the area of individual smooth muscle cells in the inner muscle layer of the intestinal wall (Fig. 2A-J and 2M). The average area of smooth muscle cells was significantly increased at 7, 12, and 15 m.p.i. in comparison to their paired non-infected controls. The chronic phase differed significantly from the acute phase ( $P \leq 0.05$ ) and the 3 m.p.i. group ( $P \leq 0.05$ ). From 7 m.p.i there was a progressive increase of the average area of smooth muscle cells only in the infected animals (Fig. 2M), indicating a progressive or cumulative change of the smooth muscle cells.

The thickness of the colonic muscularis *propria* increased significantly in comparison to the acute phase at 15 m.p.i. (Campos et al., 2016). By evaluating intermediate time intervals, we found that the thickness of the smooth muscle internal layer increased significantly by 12 and 15 m.p.i. in infected animals compared to their controls. We also observed a significant and progressive increase of thickness from 3 m.p.i to 15 m.p.i. in infected animals (Fig. 2 N;  $P \leq 0.05$ ).

### **Deranged smooth muscle $\alpha$ -actin is noticed throughout megacolon development**

Evaluating the damage of the muscle fibers, we found that acute and chronic inflammation correlated to the irregular, weak or absent staining of  $\alpha$ -actin filaments in some inner layer cells of smooth muscle (Fig. 3A-E, black arrows). These abnormalities

occurred more frequently at later time points and may reflect cumulative effects on the function of these cells. Next, we studied the effect of *T. cruzi* infection in smooth muscle cells present in primary enteric neuronal cultures up to 72 hours post-infection (h.p.i.; Fig. 3F-K). The normal  $\alpha$ -actin expression pattern shown in Fig. 3F changed to an irregular and weak staining at 72 h.p.i (Fig. 3I). We also noticed the presence of parasite nests by Hoechst staining inside  $\alpha$ -actin positive cells as early as 48 h.p.i (Fig. 3K, white arrows). The intensity of  $\alpha$ -actin immunofluorescence decreased significantly in the infected cultures along time, with marked differences at 48 h.p.i. (Fig. 3L;  $P \leq 0.05$ ).

The *in vivo* and *in vitro*  $\alpha$ -actin expression changes shown herein are an additional factor of intestinal dysfunction, associated with an increase of the thickness of the muscular *propria* as well as a progressive and marked loss of nerve profiles. Indeed, we observed a significant decrease in the innervation/thickness ratio between infected and control groups ( $P < 0.001$ ) throughout the experiment (Fig. 3M). This observation indicates that the intramuscular innervation decreases in the hypertrophic muscle wall, composed of deranged smooth muscle cells with decreased  $\alpha$ -actin expression.

Another structural parameter revealing the impairment of the colon's muscular wall was the progressive deposition of interstitial connective tissue (Masson's Trichrome) in the submucosa and in the muscular layer of infected animals. While samples from control animals showed thin fibers of connective tissue around intact smooth muscle cells and myenteric ganglia, the samples of infected animals exhibited disrupted periganglionic connective tissue. A disordered and augmented deposition of collagen in the interstitium of the hyperplastic smooth muscle was also observed (Fig. S1J-O, arrows).

### ***In vitro* evidence for damages to the enteric nervous system and neuronal death**

*In vivo* experiments indicated an early and non-progressive ganglionic damage with neuronal depopulation associated with the acute phase of the disease (Fig 2). In order to unveil the mechanisms of neuronal death, we prepared a primary culture of myenteric

neurons in a mixed background of smooth muscle cells. These cultures were infected or not (control) with *T. cruzi* trypomastigotes and followed for 72 hours.

In control cultures, smooth muscle cells and accessory cells outnumbered neuronal cells, as identified by their morphological aspects under bright field (Fig. 4A), when stained with Giemsa (Fig. 4B), and upon immunolabelling with the cytoplasmic neuronal markers PGP 9.5 (Fig. 4E) and  $\beta$ -tubulin III (Fig. 4I). Neurons were arranged in small groups or observed as isolated ovoid and birefringent cell bodies with expanding neurites firmly adhered to the smooth muscle cell monolayer, forming a dense network in control cultures (Fig. 4I, large arrows).

In infected cultures, parasites were observed mostly inside smooth muscle cells, but also inside neuronal cells at 48 h.p.i. (Fig. 4H, inset, arrowheads), some of which exhibiting accentuated degenerative changes in their cellular bodies (Fig. 4G, arrows). Immunolabelling for  $\beta$ -tubulin III showed a significant decrease in fluorescence intensity of neuronal bodies, neurite network, and varicosities (beaded rosary aspect) 24 h.p.i. (Fig. 4J) in comparison with non-infected cultures (Fig. 4I, R, and S).

Several neuronal cells were immunostained with both  $\beta$ -tubulin III and nNOS antibodies (Fig. 4L-N), indicating the presence of nitrergic neurons. The parasites' nuclei, stained by Hoechst, were mainly seen inside the cell bodies of nitrergic neurons (Fig. 4Q, inset), although they could also be observed in a few neurons not stained for nNOS (Fig. 4P).

### **Production of Reactive Nitrogen Species (RNS) and Reactive Oxygen Species (ROS) by enteric neurons in response to *Trypanosoma cruzi* infection**

To investigate the production of RNS in the primary cultures of myenteric ganglionic neurons, which contained smooth muscle cells, we infected or not these cultures with trypomastigotes of the Y and Dm28c strains of *T. cruzi*. The control cultures (Fig. 5A and B) and infected cultures (Fig. 5C-F) were followed up to 48 and 72 h.p.i., when parasite invasion and multiplication inside neuronal cells could be observed. NO

production was assayed with DAF-FM, which reacts with NO species yielding a highly fluorescent product (Balcerczyk et al., 2005). Cultures exposed to *T. cruzi*, no matter the parasite strain, presented NO production in infected neuronal cells by 72 h.p.i., but not in non-infected neighboring cells. Additionally, invaded non-neuronal cells were discretely DAF-FM positive (Fig. 5D and F, arrows, sharp symbol). Non-infected cultures were weakly DAF-FM positive but, when treated with IFN $\gamma$ , neuronal DAF-FM fluorescence was markedly increased, suggesting these neurons are able to generate NO species (Fig. 5G and H). Infected neurons of cultures treated with ionomycin, a calcium ionophore, also increased the DAF-FM fluorescence (Fig. 5I and J, asterisk). The neurons of infected cultures that did not get infected with the trypomastigotes did not react (Fig. 5J, arrows). DAF-FM fluorescence intensity was also quantified in neuronal cell bodies (Fig. 5K and L).

Analysis of reactive oxygen species (ROS) levels produced upon infection of enteric neuronal cultures with the Y strain of *T. cruzi* was performed using the CM-H<sub>2</sub>-DCFDA and the resulting fluorescence measured at 48 and 72 h.p.i. No significant difference was observed in the amount of the oxidized probe in the infected cultures compared to controls (Fig. 7C).

### **Infection of primary myenteric neuronal cultures with *Trypanosoma cruzi* induces mitochondrial depolarization**

To understand how mitochondrial abnormalities in the ENS relates to enteric neurodegeneration and to test whether infection with *T. cruzi* is associated with the depolarization of mitochondrial inner membrane, we used JC-1, a cationic dye that exhibits a potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (~525 nm, monomer in the cytoplasm) to red (~590 nm, j-aggregates in mitochondria). JC-1 fluorescence was detected in primary cultures of myenteric neurons infected with trypomastigotes of the Y and DM28c *T. cruzi* strains, suggesting that infection impaired mitochondrial function as early as 48

h.p.i., when parasites were detected inside the cells. As shown in figure 6, mitochondrial depolarization is indicated by a qualitative decrease in the intensity ratio of red/green fluorescence. Non-infected cultures (Fig. 6A-D) and IFN $\gamma$ -treated cultures (Fig. 6E-H) evidenced a slight (green) color shift, indicating low levels of mitochondrial depolarization. Infection of primary neuronal cultures with both Y (Fig. 6I-L) and DM28c (Fig. 6M-P) strains induced an increase in green fluorescence (Fig. 6K and O), suggestive of significant mitochondrial membrane depolarization. This was quantified in the neuronal cell bodies, by determining the green/red ratio (Fig. 7A).

#### **Detection of 3-NO<sub>2</sub>-Tyrosine in primary myenteric neuronal cultures infected with *Trypanosoma cruzi***

Because NO production and mitochondrial depolarization were enhanced by *T. cruzi* infection, we searched for the presence of 3-NO<sub>2</sub>-tyrosine in proteins of primary myenteric neuronal cultures infected with trypomastigotes of the Y and DM28c strains at 72 h.p.i. Figure 7 shows damaged cells of infected cultures, some of which preserve the neuronal morphology (arrowheads), which were more intensely labeled with anti-3-NO-tyrosine antibody (Fig. 7G-K) than neurons of non-infected cultures (Fig. 7C-E). Additional evidence for neuronal death in infected neuronal cultures is shown in figure 7B, where fluorescence intensity was measured in cells with neuronal morphology that were recognized by phase contrast. Infection of primary myenteric neuronal cultures with Y and DM28c strains induced a significant increase in the neuronal levels of nitrotyrosine compared to controls ( $P < 0.05$ ).

#### **MnSOD2 expression is (mostly) increased in neuronal cells of cultures infected with *Trypanosoma cruzi***

Next, we evaluated MnSOD2 expression in primary myenteric neuronal cultures. In figure 8A-E, the paired phase contrast and anti-MnSOD2 fluorescence images are shown for both control and Y strain infected neuronal cultures. The expression of

MnSOD2 in neurons, indicated by arrows and identified by its morphology was more intense in Y strain infected, and Y strain infected +  $\text{INF}\gamma$ -treated cultures (Fig. 8D and E) than in non-infected cultures (Fig. 8A-C). In addition, western blot analysis of proteins extracted from these cultures also indicated the presence of higher MnSOD2 content for cultures infected with Y or DM28c strains (Fig. 8L-O).

Confocal microscopy also confirmed the nitrergic phenotype of enteric neurons by double immunofluorescence of nNOS (green, Fig. 8F and G) and MnSOD2 (Red, Fig. 8H and I), which presented higher expression in neuronal bodies of infected than non-infected cultures.

## Discussion

One of the most challenging questions of CD is how *T. cruzi* leads to the manifestation of chronic intestinal lesions decades after infection when parasites are rare (Zhang and Tarleton, 1999; Tarleton, 2001; Benvenuti et al., 2008). The chronic phase of intestinal CD is characterized by the damage of myenteric (Adad et al., 2013; Jabari et al., 2014). However, as the parasitism is very low in the digestive chagasic lesions (da Silveira et al., 2005; Wesley et al., 2019), it has been suggested that chronic neuronal destruction might be due to the immune response that follows infection as proposed for heart lesions (Teixeira et al., 2011). It is not possible to determine when and how exactly this denervation occurs during the asymptomatic 20-30 years that follow the post-acute phase in humans. Indeed, most human studies have based on small, limited samples of enlarged intestine walls of surgically removed megacolon, obtained in the late phase of CD. Thus, it remains important to know the time line of the structural injuries at the intestine, in order to plan effective interventions to prevent morbidity associated with its late manifestations. The present study was designed to reveal the temporal changes of

the intestine throughout the development of the megacolon in a pre-established murine long-term model of *T. cruzi* infection developed in our laboratory (Campos et al., 2016).

Our model allowed the integration of the early (acute) events triggered by the infection and the late ones (chronic disease, megacolon) while investigating the underlying mechanisms and how they correlate with each other in the timeline during the disease's development in mice. We sampled the entire extension of the colon, processed as a swiss roll, detecting focal destruction of ganglia and smooth muscle cells associated with intense parasitism, cell rupture and death, as well as severe acute inflammation in coalescent foci.

Based on human and murine experimental data it has been hypothesized that 50 - 80% of ganglionic denervation could be associated with the development of intestine's motility symptoms in humans (Koberle, 1968; Adad et al., 1991, 2001, 2013; Maifrino et al., 1999; Jabari et al., 2012). Here we detected approximately 40% of myenteric neuron loss very early in the course of the disease during the acute phase (11 d.p.i.). The consequences of the parasitism in ganglionic neuronal death were severe, since by 11 d.p.i and 3 m.p.i there was a significant neuronal depopulation, which did not increase afterwards (Fig. 2K), along with the presence of residual foci of inflammatory cells in the intestine's wall. This observation suggests that the most important mechanisms of neuronal damage operate early on, but does not progress. The latter has important consequences for the management of CD.

On the other hand, we found a progressive loss of nerve termination structures during the development of megacolon. This was associated with a continuous, albeit slight, inflammatory process. Indeed, the decrease in axonal profile in the internal muscle layer was present as early as 3 m.p.i. (subacute phase) and continued up to 15 m.p.i. (chronic phase). After 3 m.p.i, the intestine wall was mostly cleared of parasitism and only low levels of parasite DNA were detected. This progressive absolute and relative axonal loss (7 to 15 m.p.i.; Fig. 2M), together with the progressive hypertrophy of smooth muscle cells, observed at the chronic time points (Fig. 3M), may impact muscle wall contractility.

Previously, we showed that the thickness of the colonic muscularis *propria* increased significantly during the acute phase in comparison to 15 m.p.i. (Campos et al., 2016). Here we expanded upon these findings by studying intermediate time intervals and show that the progressive hypertrophy of smooth muscle cells and the consequent increase of intestinal wall thickness start from 7 m.p.i. and 12 m.p.i., respectively. These data indicate that one of the most characteristic structural changes of the megacolon becomes well established by 12 m.p.i., in an apparently asymptomatic animal, similar to the human CD. Moreover, considering the observed progressive deposition of interstitial connective tissue (Masson's Trichrome) in the submucosa and muscular layer of infected animals (Supplementary Fig 1G-L, arrows), one can hypothesize that megacolon and its symptoms may be related to the cumulative impact of chronic inflammation and denervation in the intestinal smooth muscle layer.

We also noticed that well preserved, integral ganglia, occur side by side with lesioned ones. Our findings challenge previous proposals that ganglionic neuronal depopulation is *per se* the cause of dysmotility and megacolon (González Cappa et al., 1987; Adad et al., 2001; Jabari et al., 2012; Adad et al., 2013). Here we show that these alterations take place early in the acute phase, while the symptoms and pathological findings manifest decades later, thus explaining some contradictory findings. Our model helps explain not well understood aspects of the human disease, descriptively addressed and previously involving limited samples (Ribeiro et al., 1998; Meneghelli, 1999, 2004; Adad et al., 2001; Da Silveira et al., 2008; Jabari et al., 2012; Jabari et al., 2013).

We observed a progressive loss of  $\alpha$ -actin in some smooth muscle cells of the inner layer, *in vivo* and a qualitative and quantitative decrease and irregularity of  $\alpha$ -actin expression *in vitro*. These changes can be interpreted as an additional factor underlying intestinal dysfunction along with the increase in the thickness of the muscular propria, the significant ganglionic neuronal loss and the progressive intramuscular denervation.

As the acute inflammation was changed to a pattern of chronic and sustained mononuclear inflammation, we quantified the phenotype of mononuclear cells in the inflammatory infiltrate of the muscular propria (Fig. S1A-C), both at acute and chronic



phases. Similar to the findings reported for the human cardiac chronic disease (Benvenuti et al., 1997), mononuclear CD4<sup>+</sup> cells increased significantly at the acute phase while CD8<sup>+</sup> cells increased at the chronic phase. A role for CD8<sup>+</sup> cells in *T. cruzi*-dependent mechanisms for neuromyopathic damage were obtained from lymphocyte proliferative assays against skeletal muscle, sciatic nerve, and spinal cord homogenates (Mirkin et al., 1994, 1997) and should be further investigated in our *in vivo* chronic model. In addition, immunoregulatory mechanisms may play a role in controlling the production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in our chronic model, since most mononuclear cells remained non-stained by anti-CD4 and anti-CD8 antibodies (Fig. S1A and B). Interestingly, the chronic inflammatory infiltrate was irregularly distributed in the intestinal wall, mostly located inside the muscular layers and only segmentally in the myenteric ganglia. This might explain the progressive intramuscular axonal loss throughout the development of the megacolon, even when the ganglionic neuronal loss does not increase along time.

Because tissue parasitism is controlled by an adaptive IFN $\gamma$ -dependent immune response, a narrower profile of chemokines is produced in the chronic inflammatory milieu of the heart (Rodrigues et al., 2009) and probably the same occurs in the intestine. We found parasite DNA throughout the acute and the chronic (up to 15m.p.i.) phase, although there was an abrupt drop in parasite's DNA at the end of the acute phase. Indeed, several studies have now firmly established the link between the presence of parasite antigens and/or DNA and the inflammatory infiltrates observed in the hearts and intestines of chronic chagasic patients (Higuchi et al., 1993; Vago et al., 1996; Soares et al., 2001; Tarleton, 2001; Benvenuti et al., 2008; Vazquez et al., 2015). However, parasitism is poorly correlated with the degree of inflammation suggesting that other mechanisms might amplify *T. cruzi*-infection-driven chemokine production, inflammation, and pathogenesis (Leon and Engman, 2001; Teixeira et al., 2002).

Many aspects of *in vivo* studies were complemented by investigating the effect of *T. cruzi* infection in primary myenteric neuronal cultures up to 72 h.p.i. (Figs. 4, 5, and 6).

Neuronal bodies and neurite network of infected primary myenteric neuronal cultures were damaged. Immunostaining with  $\beta$ -tubulin III was significantly decreased in infected neurons. The aspect of the infected culture mimicked the *in vivo* tissue changes at the acute phase that are associated with the parasite-induced degenerative changes of enteric ganglia and muscular *propria* (Arantes et al., 2004; Campos et al., 2016).

Interestingly, despite of the vast literature referring to diverse aspects of host-parasite interaction in a variety of mammalian and transformed cell types, such as macrophages, skeletal muscle cells, cardiomyocytes, endothelial cells, primary fibroblast, mesenchymal embryonic fibroblasts, VERO and LLC-MK2 (Andrews et al., 1987), there is scarce information on the invasion of neuronal cells and its consequences to the pathogenesis. Indeed, even in the systematic electron microscopy investigation performed by Tafuri (1971), amastigotes were detected quite frequently in glia cells, capsular fibroblasts, in the interstitium of the ganglion itself, and in the periganglionic connective tissue, but not in enteric neurons. Direct neuronal *T. cruzi* invasion was never deemed as the cause of ganglionic lesions, which were attributed to the inflammation-induced swelling and degenerative changes of ganglia components. Ours is the first study to investigate infection in primary cultures of myenteric neurons and to detect parasite invasion and proliferation, not only in smooth muscle cells, but also in primary myenteric neurons (Fig. 4), thus opening a new avenue for studies on parasite-neuron interaction.

The predominant neuronal phenotype found in the primary cultures of myenteric neurons studied herein were nitrergic neurons. Although some non-nitrergic neurons were infected, most nNOS<sup>+</sup> neurons presented a small number of parasites inside their neuronal bodies at 72h.p.i. (Fig. 4Q). This suggests that parasite replication does not occur in neurons as easily as in other cells, and possibly that these neurons do not die only due to direct parasitism.

Despite the extensive sampling of the colon, we were not able to unequivocally detect parasites inside neuronal bodies in our *in vivo* study. Indeed, parasites were easily seen by H&E and anti-*T. cruzi* immunostaining inside glia cells and smooth muscle cells

close to the enteric neurons. The reasons why previous *in vivo* and *in vitro* studies did not manage to detect neuronal invasion may be due to neuronal death, loss of neuronal morphology, or selective neuronal vulnerability to oxidative stress (Wang and Michaelis, 2010; Rivera et al., 2011). The vulnerability of enteric neurons in CD was never studied before, and the resistance of superior cervical ganglion neurons to *T. cruzi* invasion (Almeida-Leite et al., 2015) also needs further addressing. The *in vivo* approach adopted herein should allow a better evaluation of the role of neuronal invasion in neuronal death.

The neuronal death observed during the acute phase was, at least partially, the consequence of RNS production with protein NO<sub>2</sub>-tyrosine modifications especially in nitrergic neurons. While NO normally functions as a physiological neuronal mediator, excess production of NO can lead to neuronal injury (Wang and Michaelis, 2010). As a free radical, NO is inherently reactive and mediates cellular toxicity by damaging critical metabolic enzymes and by reacting with radical superoxide to form an even more potent oxidant, peroxynitrite. Through these mechanisms (Bredt, 1999), NO appears to play a major role in the pathophysiology of intestinal damage associated to CD.

IFN $\gamma$ -stimulation of non-infected primary cultures of myenteric neurons and *T. cruzi* infection increased DAF fluorescence in myenteric neuronal cells. Infected myenteric neurons exhibited higher oxidation of DAF than infected glia, smooth muscle, and non-infected neurons in the same cultures. This indicates, for the first time, an increase in NO production of these neurons elicited by *T. cruzi* infection (Y and DM28c strains). Moreover, in our model, DAF-FM-positive cells correlated well with neuronal morphology (Fig. 5), and may implicate nitrergic neurons as targets for direct *T. cruzi* invasion (Fig. 5E and F) and for cytokines, such as IFN $\gamma$  (Fig. 5I and J) probably produced in the proximity of ganglionic neurons and its varicosities by glia and smooth muscle cells. We also observed DAF oxidation around amastigotes inside neuronal and non-neuronal cells in the cultures. Increase of DAF oxidation has been previously evaluated *in vitro* in isolated *T. cruzi* indicating that parasites produce RNS when

treated with an anti-tumoral combination of vitamins K3 and C (Desoti et al., 2015) and anti-*T. cruzi* (1,3,4-Thiadiazole) derivatives (Desoti et al., 2015; Martins et al., 2016). Importantly, our study is the first to suggest the production of RNS by parasites inside neuronal cells, an intriguing finding that deserves further investigation.

The activation of nNOS is dependent upon the binding of  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin, and thus, NO generation is stimulated by an increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Cho et al., 1992; Hemmens and Mayer, 1998; Forstermann and Sessa, 2012). *T. cruzi* invasion of most mammalian cells mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  during the process (Burleigh and Andrews, 1998). Ionomycin, a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore, was used in infected primary cultures of myenteric neurons, where infected and non-infected neurons, in the same culture, were accessed simultaneously and therefore used as intra-experimental controls. Y-strain infected neurons treated with ionomycin increased DAF oxidation (Fig. 5A, B, and L) in comparison to non-infected neurons (Fig. 5I and J). Our results imply that the enhanced neuronal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration triggered by *T. cruzi* infection and gliareleased  $\text{IFN}\gamma$ , in the proximity of ganglionic neurons and its varicosities, may lead to increased production of RNS.

Altogether our results reinforce the hypothesis that the oxidative stress is occurring during *T. cruzi* infection with neurotoxic consequences. Selective vulnerability of neurons has been associated with conditions involving a high demand of ROS/RNS such as signaling molecules, chronic inflammation, and calcium deregulation in vulnerable neurons (Wang and Michaelis, 2010), which could explain our results. NO, produced by NOS in the cytoplasm, and ROS from intracellular or extracellular sources may react within nitrergic neurons, causing them to be exposed to greater cytotoxic cell damage compared with other neurons. We did not detect differences in ROS production between infected and non-infected cultures 48 and 72 h.p.i. using the CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  probe (Fig. 7C). The irregularity of the neuronal culture monolayer and the threshold of detectable ROS production by the fluorimeter were limitations of our assays. Probably the single-cell fluorescence imaging approach (Gonzalez and Salido, 2016) would have detected the probe inside cells.

We also found evidence of production of protein nitrotyrosine modification in infected cultures (Y and DM28c strains) with implications in acute neuronal death in CD. The fluorescence intensity of 3-NO<sub>2</sub>-tyrosine in the infected cultures was significantly increased in infected neurons compared to non-infected neurons present in the same cultures (intra-experimental controls). 3-NO<sub>2</sub>-tyrosine constitutes a footprint left by the reactions of NO-derived oxidants in protein tyrosine residues to form 3-nitrotyrosine. Moreover, protein tyrosine nitration can cause structural and functional changes, which may be of pathophysiological relevance for human disease conditions. Indeed, the formation of 3-NO<sub>2</sub>-tyrosine *in vivo* occurs in diverse pathologic conditions and this protein is thought to be a specific marker of oxidative damage mediated by peroxynitrite (Ahsan, 2013). Much of <sup>\*</sup>NO-mediated pathogenicity depends on the formation of secondary intermediates such as peroxynitrite (ONOOH/ONOO<sup>-</sup>; pK<sub>a</sub> = 6.8) that is typically more reactive and toxic than <sup>\*</sup>NO (Radi, 2013; Batthyány et al., 2017).

NOS neurons face the additional problem that NOS is activated by Ca<sup>2+</sup>. This is hypothesized to produce an excess of NO, whose free radical properties can cause cell damage, which is exacerbated by peroxynitrite formed when NO reacts with superoxide radicals (Voukali et al., 2011). In the intestine, nNOS selectively concentrated in axon varicosities of myenteric neurons (Bredt et al., 1990; Bredt, 1999) may be related to the progressive decrease of axonal density observed in our model.

The role of mitochondrial deficits in ENS neurodegeneration was investigated in infected primary cultures of myenteric neurons by JC-1. JC-1 is more specific for mitochondrial versus plasma membrane potential in its response to depolarization than other cationic dyes (Ankarcrona et al., 1995; White and Reynolds, 1996; Kulkarni et al., 1998). The ratio of green to red fluorescence is dependent only on the membrane potential and not on other factors that may influence single-component fluorescence signals. The use of fluorescence ratio detection, therefore, allows researchers to make comparative measurements of membrane potential.

*T. cruzi* infection was associated with depolarization of the mitochondrial inner membrane, which indicates mitochondrial function impairment, as early as 48 h.p.i.,

when parasites were detected inside the cells, for both *T. cruzi* strains tested (Y and DM28c). Interestingly, mitochondrial defects in Tfam-ENSKO mice differentially affected specific subpopulations of enteric neurons such as nitrergic inhibitory neurons resulting in an imbalance of inhibitory and excitatory neurons, which likely accounted for the observed phenotype in Tfam-ENSKO mice (Viader et al., 2011), and probably explains the neurodegenerative changes (mitochondrial deficits) in infected nNOS neurons in our assays.

To confirm that oxidative stress operates in the *T. cruzi*-induced neuronal damage *in vitro*, we investigated the expression of MnSOD2 in nitrergic neurons. Greater expression of MnSOD2 is a defense response to ROS induced in *T. cruzi* invaded cardiomyocytes (Estrada et al., 2018) and protects cells from deleterious effects associated with the overproduction of NO and peroxynitrite (Candas and Li, 2014). We detected increased MnSOD2 expression in neurons of infected cultures of both *T. cruzi* strains (Y and DM28c) by fluorescence quantification and Western blot. Confocal microscopy evidenced higher expression of MnSOD in nNOS<sup>+</sup> neuronal bodies. In this scenario, where host-derived oxidant mediators are actively generated, the antioxidant arsenal of *T. cruzi* may become decisive for parasite survival and persistence (Ferreira et al., 1997; Piacenza et al., 2009a; b; Radi, 2018). The hypothesis that enzymes of the parasite antioxidant arsenal may represent novel virulence factors involved in the establishment of the disease needs to be further exploited in neuronal systems.

Despite many decades of research on CD, the disease remains incurable, and the factors that steer chronic CD from an asymptomatic state to clinical onset remain unclear. Success in translating the vast information available about CD into concrete applications are scarce, particularly in the case of intestinal chronic CD pathology. Altogether, our findings should be considered to prevent oxidative stress and to treat this highly morbid condition in newly infected individuals (acute and subacute phases).

Existing hypotheses regarding the mechanisms of intestinal CD are conciliated by our model of long-term intestinal remodeling (axonal, smooth muscle degenerative changes

and synapse damages) as the basis for the contractility disorder associated with the morbidity of the megacolon. We hope this integrative comprehension of acute and chronic phases of the *T. cruzi* infection can help drive research to make a real difference for the millions of people affected by this neglected disease.

## **MATERIAL AND METHODS**

*in vivo* and *in vitro* animal experiments complied with the principles established by the National Institute of Health (NIH) guidelines and Brazilian Practice Directive for the Care and Use of Animals for Scientific and Didactic Purposes - DBPA (Notice MCTI No. 1 - CONCEA / MCTI) and were approved by the Ethics Committee for Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) under protocol number 262/2016 and 25/2018.

### **Experimental chagasic megacolon induced in mice by chronic *Trypanosoma cruzi* infection**

#### **Mice**

We used 4-week old Swiss female mice, supplied by the Bioterium of the Institute of Biological Sciences of UFMG, and kept in the Bioterium of the Federal University of Ouro Preto (UFOP) in plastic cages, in a room with controlled dry temperature (24 °C) under a light / dark cycle of 14 / 10 hours, with free access to conventional mouse food (Nuvilab® Nuvital, Brazil) and water.

#### **Experimental design**

Our model was designed to prevent the acute death of 30% of the infected mice by administering a single intra-peritoneal sub-therapeutic dose of Benznidazole (500mg/kg) at 11d.p.i., while concomitantly guaranteeing that the circulating parasites could reach the intestinal wall and trigger the local pathology. Most Benznidazole-

treated animals died between the first and the third month of infection (approximately 50%) and the rest of them died in the course of the experiment until 450d.p.i. Once the acute phase was over (absence of circulating blood parasites), all surviving animals remained asymptomatic.

The infected animals were randomly divided into two subgroups: (1) infected mice euthanized on the 11<sup>th</sup> day post-infection (d.p.i.), called infected acute phase (IAP) group. Euthanasia occurred two days after the parasitemia peak, according to the model previously described by our laboratory (Campos et al., 2016); (2) mice infected on the same day as the previous group were treated orally with a single dose of 500 mg/kg body weight of Benznidazole (Lafepe, Brazil). These mice were maintained up to 15 months post-infection (m.p.i.), thus composing the infected chronic phase (ICP) group. Animals were euthanized at 3, 7, 12, and 15 m.p.i. (ICP3, ICP7, ICP12, and ICP15 groups, respectively) so that the analysis of several parameters of megacolon development could be performed. The uninfected age-matched control groups were maintained in the same conditions and euthanized as control of acute phase (CAP) or acute phase (AP) and control of chronic phase (CCP) or chronic phase (CP) at appropriate months indicated as CCP3, CCP7, CCP12, CCP15 and ICP3, ICP7, ICP12, ICP15. In a parallel experiment, 10 infected and Benznidazole-untreated animals were checked daily for parasites in their blood until the parasitemia ceased completely (see Fig. 1A), thus allowing us to determine the exact time of treatment (11d.p.i.). All animals infected and Benznidazole-treated were checked for blood parasites at 3, 7, 12, and 15 m.p.i. The animals did not show signal of sickness, pain distress, suffering or moribund conditions.

## **Experimental Procedures**

Inoculum preparation for animal infection was performed according to Brener (1962). Infection of the animals was done intraperitoneally with 50,000 blood trypomastigotes of *T. cruzi* strain Y at the Laboratory of Parasitic Diseases, School of Medicine, UFOP.



Infection of all inoculated animals was confirmed by the presence of parasites in fresh blood 24 hours after inoculation.

Two independent experiments were performed. A total of 201 female Swiss mice were used in the *in vivo* study, 151 were inoculated intraperitoneally with 50,000 blood trypomastigotes of the *T. cruzi* Y strain. Fifty animals composed the uninfected control group, 10 composed the AP group and 40 constituted the CCP groups at the times described in the previous paragraph. Additionally, 10 animals were destined to the construction of the parasitemia curve (Fig. 1A); 10 were euthanized at 11d.p.i (IAP group); and 151 were treated with Benznidazole (at the 11<sup>th</sup> day) and euthanized during the chronic phase at 3, 7, 12, and 15 m.p.i.

### **Parasitemia and mortality curve**

Parasitemia was determined by the method described previously (Ducci and Pizzi, 1949) and modified by Brener (1962). Five microliters of blood were collected from the tip of the tail and parasite count was performed under the optical microscope (400X), in 50 random fields using a 22 × 22mm coverslip. Mortality rate was evaluated daily in order to build a survival curve.

### **Histopathological analysis**

The colon of the mice was collected, separated from the mesentery, and washed in PBS (0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2) to remove fecal content. For histology, the entire colonic segment was extended with the serosa in contact with the filter paper to avoid mucosal damage. The segments were transferred to Bouin's solution plus 2% glacial acetic acid for 5 minutes. The pre-fixed colon was rolled up like a swiss roll with the mucosal side facing inwards to form rolls from the distal portion (anus) to the proximal end (cecum), as described before (Arantes and Nogueira, 1997). The rolls were kept in 10% formaldehyde for one week and then sectioned in half to trim the edges so that, after routine paraffin embedding, the microtomy resulted in samples of the entire length of the colon for subsequent H&E staining, Masson, and

immunohistochemistry. Fragments of 0.5 to 1 cm were taken from the proximal and distal colon to be frozen and processed for the extraction of parasite DNA.

### **Inflammatory infiltrate quantification**

Using a bright field microscope, under the 20X objective, 30 fields from each colon (H&E stained) were subjected to the counting of the absolute number of inflammatory foci, which were characterized by the presence of at least 10 inflammatory cells in the intestinal muscle layer. A sample of three representative animals from all infected groups was evaluated at all time intervals (11d.pi. and 3, 7, 12 and 15 m.p.i).

### **Immunohistochemistry**

Consecutive histological sections measuring 4µm in thickness were obtained from the colon rolls of infected and uninfected animals. The sections were deparaffinized and rehydrated for the subsequent blockade of endogenous peroxidase with 30% methanol and hydrogen peroxide solution at a concentration of 5%. To block nonspecific reactions we used 2% Bovine Albumin (BSA, Inlab, Brazil) with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) in PBS, followed by three PBS washes. To block nonspecific binding of secondary antibodies, the sections were incubated with 1:20 goat normal serum (SNC, Cripton Biotechnology, Brazil) in PBS and subsequently incubated, in a humid chamber at 4 °C overnight, with the following primary antibodies: anti-PGP9.5 (rabbit, 1: 500) (Cedarlane, USA); anti- $\alpha$ -actin (rabbit, 1: 500) (Epitomics, USA); or anti-*T. cruzi* (rabbit, 1: 5000) (Provided by Prof. Maria Terezinha Bahia, UFOP). After PBS washes, the secondary antibody complex (goat anti-rabbit and goat anti-mouse) was added and then incubated with the prediluted streptavidin peroxidase complex (KIT DAKO, LSAB, K0675, USA) for 30 minutes each in a humid chamber at 37 °C. The reaction was developed by 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, D5637, Sigma-Aldrich, USA) and the sections were counterstained in diluted Harris Hematoxylin solution. Next, the slides were dehydrated at increasing alcohol concentrations, diaphanized in xylol, and permanently mounted with Entellan (Merck, USA).

### **Obtaining images**

For photographic documentation and to obtain the images needed for morphometric analysis, the slides were photographed using the Olympus BX51 direct light optical microscope equipped with Image-Pro Express 4.0 software (Media Cybernetics, USA) with a resolution of 1392 x 1040 pixels. Images were transferred via a Cool SNAP-Proof Color camcorder to a computer-attached video system using Image-Pro Express version 4.0 for Windows (Media Cybernetics, USA).

### **Morphometric analysis**

Images (20X objective) were acquired from PGP 9.5 immunolabelled samples to analyze the innervation profiles of the myenteric plexus ganglionic neurons and the intramuscular (internal muscle). In each field, the ganglia were manually delimited to obtain the total ganglion area and the area immunolabelled with PGP 9.5 within the ganglion was automatically measured ( $\mu\text{m}^2$ ). Myenteric neuronal damage was determined as PGP9.5 immunolabelled 1 area/myenteric ganglia area. Data were expressed as mean and standard deviation.

The area of the nerve profiles immunolabelled with PGP 9.5 was automatically measured ( $\mu\text{m}^2$ ) and the total area of the internal muscle layer was delimited and measured manually in each field ( $\mu\text{m}^2$ ). Intramuscular innervation density was determined as PGP 9.5 immunolabelled intramuscular innervation/muscular inner layer area. Data was expressed as mean and standard deviation.

Images (40X objective) were acquired exclusively from the inner circular muscle layer in PGP 9.5 immunostained samples. The area ( $\mu\text{m}^2$ ) of the inner smooth muscle was delimited and measured as already described. The total number of cell nuclei was counted in the same fields using the Image J 1.52 program (NIH, USA) as parameter of the number of smooth muscle cells. The ratio muscle inner layer area/nuclei number indirectly indicates the average area of the intestinal smooth muscle cell and its variation throughout the study was determined. Images (10X objective) were obtained by sampling the full length of the colon from the control and infected mice at all time

intervals studied (11 d.pi., 3, 7, 12 and 15 m.p.i). For each image, three measurements ( $\mu\text{m}$ ) of the inner muscle layer thickness were obtained using the Image J 1.52 software (NIH, USA). The inner muscle layer was defined by the boundaries of the submucosal layer and the outer muscle layer (Fig. 1D). We expressed the data as mean and standard deviation of the thickness of the inner muscular layer as the index of colon wall thickness. The ratio PGP 9.5 positive intramuscular innervation area/ thickness of the inner muscular layer was determined.

Morphometrical analyses were performed by KS300 (Department of Pathology ICB / UFMG). All the analyses were conducted in blinded experiments.

#### **Quantitation of *Trypanosoma cruzi* in colon samples (Real-time PCR for parasite DNA)**

Tissue parasitism was evaluated in frozen samples submitted to the detection of parasite DNA by real-time polymerase chain reaction (PCR). Colon samples were thawed, minced and digested with proteinase K (20 mg / mL, Invitrogen <sup>TM</sup>, USA) for DNA extraction by RNase solution (Sigma-Aldrich, USA) following the manufacturers' instructions. The sample was subjected to quantification of a standardized total of 25  $\mu\text{g}$  of total DNA (parasite and tissue). PCR amplification was performed in duplicated aliquots in a total volume of 2  $\mu\text{L}$  containing: genomic DNA (50ng); 0.35  $\mu\text{M}$  specific primer oligonucleotides for repeating 195 base pairs (bp) of *T. cruzi* DNA, TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', where M = A or C (Invitrogen <sup>TM</sup>, USA) and TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' (Moser et al., 1989) modified (Cummings and Tarleton, 2003) that amplifies a 182 bp product. Five  $\mu\text{L}$  of Sybr®Green PCR Mastermix, and Mili-Q water were added for the final reaction volume of 10  $\mu\text{L}$ .

Reactions were distributed in 96-well plates (Fast 96-Well Reaction Plate, 01 mL, MicroAmp, TermoFischer USA), centrifuged for 2 minutes at 200 x g and taken to the StepOnePlus thermal cycler (Applied Biosystems, TermoFisher, USA). The

thermocycling program consisted of heating at 95 °C for 10 minutes, 40 cycles of 94 °C for 15 seconds, and 64.3 °C for 1 minute with fluorescence acquisition at 64.3 °C. Amplification was immediately followed by a melting program with initial denaturation of 95 °C for 15 seconds, cooling at 60 °C for 1 minute and gradual temperature increase from 0.3 °C /second to 95 °C. Each plate contained a duplicate negative extraction control (normal mouse) and a duplicate negative PCR control with water in place of DNA. The average of the obtained values was normalized. Amplification efficiencies were determined by the formula  $\text{Efficiency (E)} = 10^{(-1 / \text{slope})}$ , where slope corresponds to the slope of the standard curve (Stordeur et al., 2002) subjected to quantification of a standardized total of 25 µg of total DNA (parasite and tissue).

### **Primary cultures of mouse myenteric neurons**

Thirty-six mice C57BL/6 from 6 to 8 weeks were used, which were euthanized to remove the full length of the large intestine. The segment was processed, as explained below, and the cells isolated from the colon muscle wall were used for *in vitro* assays. Briefly, after removal, the large intestine segment was placed in Krebs solution (126mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 11mM Glucose) as described before (Wahba et al., 2016). The intestinal fragment was sectioned along the mesenteric border to obtain a flat segment of tissue, whose edges were carefully distended and fixed with entomological pins, to facilitate delamination of the layers (mucosa, submucosa, and serosa), and thus expose the muscular layer where the Auerbach's myenteric plexuses are laid (Smith et al., 2013). The tissue was incubated for 15 minutes at 37 °C in a 1mg/ml solution of collagenase type II-S (Merck, USA) under shaking and manually homogenized by inversion every 5 minutes. The fragments were centrifuged at 200 x g for 5 minutes at 4 °C and washed with Hanks/HEPES buffer solution for 5 minutes under stirring, followed by centrifugation at 200 x g for 5 minutes at 4 °C. Trypsin solution (0.25%; Merck, USA) was added at 37 °C for 10 minutes, followed by stirring for 15 minutes and manual homogenization by inversion every 5 minutes.

Next, the preparation was further suspended using a glass Pasteur pipette and the suspension centrifuged 200 G for 5 minutes at 4 °C. The supernatant was removed and was added to 1ml of sterile culture medium (Minimum Essential Medium; 31095-029; Gibco, Invitrogen, USA) enriched with 10% fetal bovine serum (FBS;16140-071; Gibco, Invitrogen, USA) and antibiotics: penicillin (100 IU / ml; P4333, Sigma-Aldrich, USA) and streptomycin (10,000 µg / ml; P4333,36; Sigma-Aldrich, USA). The suspended cells were plated in a 48-well culture dish on Matrigel-coated 9mm glass coverslips (354234 BD; Franklin Lakes, USA) at a minimum density of  $2 \times 10^4$  cells per well (Arantes et al., 2000).

#### ***In vitro* Trypanosoma cruzi infection**

The *T. cruzi* strains Y and DM28c were used in infection experiments. Trypomastigote forms were cultured and purified using kidney epithelial lineage (VERO) cells as described by Braga et al. (1993). After six days of culture, the parasites collected were centrifuged at 150 G for 10 minutes at room temperature and counted in a Neubauer chamber, centrifuged at 450 G for 10 minutes at 4 °C and suspended 90% DMEM medium in 10% fetal calf serum (FCS) and added to cultures. These experiments were performed with the collaboration of Prof. Dr. Luciana O. Andrade from the Morphology Department, ICB/UFMG and Prof. Dr. Lucia Piacenza from the Department of Biochemistry, Montevideo Medical School (UDELAR). Trypomastigotes of both strains were added to the primary culture of neurons at a ratio of 10:1 and cultures were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and studied at 24, 48 and 72 hours post-infection (h.p.i.).

#### **Evaluation of oxidant production by infected cells**

A general measure of NO formation was performed using the probe DAF-FM (4-Amino-5-Methylamino-2', 7'-Difluorofluorescein Diacetate) (Invitrogen, USA), which fluoresces green upon oxidation. For this, primary cultures of mouse enteric neurons grown on coverslips in 48-well plates, as described above, were infected or not with *T. cruzi* strains Y or DM28c trypomastigotes and followed up for 48 and 72 h.p.i. Then, the coverslips were washed once with PBS and exposed to DAF-FM (2 µM in PBS) for

15 minutes at 37 °C. After the infection, we also used Ionomycin (1  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich, USA), which induces  $\text{Ca}^{2+}$  influx and interferes with nNOS activity through calmodulin binding, and evaluated its effect in the DAF-FM fluorescence. IFN $\gamma$  (0.1mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA) was added to control cultures for 48hs before submitted to DAF-FM assays. After incubation, cells were imaged using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 200) equipped with a digital camera. Green fluorescence was captured using a filter cube with an excitation wavelength of 540 nm (band pass, 25 nm) and an emission filter of 605 nm (band pass, 55 nm).

A general measure of oxidant formation was performed using the probe CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5- (and-6) -chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) (Molecular Probes, USA), which fluoresces upon oxidation. For this, primary cultures of mouse enteric neurons grown on coverslips in 48-well plates were infected or not with *T. cruzi* strains Y or DM28c trypomastigotes and followed up for 48 and 72 h.p.i.. Then, the coverslips were washed once with PBS and exposed to CM-H<sub>2</sub>DCFDA at a final concentration of 1  $\mu$ M in PBS. Immediately after the addition of CM-H<sub>2</sub>DCFDA, the 48-well plate was read using the fluorimeter Synergy<sup>TM</sup> 2 (Biotek®, USA) at 37 °C in order to monitor the probe's oxidization rate, with excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. Data were analyzed using the program Gen5<sup>TM</sup>. Probe oxidation curves were used to calculate the slope and are expressed as Relative Fluorescence Units (RFU)/minute.

### **Mitochondrial membrane potential in *Trypanosoma cruzi*-infected primary enteric neurons, glia, and smooth muscle**

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ) was measured using the J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. For this, primary cultures of mouse enteric neurons grown on coverslips in 48-well plates were infected or not with *T. cruzi* strains Y or DM28c trypomastigotes and followed up for 72h.p.i. Then, the coverslips were washed once with PBS and exposed to JC-1 (0.5  $\mu$ M) (Molecular Probes, USA) and incubated at 37°C for 1 hour before it was rinsed with Krebs buffer. Green fluorescence (JC-1-monomers at the cytosol) and red fluorescence (mitochondrial matrix JC-1-aggregates)

were detected using fluorescence microscopy as described above, at a fixed exposure time.

### **Immunofluorescence and photographic documentation**

Primary cultures of mouse enteric neurons submitted to the above-described conditions grown on coverslips were fixed with 4% buffered paraformaldehyde at room temperature for at least 1 hour. To identify neuronal bodies and neurites and facilitate their quantification we used anti-PGP 9.5 (Rabbit, 1:500; Cedarlane, USA), anti- $\beta$ -tubulin III (Mouse, 1:800; Millipore, USA) and anti-nNOS (Rabbit, 1:500; Epitomics, USA). Smooth muscle cells were identified using the anti- $\alpha$  actin antibody (Rabbit, 1:400; Abcam, USA). For the immune-labeling of other structures we used the following antibodies: anti-3-NO<sub>2</sub>-tyrosine (Rabbit, 1:200; provided by Dr. Rafael Radi, see Brito et al., 1999, an antibody that specifically detects the protein bound 3-Nitrotyrosine (NO<sub>2</sub>Tyr) (Brito et al., 1999); anti-MnSOD2 (Mouse, 1:200; Santa Cruz, USA) and anti-*T. cruzi* (Rabbit, 1:5000; provided by Prof. Maria T. Bahia, UFOP). Identification of cell nuclei *in vitro* was performed by the fluorescence-emitting probe Hoechst H33342 (Invitrogen, USA), which binds to nuclear DNA and allows the optimal visualization of parasite and host nuclear morphology. The coverslips were analysed under the Olympus BX51 fluorescence microscope and images were obtained using Image-Pro Express 4.0 software (Media Cybernetics, USA).

### **Fluorescence intensity measurements**

Quantification of the fluorescence intensities of neuronal bodies, neuritic network (24h.p.i., 40X objective, anti  $\beta$ -tubulin III) and  $\alpha$ -actin filaments (24, 48, 72 h.p.i.; 20X objective, anti- $\alpha$ -actin) was performed using at least eight images randomly photographed of control and infected groups, obtained from at least two coverslips with primary cultures of mouse enteric neurons, from two independent experiments. DAF-FM and JC-1 (20X objective), anti-3-NO<sub>2</sub>-tyrosine (40X objective) fluorescence intensity was analyzed in at least five images selected by the presence of neuronal bodies, of control and infected groups, obtained from two coverslips, in duplicate experiments.



JC-1 fluorescence of enteric neurons grown on coverslips was expressed as an indicator of potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (~525 nm) to red (~590 nm) detected upon excitation and filtering using an Olympus BX51 fluorescence microscope equipped with a dual-bandpass. We evaluated the images obtained to find the proportion of red fluorescence to green fluorescence. The micrographs were analysed for fluorescence intensity in arbitrary units using Image J 1.52 (Bereiter-Hahn, 1975).

### **Expression of MnSOD2 by Western blot**

The expression levels of mitochondrial MnSOD2 were evaluated by western blot. Briefly, control and infected cultures were treated with trypsin from porcine pancreas (Sigma-Aldrich, USA) and lysed in buffer Tris-EDTA (10 and 1 mM, respectively) containing 0.1% of Triton X-100. For immunoblotting, samples were separated by SDS-PAGE (15%), transferred onto the nitrocellulose membrane and blocked with non-fat dry milk (3% w/v) in PBS (pH 7.4) for 1 hour. The membranes were incubated with a monoclonal anti-MnSOD2 antibody (1: 200) (Santa Cruz, USA). Primary and secondary antibodies were diluted 1: 1000 in Tween-20 (0.1% v/v) in PBS (pH 7.4) and incubated overnight at 4 °C. The membranes were then washed in Tween-20 (0.1%, v / v) in PBS and incubated for 1 hour with anti-mouse IgG antibody (1:15.000) (IR Dye-800 conjugated; LI-COR Biosciences). After washing, immunoreactive proteins were visualized with an infrared fluorescence detection system (Odyssey, LI-COR Biosciences).

### **Statistical analysis**

The Shapiro-Wilk test revealed that the parameters evaluated did not show a significant departure from normal distribution, except for parasite DNA (Fig. 1 E), which was submitted to a logarithmic transformation and analyzed as normally distributed data. *In vivo* experiments of infection were repeated twice, and at least 5 mice were analysed by group and time point. *In vitro* experiments were repeated twice and at least 2 coverslips of each were used for the analysis.

Comparisons between means were made using unpaired student's tests (i.e., Control vs. Infected). One-way analyses of variance (ANOVAs) were used to compare multiple treatments *in vitro* experiments. C (CTRL), CTRL + IFN (IFN $\gamma$ ), DM28c, DM28c + INF and CTRL, CTRL + INF, Y, Y + INF or at the time points (11d.p.i. and 3, 7, 12 and 15 m.p.i.). A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare treatments (Control vs. infected) and along time points (11d.p.i and 3, 7, 12, 15 m.p.i.). When a significant F value was found, we performed a post-hoc test according to the coefficient of variation (CV): Tukey (CV  $\leq$  15%) or Student-Newman-Keuls (CV > 15%). The  $\alpha$  level was set at 0.05. Data are shown as mean  $\pm$  SD.

### **Acknowledgments**

This work was supported by CAPES/Brazil ( PhD and Post-Doctoral fellowships), CNPq/Brazil (Researcher fellowship 305952/2017) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG/Brazil (PPM 00346-14, 00304-16), and CBB- APQ-01419-14, [APQ-00921-18](#)). The authors are grateful to Dr. Joana Lobato Barbosa for her assistance with the primary enteric cultures

The authors declare no competing financial interests.

### **Author contributions**

M.F. Ricci: experimental design, experimental procedures, and manuscript preparation; S.R. Béla, experimental procedures; C.F. Campos: experimental procedures; M.M. Moraes: manuscript preparation; M.T. Bahia: experimental design and manuscript preparation; A.L. Mazzeti: experimental procedures; A.C.S. Oliveira: experimental procedures; LO. Andrade: experimental design and manuscript preparation; R. Radi: experimental design and manuscript preparation; L. Piacenza: experimental design, experimental procedures, and manuscript preparation; and R.M.E. Arantes: experimental design, experimental procedures, and manuscript preparation.

**ABBREVIATIONS**

AP - acute phase

BZ - benznidazole

Ca<sup>2+</sup> - calcium

CAP - control acute phase

CCP- control chronic phase

CD - Chagas' disease

CM-H<sub>2</sub>DCFDA - 5- (and-6) -chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester

CP - chronic phase

CTRL - control

CV - coefficient of variation

DAF-FM - 4-Amino-5-Methylamino-2', 7'-Difluorofluorescein Diacetate

d.p.i. - days post-infection

ENS - enteric nervous system

h.p.i. – hours post-infection

IAP – infected acute phase

ICB – Institute of Biological Science

ICP – infected chronic phase

JC-1 - J-aggregate-forming lipophilic cation

MnSOD2 - manganese superoxide dismutase 2

m.p.i. - months post-infection

NO - nitric oxide

3-NO<sub>2</sub>Tyr - Nitrotyrosine

nNOS – neuronal nitric oxide synthase

PGP 9.5 - protein gene product 9.5

RNS - reactive nitrogen species

ROS - reactive oxygen species

*T.cruzi* - *Trypanosoma cruzi*

UFMG - University Federal of Minas Gerais

UFOP - University Federal of Ouro Preto

µm - micron

µM - micromolar

mM - milimolar

#### Legends:

**Figure 1. Mortality curve, infection parameters, and characterization of the inflammation associated with parasitism throughout the infection.** Swiss female mice were infected with 50,000 *T. cruzi* strain Y trypomastigotes. **(A)** Survival curve: The mice in the control group and those treated with Benznidazole (BZ) were followed throughout the time of infection. Control animals (no treatment) showed 100% mortality up to 20 d.p.i.; **(B)** Inflammatory foci: following H&E staining, 30 fields presenting inflammatory foci in the colon of infected mice were analyzed using an Olympus BX51 optical microscope with a 20X objective. Inflammatory foci were identified by the number of cells (at least 10 cells) and counted for the IAP, ICP3, ICP7, ICP12 and ICP15 groups. ( $n = 3$  mice). Representative of two independent experiments. Statistical analysis: ANOVA one-way with Tukey's post-hoc tests, after logarithmic transformation. Difference in relation to the infected acute phase group (IAP),  $P \leq 0.05$  (#). Data are shown as mean and standard deviation (SD); **(C)** The peak of parasitemia was at the 9<sup>th</sup> d.p.i.; **(D)** Sagittal section of the intestine showing the IAP (upper panel) and chronic infected (ICP15.; lower panel) stages of infection. The distribution of inflammation in the acute phase presents diffuse, coalescent foci whereas in the chronic phase, it persists as smaller foci. The thickness of the inner muscular layer was measured from the submucosal layer to the inner edge of the outer muscular layer (black line; Scale bar: 10µm. 1X and 5X objective; the Sharp symbol indicates the width of the inner muscular layer); **(E)** DNA of the parasite: a sample of approximately 0.5 cm was taken from the proximal and distal colon of acute (IAP) and chronic (ICP3, ICP7, ICP12, ICP15) mice. Tissues were macerated and DNA extraction was performed, followed by PCR to amplify the parasite's DNA. ( $n = 9-16$  mice). Representative of two independent experiments. Statistical analysis: one-way ANOVA with Student-Newman-Keuls pos-hoc test. Time difference from acute (IAP),  $P < 0.001$  (#). Data are shown as mean and SD; **(F and G)** Immunolabelling of paraffin-embedded tissues from infected colons using anti-*T. cruzi*; **(F)** Acute phase,

presence of amastigote nests along the colon (arrows); **(G)** Chronic phase, at 15m.p.i., rare foci and less intense labeling (arrows). Scale bar = 3 $\mu$ m. 10X and 20X objective. The arrowheads indicate the inflammatory infiltrate and the arrows indicate immunostaining for anti-*T. cruzi* at 11d.p.i. (acute phase) and 15m.p.i. (chronic phase).

**Figure 2. Ganglionic neuronal damage, intramuscular denervation, and phenotype changes of intestinal muscular propria during megacolon development.** **(A - J)** ganglia and intestinal muscle layer of Swiss mice infected with 50,000 *T. cruzi* strain Y trypomastigotes obtained from animals at the acute (CAP, controls; IAP, infected) and chronic (CCP, controls; ICP3, ICP7, ICP12 and ICP15 as 3, 7, 12, and months post-infection, respectively) phases and immunostained for PGP 9.5. Scale bar: 3  $\mu$ m. 40X objective; **(K - M)** Morphometrical analysis of innervation changes. Ten images of the myenteric plexus and internal muscular layer of each animal were acquired with a 40X objective. Statistical analysis: Two- way ANOVA with Student-Newman-Keuls tests. Results are expressed as the mean and standard deviation (SD) of two independent experiments; **(K)** PGP + area / myenteric ganglia total area ( $\mu\text{m}^2$ ). Difference in relation to the respective control groups,  $P \leq 0.05$  (\*) ( $n = 4$  mice); **(L)** PGP + intramuscular innervation / muscle inner layer area ( $\mu\text{m}^2$ ). Difference in relation to the control group,  $P \leq 0.05$  (\*). ( $n = 3$  mice). Representative of two independent experiments. **(M)** Muscle inner layer area ( $\mu\text{m}^2$ ) / nuclei number ( $n = 3-8$  mice). Difference in relation to the control group,  $P \leq 0.05$  (\*). Difference in time in relation to 11d.p.i and 3m.p.i.,  $P \leq 0.05$  (#). Difference over time in relation to all times in infected animals,  $P \leq 0.05$  (#); **(N)** Thickness of the inner muscular layer ( $\mu\text{m}$ ). Ten images of each animal, in H&E, were acquired with a 10X objective; three measurements of the thickness of the muscular layer were made in each image ( $n = 5$  mice). Representative of two independent experiments. Difference in relation to each respective control group,  $P \leq 0.05$  (\*). Difference in time compared to the other times in infected animals,  $P \leq 0.05$  (#). Arrows indicate immunostaining for PGP 9.5 of nerve fibers. Asterisks indicate immunostaining of neuronal bodies in the myenteric plexus ganglia. Arrowhead indicates inflammatory infiltrate.

**Figure 3. Deranged smooth muscle  $\alpha$ -actin immuno-expression *in vivo* and *in vitro*.** **(A - E)** Colon samples obtained from Swiss mice infected with 50,000 *T. cruzi* Y strain trypomastigotes were immunostained with anti- $\alpha$ -actin. Colon samples were obtained from animals in the acute phase (IAP) and chronic phase ICP (3, 7, 12 and 15 months post-infection - m.p.i). 10X objective. Scale bar: 2 $\mu$ m; **(F - K)** Anti- $\alpha$ -actin immunofluorescence in control (CTRL) and infected primary enteric neuron cultures at 24, 48, and 72 hours post-infection (h.p.i.). Scale Bar: 2 $\mu$ m. 20X objective; **(L)** Quantitative analysis of fluorescence intensity throughout infection (fluorescence Intensity of  $\alpha$ -actin / total muscle area). ( $n = 3$  mice). Representative of two independent experiments. **(M)** PGP 9.5 + intramuscular innervation / thickness of the inner muscle layer.  $n = 4$ . Representative of two independent experiments, in triplicate coverslips. Statistical analysis: ANOVA two-way with Student-Newman-Keuls tests. Difference in

relation to the respective control group,  $P < 0.01$  (\*\*). Difference in time in relation to the 24h.p.i.,  $P < 0.05$  (#). Data are shown as mean and standard deviation (SD). Arrowheads indicate the inflammatory infiltrate. Black arrows indicate a decrease and / or absence of immunostaining for anti- $\alpha$ -actin in the internal muscle. White arrows indicate fluorescence for anti- $\alpha$ -actin. **(J and K)** Nuclear staining with Hoechst 33342.

**Figure 4. Effect of *T. cruzi* infection of enteric neuron cultures on neuronal bodies and neurite network.** Neurons removed from the myenteric plexus were dissociated, plated and infected or not with *T. cruzi* strains Y and Dm28c trypomastigotes. Cultures were analyzed at 24, 48 and 72 hours post-infection (h.p.i.) after they were fixed using a 4% buffered paraformaldehyde solution. The coverslips were photographed in phase contrast (**A**, control (CTRL) and **C**, infected); stained with Giemsa (**B**, CTRL and **D**, infected); immunostained with anti-PGP 9.5 (in green; **E**, CTRL and **F, G and H**, infected) and anti- $\beta$ -tubulin III (in red; **I**, CTRL and **J**, infected); **(H)** Nuclear staining with Hoechst 33342 (in blue). Notice in the inset the presence of Hoechst fluorescent amastigotes labelled with PGP 9.5 inside neuronal cell bodies (arrowheads);  $\beta$ -tubulin and nNOS double-stained neurons (arrowheads) and correspondent phase-contrast images (**L-N**, CTRL; **O-Q**, infected); **(P and Q)** confocal images, with arrows indicating  $\beta$ -tubulin stained neurons. The double nNOS and  $\beta$ -tubulin infected neurons are indicated by arrowheads. The inset shows Hoechst fluorescent (in blue) amastigotes inside the neurons (green). Scale bar: 3 $\mu$ m. **(A and C)** 10X objective; **(G and H)** 20X objective; and **(E, F, I and J, L-Q)** 40X objective. **(R)** Fluorescence intensity of anti- $\beta$ -tubulin III labeled neuronal bodies; **(S)** Fluorescence intensity of anti- $\beta$ -tubulin III labelled neurites.  $n = 4$ . Representative of two independent experiments in duplicate coverslips). Images were obtained an Olympus BX51 fluorescence microscope, 40 X objective. Statistical analysis: Student *t* test. Difference in relation to the control group,  $P < 0.001$  (\*\*\*). Data are shown as mean and standard deviation (SD). The arrows indicate neurons, arrowhead indicates the presence of parasites inside the neurons, large arrows indicate neuritic varicosities.

**Figure 5. Neuronal nitric oxide production in myenteric neuronal cultures indicated by DAF-FM probe oxidation.** Neurons removed from the myenteric plexus were dissociated, plated and infected or not with *T. cruzi* strains Y and Dm28c trypomastigotes for 72 hours. Then, the coverslips were washed and exposed to DAF-FM. **(A)** Control cultures (CTRL) in phase contrast and **(B)** DAF fluorescence (DAF). No oxidation of DAF-FM is observed; **(C and D)** Y strain infected cultures (Y); **(E and F)** Dm28c strain infected cultures (DM28C). Infection produced greater oxidation in cells with neuronal morphology and that were are infected (asterisk); **(G and H)** Control cultures treated with IFN $\gamma$  (CTRL + IFN). Neuronal cells activated with IFN $\gamma$  showed increased oxidation of DAF-FM; **(I and J)** Y strain infected and ionomycin-treated cultures (Y + IONO). Activation of cells with Ca<sup>2+</sup> + ionophore (IONO) increased oxidation of DAF-FM; **(K and L)** Quantification of DAF-FM fluorescence intensity.  $n = 6$ . Representative of three independent experiments in duplicate coverslips. Scale bar: 100 $\mu$ m. 20X

objective. Student *t* test. Difference in relation to the control group,  $P < 0.05$  (\*). Data are shown as mean and standard deviation (SD). Asterisks indicate infected and DAF-fluorescent neurons. Arrows indicate neuronal bodies without infection. The sharp symbol indicates infected accessory cell.

**Figure 6. Increased mitochondrial depolarization in myenteric neurons infected with the Y and Dm28c strains of *T. cruzi*.** Neurons removed from the myenteric plexus were dissociated, plated and infected or not with *T. cruzi* strains Y and Dm28c trypomastigotes for 72 hours. Then, the coverslips were washed and exposed to JC-1 to evaluate mitochondrial membrane potential (*see methods*). (A – D) Control (CTRL); (E – H) CTRL + IFN $\gamma$  (IFN); (I – L) Infected with Y strain; (M – P) Infected with the DM28c strain. Living cells were detected by green (C,G,K,O; JC-1-monomers at the cytosol) and red fluorescence (B,F,J,N; mitochondrial matrix JC-1-aggregates) using fluorescence microscopy (Nikon Eclipse TE 200) (A, E, I, M) and correlated with the respective phase-contrast images (D, H, L and P). Scale bar: 100 $\mu$ m. 20X objective. (C – H) CTRL + IFN $\gamma$  cultures indicating preservation of mitochondrial membrane; (K – P) Infected cultures. Green fluorescence increase indicating loss of mitochondrial membrane function, especially in neuronal cells sometimes visibly infected (arrows), and in varicosities (arrowhead).

**Figure 7. Quantification of mitochondrial function (JC-1), nitrotyrosination, and ROS production in primary enteric neuronal cultures.** Neurons removed from the myenteric plexus were dissociated, plated and infected or not with *T. cruzi* strains Y and Dm28c trypomastigotes and followed up for 72 hours. (A) Quantification of fluorescence intensity for JC-1.  $n = 6$ . Representative of three independent experiments in triplicate coverslips (B) Quantification of anti-3-NO $_2$ -tyrosine antibody (NO $_2$ TYR); (C) Fluorescence (in relative fluorescence units, RFU) of the oxidized CM-H $_2$ DCFDA probe.  $n = 4$ . Representative of two independent experiments in duplicate coverslips. Phase contrast images of (D) Control (CTRL); (G) Infected with the Y strain; (J) infected with the Dm28c strain. (E-L) Immunofluorescence for NO $_2$ TYR. After fixing the coverslips in a 4% buffered paraformaldehyde solution, they were incubated with anti-3-NO $_2$ -tyrosine (green) and photographed under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 200). Cell nuclei were identified using the Hoechst marker (blue). Scale bar: 50 $\mu$ m. 40X Objective. Student *t* test. Difference in relation to the control group,  $P < 0.05$  (\*)  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). Data are shown as mean and standard deviation (SD). Arrows indicate neuronal bodies. Asterisk indicates strong immunofluorescence of nitrotyrosine in neurons.

**Figure 8. nNOS neurons infected with strains Y and Dm28c show greater expression of MnSOD2.** Neurons removed from the myenteric plexus were dissociated, plated and infected or not with *T. cruzi* strains Y and Dm28c trypomastigotes, followed up for 72 hours and had their expression levels of mitochondrial MnSOD2 analyzed. (A) Control (CTRL); (B), CTRL + interferon  $\gamma$  (IFN); (C), CTRL + L-

NAME; **(D)** Infected with Y strain (Y); **(E)** Infected with Y strain + interferon  $\gamma$  (Y + IFN). After treatments, the coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with anti-MnSOD2 (green) and photographed under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 200). Cell nuclei were identified using the Hoechst marker (blue); **(D and E)** The cells with the highest fluorescence intensity for anti-MnSOD2 were those presenting neuronal morphology and infected as well as those activated with IFN; **(F - K)** Coverslips were double-labeled with anti-nNOS (green) and anti-MnSOD2 (red) and photographed with the LSM 880 confocal microscope (ZEISS, Germany); Panels **(F)** nNOS CTRL; **(G)** nNOS Y strain; **(H)** CTRL MnSOD2; **(I)** Y strain MnSOD2; **(J)** Merge CTRL; **(K)** Infected nNOS neurons (presented higher MnSOD2 staining when compared to control; **(J)** infected nNOS neurons present a higher intensity for MnSOD2 when compared to their respective control **(H, CTRL, I, Y infected)**); Panels **(J)** CTRL and **(K)** Y strain-infected neurons show double labeling for nNOS and MnSOD2; **(L-O)** Western Blot with the anti-MnSOD2 antibody. To this end, primary cultures of enteric neurons were trypsinized and prepared for Western Blot as described in the methods section. The panels show greater expression of MnSOD2 in the cultures infected with both Y and Dm28c strains when the cells were activated using IFN. Scale bar: 100 $\mu$ m. 20X lens.  $n = 4$ . Representative of two independent experiments duplicate coverslips. **(M and O)** quantification of MnSOD2 expression. Statistical analysis: ANOVA one-way with Tukey's post hoc tests. Difference between groups,  $P \leq 0.05$  (\*);  $P < 0.001$  (\*\*\*) ;  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). Data are shown as mean and standard deviation (SD). White arrows indicate cells immunostained with anti-MnSOD2 and that present neuronal morphology.

**Supplementary Figure 1. Histopathological aspects of the colonic changes induced by the infection with the Y strain of *T. cruzi*.** **(A)** CD4+ and **(B)** CD8+ cells observed in *muscularis propria* of chronic infected animals (15m.p.i.) were quantified and expressed as **(C)** percentage of immunophenotyped (CD4+ and CD8+) cells/total cells of control and infected mice at acute (IAP, 11d.p.i.) and chronic phase (ICP15, 15m.p.i.). The percentage of CD4 + cells / total cells was higher for the infected groups when compared to the control groups (CTRL). The percentage of CD8 + cells / total cells decreased in IAP when compared to CTRL (CAP) animals, but increased in ICP15 mice ( $p = 0.07$ ); **(D - H)** Histopathological aspects observed in colon samples of infected animals stained with HE where **(D)** CAP, **(E)** IAP, **(F)** ICP3, **(G)** ICP7, **(H)** ICP12, and **(I)** ICP15. Inflammatory foci were found scattered throughout the colon wall, at all times of the experiment. Notice that inflammatory cells in **(E)** (IAP) and **(F)** (ICP3) are associated with the vacuolization of parenchyma cells and hyper-eosinophilia. The infiltrate surrounds the enteric ganglia and sometimes blur its limits (inset, dashed line). Arrowhead indicates inflammatory infiltrate. **(J)** CTRL, **(K)** IAP, **(L)** ICP3, **(M)** ICP7, **(N)** ICP12, and **(O)** ICP15 Masson's trichome stains the connective tissue in blue. Reorganization and increased production of collagen fibers throughout the infection. Thin arrows indicate interstitial and periganglionic collagen fibers, large arrows indicate collagen fibers in the submucosal plexus. Scale Bar: 3  $\mu$ m. 20X objective. Statistical analysis: ANOVA one-way with Student-Newman-Keuls post hoc tests. Difference in relation to the control group,  $P \leq 0.05$  (\*) ( $n = 5$  mice).



Representative of two independent experiments. Data are shown as mean and standard deviation (SD).

## References

- Acevedo, G.R., M.C. Girard, and K.A. Gómez. 2018. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Front. Immunol.* 9:1929. doi:10.3389/fimmu.2018.01929.
- Adad, S.J., D.C. Andrade, E.R. Lopes, and E. Chapadeiro. 1991. Pathological anatomy of chagasic megacolon. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 33:443–450.
- Adad, S.J., C.G. Cançado, R.M. Etchebehere, V.P. Teixeira, U.A. Gomes, E. Chapadeiro, and E.R. Lopes. 2001. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch.* 438:254–8. doi:10.1007/s004280000319.
- Adad, S.J., G.B. E Silva, and A.A. Jammal. 2013. The development of chagasic megacolon requires severe denervation and the reduction in interstitial cells of Cajal number might be a contributing factor. *Virchows Arch.* 462:127. doi:10.1007/s00428-012-1349-1.
- Ahsan, H. 2013. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum. Immunol.* 74:1392–9. doi:10.1016/j.humimm.2013.06.009.
- Akpan, N., K. Caradonna, M. V Chuenkova, and M. PereiraPerrin. 2008. Chagas' disease parasite-derived neurotrophic factor activates cholinergic gene expression in neuronal PC12 cells. *Brain Res.* 1217:195–202. doi:10.1016/j.brainres.2008.03.082.
- Aliberti, J.C., F.S. Machado, J.T. Souto, A.P. Campanelli, M.M. Teixeira, R.T. Gazzinelli, and J.S. Silva. 1999. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 67:4819–26.
- Almeida-Leite, C.M. de, L.M. da C. Galvão, L.C.C. Afonso, F. de Q. Cunha, and R.M.E. Arantes. 2007. Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Neurobiol. Dis.* 25:170–8. doi:10.1016/j.nbd.2006.09.003.
- Andrews, N.W., K.S. Hong, E.S. Robbins, and V. Nussenzweig. 1987. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 64:474–84. doi:10.1016/0014-4894(87)90062-2.
- Ankarcrona, M., J.M. Dypbukt, E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S.A. Lipton, and P. Nicotera. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 15:961–73. doi:10.1016/0896-6273(95)90186-8.
- Arantes, R., S. Lourenssen, C. Machado, and M. Blennerhassett. 2000. Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro. *Neuroreport.* 11:177–81.
- Arantes, R.M., and A.M. Nogueira. 1997. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res.* 290:61–9.
- Arantes, R.M.E., H.H.F. Marche, M.T. Bahia, F.Q. Cunha, M.A. Rossi, and J.S. Silva. 2004. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am. J. Pathol.* 164:1361–8.
- Balcerczyk, A., M. Soszynski, and G. Bartosz. 2005. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 39:327–35. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.017.

- Batthyány, C., S. Bartesaghi, M. Mastrogiovanni, A. Lima, V. Demicheli, and R. Radi. 2017. Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. *Antioxid. Redox Signal.* 26:313–328. doi:10.1089/ars.2016.6787.
- Benvenuti, L.A., G. Bellotti, V.D. Aiello, P.S. Gutierrez, M. de L. Higuchi, F. Pileggi, and M.M. Reis. 1997. Association of an Increase in CD8+ T Cells with the Presence of Trypanosoma cruzi Antigens in Chronic, Human, Chagasic Myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56:485–489. doi:10.4269/ajtmh.1997.56.485.
- Benvenuti, L.A., A. Roggério, H.F.G. Freitas, A.J. Mansur, A. Fiorelli, and M.L. Higuchi. 2008. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 102:481–7. doi:10.1179/136485908X311740.
- Bereiter-Hahn, J. 1975. Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodine (daspmi) as a fluorescent probe for mitochondria in situ. *Biochim Biophys Acta.* 15;1-14.
- Bonney, K.M., and D.M. Engman. 2008. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr. Mol. Med.* 8:510–8. doi:10.2174/156652408785748004.
- Bredt, D.S. 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31:577–96. doi:10.1080/10715769900301161.
- Bredt, D.S., P.M. Hwang, and S.H. Snyder. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347:768–70. doi:10.1038/347768a0.
- Brener, Z., Z. Andrade, and M. Barral-Neto. 2000. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. 2nd edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Brener, Z.B.Z.T. activity and criterion of cure on mice experimentally infected with T. cruzi. R.I.M.T.S.P. [Internet]. 1962;4:389–96. A. from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1401523>. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 4:389–96.
- Brito, C., M. Naviliat, A.C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, and A.M. Cayota. 1999. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* 162:3356–66.
- Bubenheimer, R.K., I.A.M. Brown, D.E. Fried, J.L. McClain, and B.D. Gulbransen. 2016. Sirtuin-3 Is Expressed by Enteric Neurons but It Does not Play a Major Role in Their Regulation of Oxidative Stress. *Front. Cell. Neurosci.* 10:73. doi:10.3389/fncel.2016.00073.
- Burgos, J.M., M. Diez, C. Vigliano, M. Bisio, M. Risso, T. Duffy, C. Cura, B. Brusses, L. Favaloro, M.S. Leguizamón, R.H. Lucero, R. Laguens, M.J. Levin, R. Favaloro, and A.G. Schijman. 2010. Molecular identification of Trypanosoma cruzi discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 51:485–95. doi:10.1086/655680.
- Burleigh, B.A., and N.W. Andrews. 1998. Signaling and host cell invasion by Trypanosoma cruzi. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:461–5. doi:10.1016/s1369-5274(98)80066-0.
- Campos, C.F., S.D. Cangussú, A.L.C. Duz, C.T. Cartelle, M. de L. Noviello, V.M. Veloso, M.T. Bahia, C.M. Almeida-Leite, and R.M.E. Arantes. 2016. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of Tripanosoma cruzi Infection. *PLoS One.* 11:e0153038. doi:10.1371/journal.pone.0153038.
- Candas, D., and J.J. Li. 2014. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid. Redox Signal.* 20:1599–617. doi:10.1089/ars.2013.5305.
- Cho, H.J., Q.W. Xie, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, and C. Nathan. 1992.

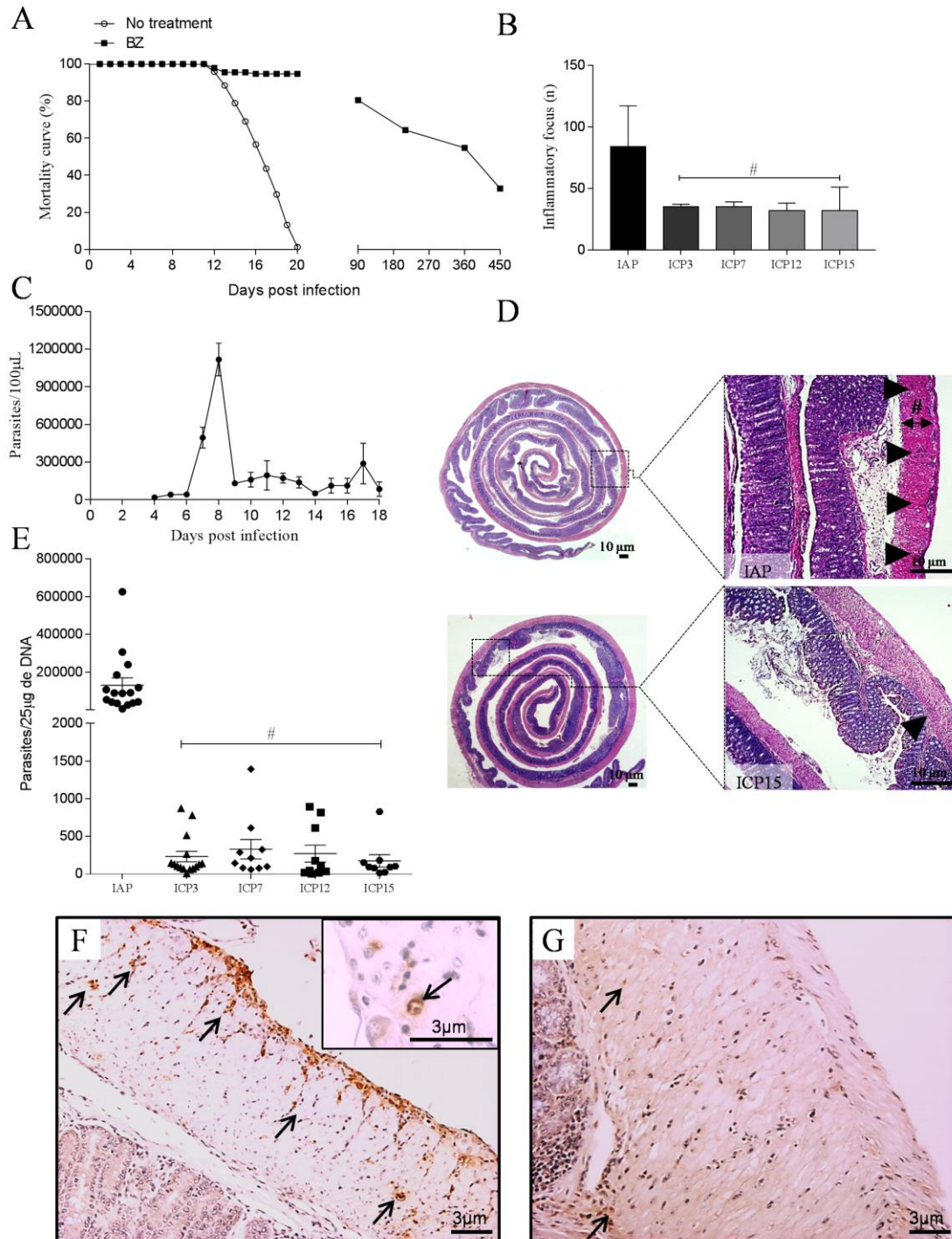
- Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 176:599–604. doi:10.1084/jem.176.2.599.
- Cruz, J.S., A. Santos-Miranda, P.A. Sales-Junior, R. Monti-Rocha, P.P. Campos, F.S. Machado, and D. Roman-Campos. 2016. Altered Cardiomyocyte Function and *Trypanosoma cruzi* Persistence in Chagas Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94:1028–33. doi:10.4269/ajtmh.15-0255.
- DeFaria, C.R., J.M. De Rezende, and A. Rassi. 1988. [Peripheral denervation in the various clinical forms of Chagas' disease]. *Arq. Neuropsiquiatr.* 46:225–37.
- Desoti, V.C., D. Lazarin-Bidóia, F.M. Ribeiro, S.C. Martins, J.H. da S. Rodrigues, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, V.F. Ximenes, and S. de O. Silva. 2015. The Combination of Vitamin K3 and Vitamin C Has Synergic Activity against Forms of *Trypanosoma cruzi* through a Redox Imbalance Process. *PLoS One*. 10:e0144033. doi:10.1371/journal.pone.0144033.
- Dias, P.P., R.F. Capila, N.F. do Couto, D. Estrada, F.R. Gadelha, R. Radi, L. Piacenza, and L.O. Andrade. 2017. Cardiomyocyte oxidants production may signal to *T. cruzi* intracellular development. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0005852. doi:10.1371/journal.pntd.0005852.
- Ducci, H., and T. Pizzi. 1949. Miocarditis chagásica. *Rev. Med. Chil.* 77:207–9.
- Dutra, W.O., C.A.S. Menezes, L.M.D. Magalhães, and K.J. Gollob. 2014. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36:377–87. doi:10.1111/pim.12107.
- Dutta, S., and P. Sengupta. 2016. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 152:244–248. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025.
- Estrada, D., G. Specker, A. Martínez, P.P. Dias, B. Hissa, L.O. Andrade, R. Radi, and L. Piacenza. 2018. Cardiomyocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. *Biochem. J.* 475:1235–1251. doi:10.1042/BCJ20170698.
- Ferreira, M.S., S. de A. Nishioka, M.T.A. Silvestre, A.S. Borges, F.R.F. Nunes-Araujo, and A. Rocha. 1997. Reactivation of Chagas' Disease in Patients with AIDS: Report of Three New Cases and Review of the Literature. *Clin. Infect. Dis.* 25:1397–1400. doi:10.1086/516130.
- Flurkey, K., J.M. Curren, and D.E. Harrison. 2007. The mouse in aging research. in: J.G. Fox, et al. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research*, In Elsevier. Burlington, MA. 637–672.
- Forstermann, U., and W.C. Sessa. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33:829–837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- Garcia, S.B., J.S. Paula, G.S. Giovannetti, F. Zenha, E.M. Ramalho, S. Zucoloto, J.S. Silva, and F.Q. Cunha. 1999. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 93:191–7. doi:10.1006/expr.1999.4451.
- Gazzinelli, R.T., I.P. Oswald, S. Hieny, S.L. James, and A. Sher. 1992. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* 22:2501–6. doi:10.1002/eji.1830221006.
- Gonzalez, A., and G.M. Salido. 2016. Determination of reactive oxygen species production in pancreatic acinar cells. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl. Base.* 1:9. doi:10.3998/panc.2016.32.
- González Cappa, S.M., O.P. Sanz, L.A. Muller, H.A. Molina, J. Fernández, M.T. Rimoldi, and R.E. Sica. 1987. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36:41–5.
- Guillén-Pernía, B., A. Lugo-Yarbu, and E. Moreno. 2001. [Digestive tract dilation in mice infected with *Trypanosoma cruzi*]. *Invest. Clin.* 42:195–209.

- Gupta, S., V. Bhatia, J. Wen, Y. Wu, M.-H. Huang, and N.J. Garg. 2009. Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 47:1414–21. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.008.
- Gupta, S., and N.J. Garg. 2013. TeVac3 Induced Control of Trypanosoma cruzi Infection and Chronic Myocarditis in Mice. *PLoS One.* 8:e59434. doi:10.1371/journal.pone.0059434.
- Hemmens, B., and B. Mayer. 1998. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol. Biol.* 100:1–32. doi:10.1385/1-59259-749-1:1.
- Higuchi, M. de L., T. De Brito, M. Martins Reis, A. Barbosa, G. Bellotti, A.C. Pereira-Barreto, and F. Pileggi. 1993. Correlation between Trypanosoma cruzi parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.* 2:101–6. doi:10.1016/1054-8807(93)90021-S.
- Jabari, S., E.C. de Oliveira, A. Brehmer, and A.B.M. da Silveira. 2014. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. *Histochem. Cell Biol.* 142:235–44. doi:10.1007/s00418-014-1250-x.
- Jabari, S., A.B.M. da Silveira, E.C. de Oliveira, K. Quint, W. Neuhuber, and A. Brehmer. 2012. Preponderance of inhibitory versus excitatory intramuscular nerve fibres in human chagasic megacolon. Jabari, S., da Silveira, A. B. M., de Oliveira, E. C., Quint, K., Neuhuber, W., & Brehmer, A. (2012). Preponderance of inhibitory versus excitatory intram. *Int. J. Colorectal Dis.* 27:1181–9. doi:10.1007/s00384-012-1500-0.
- Jabari, S., A.B.M. da Silveira, E.C. de Oliveira, K. Quint, A. Wirries, W. Neuhuber, and A. Brehmer. 2013. Interstitial cells of Cajal: crucial for the development of megacolon in human Chagas' disease? *Colorectal Dis.* 15:e592-8. doi:10.1111/codi.12331.
- Koberle, F. 1968. Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6:63–116. doi:10.1016/S0065-308X(08)60472-8.
- Koberle, F., and F. de Alcantara. 1960. [Mechanism of destruction of the neurons of the peripheral nervous system in Chagas' disease]. *Hospital (Rio J).* 57:1057–62.
- Kulkarni, G. V, W. Lee, A. Seth, and C.A. McCulloch. 1998. Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 245:170–8. doi:10.1006/excr.1998.4245.
- Labovsky, V., C.R. Smulski, K. Gómez, G. Levy, and M.J. Levin. 2007. Anti- $\beta$ 1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 148:440–449. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03381.x.
- Laranja, F.S., E. Dias, G. Nobrega, and A. Miranda. 1956. Chagas' Disease. *Circulation.* 14:1035–1060. doi:10.1161/01.CIR.14.6.1035.
- Leon, J.S., and D.M. Engman. 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int. J. Parasitol.* 31:555–61. doi:10.1016/s0020-7519(01)00163-1.
- Lopez, M., H.B. Tanowitz, and N.J. Garg. 2018. Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Curr. Clin. Microbiol. reports.* 5:45–54.
- Machado, C.R., J.B. Alves, and A.B. Machado. 1984. Adrenergic innervation and noradrenaline content of the rat submandibular gland during the experimental Trypanosoma cruzi infection. *J. Neural Transm.* 59:289–97. doi:10.1007/bf01255597.
- Machado, F.S., W.O. Dutra, L. Esper, K.J. Gollob, M.M. Teixeira, S.M. Factor, L.M. Weiss, F. Nagajyothi, H.B. Tanowitz, and N.J. Garg. 2012. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.* 34:753–70. doi:10.1007/s00281-012-0351-7.
- Maifrino, L., E. Liberti, and R. de Souza. 1999. Vasoactive-intestinal-peptide- and substance-P-

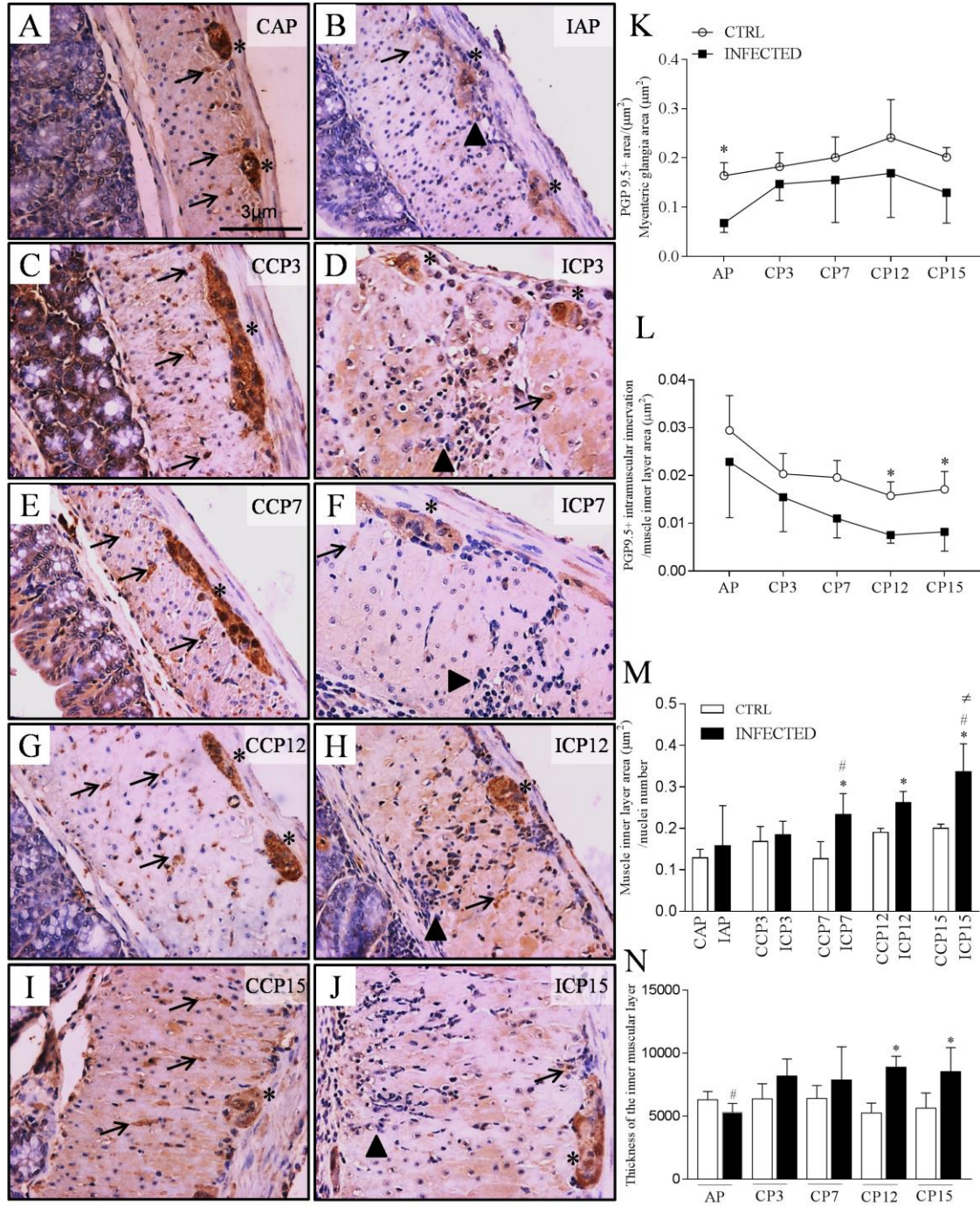
- immunoreactive nerve fibres in the myenteric plexus of mouse colon during the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93:49–56.
- Martins, S.C., D. Lazarin-Bidóia, V.C. Desoti, H. Falzirolli, C.C. da Silva, T. Ueda-Nakamura, S. de O. Silva, and C. V Nakamura. 2016. 1,3,4-Thiadiazole derivatives of R-(+)-limonene benzaldehyde-thiosemicarbazones cause death in *Trypanosoma cruzi* through oxidative stress. *Microbes Infect.* 18:787–797. doi:10.1016/j.micinf.2016.07.007.
- Massocatto, C.L., N. Martins Moreira, E. Muniz, S. Marques de Araújo, P. Pinge-Filho, R.M. Rossi, E.J. de Almeida Araújo, and D. de Mello Gonçalves Sant’ana. 2017. Treatment with low doses of aspirin during chronic phase of experimental Chagas’ disease increases oesophageal nitrenergic neuronal subpopulation in mice. *Int. J. Exp. Pathol.* 98:356–362. doi:10.1111/iep.12259.
- Meneghelli, U.G. 1999. Clinical treatment of the digestive form of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:341–342. doi:10.1590/S0074-02761999000700066.
- Meneghelli, U.G. 2004. Chagasic enteropathy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37:252–60.
- Mirkin, G.A., A.M. Celentano, E.L. Malchiodi, M. Jones, and S.M. González Cappa. 1997. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 107:328–34. doi:10.1111/j.1365-2249.1997.267-ce1166.x.
- Mirkin, G.A., M. Jones, O.P. Sanz, R. Rey, R.E.P. Sica, and S.U.G. Cappa. 1994. Experimental Chagas’ Disease: Electrophysiology and Cell Composition of the Neuromyopathic Inflammatory Lesions in Mice Infected with a Myotropic and a Pantropic Strain of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73:69–79. doi:10.1006/clin.1994.1171.
- Moreira, N.M., D.M.G. Sant’ana, E.J.A. Araújo, M.J.O. Toledo, M.L. Gomes, and S.M. de Araújo. 2011. Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: an experimental model. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83:545–55.
- Nascimento, R.D., A. de Souza Lisboa, R.T. Fujiwara, M.A.R. de Freitas, S.J. Adad, R.C. Oliveira, D. d’Avila Reis, and A.B.M. da Silveira. 2010. Characterization of enteroglial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. *Hum. Pathol.* 41:528–34. doi:10.1016/j.humpath.2009.05.018.
- De Oliveira, R.B., L.E.A. Troncon, R.O. Dantas, and U.G. Meneghelli. 1998. Gastrointestinal manifestations of Chagas’ disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93:884–889. doi:10.1016/S0002-9270(98)00151-8.
- Pérez-Molina, J.A., and I. Molina. 2018. Chagas disease. *Lancet (London, England)*. 391:82–94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Piacenza, L., M.N. Alvarez, G. Peluffo, and R. Radi. 2009a. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:415–421. doi:10.1016/j.mib.2009.06.011.
- Piacenza, L., M.P. Zago, G. Peluffo, M.N. Alvarez, M.A. Basombrio, and R. Radi. 2009b. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int. J. Parasitol.* 39:1455–1464. doi:10.1016/j.ijpara.2009.05.010.
- Pinto, N.X., M.A. Torres-Hillera, E. Mendoza, and F.E. León-Sarmiento. 2002. Immune response, nitric oxide, autonomic dysfunction and stroke: a puzzling linkage on *Trypanosoma cruzi* infection. *Med. Hypotheses.* 58:374–377. doi:10.1054/mehy.2001.1401.
- Radi, R. 2013. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem.* 288:26464–72. doi:10.1074/jbc.R113.472936.
- Radi, R. 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115:5839–5848. doi:10.1073/pnas.1804932115.

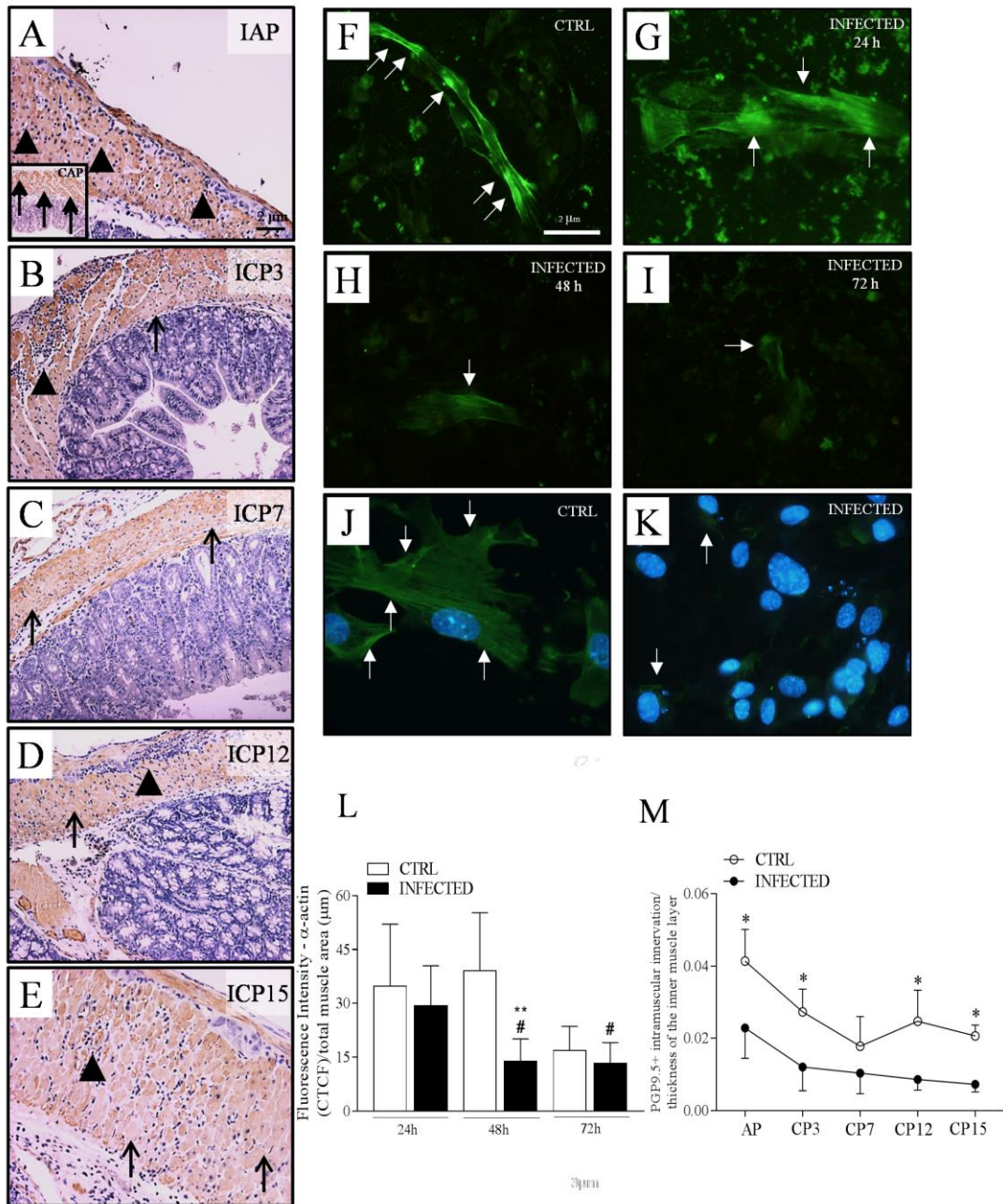
- Rassi, A., A. Rassi, and J. Marcondes de Rezende. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26:275–91. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002.
- Ribeiro, U., A. V Safatle-Ribeiro, A. Habr-Gama, J.J. Gama-Rodrigues, J. Sohn, and J.C. Reynolds. 1998. Effect of Chagas' disease on nitric oxide-containing neurons in severely affected and unaffected intestine. *Dis. Colon Rectum.* 41:1411–7. doi:10.1007/bf02237058.
- Rivera, L.R., D.P. Poole, M. Thacker, and J.B. Furness. 2011. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. *Neurogastroenterol. Motil.* 23:980–8. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01780.x.
- Roman-Campos, D., R. Monti-Rocha, F.S. Machado, A. Santos-Miranda, P.A. Sales-Junior, P.P. Campos, and J.S. Cruz. 2016. Altered Cardiomyocyte Function and Trypanosoma cruzi Persistence in Chagas Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94:1028–1033. doi:10.4269/ajtmh.15-0255.
- Salvador, F., M. Mego, A. Sánchez-Montalvá, M. Morís, K. Ramírez, A. Accarino, J.-R. Malagelada, F. Azpiroz, and I. Molina. 2015. Assessment of rectocolonic morphology and function in patients with Chagas disease in Barcelona (Spain). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92:898–902. doi:10.4269/ajtmh.14-0546.
- Shikanai-Yasuda, M.A., and N.B. Carvalho. 2012. Oral Transmission of Chagas Disease. *Clin. Infect. Dis.* 54:845–852. doi:10.1093/cid/cir956.
- Da Silveira, A., M. Freitas, E. de Oliveira, S. Neto, A. Luquetti, J. Furness, R. Correa-Oliveira, and D. D'Avila Reis. 2008. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102:1154–6. doi:10.1016/j.trstmh.2008.04.043.
- da Silveira, A.B.M., R.M.E. Arantes, A.R. Vago, E.M. Lemos, S.J. Adad, R. Correa-Oliveira, and D. D'Avila Reis. 2005. Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology.* 131:627–34. doi:10.1017/S0031182005008061.
- Smith, T.H., J. Ngwainmbi, J.R. Grider, W.L. Dewey, and H.I. Akbarali. 2013. An in-vitro preparation of isolated enteric neurons and glia from the myenteric plexus of the adult mouse. *J. Vis. Exp.* e50688. doi:10.3791/50688.
- Soares, M.B., L. Pontes-De-Carvalho, and R. Ribeiro-Dos-Santos. 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73:547–59. doi:10.1590/s0001-37652001000400008.
- Stordeur, P., L.F. Poulin, L. Craciun, L. Zhou, L. Schandené, A. de Lavareille, S. Goriely, and M. Goldman. 2002. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J. Immunol. Methods.* 259:55–64.
- Tanowitz, H.B., L. V Kirchhoff, D. Simon, S.A. Morris, L.M. Weiss, and M. Wittner. 1992. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:400–19. doi:10.1128/cmr.5.4.400.
- Tarleton, R.L. 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31:550–4. doi:10.1016/s0020-7519(01)00158-8.
- Teixeira, A.R.L., M.M. Hecht, M.C. Guimaro, A.O. Sousa, and N. Nitz. 2011. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24:592–630. doi:10.1128/CMR.00063-10.
- Teixeira, M.M., R.T. Gazzinelli, and J.S. Silva. 2002. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. *Trends Parasitol.* 18:262–265. doi:10.1016/S1471-4922(02)02283-3.
- Vago, A.R., A.M. Macedo, S.J. Adad, D.D. Reis, and R. Corrêa-Oliveira. 1996. PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease.

- Lancet (London, England)*. 348:891–2. doi:10.1016/S0140-6736(05)64761-7.
- Vazquez, B.P., T.P. Vazquez, C.B. Miguel, W.F. Rodrigues, M.T. Mendes, C.J.F. de Oliveira, and J.E.L. Chica. 2015. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. *Parasit. Vectors*. 8:206. doi:10.1186/s13071-015-0811-8.
- Viader, A., E.C. Wright-Jin, B.P.S. Vohra, R.O. Heuckeroth, and J. Milbrandt. 2011. Differential regional and subtype-specific vulnerability of enteric neurons to mitochondrial dysfunction. *PLoS One*. 6:e27727. doi:10.1371/journal.pone.0027727.
- Voukali, E., H.R. Shotton, and J. Lincoln. 2011. Selective responses of myenteric neurons to oxidative stress and diabetic stimuli. *Neurogastroenterol. Motil.* 23:964-e411. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01778.x.
- Wahba, G., A.-E. Hebert, D. Grynspan, W. Staines, and S. Schock. 2016. A rapid and efficient method for dissociated cultures of mouse myenteric neurons. *J. Neurosci. Methods*. 261:110–6. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.11.024.
- Wang, X., and E.K. Michaelis. 2010. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* 2:12. doi:10.3389/fnagi.2010.00012.
- Weinkauff, C., R. Salvador, and M. Pereiraperrin. 2011. Neurotrophin receptor TrkC is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* in neural, glial, and epithelial cells. *Infect. Immun.* 79:4081–7. doi:10.1128/IAI.05403-11.
- White, R.J., and I.J. Reynolds. 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* 16:5688–97.
- WHO. 2018. Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Tech. UNDP/World Bank/WHO*.
- Zhang, L., and R.L. Tarleton. 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180:480–6. doi:10.1086/314889.

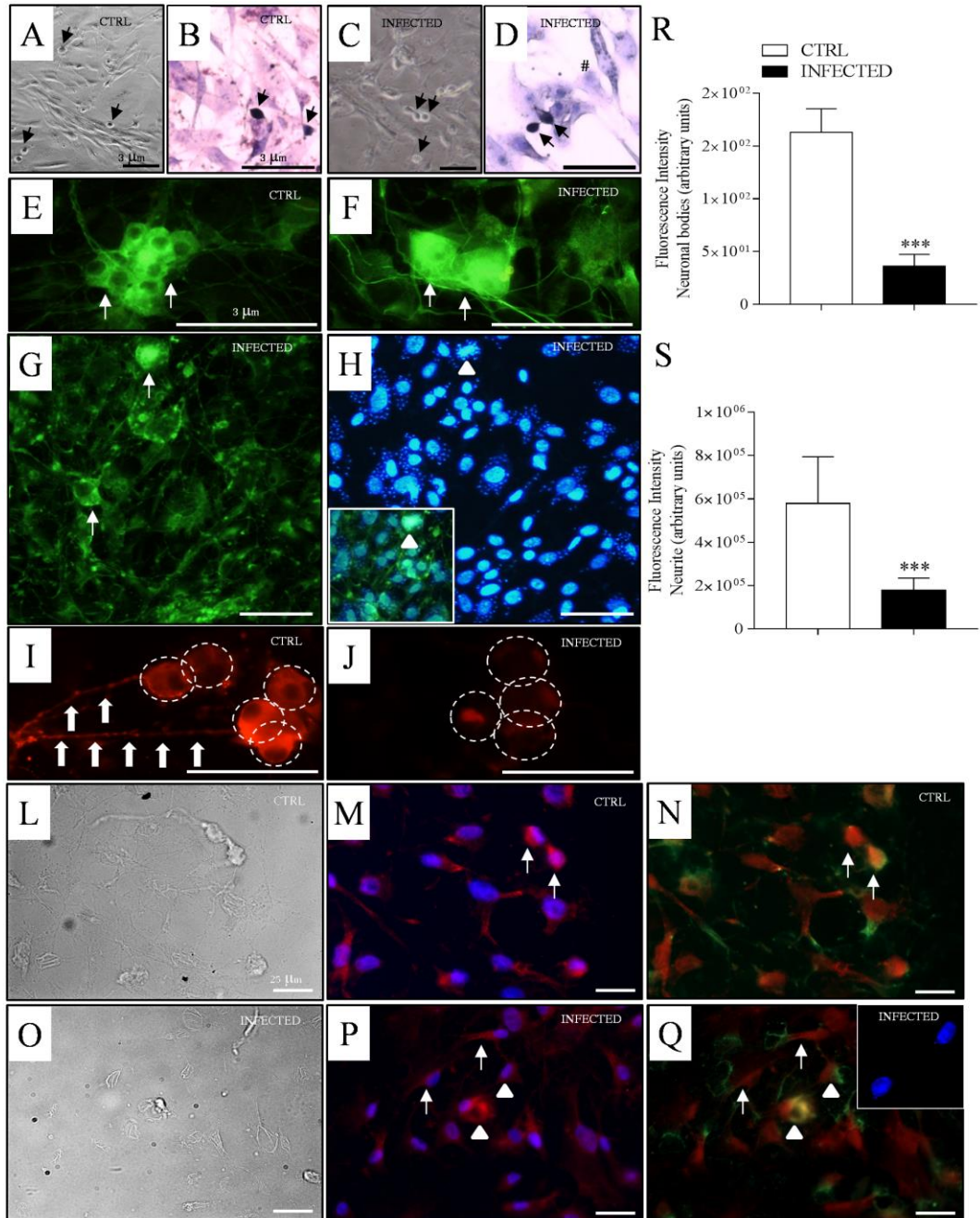


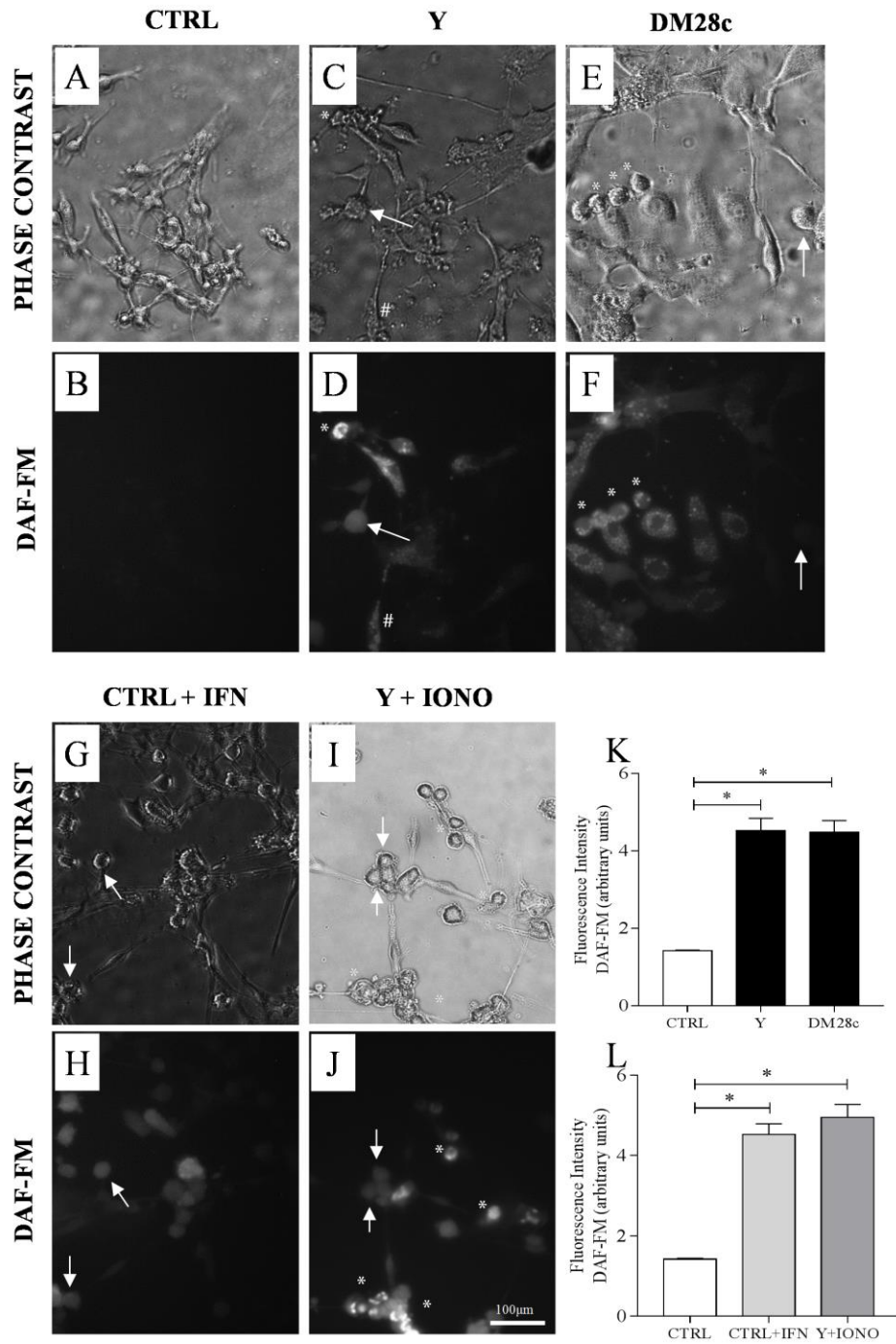


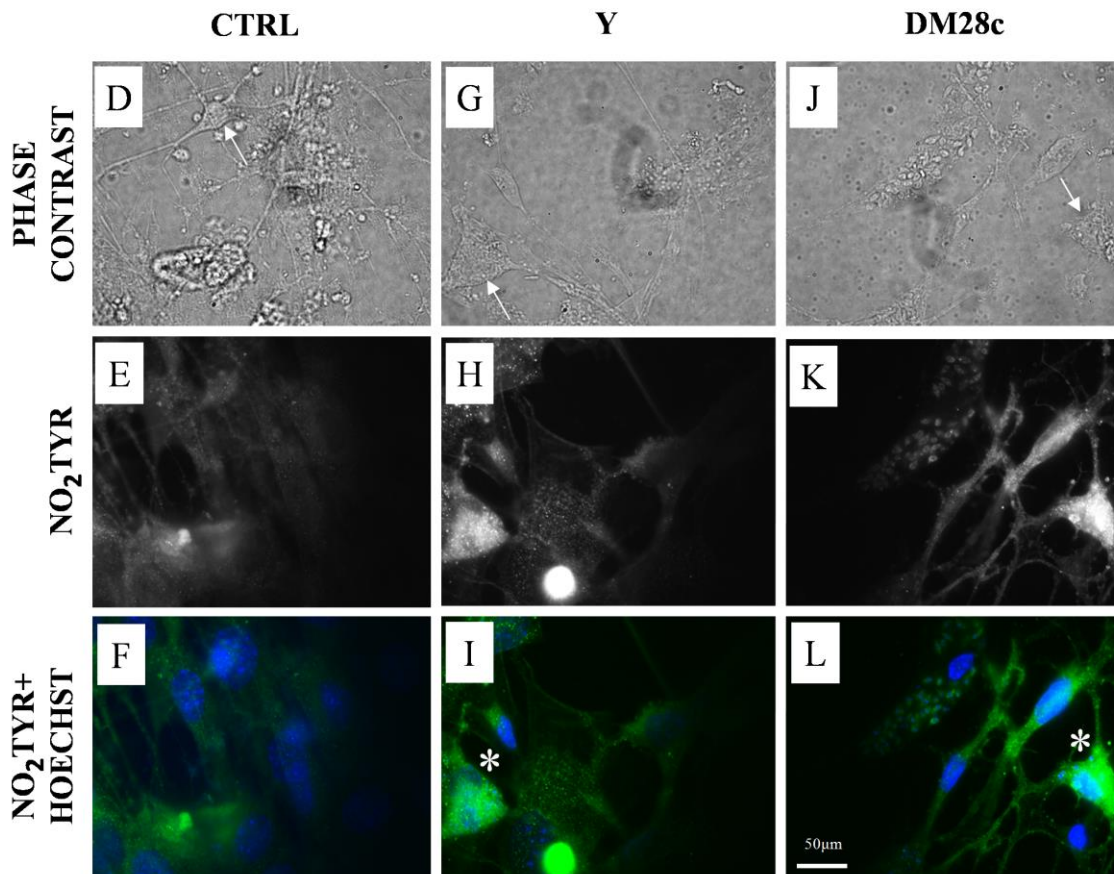
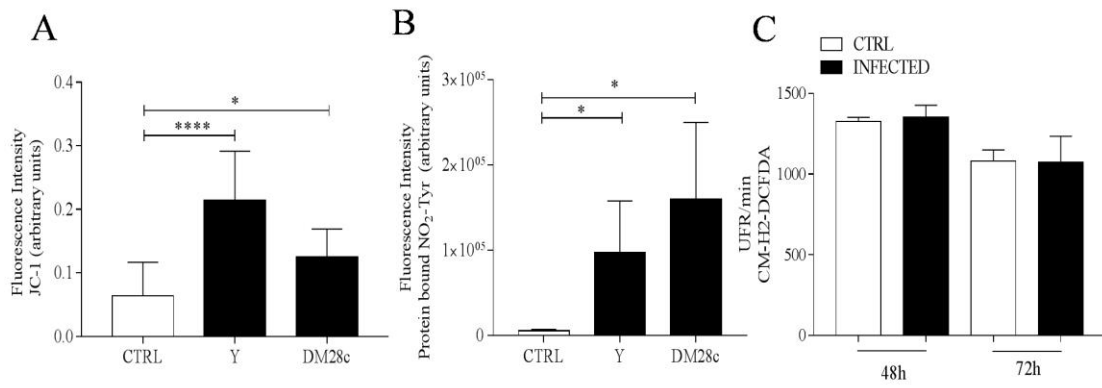


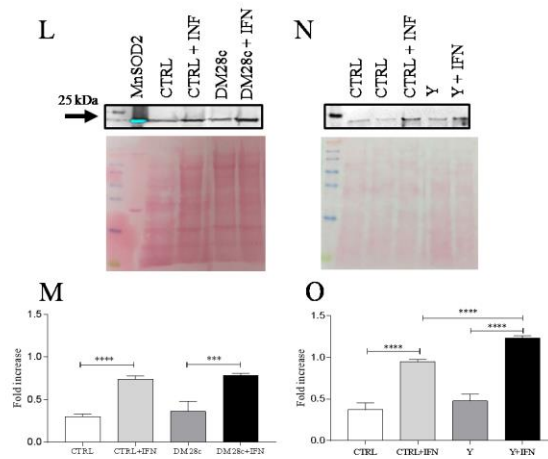
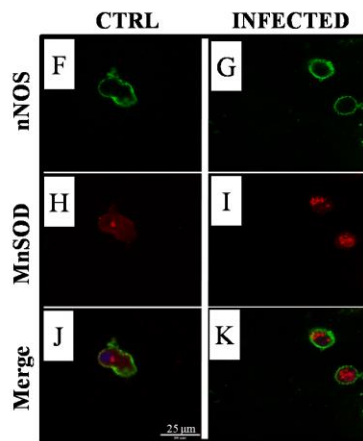
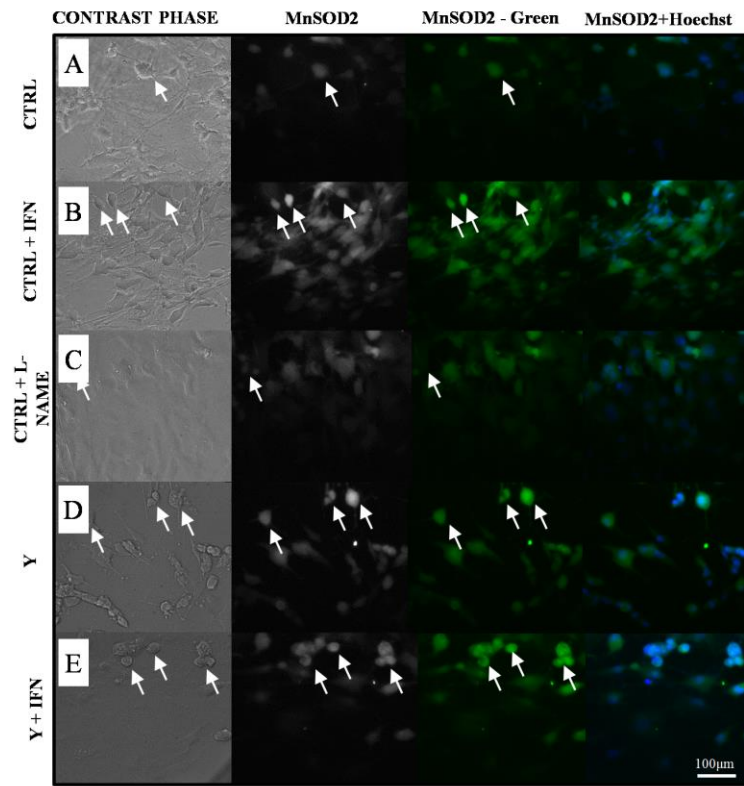












## 5. MANUSCRITO SUBMETIDO A PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES – COLABORAÇÃO

### PLOS Neglected Tropical Diseases

#### NOD2 receptor is crucial for protecting against the digestive form of Chagas disease --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PNTD-D-20-00421
Full Title:	NOD2 receptor is crucial for protecting against the digestive form of Chagas disease
Short Title:	NOD2 protects against digestive Chagas disease
Article Type:	Research Article
Keywords:	Chagas disease; Digestive chronic form; Trypanosoma cruzi; patients, innate immune receptors; NOD2
Corresponding Author:	Paulo Marcos Matta Guedes Universidade Federal do Rio Grande do Norte Natal, Rio Grande do Norte BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Nathalie de Sena Pereira
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Nathalie de Sena Pereira Tamyres Bernadete Dantas Queiroga Denis Dantas Silva Manuela Sales Lima Nascimento Cléber Mesquita de Andrade Janeusa Trindade de Souto Mayra Fernanda Ricci Rosa Maria Esteves Arantes Dario Simões Zamboni Egler Chiari Antonia Cláudia Jacome da Câmara Lúcia Maria da Cunha Galvão Paulo Marcos Matta Guedes
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Digestive and cardiodigestive forms of Chagas' disease are observed in 2% to 15% of the patients, but immunopathological mechanisms remain undefined. The aim of this work was to evaluate the role of NOD2 innate immune receptor in the pathogenesis of the digestive system in Chagas' disease. Patients with digestive form of the disease showed lower mRNA expression of NOD2, higher expression of RIP2 and $\alpha$ -defensin, compared to indeterminate form, detected by Real-time PCR in peripheral blood mononuclear cells. In addition, there was a negative correlation between the expression of NOD2 and the degree of dilation of the esophagus, sigmoid and rectum in those patients. The infection of NOD2 $-/-$ mice with Trypanosoma cruzi strain isolated from digestive patient induced decreased in intestinal motility. Histopathological analysis of the colon and jejunum of NOD2 $-/-$ and wild type C57BL/6 animals revealed discrete inflammatory foci during the acute phase of infection. Interestingly, during the chronic phase of the infection there was inflammation



## 6. MANUSCRITO 2 - EM PREPARAÇÃO (*Draft*)

### **British Journal of Pharmacology**

#### **Role of defective acetylcholine release on impaired colon motility in chronic intestinal Chagas's disease**

**Running title:** Impaired acetylcholine release in experimental chagasic megacolon

Mayra Fernanda Ricci<sup>1</sup>; Samantha Ribeiro Béla<sup>1,2</sup>, Ana Lia Mazetti<sup>3</sup> Terezinha Bahia<sup>3</sup>; Laila Horta<sup>4</sup>; Helton da Costa Santiago<sup>4</sup>; Luciano dos Santos Aggum Capettini<sup>5</sup>; Rosa Maria Esteves Arantes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas e Exatas, Universidade Federal de Ouro Preto.

<sup>3</sup>Escola de Medicina & Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Farmacologia Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

#### **Correspondence:**

Rosa Maria Esteves Arantes  
+55 31 34092896/2878  
[rosa.esteves.arantes@gmail.com](mailto:rosa.esteves.arantes@gmail.com); [rosa@icb.ufmg.br](mailto:rosa@icb.ufmg.br)

#### **Full address:**

Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Patologia Geral  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
Mail Box: 486  
31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil



**Background and Purpose:** Chagas' disease, caused by infection with *Trypanosoma cruzi*, may present as megacolon, a pathological dilation and hypertrophy of the colon wall that represent the main anatomic-clinical disorder concerning the digestive tract. The disorder is characterized by *T.cruzi*-induced structural damage to enteric nervous system (ENS) ganglionic neurons and to the innervation of gastrointestinal muscles resulting in motility dysfunction. The consequences of these structural injuries to the patterns of colonic contractile activity will herein be investigated using an experimental model of chagasic megacolon.

**Experimental Approach:** We developed a long-term murine model that reproduces the enlarged colon and its wall modifications and evaluated *in vivo* total intestinal and colonic transit time as parameter of peristalsis at acute and chronic phase. We also submitted colonic circular strips to organ baths assays at several time intervals between the acute phase at 11 days post-infection, and the chronic phase at 3, 7, 12, and 15 months post-infection in order to characterize the motor response to diverse stimuli. Enteric motor neurons (EMNs) were stimulated by electrical field stimulation (EFS) and amplitude of contractility was studied in presence of nicotinic and muscarinic ACh receptors inhibition. Western Blot (WB) analyses were realized to evaluate the expression of nicotinic and muscarinic receptors. Besides, we quantified the expression of excitatory and inhibitory neurotransmitters by RT-PCR.

**Key Results:** In studies of motility *in vivo* and electrophysiological and pharmacological tests *ex vivo*, we observed changes in the amplitude of contraction of smooth muscles, as well as their rhythmicity in chronic infection (15 m.p.i.). The pharmacological tests suggest changes in the functional response of the muscarinic receptor. In the acute phase, atropine blockade decreased the contractile response, with the opposite occurring in the chronic phase. Such responses in conjunction with the observation of decreased muscarinic receptor (WB) expression indicates structural damage in the chronic phase. The blockade of nicotinic receptors in the acute phase, on the other hand, led to an increase in the amplitude of contraction in infected animals, in correlation with increased expression of these receptors.

**Conclusion and Implications:** This study integrates the natural history of Chagas' disease in the acute and chronic phase and opens perspectives for the design of therapeutic interventions aimed at the pathogenic mechanisms of intestinal disease.

**Keywords:** Chagas' disease, megacolon, enteric neurons, smooth muscle, motility disorder, neurotransmitters, organ baths.

**Abbreviations:**

AP - Acute phase

BZ - Benznidazole

CAP - Control acute phase

CCP- Control chronic phase

CD - Chagas' disease

CP - Chronic phase

d.p.i. - Days post-infection;

EFS - Electrical field stimulation

ENS – Enteric nervous system

IAP – Infected acute phase

ICB – Institute of Biological Science

ICP – Infected chronic phase

m.p.i. - Months post-infection

*T.cruzi* - *Trypanosoma cruzi*

UFMG - University Federal of Minas Gerais

UFOP - University Federal of Ouro Preto

µm - micron

µM - micromolar

mM – millimolar

**What is already know**

- Chagas' Megacolon presents severe motility disorders associated with persistence of DNA parasite, damage to ENS, inflammation and hypertrophy of the colon wall.
- The motility disorders confers high morbidity to the affected Chagasic patients.

**What this study adds**

- The rhythmic patterns, controlled by the ICC's, are affected in the murine model of chagasic megacolon.
- Prolonged *T. cruzi* infection not only induces changes in myenteric excitatory neurons, but also affects the contractile mechanism in smooth muscle.
- |Our murine model of chagasic megacolon offers the opportunity to study motility disorders in CD and also allows to infer about motility disorders in other diseases.

## INTRODUCTION

The pathogenesis of intestinal Chagas' disease (CD) involves damage to the enteric nervous system (ENS) and may involve changes in intestinal motor patterns and neurotransmitters released by enteric neurons.

Gastrointestinal alterations such as megaesophagus and/or megacolon have been described since the 1950s (Koberle and Nador, 1955; Koberle, 1958) and represents the chronic, late manifestation of the disease after a long asymptomatic period. The megacolon is characterized by thickness, dilation and sometimes elongation of the intestinal wall which present considerable ENS damage and resulting denervation (Koberle, 1956; Adad et al., 2001, 2013; da Silveira et al., 2007).

Chronic constipation is the main symptom related to megacolon (Meneghelli, 1985; Lopes et al., 1988; De Oliveira et al., 1998; Bern et al., 2007). Manometric studies in chagasic patients have demonstrated the basal motility index and wave frequency of the sigmoid colon and rectum to be lower than in normal subjects, as well as changes in the migrating motor complex (MMC) and disappearance of postprandial motor phenomena in the colon and rectum. In addition, the studies show a lack of relaxation of the internal sphincter of the anus in the chagasic patients (Meneghelli et al., 1982; Meneghelli, 1985; Adad et al., 2001; Cavenaghi et al., 2008; Salvador et al., 2015), making important to study factors influencing intestinal dysmotility mechanism in this affection.

Gastrointestinal motility is the result of coordinated contractions of the two layers of circularly or longitudinally oriented muscle bundles in the alimentary canal. Smooth muscle cells form electrical and mechanical junctions that facilitate coordination of contractions but multiple levels of regulatory cells and mechanisms, including interstitial cells, motor neurons, hormones, paracrine substances and inflammatory mediators, are superimposed upon myogenic activity to generate normal and abnormal contractile behaviors (Sanders et al., 2012). The essential role of the ENS is the generation of inputs from enteric motor neurons that innervate smooth muscle cells and interstitial cells ensuring patterns of contractile activity in gastrointestinal muscles responsible for the progression of the contents along the intestine.

The origin of propulsive colonic motility is complex and involves the activation of extrinsic parasympathetic and sympathetic nerves and/or interneurons in the myenteric plexus, which supply excitatory and inhibitory enteric motor neurons (Hinds et al., 2006). The myenteric plexus presents a diversity of neurons with neurotransmitters of excitatory or inhibitory origin or both, which function is directly related to the control of the intestinal peristalsis machinery. The two main components responsible for peristalsis are acetylcholine, an excitatory neurotransmitter that has the capacity of muscular contraction, and nitric oxide, that induces relaxation of the intestinal smooth muscle (Bornstein et al., 2004). In the murine megacolon we previously observed a selective preservation of nNOS<sup>+</sup> neurons in detriment of cholinergic neurons (Ricci et al., 2016). Jabari and collaborators also described evidences for enhanced inhibitory neurotransmission in the human megacolon (Jabari et al., 2011).

All the above cited structural elements, embedded in the *tunica muscularis*, are affected by *T.cruzi*-induced inflammation, necrosis and denervation with potential implication on the anomalous pattern of the intestinal motility that installs along the megacolon development.

Although the extensive analysis of enteric neural circuits is well advanced (Dickson et al., 2007; Costa and Brookes, 2008; Furness et al., 2014; Spencer and Hu, 2020), the integration between the structural events and motor components behavior is still poorly understood along the course of CD and difficult to study even in experimental models.

We intend to study the effects of *T.cruzi*-induced inflammation and denervation in these circuits, using a long-term animal model (Campos et al., 2016) that reproduced progression of the colonic changes culminating in megacolon formation. For that we will perform studies of motility *in vivo* and electrophysiological and pharmacological tests *ex vivo*, in a time line along evolution of CD in correlation with the progressive structural changes affecting the ENS, neurotransmitters expression, intestinal smooth muscle phenotype and the contractile machinery. Our goal is investigate how the *T.cruzi*-induced intestinal pathology interfere with peristalsis and gastrointestinal

motility mechanisms resulting in the morbid symptoms of human megacolon (Salvador et al., 2015; Bafutto et al., 2017).

## **MATERIALS AND METHODS**

*In vivo* and *ex vivo* animal experiments complied with the principles established by guidelines and Brazilian Practice Directive for the Care and Use of Animals for Scientific and Didactic Purposes - DBPA (Notice MCTI No. 1 - CONCEA / MCTI). Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010; McGrath et al., 2015) and were approved by the Ethics Committee for Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) under protocol number 262/2016.

### **Experimental chagasic megacolon induced in mice by chronic *Trypanosoma cruzi* infection**

#### **Mice**

We used 4-week old Swiss female mice, supplied by the Bioterium of the Institute of Biological Sciences of UFMG, and kept in the Bioterium of the Federal University of Ouro Preto (UFOP) in plastic cages, in a room with controlled dry temperature (24 °C) under a light / dark cycle of 14 / 10 hours, with free access to conventional mouse food (Nuvilab® Nuvital, Brazil) and water.

#### **Experimental Procedures**

Inoculum preparation for animal infection was performed according to Brener (1962). Infection of the animals was done intraperitoneally with 50,000 blood trypomastigotes of *T. cruzi* strain Y at the Laboratory of Parasitic Diseases, School of Medicine, UFOP. Infection of all inoculated animals was confirmed by the presence of parasites in fresh blood 24 hours after inoculation.

Two independent experiments were performed. A total of 182 female Swiss mice were used and randomly divided into two groups. The non-infected control group was composed by 75 animals; 15 of them used as control acute phase group (CAP) and 60

used for chronic phase control group (CCP). One hundred seven animals were inoculated intraperitoneally with 50,000 blood trypomastigotes of the *T. cruzi* Y strain. 15 animals were euthanized at 11d.p.i and constituted the infected group of acute phase (IAP). The 92 remaining animals were treated orally with a single dose of 500 mg/kg body weight of Benznidazole (Lafepe, Brazil) according to Campos et. al. (2016) and were maintained up to 15 months post-infection (m.p.i.), thus composing the infected chronic phase groups (ICP). Animals were euthanized at 3, 7, 12, and 15 m.p.i. (ICP3, ICP7, ICP12, and ICP15 groups, respectively) so that the analysis of several parameters of megacolon development could be performed in correlation to the motility studies and electrophysiology assays. The non-infected age-matched chronic control groups were maintained in the same conditions and euthanized at appropriate months indicated as CCP3, CCP7, CCP12, CCP15. The animals did not show signal of sickness, pain distress, suffering or moribund conditions. Cervical dislocation euthanasia were performed by trained individuals using appropriate equipment.

### **Histopathological analysis and semi-quantitative score**

The colon of the mice was collected, separated from the mesentery, and washed in PBS (0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2) to remove fecal content. For histology, the entire colonic segment was extended with the serosa in contact with the filter paper to avoid mucosal damage. The segments were transferred to Bouin's solution plus 2% glacial acetic acid for 5 minutes. The pre-fixed colon was rolled up like a swiss roll with the mucosal side facing inwards to form rolls from the distal portion (anus) to the proximal end (cecum), as described before (Arantes and Nogueira, 1997). The rolls were kept in 10% formaldehyde for one week and then sectioned in half to trim the edges so that, after routine paraffin embedding, the microtomy resulted in samples of the entire length of the colon for subsequent H&E staining.

Using a bright field microscope, under the 20X objective, the entire extension of each colon (H&E stained) were subjected to semi quantitative analysis of inflammatory foci, parasitism, thickness of intestinal wall and smooth muscle degenerative changes. The score was plotted on a blue color scale. A sample of five representative animals from all



infected groups was evaluated at all time intervals (11d.pi. and 3, 7, 12 and 15 m.p.i). We attributed the score based in the intensity of the changes as 0, absence, 1, small changes, 2, intermediate, and 3 intense changes. Each row represents the group control, IAP, ICP3, ICP7, ICP12 and ICP15 and each column the histopathological aspects for the group in question (Figure 1g, see representation).

#### **Total gastrointestinal (GI) transit assay.**

Adult mice were fed by intragastric gavage with 300  $\mu$ l of 6% carmine red dye solution dissolved in distilled water containing 0.5% methylcellulose (Merck. USA). Mice then were placed into individual cages without bedding. A white sheet of paper covered the cage bottom to facilitate detection of carmine in fecal pellets. In order to analyze the total GI transit time (total motility) the time at which gavage took place was recorded as time 0. After gavage, fecal pellets were monitored at 10 minutes intervals for the presence of carmine red. Total motility time was considered as the interval between time 0 and the time of first observance of carmine red in stool.

#### **Colon motility assay**

After adult mice were anesthetized with isoflurane, a glass rod was used to insert a glass bead (3 mm in diameter; #Z143928, Sigma-Aldrich) into the rectum, 2 cm from the anal verge. The glass rod and beads were lubricated with glycerin (G1005.01.BJ, LabSynth) before insertion. The time required to eject the bead was measured as an estimate of colonic motility time (colonic motility).

We also evaluated the colonic and total motility in mice previously treated with the cholinesterase inhibitor pyridostigmine (1mg/kg, Sigma-Aldrich, USA

#### **Preparation of circular muscle strips and isometric tension recording**

The colonic segment was cut open longitudinally along the mesenteric border, the colon was cut into rings approximately 3 mm-long, two metal rods were pierced at the ends of the colon, one of these metal rods being affixed to an isometric tension transducer. The strips and they were placed in 10 mL organ baths filled with Krebs solution (37  $^{\circ}$ C,

bubbled with a mixture of 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>, pH 7.4). The Krebs solution contained (in mM: 110.8 NaCl, 5.9 KCl, 25.0 NaHCO<sub>3</sub>, 1.07 MgSO<sub>4</sub>, 2.49 CaCl<sub>2</sub>, 2.33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 11.51 glucose, pH 7.4). After mounting the rings on the equipment, they were subjected to a resting tension of 0.5g, constantly regulated over a period of one hour to stabilize the preparation (World Precision Instruments, Inc., USA) connected to an amplifier (TBM4M, WPI), which is coupled to a computer equipped with an analog-to-digital converter board. For data acquisition, the WinDaq Data Acquisition program (Dataq® Instruments, USA) was used. After an equilibration period of 1h (Gallego et al., 2006), strips developed spontaneous phasic contractions and the experiment started. In each experiment, up to four strips from the same specimen were simultaneously studied (Capettini et al., 2008). After the stabilization period, the preparations were challenged electrically or pharmacologically for contractility assays records.

### **Experimental design**

Our experiments included (a) the assessment of mechanical responses induced by the stimulation of EMNs by electric-field stimulation (EFS) and (b) the study of the contractility responses induced after drugs administrates. The EFS were applied by an electrical stimulator (Model SD9, Grass Technologies, Astro-Med, Inc.). The colons of the control and infected mice (all intervals) were subjected to an electrical stimulus in increasing order of frequency 0 , 5, 1, 5, 10 and 20 Hz (Aulí et al., 2008). Each stimulus was applied by placing silver electrodes attached to the organ bath for 10 seconds, followed by intervals of 1 minute and 30 seconds to 2 minutes before the application of the next stimulus of greater intensity (Farré et al., 2006). Simultaneously *on* and *off*-contraction waves were recorded with tension tracings through a synchronized transistor–transistor logic signal between the electrical stimulator Grass S88 and the computerized Biopac system. The *on*-contraction waves were characterized as the contractile responses developed during the application of the electrical stimulus. The *off*-contraction waves were characterized as the contractile responses after the end of the electrical stimulus (Figure 3g, see graphical representation). The latency (time in

seconds between the application of electrical stimuli and the beginning of the contractile response) of the *on*- and *off*-contraction waves and the amplitude for the *off*-contraction waves (characterized by the difference between the state of basal voltage and the peak contraction in g/mg) were measured.

For pharmacological tests, the strips were subjected to contraction with the muscarinic agonist acetylcholine (ACh, 10  $\mu$ M, Sigma A6625, USA). The preparations were then washed and stabilized for 15 minutes followed by incubation with the NO synthase enzyme inhibitor (L-NAME 300  $\mu$ M, Sigma N5751, USA) for another 15 min. In the presence of L-NAME, the preparations were again stimulated with acetylcholine (ACh, 10  $\mu$ M). The contractile activity of the stimuli listed above were measured, and indicated as amplitude (g / mg).

Tetrodotoxin (TTX, 100 nM, Sigma T8024, USA) was added to block the neural action potential by blocking sodium channels. Thus, treatment with TTX excludes the participation of enteric innervation in the contractile response induced by ACh. In order to inhibit the activity of nicotinic receptors, we used d-tubocurarine chloride (50  $\mu$ M, T-2379, Sigma, USA). We also inhibit NOS activity using L-NAME (300  $\mu$ M). Then, we add atropine (1  $\mu$ M, Sigma A0132, USA) in order to inhibit the activity of muscarinic receptors and assess whether the contractile effect of ACh is due to direct stimulation of muscarinic receptors on smooth muscle. We evaluated the amplitudes related to the combined pharmacological stimuli described below: ACh + TTX + atropine; ACh + TTX + Curare; ACh + TTX + L-NAME. After carrying out the experiments in isolated organ baths, the colons were carefully removed and left in an airy environment, for drying for 48 hours, followed by weighing.

### **Obtaining images**

For photographic documentation and to obtain the images needed for morphometric analysis, the slides were photographed using the Olympus BX51 direct light optical microscope equipped with Image-Pro Express 4.0 software (Media Cybernetics, USA) with a resolution of 1392 x 1040 pixels. Images were transferred via a Cool SNAP-

Proof Color camcorder to a computer-attached video system using Image-Pro Express version 4.0 for Windows (Media Cybernetics, USA).

We also obtaining imagens from macroscopic aspects in the colon from long-term murine model of chagasic megacolon from control and infected in 15 m.p.i.

### **Morphometric analysis**

Images (10X objective) were obtained by sampling the full length of the colon from the control and infected mice at all time intervals studied (11 d.pi., 3, 7, 12 and 15 m.p.i). For each image, three measurements ( $\mu\text{m}$ ) of the inner muscle layer thickness were obtained using the Image J 1.52 software (NIH, USA). The inner muscle layer was defined by the boundaries of the submucosal layer and the outer muscle layer (Fig. 1H). We expressed the data as mean and standard deviation of the thickness of the inner muscular layer as the index of colon wall thickness. All the analyses were conducted in blinded experiments.

### **Evaluation of the expression of cholinergic receptor proteins in colon fragments (*in vivo*)**

The expressions of mAChR M3 (sc-9108, Santa Cruz Biotechnology, USA) and AChR $\alpha$ 7 (sc-5544, Santa Cruz Biotechnology, USA) receptors in infected colon were evaluated and compared to the control. The colon was lysed in lysis buffer (NaCl 150 mmol / L; Tris 50 mmol / L; EDTA.2Na 5 mmol / L; MgCl<sub>2</sub> 1 mmol / L) plus 0.3% Triton X-100, 0.5 % of SDS and protease inhibitor cocktail (SigmaFast®, Sigma). The lysate was centrifuged at 14000 rpm for 20 minutes to separate the protein fraction. The amount of protein in the samples was measured by measuring the absorbance by spectrophotometry (260nm in Nanodrop®). The samples were diluted in sample buffer (4X 0.25M tris HCl, pH = 6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% b-mercaptoethanol, 0.25% Bromophenol Blue) and heated at 100°C for 5 minutes. For separation, 60  $\mu\text{g}$  of protein was applied on 10% SDS-PAGE gel [sodium dodecyl (lauryl) sulfate-polyacrylamide] using the Mini-Protean Tetra Cell system (Biorad). After being separated on the polyacrylamide gel (100V; 90 minutes), the proteins were transferred (100V; 100

minutes) to a nitrocellulose membrane with a 0.45 $\mu$ m pore (Millipore, USA). The membrane was then washed in distilled water and placed for 1 hour in blocking solution (3% albumin and 0.1% Tween-20, in TBS). After blocking, the membrane was incubated overnight at 4°C with the specific primary antibody diluted in blocking solution. The following primary antibodies were used: anti-mAChR M3 and anti-AChR $\alpha$ 7. Then, the membrane was washed with TBS containing 0.3% Tween 20 (TBS-T) for 5 minutes (three times) and incubated for two hours with secondary antibodies conjugated to Alexa fluor 488 fluorescent probes (1: 1000) diluted in 1% albumin in TBS-Tween. After the incubation period, the membrane was washed again in TBS-T (5 minutes three times) (Capettini et al., 2008). The bands were detected by a fluorescence reaction and their intensity was evaluated by densitometric analysis using the ImageJ 1.52 software.

#### **NK 1 receptor, ChAT, VIP and nNOS detection by real-time RT-PCR**

cDNA was obtained and conventional RT-PCR of footpads was performed as described previously (dos Santos et al., 2001). Each reaction was evaluated in 3 different numbers of cycles and the best condition chosen for representation. Real-time RT-PCR reactions were performed in the Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CFX Manager 3.1 Laboratories, Inc). PCR amplifications were carried out using SYBR@Green PCR Core Reagents Kit and performed as recommended by the manufacturer in a total volume of 20 mL containing 6 mL of cDNA. Each PCR amplification was performed in duplicate wells, using the following conditions: 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by a total of 45 two-temperature cycles (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C) followed by a dissociation stage for detecting unspecific product formation. No unspecific PCR product was detected. The cDNA was diluted to obtain CTs (“Arithmetic Fit Point Analysis for the Lightcycler”) between the 20th and 38th cycles. Primers (Applied Biosystems) for the target genes are listed below: NK1-foward: GGTCTGACCGCAAATCGAAC; NK1-reverse: AGAGCCTTTAACAGGGCCAC; ChAT-foward: AGGGCAGCCTCTCTGTATGA ChAT-reverse:

ATCCTCGTTGGACGCCATTT; VIP-foward: GCAAGATGTGGGACAACCTC VIP-reverse: CAGTCTGTTGCTGCTCATCC; nNOS-foward: ATGAAGTGACCAACCGCCTT and nNOS-reverse: AGCTGAAAACCTCATCTGTGTC. Data were normalized using GAPDH-foward: GACACCTTTGGCATTGTGG; GAPDH-reverse: ATGCAGGGATGATGTTCTG, amplified in the same assay plate.

### Statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the British Journal of Pharmacology recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). Normalization was performed in order to control the variations in the contractility amplitude values. Colon dry weight was used to normalize the records obtained in contractility experiments. The contractility amplitude values expressed in g were normalized by the dry weight in mg.

Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism program (v 7.0) (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). The Shapiro-Wilk test revealed that the parameters evaluated did not show a significant departure from normal distribution.

A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare treatments (Control vs. infected) and along time points (11d.p.i and 3, 7, 12, 15 m.p.i) in the thickness of muscle layer. The data of *ex vivo* contractility was plotted as the difference of contraction between the basal state and in response to ACh. The contraction data, in turn, will be expressed in g/mg dry tissue. The contractile responses were analyzed using the *two-way* ANOVA method. In the RT-PCR analysis of the neurotransmitters ChAT, nNOS, VIP and NK1, between the groups of infected acute and chronic phase and respective controls we used the *t* Student test. When a significant F value was found, we performed a post-hoc test according to the coefficient of variation (CV): Tukey (CV  $\leq$  15%) or Duncan (CV  $>$  30%). The  $\alpha$  level was set at 0.05. Data are shown as mean  $\pm$  SD.

### Drugs

Isoflurane (BioChimico®, Brasil), carmine red (Merck, USA) suspended in 0.5% methylcellulose (Merck, USA). Pyridostigmine, ACh, Tetrodotoxin (TTX), N( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), atropine, d-tubocurarine chloride were obtained from (Sigma-Aldrich, USA). All drugs were dissolved in Krebs solution. Drug and receptor nomenclature conform to the guidelines of the *British Journal of Pharmacology* (Alexander et al., 2011).

## RESULTS

### Natural history and pathological anatomy of the murine chagasic megacolon

The acute *T. cruzi*-induced intestinal histopathological changes were described before by our group (Arantes et al., 2004) and others (Meneghelli, 1985; González Cappa et al., 1987; Guillén-Pernía et al., 2001; da Silveira et al., 2007). Recently we proposed a chronic murine model which reproduces the structural changes of megacolon (Campos et al., 2016). In this work we reproduced the acute histopathological aspects of the infection in the colon by 11 d.p.i. (Figure 1b) detecting expressive presence of mono and polymorphonuclear cells, evident cell death and destruction of the intestinal wall tissue elements, including intramural ganglia and large areas of the *tunica muscularis*. Amastigote nests were present within preserved smooth muscle cells and isolated amastigotes were observed in the intersticium. We sampled all the extension of the colon as described before (Arantes and Nogueira, 1997), at 3, 7, 12 and 15 m.p.i. There was a progressive attenuation and modification of the acute inflammatory infiltrate along the time, and decreasing tissue parasitism. From 7 m.p.i. the infiltrate was predominantly mononuclear and there was remodeling of the circular smooth muscle with significant increase of the thickness of muscularis propria by 12 and 15 m.p.i. (Figure 1e and f). As visible the persistent of chronic inflammation is represented by small foci of mononuclear cells. There was an increasing of the staining of interstitial connective tissue (Figure 1e).

A semi-quantification score (Figure 1g) shows simultaneous changes of microscopic parameters along the experimental periods. While the acute inflammation, cellular

damage and parasitism tend to decrease over time, the chronic inflammation persists associated to increasing muscular wall thickness which was confirmed by morphometric evaluation (Figure 1h). There is macroscopic evidence of increase in the length of the intestine (megadolicocolon) in the infected mice by 15 m.p.i. in comparison to control (Figure 1i).

### ***T. cruzi* infection impairs intestinal motility**

To determine the effects of infection with *T. cruzi* on TGI we studied colonic motility (Figure 2a), total motility (Figure 2b), with or without piridostigmine (Figure 2c and d) in the acute phase (11 d.p.i) and chronic phase (3, 7, 12, and 15 m.p.i). The time taken to the expulsion of glass beads inserted into the rectum (in seconds) was used to evaluate to Colonic Motility Time (glass beads release time). The time (in minutes) from oral gavage to the first appearance of carmine red in fecal pellets was used to estimate Total Motility Time (Figure 2b and d). The two tests (colonic and total motility) were performed consecutively, before the euthanasia of animals.

The colon peristalsis was increased by infection in the acute phase (11 d.p.i) and chronic phase 3 m.p.i compared to their respective non-infected control, indicated by decreasing of the colonic transit time (glass beads release time). Considering the differences in the release time of beads between the acute infected and the chronic infected mice we noticed a significant decrease in peristalsis from ICP7 (Figure 2a).

The total motility time assessed by the carmine red was increased in IAP and ICP3 in comparison to their respective controls. These early times of our kinetic show significantly decreased total motility time than the later time (ICP7). Altogether our results indicate a colonic-derived impairment in the peristalsis

At the later chronic time-point (15 m.p.i.) we treated the animals with piridostigmine, an inhibitor of acetyl-cholinesterase that is known to increase the biodisponibility of



acetylcholine at the synaptic clefts. Piridostigmine-treated control animals compared to piridostigmine-treated infected ones decreased the colonic motility time indicating the enhanced action of the neurotransmitter (Figure 2c) only in non-infected animals. The total motility time of CCP15 group compared to the infected ones was also decreased indicating the effect of piridostigmine in the transit time (Figure 2d).

### **Infection decreases the electrically induced contractile responses**

Strips of the colon responded to low frequencies of electrical stimulation with *off* contractions, which appeared after the electrical stimulation. Amplitude of the response were enhanced with increasing frequencies of electrical stimulation above 5 Hz (Figure 3).

*EFS-induced off-contractions.* The amplitude of contractility in chronic phase control animals was significantly smaller compared to the acute phase control animals (Figure 3c and d). There was no difference in the latency of *off*-contractions compared to increasing electrical stimuli in any of the groups (Figure 3 a and b). The amplitude of *off*-contractions was significantly enhanced from of electrical stimulation for both acute and chronic groups. In the infected acute phase, the response of electrical stimulus was significantly decreased when compare to respective control (Figure 3a). In the chronic infected group, the response remains decreased.

*EFS-induced on-contractions.* In the acute phase, for the latency responses, the values were higher for the infected group, although without statistical difference in face of the increasing electrical stimuli (Figure 3e). However, in the chronic phase (15 months), we observed that the latency period in the chronic infected mice is significantly shorter when compared to their paired control at the frequency of 5 Hz, indicating a change also in the intestinal contractile rhythmicity (Figure 3f).

**Responses induced by stimulation of mAChR M3 and AChR $\alpha$ 7 and by blockage of NOS – The infection is associated to hyperresponsivity to the stimuli only in acute phase.**

The groups IFA and IFC3 showed increased amplitude when compared to their controls after ACh administration (Figure 4a).

L-NAME, a stereospecific NOS inhibitory drug, produces a decrease in amplitude values at all times analyzed both in control and infected, when compared to the administration of ACh only, except in the acute phase where the amplitude is significantly greater in animals infected when compared to their controls (Figure 30b).

In the presence of L-NAME (Figure 30c) the preparation was treated with ACh and it was observed that in the acute phase the amplitude is significantly greater in infected animals compared to their paired controls. The administration of ACh annulled the NO blocking effect at all times, producing a response similar to that represented in figure 30a (pharmacological stimulus only with ACh) without statistically significant difference.

### **Responses induced by TTX and antagonists of muscarinic and nicotine receptors**

In order to better investigate the elements of the contractile response in association with the structural changes in our *T.cruzi*-induced megacolon model we performed pharmacological assays in the IAP and ICP15 (Figure 5).

The amplitude was significantly increased in the IAP group compared to control and also when we compared to IFC15 (Figure 5a).

The administration of atropine, a muscarinic antagonist known to inhibit parasympathetic nerve endings, decreased the amplitude of contraction previously induced by ACh in the IAP and when we compared IAP to ICP15 (Figure 5a). However, the pharmacological blockade of these receptors did not interfere in the amplitude of contraction between infected and controls in both phases. As the activation of cholinergic neurons by ACh could also increase muscle contraction, so, we used TTX (blocking action potentials in the nerves). TTX did not induce difference in contractility between control and infected groups. In the presence of neural block the addition of atropine resulted in decreased amplitude in IAP and ICP15 group when we compared to neural block only. In the presence of double block, there was an increase in amplitude in ICP15 compared to CCP15.

TTX neural block and additional nicotinic receptor blockade (d-tubocurarine chloride) induced an increase in the contractile response in IAP and ICP15 group (Figure 5c).

The administration of TTX associated with L-NAME promoted a decrease in amplitude in all control or infected groups (Figure 5d) in comparison to the isolated neural block group.

The expression of M3r and  $\alpha$ -7 receptors by Western Blot analysis in the colon of control and infected mice of AP and CP15 m.p.i., showed that the IAP group was increased expression of both receptors when compared to their respective non-infected controls. The increased expression of the M3r receptor occurs when we compared IAP with ICP15. The ICP15 group showed a significant decrease in the expression of M3r and  $\alpha$ -7 when compared to the control (Figure 5a and b).

### **Expression of excitatory and inhibitory neurotransmitters of the colon of the control and infected group**

The expression of the receptor for the excitatory neurotransmitter NK1, a substance P receptor, showed a significant reduction in the ICP3 and ICP12 compared to their controls. The ICP3, ICP12 and ICP15 m.p.i., also reduced the expression of NK1 when compared to the IAP group (Figure 6a). The expression of the enzyme choline acetyltransferase (ChAT), responsible for the synthesis of the neurotransmitter ACh, significantly decreased when compared ICP15 with CCP15 (Figure 6b).

For the receptor of the inhibitory neurotransmitter VIP, there was a significant decrease CCP15 compared to ICP15 group. ICP12 and ICP15 showed reduced VIP expression compared to IAP. There is also a reduction in VIP expression in ICP15 compared to ICP3 and ICP7 (Figure 6c). The nNOS, showed a significant decrease expression in IAP and ICP15 compared to their respective controls (Figure 6d).

### **Discussion**

This is the first work that study patterns of stimulation in a long-term murine model from chagasic megacolon. We assessed the amplitude of responses induced by stimulation of EMNs by EFS and the study of the responses induced by ACh, antagonists of mAChr M3, nAChr and effects of NOS inhibitory. Besides we used the *in vivo* approach to showed a commitment of colonic and total gastrointestinal transit related to alterations in a cholinergic system.

We observed *in vivo* motility disorders associated with evidence of decreased ACh biodisponibility at synaptic clefts, decreased expression of ChAT and receptor of substance P (NK1) in infected animals, especially in the later stages of the disease.

In the IAP group, hyperresponsiveness to acetylcholine administration is observed, which is not affected by the pharmacological blockade of NO by L-NAME. The long term *T.cruzi* infection not only induces alteration in the myenteric excitatory neurons but also affects the contractile mechanism in the smooth muscle. There was also a decrease in VIP and nNOS expression in infected animals, showing that other structures of the colon may be altered, such as the submucosal plexus.

Our pathological anatomic findings reproduce the aspects of this model (Campos et al., 2016) and confirm the model reproducibility. The intense parasitism and destructive inflammation of the acute phase of the infection is followed by progressive thickness of the colon wall which become evident histologically and quantitatively from 12 m.p.i. (Figure 1h). The progression of inflammation decreases but persists along the experiment. The macroscopic aspects observed also showed an increase in colon length (megadolicocolon) when compared to the control indicating the substantial plasticity of the organ.

The intestinal circuitry is extremely complex, and can be approached by *in vivo* motility studies and complementarily by muscle strips preparations for isometric tension recording. The origin, regulatory mechanisms and spatial and temporal characteristics of intestinal wall contractions are not fully understood, limiting the development of

specific drugs to treat colonic motor disorders (Sarna and Shi, 2006), and the understanding of intrinsic mechanism of lesion in chagasic megacolon.

Our *in vivo* studies showed decreased colonic motility time in the IAP and ICP3 groups compared to their controls, indicating a hyperresponsiveness of the tunica muscularis, probable due to the intense acute inflammation associated to necrosis noted at these times. After that there is a progressive impairment of the motility. The total motility time was increased in the IAP and ICP3 groups. In the latter times, we detect increased in total motility time by ICP7 indicating the beginning of functional impairment of peristalsis, even that at this time we still did not detected significant structural changes or plasticity of the wall, except for the changes in the inflammatory infiltrate profile. The beginning of functional changes noticed from 7 m.p.i. indicated that interventions should be planed before the functional impairment is installed.

In the literature circular strips of human colon developed, *ex vivo*, responded to EFS with two distinct patterns of contractile responses of neural origin: (a) a phasic contraction, which began during EFS (*on*-contractions) or (b) a phasic contraction, which began after EFS (*off*-contractions). The same pattern of *on*- and *off*-contractions was observed in ours analysis. The amplitude of EFS-induced *on*- and *off*-contractions depends on the stimulation of excitatory EMNs releasing ACh and tachykinins, mainly acting on muscarinic and NK2 receptors located on smooth muscle cells (Aulí et al., 2008). Indeed, we observed that the amplitude of the contractile responses initiated after the application of the electrical stimulus (*on*-contractions), in the infected groups of both acute and chronic phases decreased in relation to the control, indicating functional changes in the cholinergic system.

The *on*-contraction latency in the IAP15 group is lower compared to its control. *On*-contractions are caused by the selective stimulation of enteric motor neurons and are practically abolished through the addition of drugs such as atropine and tachykinin antagonists (Anand and Paterson, 1994). The cholinergic excitatory component of contractions induced by electrical stimuli observed in the colon of mice has been previously described by several authors in human models (Venkova et al., 2002; Hinds

et al., 2006; Celtek et al., 2007), so the lack of response observed in ICP15 in our murine model may be related to changes in the cholinergic excitatory system modified by the installation of the megacolon.

Complementarily the organ bath assays demonstrated that acute infection with *T. cruzi* strain Y caused hyperresponsiveness to contractile agents of the smooth colonic musculature (ACh) what is associated to the inflammatory-induced necrosis and destruction predominantly of the circular smooth muscle. As the originally diffuse inflammatory process in the acute phase becomes more focal and a gradual development of hypertrophy of the muscular layer is noticed there was a gradual reduction of muscle hyperresponsiveness between 3 and 15 m.p.i., however the assays did not detected differences with the control animals. So, our contractile data in isolated organ bath systems suggest that smooth intestinal musculature remains responsive to ACh even 15 m.p.i. The exogenous application of ACh was able to induce contraction at the same levels obtained in the control animals. Thus, our data consistently suggest that the intestinal smooth muscle is hyperresponsive in the acute phase and 3 m.p.i of infection and that between 7 and 15 m.p.i possible regulatory mechanisms inherent to the tissue adaptation to infection may normalize the contractile response to ACh.

The hyperresponsiveness in the acute phase led us to question whether the intense and diffuse inflammatory infiltrate could be regulating the contractile response to ACh.

NO is an important neurotransmitter and mediator of the acute inflammatory process, aiding in the defense process against pathogens including vasodilation and increased local vascular permeability. When assessing the role of NO we have to consider the NO produced in response to infection and the constitutive nNOS-derived NO. We pharmacologically assessed the contractile response pattern to ACh in colon fragments preincubated with the NOS inhibitor, and observed an increase in the basal contractile response to inhibition of NOS. However, the contractile response to ACh was preserved from 3 months after inhibition of NOS, indicating that the probably source of NO that was blocked originated from the acute inflammation (Arantes et al., 2004) which decrease and change to a chronic infiltrate after 3 months that did not stain for iNOS in

our hands (Campos et al., 2016). These data corroborate with data from the literature demonstrating that the increase in NO production is directly associated with a reduction in smooth muscle contractility in various inflammatory bowel conditions such as inflammatory colitis and Chron's disease (Boughton-Smith et al., 1993; Rachmilewitz et al., 1995). In addition, the inhibition of NO production did not potentiate ACh-induced contraction in the acute phase of infection.

The production of excitatory and inhibitory neurotransmitters are of great importance for the balance of intestinal functionality. Studies in patients and animals with megacolon have shown that neuronal NO is preserved (Jabari et al., 2011; Ricci et al., 2016) and that there is evidence of loss of ACh (Jabari et al., 2011). Based on the importance of the cholinergic system in the control of colonic contractility, we evaluated the effect of peripheral cholinesterase inhibition with the reversible pyridostigmine inhibitor. This drug is used to improve muscle strength in patients with muscle disease and works by preventing the breakdown of acetylcholine that is needed for normal muscle function. When we orally administered this drug to our animals, we observed a significant increase in the colonic motility time in the ICP15 compared to its control, indicating that even when the bioavailability of ACh was improved the colonic transit of infect animals did not improve suggesting a downregulation of the cholinergic system in megacolon mice. These data conflict with literature studies superficially suggesting a deficiency in the intestinal cholinergic system in the chronic phase of Chagas' disease (Jabari et al., 2011, 2012). Also, it showed that the contractility capacity of the smooth muscle may be affected despite or even because of its hypertrophy. The total motility time was affected by the drug administration at the same pattern, reinforcing our data. Altogether our results indicate a colonic-derived impairment in the peristalsis associated with acute inflammation in the beginning of the kinetic and damage to the EMNs and smooth muscle at later times.

Excitatory neuromuscular transmission seems to be mostly cholinergic in the gastrointestinal tract (Sarna and Shi, 2006) however, some recent studies have

suggested that tachykinins may be the main excitatory neurotransmitters in human sigmoid colon (Cao et al., 2000, 2006). Both NK1 and NK2 receptors are expressed in human colon smooth muscle and the most prominent subtype involved in colonic contraction is not fully understood (Lecci et al., 2006). In addition, little is known about the regulatory mechanisms of excitatory and inhibitory neuromuscular transmission that control motility in human sigmoid colon (Grider, 1989; Hinds et al., 2006; Celtek et al., 2007). Sacral parasympathetic neurons and interneurons have been shown to provide excitatory input to EMNs in the myenteric plexus, synapsing with nicotinic ACh receptors (nAChRs) on excitatory and inhibitory intrinsic EMNs (Venkova et al., 2002; Sarna and Shi, 2006).

In this study, the amplitude was affected by atropine probably by the changes in basal tone of smooth muscle cells, excitability of ICCs or blockade of minimal amounts of neurotransmitters released by EMNs through potential action-independent mechanisms. The TTX effect with atropine showed decrease in the amplitude. Specifically in the chronic phase group, the amplitude of contractile waves was almost zero in the control group, indicating that the observed contraction comes from muscarinic receptors activated by ACh in the musculature, and that when we compare the infected chronic phase 15 m.p.i. it exhibits a statistically significantly increased amplitude when compared to its control. The amplitudes observed in the ICP15 may indicate that there are other possible sources of contraction in the intestinal smooth muscle. The increase in amplitude in the IC15 could be explained by the loss of intramuscular fibers, which was observed *in vivo* in the infected animals of the chronic phase. Associated with this loss, we also observed decreased expression in WB analysis of M3 and  $\alpha$ -7 receptors in chronic infected tissues when compared to their control. With denervation, some contraction mechanism that was peripherally inhibited at the synapse or in the fiber, may be prevented, releasing the contraction even in the presence of ACh receptors. Another type of neurotransmitter, for example, an inhibitor or relaxant other than ACh would also be absent, releasing the inhibition. Thus, we suggest that there could also be the participation of another type of cholinergic receptor in the colonic smooth muscle. Studies in the 1990s reported that inhibitory neurotransmission in



human colon EMNs involves a nitrergic and non-nitrergic and apamine-sensitive neurotransmitter, probably ATP or a related purine (Boeckxstaens et al., 1993; Keef et al., 1993).

The drug d-tubocurarine, after blocking with TTX, showed that in the IAP group a statistically significant increase in amplitude. Functional studies using isolated segments of guinea pig intestine *in vitro* have shown that nAChRs participate in the ascending and descending pathways of the excitatory motor reflex and also in the longitudinal and circular muscles (Spencer et al., 2000). These studies have shown that the contractions caused by mucosal stimulation through the upward excitatory reflex was inhibited (but not blocked) by a nAChR antagonist, hexamethonium. These data indicated that nAChR activation is the predominant mechanism of upward neurotransmission in the myenteric plexus (Costa et al., 2000; Spencer et al., 2000) However, neurotransmission to muscle layers in descending excitatory pathways was largely resistant to hexamethonium, indicating that nAChRs make a minor contribution to neurotransmission in descending pathways in the small intestine of guinea pigs (Monro et al., 2002). In our results, we can conclude that in fact the acute infection alters the pathways of the excitatory motor reflex, we can suggest that the descending pathway would be the most dysfunctional according to the contractions observed even after the use of a nicotinic receptor blocker in the intestinal smooth muscle. However, we need more specific and isolated tests to fully characterize electrophysiology in the colon of mice in our megacolon model.

The administration of TTX followed by NOS blocker, LNAME, did not show differences in contractile amplitudes, probably the inhibition that L-NAME produces can mediate the neuronal NO pathway that is inhibited by TTX block, and it is not possible to observe differences in contraction amplitudes.

The expression of the receptor for the excitatory neurotransmitter SPR (NK1) was studied on our kinetic and we could detect significant decreased at some time points compared to their controls (Figure 6a). Also, excepted for the 7 m.p.i all the chronic groups presented reduction in the expression of the NK1 when compared to the IFA group (Figure 6a). Since both NK1 and NK2 receptors are expressed in human colon

smooth muscle (Lecci et al., 2006) we could suggest that the excitatory mechanism of colonic contraction in chagasic megacolon may be impaired at this cellular level.

We also analyzed the curve of ChAT expression along the development of megacolon. This indirect indicator of cholinergic activity was significantly decreased in IFC15 group compared to its non-infected control (Figure 6b) corroborating a role for this marker in the cholinergic dysfunction in our model. The VIP expression, an inhibitory neurotransmitter, was significantly decreased by 15.m.p.i compared to the controls. Also, the infected animals presented progressive reduction of the VIP expression along the experimental times from 3 m.p.i. (Figure 6c). The nNOS expression, an inhibitory neurotransmitter, had significantly decreased by 15.m.p.i compared to the controls (Figure 6d) and may reflect the damage or modification of the nitrergic system at the submucosal enteric plexus (Montedonico et al., 2006) differently of the myenteric ganglia where we found relative increase of this subtype of neuron in the chagasic megacolon (Ricci et al., 2016) by immunohistochemistry. Studies in the 1990s reported that inhibitory neurotransmission in human colonic EMNs involves a nitrergic as well as a non-nitrergic and apamin-sensitive neurotransmitter, probably ATP or a related purine (Boeckxstaens et al., 1993; Keef et al., 1993). In human Chagas disease the co-application of the pan-neuronal marker HU or PGP9.5 has enabled to discriminate the relative increase of the nitrergic/VIP-ergic subpopulation from its absolute decrease (Ribeiro et al., 1998; Jabari et al., 2011) in presence of decreased cholinergic neurons and nerve fibers, but other neurotransmitter need to be investigated.

In our previous structural findings of increased relative numbers of nitrergic neurons in murine chagasic megacolon (Ricci et al., 2016) with evidences for decreased expression of VIP and nNOS when the megacolon is structurally and functionally well characterized, we cannot conclude that the inhibitory neurotransmission is enhanced as a mechanism for the constipation and dilation of the colon. Neuromuscular neurotransmission in the human and animal colon has not been fully characterized. Our functional studies of motility in the murine chagasic megacolon are innovative and may contribute to further explore this important aspect of neurogastroenterology.

### **Author Contributions**

M.F. Ricci: experimental design, experimental procedures, and manuscript preparation; S.R. Béla, experimental procedures; A.L. Mazetti: experimental procedures; M.T. Bahia: experimental design and manuscript preparation; L.H. Horta: experimental procedures; H.C. Santiago: experimental design and manuscript preparation; L.S.A. Capettini: experimental design and manuscript preparation and R.M.E. Arantes: experimental design, experimental procedures, and manuscript preparation.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq Universal Grant, CNPq Research scholarship, CAPES Doctorate Scholarship, and FAPEMIG (PPM, Universal and PRONEX grants).

Prof. Jader dos Santos Cruz, Department of Biochemistry and Immunology, ICB/UFMG to provide the TTX drug.

### **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interests.

### **ORCID**

<https://orcid.org/0000-0003-1428-9717>

### **Declaration of transparency and scientific rigour**

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the BJP guidelines for **Design & Analysis, Immunoblotting and Immunochemistry and Animal Experimentation**, and as recommended by funding agencies, publishers and other organizations engaged with supporting research.

## References

- Adad, S.J., Cançado, C.G., Etchebehere, R.M., Teixeira, V.P., Gomes, U.A., Chapadeiro, E., et al. (2001). Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch.* 438: 254–8.
- Adad, S.J., E Silva, G.B., and Jammal, A.A. (2013). 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: 127.
- Alexander, S.P.H., Mathie, A., and Peters, J.A. (2011). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br. J. Pharmacol.* 164 *Suppl*: S1-324.
- Almeida-Leite, C.M. de, Galvão, L.M. da C., Afonso, L.C.C., Cunha, F. de Q., and Arantes, R.M.E. (2007). Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Neurobiol. Dis.* 25: 170–8.
- Anand, N., and Paterson, W.G. (1994). Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. *Am. J. Physiol.* 266: G123-31.
- Arantes, R.M., and Nogueira, A.M. (1997). Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res.* 290: 61–9.
- Arantes, R.M.E., Marche, H.H.F., Bahia, M.T., Cunha, F.Q., Rossi, M.A., and Silva, J.S. (2004). Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am. J. Pathol.* 164: 1361–8.
- Aulí, M., Martínez, E., Gallego, D., Opazo, A., Espín, F., Martí-Gallostra, M., et al. (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 155: 1043–55.
- Bafutto, M., Luquetti, A.O., Gabriel Neto, S., Penhavel, F.A.S., and Oliveira, E.C. (2017). Constipation Is Related to Small Bowel Disturbance Rather Than Colonic Enlargement in Acquired Chagasic Megacolon. *Gastroenterol. Res.* 10: 213–217.
- Bern, C., Montgomery, S.P., Herwaldt, B.L., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., Dantas, R.O., et al. (2007). Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. *JAMA* 298: 2171.
- Boeckxstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Herman, A.G., and Maercke, Y.M. Van (1993). Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. *Gastroenterology* 104: 690–7.
- Bornstein, J.C., Costa, M., and Grider, J.R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 *Suppl 1*: 34–8.
- Boughton-Smith, N.K., Evans, S.M., Hawkey, C.J., Cole, A.T., Balsitis, M., Whittle, B.J., et al. (1993). Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet (London, England)* 342: 338–40.
- Brener, Z.B.Z.T. activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *T. cruzi*. R.I.M.T.S.P. [Internet]. 1962;4:389–96. A. from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1401523>. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4: 389–96.
- Campos, C.F., Cangussú, S.D., Duz, A.L.C., Cartelle, C.T., Noviello, M. de L., Veloso, V.M., et al. (2016). Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as

Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS One* 11: e0153038.

Cao, W., Harnett, K.M., and Pricolo, V.E. (2006). NK2 receptor-mediated spontaneous phasic contractions in normal and ulcerative colitis human sigmoid colon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317: 1349–55.

Cao, W., Pricolo, V.E., Zhang, L.J., Behar, J., Biancani, P., and Kirber, M.T. (2000). Gq-linked NK2 receptors mediate neurally induced contraction of human sigmoid circular smooth muscle. *Gastroenterology* 119: 51–61.

Capettini, L.S.A., Cortes, S.F., Gomes, M.A., Silva, G.A.B., Pesquero, J.L., Lopes, M.J., et al. (2008). Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295: H2503-11.

Cavenaghi, S., Felicio, O.C. da S., Ronchi, L.S., Cunrath, G.S., Melo, M.M.C. de, and Netinho, J.G. (2008). Prevalence of rectoanal inhibitory reflex in chagasic megacolon. *Arq. Gastroenterol.* 45: 128–31.

Cellek, S., Thangiah, R., Bassil, A.K., Campbell, C.A., Gray, K.M., Stretton, J.L., et al. (2007). Demonstration of functional neuronal beta3-adrenoceptors within the enteric nervous system. *Gastroenterology* 133: 175–83.

Costa, M., and Brookes, S. (2008). Architecture of enteric neural circuits involved in intestinal motility. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 12 *Suppl* 1: 3–19.

Costa, M., Brookes, S.J., and Hennig, G.W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 *Suppl* 4: iv15-9; discussion iv26.

Curtis, M.J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J.R., George, C.H., Giembycz, M.A., et al. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br. J. Pharmacol.* 175: 987–993.

Dickson, E.J., Spencer, N.J., Hennig, G.W., Bayguinov, P.O., Ren, J., Heredia, D.J., et al. (2007). An enteric occult reflex underlies accommodation and slow transit in the distal large bowel. *Gastroenterology* 132: 1912–24.

Farré, R., Aulí, M., Lecea, B., Martínez, E., and Clavé, P. (2006). Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 1238–48.

Furness, J.B., Callaghan, B.P., Rivera, L.R., and Cho, H.-J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 817: 39–71.

Gallego, D., Hernández, P., Clavé, P., and Jiménez, M. (2006). P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G584-94.

González Cappa, S.M., Sanz, O.P., Muller, L.A., Molina, H.A., Fernández, J., Rimoldi, M.T., et al. (1987). Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 41–5.

Grider, J.R. (1989). Identification of neurotransmitters regulating intestinal peristaltic reflex in humans. *Gastroenterology* 97: 1414–9.

Guillén-Pernía, B., Lugo-Yarbuh, A., and Moreno, E. (2001). [Digestive tract dilation in mice infected with *Trypanosoma cruzi*]. *Invest. Clin.* 42: 195–209.

- Hinds, N.M., Ullrich, K., and Smid, S.D. (2006). Cannabinoid 1 (CB1) receptors coupled to cholinergic motoneurons inhibit neurogenic circular muscle contractility in the human colon. *Br. J. Pharmacol.* *148*: 191–9.
- Jabari, S., Silveira, A.B.M. da, Oliveira, E.C. de, Neto, S.G., Quint, K., Neuhuber, W., et al. (2011). Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon. *Histochem. Cell Biol.* *135*: 47–57.
- Jabari, S., Silveira, A.B.M. da, Oliveira, E.C. de, Quint, K., Neuhuber, W., and Brehmer, A. (2012). Preponderance of inhibitory versus excitatory intramuscular nerve fibres in human chagasic megacolon. *Int. J. Colorectal Dis.* *27*: 1181–9.
- Keef, K.D., Du, C., Ward, S.M., McGregor, B., and Sanders, K.M. (1993). Enteric inhibitory neural regulation of human colonic circular muscle: role of nitric oxide. *Gastroenterology* *105*: 1009–16.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., and NC3Rs Reporting Guidelines Working Group (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* *160*: 1577–9.
- Koberle, F. (1956). Pathologische Befunde an den muskulären Hohlororganen bei der experimentellen Chagaskrankheit. *Zbl. Allg. Path. Path. Anat.* *95*: 321–329.
- Koberle, F. (1958). Megacolon. *J. Trop. Med. Hyg.* *61*: 21–4.
- Koberle, F., and Nador, E. (1955). [Etiology and pathogenesis of megaesophagus in Brazil]. *Rev. Paul. Med.* *47*: 643–61.
- Lecci, A., Capriati, A., Altamura, M., and Maggi, C.A. (2006). Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. *Auton. Neurosci.* *126–127*: 232–49.
- Lopes, E.R., Rocha, A., Meneses, A.C., Lopes, M.A., Fatureto, M.C., Lopes, G.P., et al. (1988). [Prevalence of visceromegalies in necropsies carried out in Triângulo Mineiro from 1954 to 1988]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *22*: 211–5.
- McGrath, J.C., McLachlan, E.M., and Zeller, R. (2015). Transparency in Research involving Animals: The Basel Declaration and new principles for reporting research in BJP manuscripts. *Br. J. Pharmacol.* *172*: 2427–32.
- Meneghelli, U.G. (1985). Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas e Biol.* *18*: 255–64.
- Meneghelli, U.G., Godoy, R.A. de, Macedo, J.F., Oliveira, R.B. de, Troncon, L.E., and Dantas, R.O. (1982). Basal motility of dilated and non-dilated sigmoid colon and rectum in Chagas' disease. *Arq. Gastroenterol.* *19*: 127–32.
- Monro, R.L., Bertrand, P.P., and Bornstein, J.C. (2002). ATP and 5-HT are the principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol. Motil.* *14*: 255–64.
- Montedonico, S., Sri Paran, T., Pirker, M., Rolle, U., and Puri, P. (2006). Developmental changes in submucosal nitrergic neurons in the porcine distal colon. *J. Pediatr. Surg.* *41*: 1029–35.
- Oliveira, R.B. De, Troncon, L.E.A., Dantas, R.O., and Meneghelli, U.G. (1998). Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Gastroenterol.* *93*: 884–889.
- Rachmilewitz, D., Stamler, J.S., Bachwich, D., Karmeli, F., Ackerman, Z., and Podolsky, D.K. (1995). Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and

Crohn's disease. *Gut* 36: 718–23.

Ribeiro, U., Safatle-Ribeiro, A. V, Habr-Gama, A., Gama-Rodrigues, J.J., Sohn, J., and Reynolds, J.C. (1998). Effect of Chagas' disease on nitric oxide-containing neurons in severely affected and unaffected intestine. *Dis. Colon Rectum* 41: 1411–7.

Ricci, M.F., Campos, C.F., Cartelle, C.T., Béla, S.R., Cangussú, S.D., Santiago, H. da C., et al. (2016). Nitroergic Myenteric Neurons are Spared in Experimental Chagasic Megacolon. *J. Neuroinfectious Dis.* 07:

Salvador, F., Mego, M., Sánchez-Montalvá, A., Morís, M., Ramírez, K., Accarino, A., et al. (2015). Assessment of rectocolonic morphology and function in patients with Chagas disease in Barcelona (Spain). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92: 898–902.

Sanders, K.M., Koh, S.D., Ro, S., and Ward, S.M. (2012). Regulation of gastrointestinal motility--insights from smooth muscle biology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9: 633–45.

Santos, P. V dos, Roffê, E., Santiago, H.C., Torres, R.A., Marino, A.P., Paiva, C.N., et al. (2001). Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* 3: 971–84.

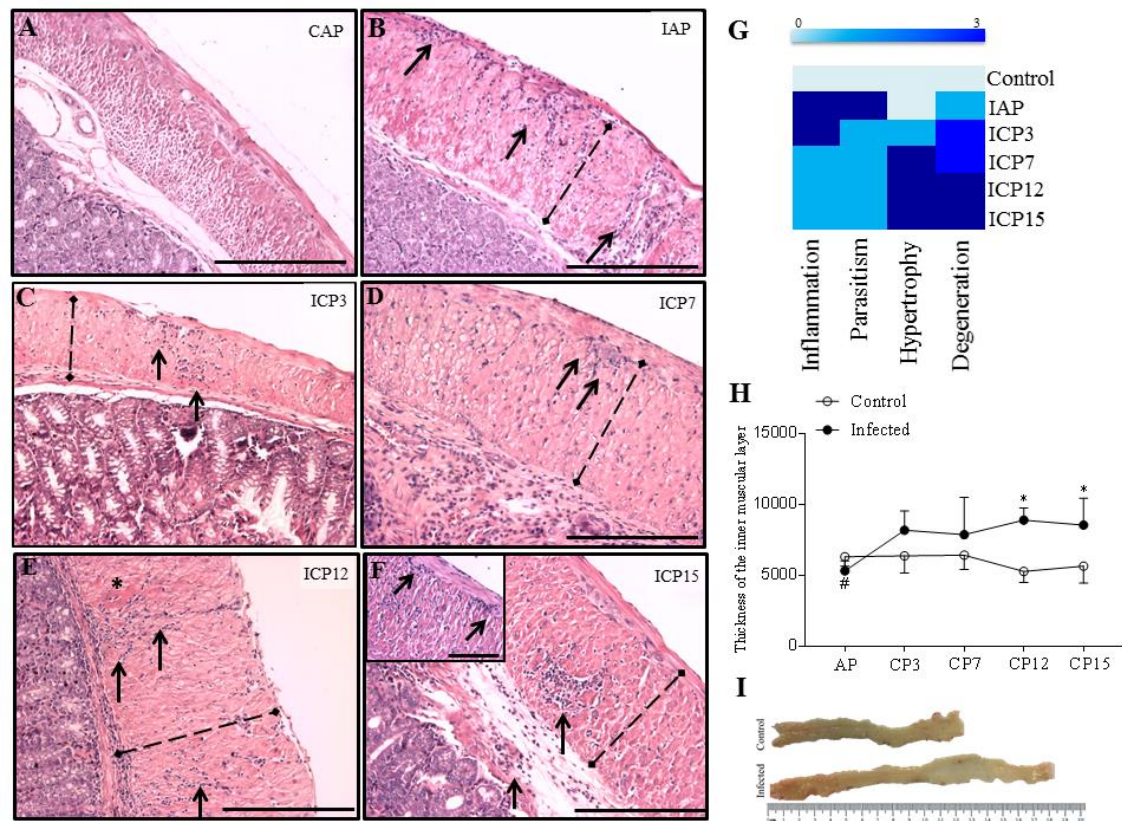
Sarna, S., and Shi, X. (2006). Function and regulation of colonic contractions in health and disease (*Physiology of the Gastrointestinal Tract*).

Silveira, A.B.M. da, Lemos, E.M., Adad, S.J., Correa-Oliveira, R., Furness, J.B., and D'Avila Reis, D. (2007). Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum. Pathol.* 38: 1256–1264.

Spencer, N.J., and Hu, H. (2020). Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*

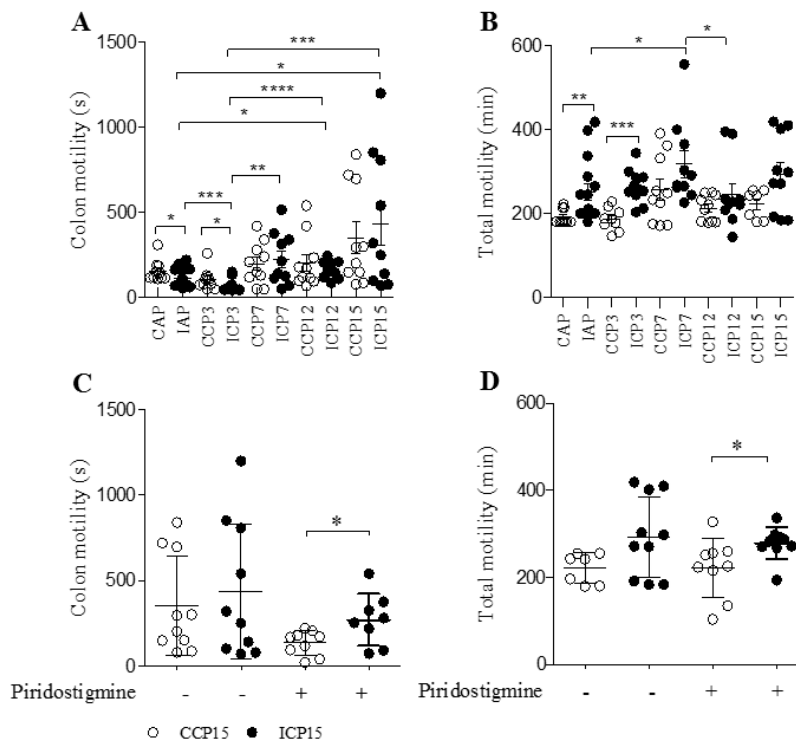
Spencer, N.J., Walsh, M., and Smith, T.K. (2000). Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 522 Pt 2: 321–31.

Venkova, K., Greenwood-Van Meeveld, B., and Krier, J. (2002). Neural Control of the Large Intestine. In *Innervation of the Gastrointestinal Tract.*, (London: In: Brookes SJ and Costa M (eds).), pp 171–187.



**Figure 1** Natural history and pathological anatomy of the murine megacolon. Acute and chronic phases (3, 7, 12 and 15 months) of infection with 50,000 trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi*. (A) CAP (B) IAP (C) ICP3 (D) ICP7 (E) ICP12 (F) ICP15 months. (G) Clinical score of the histopathological aspects of the control and infected chronic phase. (H) Thickness of the inner muscular layer ( $\mu\text{m}$ ). Ten images of each animal, in H&E, were acquired with a 10X objective; three measurements of the thickness of the muscular layer were made in each image ( $n = 5$  mice). Statistical analysis ANOVA two away with Student Newman-Keuls post-test. \*Difference to the respective control group. #Difference in time compared to other times for the same condition (infected).  $p < 0.05$ . (I) Macroscopic aspects of the megadolicocolon of the infected ICP15 in compare to their control. Arrows indicate inflammatory infiltrate; asterisk indicates muscle degeneration; dashed line indicates thickness of circular smooth muscle layer. Bar: 50 $\mu\text{m}$  (10X) A, B C, D; 20 $\mu\text{m}$  (20X) insert. The results represent two independent experiments.

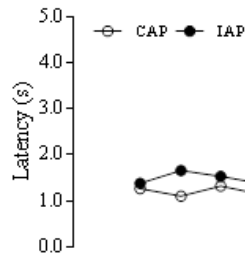




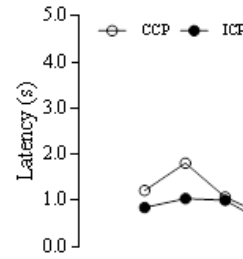
**Figure 2 Colonic and total gastrointestinal tract (TGI) motility are delayed throughout the experimental times.** (A) Colonic motility was estimated by measuring the time required to release a glass bead. This time was significantly smaller indicating faster motility in IAP and ICP3 months compared to CAP and CCP. In the infected group a long term (ICP 7, 12 and 15 months) slower of motility along time was observed. (B) Carmine red was administered orally, and the time to development of red stools was noted. TGI transit time in IAP, ICP3 months and ICP7 months was increased indicating slower transit than in their respective controls. (C) Colonic motility (15 months) in pyridostigmine-treated mice indicated the higher bioavailability of acetylcholine only in control animals. (D) The TGI transit time was also examined under pyridostigmine effect indicating slower transit time in ICP15 compare with their control. ( $n = 8 - 10$ ). Test  $t$  Student. Values of  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,001$  (\*\*\*)  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). The results represent two independent experiments.

**Off - contraction**

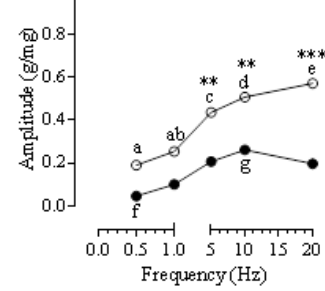
**A**



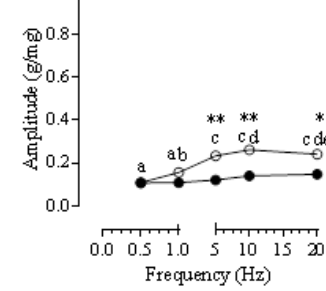
**B**



**C**

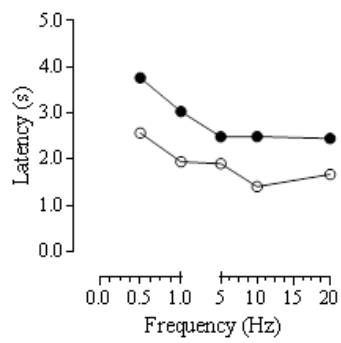


**D**

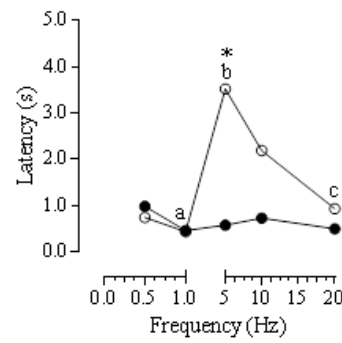


**On - contraction**

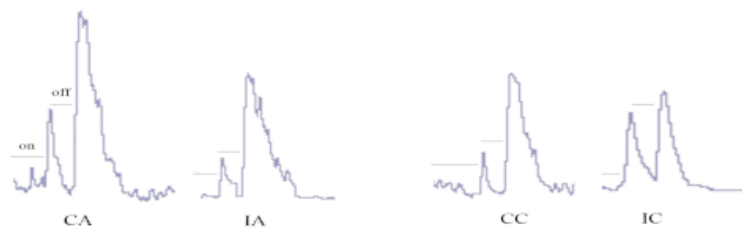
**E**



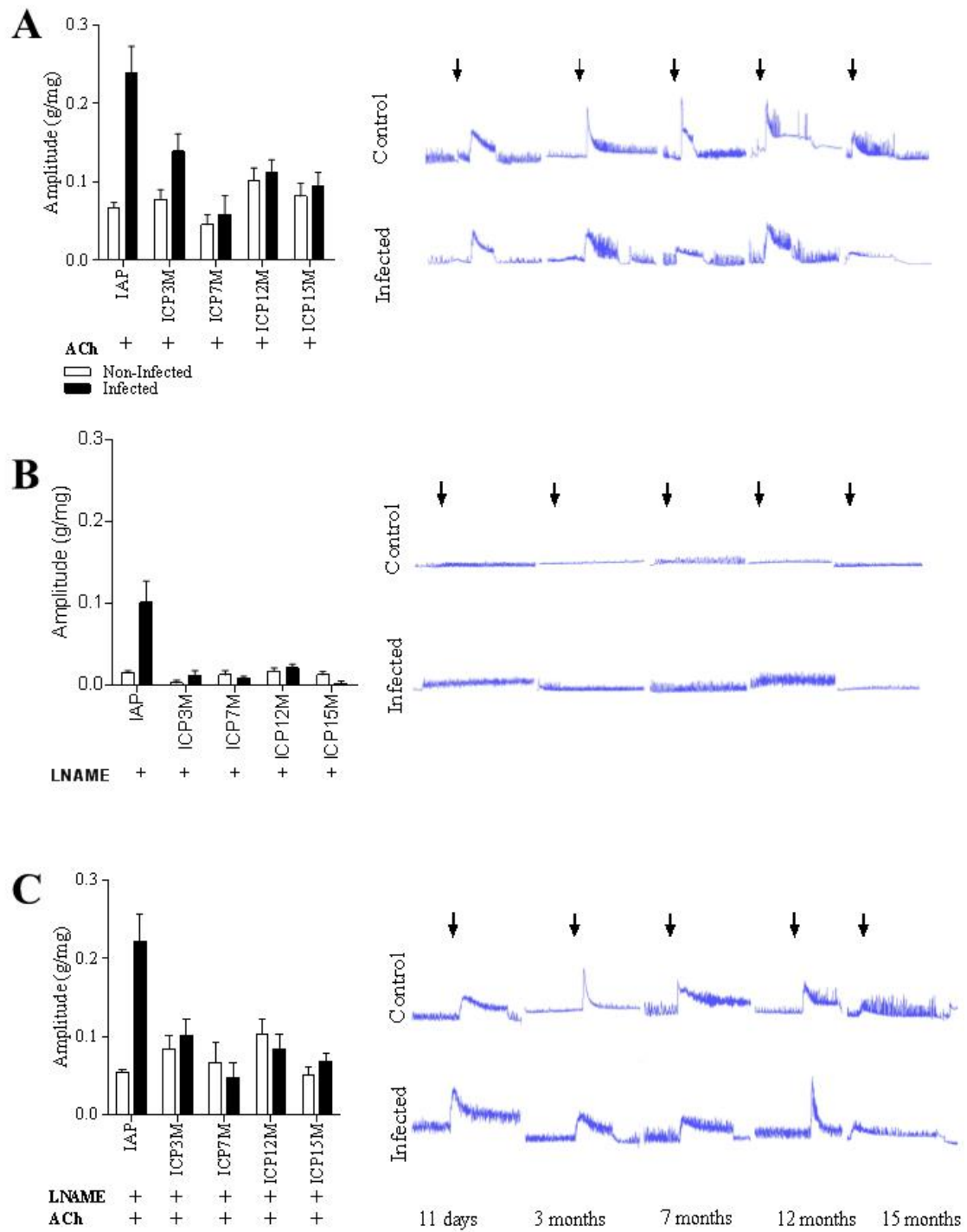
**F**



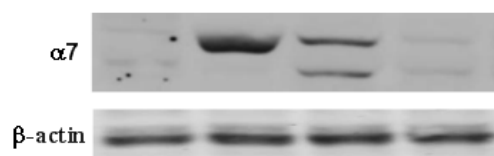
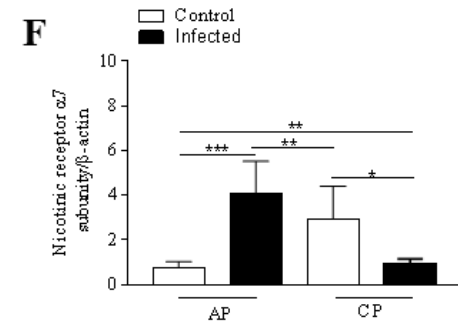
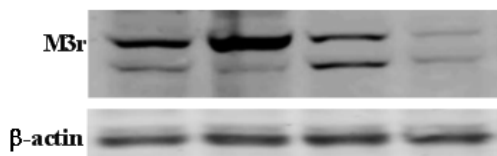
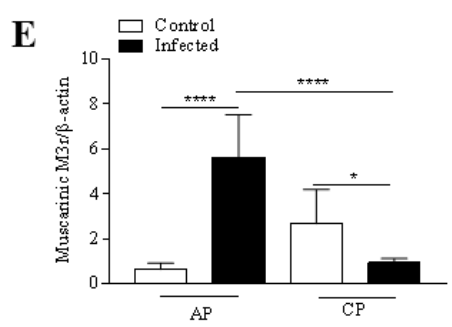
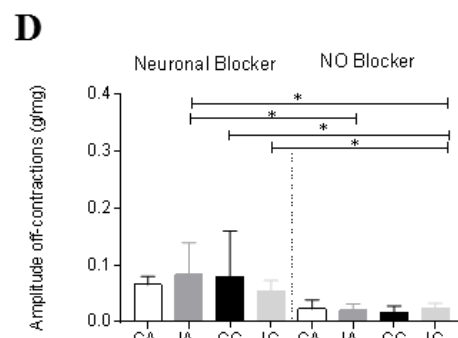
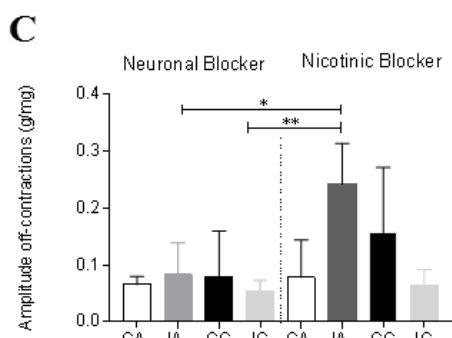
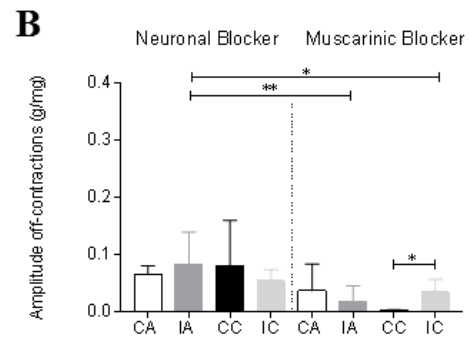
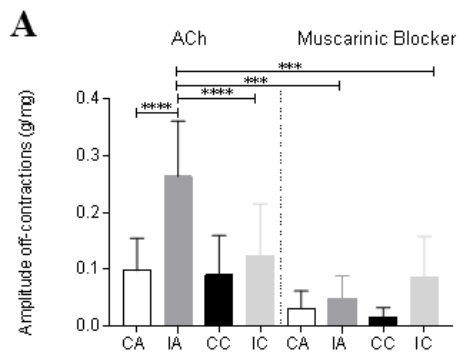
**G**



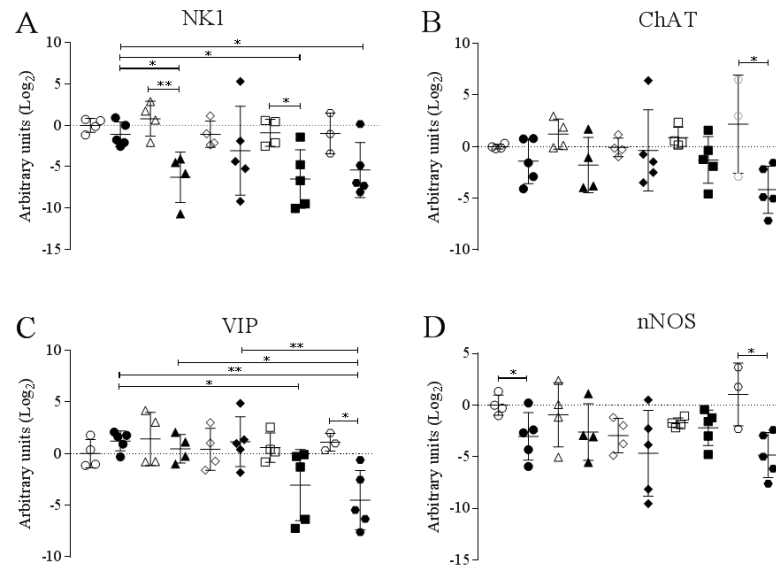
**Figure 3 Patterns of electrical responses induced by stimulation (Hz) in the colon fragments of control and infected mice.** Female Swiss mice were infected with 50.000 trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi*. Of the animals, 10 were euthanized at the 11 d.p.i. (acute phase group; 5 control and 5 infected), 10 were euthanized in the chronic phases (chronic phase control group) and 62 were treated with Benznidazole and euthanized at the 3, 7, 12 and 15 m.p.i. (chronic phase infected group). The fragments were placed vertically in the organ bath system containing Krebs solution and after the 1h stabilization proceeded to the experiments, with the application of increasing electrical stimuli of 0.5, 1, 5, 10 and 20 Hz. **(A, B, C and D)** *off* contractions, where we observed a change in the contraction amplitude compared to the sequence of applied stimuli. **(E and F)** *on* contractions, where we observed that in the chronic phase, the latency period of the chronically infected mice were decreased compared to their control. **(G)** Schematic drawing indicating the *on* and *off* latencies and the highest peak amplitude of the *off* contraction. ( $n = 5$  mice). Statistical analysis ANOVA *two away* followed by Duncan's post-test. \*Statistical difference between the control and the infected groups. Letters indicate the comparison between the applied electrical stimuli (Hz) in the control and infected group. Same letters there is no difference and different letters there are statistical differences. Values of  $p < 0.05$  (\*)  $p < 0.01$  (\*\*)  $p < 0.001$  (\*\*\*). CAP (control acute phase), IAP (infected acute phase), CCP15 (control chronic phase) and ICP15 (infected chronic phase).



**Figure 4 Analysis of colon contractility in organ bath *ex vivo* for ACh, L-NAME and L-NAME + ACh.** Female Swiss mice were infected with 50,000 trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi*. Ten animals were euthanized at the 11 d.p.i. (acute phase group; 5 control and 5 infected), 10 were euthanized in the chronic phases (chronic phase control group) and 62 were treated with Benznidazole and euthanized at the 3, 7, 12 and 15 m.p.i. (chronic phase infected group). The fragments were placed vertically in the organ bath system containing Krebs solution and after the 1h stabilization, the experiments were carried out, initially with the addition of the drug (A) ACh, followed by inhibition with (B) L-NAME and then addition of (C) ACh. Statistical analysis ANOVA *two away* followed by Tukey's post-test. ( $n = 5$  mice). \*Statistical difference between the control and the infected. Values of  $p < 0.05$  (\*). In the schematic drawing next to the graphs, the arrows indicate the time of administration of the drug ACh.



**Figure 5 Characterization of responses inhibited by muscarinic, neural and nicotinic pathways in colon fragments showing amplitudes and expression of nicotinic and muscarinic receptors in the colon of mice infected with the *T. cruzi* Y strain, in the acute and chronic phases.** Colon fragments were incubated with acetylcholine (ACh; 10  $\mu$ M), atropine (muscarinic receptor blocker) (1  $\mu$ M), tetrodotoxin (neural blocker) (TTX; 100nM), d-tubocurarine chloride (nicotinic receptor blocker) (50  $\mu$ M) methyl ester of N ( $\omega$ ) -nitro-L-arginine (NO blocker) (L-NAME; 300  $\mu$ M). **(A)** ACh + Muscarinic receptor block **(B)** Neural block + Muscarinic receptor block **(C)** Neural block + Nicotinic receptor block **(D)** Neural block + NO block. n = 4 mice. Statistical analysis ANOVA *one-way* with Tukey's post-test. Values of  $p < 0.005$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). **(E and F)** The colons of the control and infected groups of the acute and chronic phases 15 months were prepared for the Western Blot technique to evaluate the expression of proteins through anti-M3r (mAChR M3) and anti- $\alpha$ -7 (AChR $\alpha$ 7) antibodies, where we show the highest expression of this protein in crops infected by strain Y in the acute phase.  $\beta$ -actin were used as a constitutive protein to perform the technique. (n = 5 mice). Statistical analysis: ANOVA *one way* with Tukey's post-test. \*Difference between groups,  $p \leq 0.05$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*\*) ;  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). AP (acute phase) and CP (chronic phase).



**Figure 6 Expression of excitatory and inhibitory receptors of neurons acutely and chronically infected by *T. cruzi*.** The results expressed in dispersion show the gene expression of the neurotransmitter receptors measured by the Real Time PCR assay. **(A)** NK1 – Neurokinin 1, **(B)** ChAT – Coline-Acetyltransferase, **(C)** VIP - Vasoactive Intestinal Polypeptide, **(D)** nNOS - Neuronal Nitric Oxide Synthase. The groups are represented by the symbols, CAP - Control acute phase (O, 4); IAP - Infected acute phase (●, 5); CCP3 - Control chronic phase 3 months (Δ, 4); ICP 3- Infected Chronic phase 3 months (▲, 4); CCP7- Control chronic phase 7 months (◇, 5); ICP7- Infected chronic phase 7 months (◆, 5); CCP12- Control chronic phase 12 months (□, 4); ICP12- Infected chronic phase 12 months (■, 5); CCP15- Control chronic phase 15 months (○, 4); ICP15- Infected chronic phase 15 months (●, 5) and each symbol corresponds to one individual. Significant statistical differences were considered when  $p \leq 0.05$ . Test *t* Student. Values of  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,001$  (\*\*\*)  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).



## 7. OUTRAS PUBLICAÇÕES 1



Journal of Neuroinfectious Diseases

Ricci, et al., J Neuroinfect Dis 2016, 7:4  
DOI: 10.4172/2314-7326.1000235

Research Article

OMICS International

### Nitroergic Myenteric Neurons are Spared in Experimental Chagasic Megacolon

Mayra Fernanda Ricci<sup>1</sup>, Camila França Campos<sup>1</sup>, Christiane Teixeira Cartelle<sup>1</sup>, Samantha Ribeiro Béla<sup>1</sup>, Sílvia Dantas Cangussú<sup>2</sup>, Helton da Costa Santiago<sup>3</sup>, Camila Megale de Almeida-Leite<sup>4</sup> and Rosa Maria Esteves Arantes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences LAFEX, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup>Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil

\*Corresponding author: Rosa Maria Esteves Arantes, Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Tel: 3134092896; Fax: 31 3409-2879; E-mail: [rosa.esteves.arantes@ufmg.br](mailto:rosa.esteves.arantes@ufmg.br)

Rec date: Nov 23, 2016; Acc date: Dec 21, 2016; Pub date: Dec 23, 2016

Copyright: © 2016 Ricci MF, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the creative commons attribution license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## 8. OUTRAS PUBLICAÇÕES 2



### RESEARCH ARTICLE

# Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection



CrossMark  
click for updates

Camila França Campos<sup>1</sup>\*, Silvia Dantas Cangussú<sup>2</sup>\*, Ana Luiza Cassin Duz<sup>1</sup>, Christiane Teixeira Cartelle<sup>1</sup>, Maria de Lourdes Noviello<sup>1</sup>, Vanja Maria Veloso<sup>3</sup>, Maria Terezinha Bahia<sup>3</sup>, Camila Megale Almeida-Leite<sup>4</sup>, Rosa Maria Esteves Arantes<sup>1</sup>\*

1 Departamento de Patologia Geral Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2 Departamento de Ciências Biológicas/LAFEX, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, 3 Departamento de Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, 4 Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### OPEN ACCESS

**Citation:** Campos CF, Cangussú SD, Duz ALC, Cartelle CT, Noviello MdL, Veloso VM, et al. (2016)

\* These authors contributed equally to this work.

\* [rosa@icb.ufmg](mailto:rosa@icb.ufmg)

## 8. OUTRAS PUBLICAÇÕES 3



# Protective Effect of *Lactobacillus diolivorans* 1Z, Isolated From Brazilian Kefir, Against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Experimental Murine Models

Mario Abatemarco Júnior<sup>1</sup>, Sávio Henrique Cicco Sandes<sup>2</sup>, Mayra Fernanda Ricci<sup>3</sup>, Rosa Maria Esteves Arantes<sup>3</sup>, Álvaro Cantini Nunes<sup>2</sup>, Jacques Robert Nicoli<sup>1</sup> and Ellsabeth Neumann<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>3</sup> Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS