

JACQUELINE GARCIA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO NGF
NA PATOLOGIA DO MEGAESÔFAGO INDUZIDO PELA
INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi***

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Jan/2016

JACQUELINE GARCIA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO NGF
NA PATOLOGIA DO MEGAESÔFAGO INDUZIDO PELA
INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dr. Débora d'Ávila Reis

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Jan/2016

Este trabalho foi todo desenvolvido no Laboratório Profª Conceição Machado do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

COLABORADORES:

Dra. Sheila Jorge Adad₁
Dr. Rodolfo Duarte Nascimento₂

1. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais
2. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais

ÓRGÃOS FINANCIADORES: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Jan/2016

Dedico este trabalho aos que me regam de amor, conhecimento e ternura, para que eu cresça, floreça e dê muitos frutos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização do meu sonho.

Agradeço ao prof. Dr. Nilo Bazzoli por ter me apresentado a morfologia e feito me apaixonar por ela desde o início, em suas aulas de cito e histologia.

Agradeço a profa. Dr. Luciana Andrade que me iniciou no departamento de morfologia da UFMG, e que me fez encantar mais pela área.

Agradeço a profa. Dr. Cristina Guatimosim que ao me apresentar um novo campo de pesquisa me fez perceber o quanto a diversidade da morfologia me surpreende.

Agradeço com carinho a profa. Dr. Débora d'Ávila que me recebeu de braços abertos como sua aluna de mestrado e que me transmitiu tantos conhecimentos de forma brilhante.

Agradeço a equipe do LABRE e em especial ao Gabriel Campolina, a Letícia Cardoso e a Dr. Mônica Morais, amigos parceiros dessa jornada.

Em especial, agradeço ao meu namorado Dr. Rodolfo Duarte que compartilhou comigo toda a experiência do meu mestrado, me ensinou e transmitiu muitas coisas e foi essencial para a conclusão do meu sonho.

Agradeço também a todos os amigos, principalmente os da pós-graduação, e em especial a Patrícia Martins, que compartilharam comigo conquistas, problemas e frustrações semelhantes. Enfim, que entenderam e compartilharam os mesmos sentimentos que eu e que me lembravam todos os dias que eu não estava sozinha nesse barco.

Levo um pedacinho de cada um de vocês na minha história e no meu coração.

“Tu te tornas eternamente
responsável por aquilo que
cativas” *O Pequeno Príncipe*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. Doença de Chagas	15
2. Sistema Nervoso Entérico	18
3. Fator de Crescimento Neural e Receptor Tirosina Quinase A	20
JUSTIFICATIVA	25
OBJETIVOS	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
1. Grupos estudados	27
2. Análise imunohistoquímica	29
3. Análise morfológica	29
4. Análise estatística	30
RESULTADOS	31
1. Análise qualitativa.....	31
Estruturas imunorreativas a NGF.....	31
Estruturas imunorreativas a TrkA.....	33
2. Análise quantitativa de células imunorreativas a NGF.....	36
Mastócitos e eosinófilos	36
Células epiteliais.....	38
3. Análise quantitativa de células imunorreativas a TrkA.....	39
Mastócitos e eosinófilos.....	39
Células epiteliais.....	41
Células musculares.....	42
4. Análises de correlação.....	43
Neurônios imunorreativos a TrkA.....	43
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	50
PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO 1	64

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Caracterização dos grupos estudados	28
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Número total de mastócitos NGF-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i>	37
Gráfico 2: Número total de eosinófilos NGF-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i>	38
Gráfico 3: Densidade de células epiteliais NGF-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i>	39
Gráfico 4: Número total de mastócitos TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i>	40
Gráfico 5: Número total de eosinófilos TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i>	41
Gráfico 6: Densidade de células epiteliais TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i>	42
Gráfico 7: Densidade de células musculares lisas TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com <i>T. cruzi</i>	43
Gráfico 8: Correlação entre o número de neurônios e o número total de mastócitos NGF-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago	44
Gráfico 9: Correlação entre o número de neurônios e o número total de eosinófilos NGF-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil de marcação de mastócitos e eosinófilos imunorreativos à NGF.....	32
Figura 2: Perfil de marcação de células epiteliais imunorreativas à NGF.....	33
Figura 3: Perfil de marcação de mastócitos e eosinófilos imunorreativos à TrkA.....	34
Figura 4: Perfil de marcação de células epiteliais imunorreativas à TrkA.....	35
Figura 5: Perfil de marcação de células da camada muscular interna imunorreativas à TrkA.....	35
Figura 6: Perfil de marcação de neurônio imunorreativo à TrkA.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

IFN- γ - Interferon- γ

MIG - Quimiocina CXCL9

T. cruzi- *Trypanosoma cruzi*

GI- Gastro Intestinal

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNE – Sistema Nervoso Entérico

IPANs - Neurônios aferentes primários intrínsecos

VIP - Polipeptídeo intestinal vasoativo

IL- Interleucina

CCL22 - Quimicina que induz a migração de células Th2

CXCL10 - Quimicina que induz a migração de células Th1

NGF - Fator de crescimento neural

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

RE - Reticulo Endoplasmático

p75^{NTR} - Receptor de neurotrofina p75

TrkA/ NTRK1 - Receptor Tirosina Quinase A

NF- $\kappa\beta$ - Fator nuclear kappa beta

Akt - Proteína quinase B

PLC- γ – Fosfolipase C- γ

MAPK – Proteína Quinase ativada por mitógenos

PI3K/Akt – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfatado-3quinase/proteína quinase B

IBS - Síndrome do intestino irritável

EPO – Peroxidase eosinofílica

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

Ig - Imunoglobulina

FC ϵ RI - Receptor de IgE

IR – Imunorreativo

PBS - Solução salina tamponada

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

DAB – Diaminobenzidina

DP – Desvio padrão

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

EGF - Fator de crescimento epidermal

TGF- α - Fator de crescimento transformante- α

NK1 - Receptor neuroquinina-1

PAR-2 - Receptor ativado por protease-2

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina-1

RESUMO

O megaesôfago chagásico é uma das principais complicações digestivas da fase crônica da doença de Chagas. Acredita-se que ele se desenvolva devido ao intenso processo de desnervação, o qual por sua vez é decorrente da infecção pelo parasito e da inflamação local. Sabendo do papel do NGF na comunicação entre sistema imune e o sistema nervoso, de suas propriedades neurotrófica e pró-inflamatória, neste trabalho nos propusemos avaliar a sua participação na patologia do megaesôfago chagásico. Para isso analisamos amostras de esôfago de 12 indivíduos infectados, sendo 6 deles sem megaesôfago ou sem qualquer sintoma da doença digestiva e 6 com megaesôfago. As amostras foram submetidas à imunohistoquímica para os anticorpos anti-NGF e anti-TrkA (receptor de NGF). Os resultados demonstraram imunorreatividade para NGF e TrkA no epitélio, eosinófilos e mastócitos e apenas para TrkA na muscular interna e neurônios do esôfago. Em indivíduos infectados sem megaesôfago foi demonstrado aumento significativo da imunorreatividade para NGF em mastócitos e aumento significativo para TrkA no epitélio, na camada muscular interna e em mastócitos da camada muscular interna. Além disso, foi vista correlação negativa entre o número de neurônios e o número de eosinófilos e mastócitos imunorreativos à NGF no plexo mioentérico. Em indivíduos infectados com megaesôfago foi visto aumento significativo da imunorreatividade para NGF e TrkA no epitélio, nos eosinófilos e nos mastócitos; e aumento significativo apenas para TrkA na camada muscular interna. A partir desses dados, sugerimos que o aumento da imunorreatividade ao NGF e a TrkA no esôfago de indivíduos infectados com o *T. cruzi* possa estar relacionado com a inflamação e também com a própria infecção causada pelo parasito.

PALAVRAS CHAVE: Megaesôfago chagásico, NGF, TrkA

ABSTRACT

Chagasic megaesophagus is one of major digestive complications of chronic Chagas' disease. It is believed that it develops due to the intense process of denervation, which in turn is due to the parasite infection and local inflammation. Knowing the role of NGF in the cross-talk between the immune system and the nervous system, its neurotrophic and pro-inflammatory properties, this study aimed to evaluate its participation in the pathology of chagasic megaesophagus. For this we analyzed esophageal samples from 12 infected individuals, six of them without megaesophagus or any symptoms of digestive disease and 6 with megaesophagus. The samples were subjected to immunohistochemistry with anti-NGF and anti-TrkA (NGF receptor). The results showed immunoreactivity for NGF and TrkA in the epithelium, eosinophils and mast cells and only for TrkA in inner muscle layer and neurons in the esophagus. In infected individuals without megaesophagus it demonstrated significant increased immunoreactivity for NGF in mast cells and increased immunoreactivity for TrkA in the epithelium, inner muscle layer and mast cells of inner muscle layer. In addition, negative correlation was seen between the number of neurons and the number of eosinophils and mast cells immunoreactive for NGF in the myenteric plexus. In infected individuals with megaesophagus was seen significant increase in immunoreactivity for NGF and TrkA in the epithelium, eosinophils and mast cells, and significant increase only for TrkA in the inner muscle layer. From these data, we suggest that increased immunoreactivity for NGF and TrkA in the esophagus of individuals infected with *T. cruzi* may be related to inflammation and also with the parasite infection.

KEYWORDS: Chagas megaesophagus, NGF, TrkA receptor

INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* e é considerada uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas. Essa doença, antes endêmica apenas em áreas rurais, ganhou grande foco no meio urbano devido à migração rural-urbana que disseminou o parasito (DIAS *et al.*, 2002; AGUILAR *et al.*, 2007). Estima-se que cerca de 6-7 milhões de pessoas ainda estão infectadas com o parasito, principalmente na América Latina (WHO, 2015).

O principal mecanismo de transmissão do parasito se dá pela picada do barbeiro contaminado. Entretanto, em áreas de maior incidência também são vistas transmissões por via transfusional, oral, congênita e menos frequentemente, via transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (COURA E VIÑAS, 2010; SILVEIRA E PIMENTA JUNIOR, 2011).

O ciclo da doença se dá através da picada do barbeiro vetor (hospedeiro invertebrado) não contaminado em um hospedeiro vertebrado que contenha formas infectantes do parasito no sangue, a forma tripomastigota. Já no hospedeiro invertebrado, especificamente no intestino médio, o parasito se transforma na forma epimastigota, onde sofre vários ciclos de replicação. Nessa fase o parasito migra para porção posterior do intestino do vetor onde então retornará à forma tripomastigota. Durante a noite, o barbeiro contaminado ao picar um novo indivíduo elimina fezes contendo a forma infectante, tripomastigota, próxima à picada. O contato do parasito com a mucosa ou com uma área lesionada o transferirá para a circulação linfática ou sanguínea do indivíduo, dando-o acesso a vários tipos celulares. Já no interior celular do hospedeiro vertebrado, a forma tripomastigota do parasito se transforma em amastigota sofrendo assim muitos ciclos de replicação para gerar numerosas formas tripomastigotas. Devido ao intenso volume de parasitos a célula se rompe, liberando novos parasitos no sangue e tecidos adjacentes. Logo, a picada de um novo barbeiro não infectado em um indivíduo infectado, fechará o ciclo, pois transmitirá o parasito para um novo hospedeiro invertebrado (BRENER, 1982; KOBERLE, 1968).

A alta densidade de parasitos no sangue e tecidos de indivíduos infectados caracteriza a fase aguda da doença. Não se sabe ao certo, mas acredita-se que essa fase dure de seis a oito semanas (MONCAYO E SILVEIRA, 2009). Ela apresenta destruição celular e infecção de diferentes tipos celulares como, macrófagos, células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas e células gliais (DA MATA *et al.*, 2000; DIAS, 2006). Após um período entre 7 a 14 dias aparecem os sintomas como, lesão inflamatória no local da picada, hepatoesplenomegalia, náusea, vômito, diarreia, tosse e anorexia. Nessa fase pode haver morte do indivíduo devido a complicações associadas à miocardite ou meningoencefalite (KOBBERLE, 1968).

Na fase crônica, a densidade de parasitos no sangue e tecidos é reduzida significativamente devido à resposta imunológica do indivíduo. Interessantemente, nessa fase, a maioria dos indivíduos infectados permanece sob a forma indeterminada, ou seja, sem sintomas decorrentes da infecção, vindo a falecer por outras causas. Após um período indeterminado alguns pacientes, cerca de 20%-35% dependendo da área geográfica (MONCAYO E SILVEIRA, 2009), podem evoluir para a forma crônica sintomática da infecção com comprometimento cardíaco, digestivo ou cardio-digestivo e, mais raramente, sintomas neurológicos (COURA, 2007; COURA E BORGES-PEREIRA, 2011).

As manifestações clínicas digestivas da doença de Chagas são caracterizadas por alterações motoras que envolvem principalmente o esôfago e o cólon, resultando no megaesôfago e no megacólon (OLIVEIRA *et al.*, 1998; MENEGHELLI, 2004). Falando mais especificamente do megaesôfago, acredita-se que a dilatação da parede e do lúmen deste órgão se dê em decorrência do processo de desnervação (KOBBERLE *et al.*, 1968; ADAD *et al.*, 1991; DA SILVEIRA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2013). Inicialmente os pacientes com megaesôfago apresentam dificuldade de relaxamento do esfíncter inferior do esôfago (fenômeno conhecido como acalásia), o que pode se manifestar pela dificuldade de deglutição do alimento (fenômeno conhecido como disfagia) (PINAZO *et al.*, 2014).

No megaesôfago, são observadas, em suas camadas musculares, alterações como fibrose intersticial intermuscular, focal ou difusa (TAFURI E RASO, 1983; PINHEIRO *et al.*, 2003); hiperplasia da musculatura, com aumento de células musculares numa proporção 6:1 quando em comparação aos indivíduos não infectados (PEREIRA E

GONÇALVES, 1958; PINAZO *et al.*, 2014) e aumento de 4:1 quando comparadas respectivamente, as camadas musculares interna e externa do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (KOBBERLE 1960; ADAD *et al.*, 1991). Outras alterações também são percebidas como, arterite necrozante, necrose parcial ou total da parede dos vasos (BRITO E VASCONCELOS, 1959). Além disso, no megaesôfago, também é observada a redução da área de células intersticiais de Cajal (DE LIMA *et al.*, 2008).

A inflamação, por sua vez, é sugerida como uma das causas da desnervação do trato gastrointestinal (GI) acometido pela doença de Chagas. Uma evidência da importância da inflamação para o desenvolvimento da forma digestiva dessa doença é a variação dos níveis de citocinas nos indivíduos infectados. Estudo anterior demonstrou o aumento dos níveis de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e da quimiocina CXCL9 (MIG) em indivíduos com esofagopatia chagásica. TNF- α e IFN- γ são citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel importante no controle do parasitismo tecidual durante a infecção por *T. cruzi* e MIG é uma quimiocina regulada por IFN. A alta taxa de síntese de TNF- α , IFN- γ e MIG nos pacientes com esofagopatia chagásica sugere que essas citocinas estão envolvidas no controle da infecção pelo *T. cruzi*. No entanto, o mesmo estudo demonstrou que pacientes com a forma avançada da esofagopatia chagásica apresentaram diminuição dos níveis de TNF- α quando comparado com a forma não avançada. Esses dados sugerem que um desbalanço da resposta imune pode contribuir para o desenvolvimento de danos teciduais observados nos pacientes com a forma avançada do megaesôfago (CREMA *et al.*, 2006).

Em relação aos focos inflamatórios presentes na fase crônica, eles se concentram no plexo mioentérico e nas camadas musculares, interna e externa do megaesôfago. O infiltrado inflamatório é composto por linfócitos T CD3+ CD4+, linfócitos B CD 20+, linfócitos TIA1+, células *natural killer* CD57+, macrófagos, eosinófilos e mastócitos (D'ÁVILA REIS *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005). Interessantemente, análise do sangue de indivíduos infectados com *T. cruzi* portadores da forma digestiva da doença demonstrou baixos níveis de linfócitos T CD3(+) e linfócitos B CD19(+), bem como diminuição na taxa de linfócitos CD4/CD8 nas amostras (LEMOS *et al.*, 1998). Tais fatos apontam para um recrutamento destas células do sangue para os tecidos.

2. Sistema nervoso entérico

O trato (GI) desempenha diversas funções tais como, digestão dos alimentos, absorção de nutrientes. Também participa da secreção e reabsorção de fluidos que ocorrem devido à ação da inervação extrínseca, a qual é representada pelo sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático; e pela inervação intrínseca, representada pelo sistema nervoso entérico (SNE) (FURNESS, 2006).

O SNE é composto pelos gânglios entéricos, que são formados por corpos neuronais e células enterogliais dispostos numa cápsula de tecido conjuntivo, e pelos filetes nervosos localizados na própria parede dos órgãos que se estendem do esôfago até o ânus (SCHEMANN E NEUNLIST, 2004; FURNESS, 2006; 2008; 2012). Os gânglios entéricos são divididos em dois grandes plexos, o submucoso e o mioentérico. O plexo submucoso está situado na camada submucosa, sendo formado de gânglios interconectados por filetes nervosos que inervam principalmente a mucosa, vasos sanguíneos e glândulas. Esse plexo é mais desenvolvido nos intestinos (HOYLE E BURNSTOCK, 1989; TIMMERMANS *et al.*, 2001). O plexo mioentérico está situado entre as duas camadas da muscular própria e seus neurônios projetam filetes principalmente para as camadas musculares, interna e externa dos órgãos. Desse plexo, também podem partir filetes nervosos para inervar a mucosa e a submucosa (GABELLA, 1972; WOOD *et al.*, 1999).

Dentre as peculiaridades do SNE, podemos citar a sua capacidade de regular as funções do trato GI na ausência do SNA (FURNESS, 2000). Esta característica está atribuída a uma diversidade de neurônios, cerca de 400 a 600 milhões, e de neurotransmissores distribuídos de forma variável por toda a extensão do trato GI. Esses neurônios podem ser classificados funcionalmente como: neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs) ou neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores, desempenhando assim, vários efeitos sobre as células efectoras, tais como o epitélio, glândulas, vasos sanguíneos, músculo liso, células imunes e mastócitos (FURNESS, 2000; 2012).

As alterações no SNE têm sido bastante discutidas no contexto das patologias que acometem o trato GI, como na colite ulcerativa (KAMINSKA *et al.*, 2006), acalasia idiopática (VILLANACCI *et al.*, 2010), megaesôfago chagásico (NASCIMENTO *et al.*,

2010; 2013) e megacólon chagásico (DA SILVEIRA *et al.*, 2007). Esses estudos, além de demonstrarem intenso processo de desnervação nos órgãos afetados, têm chamado atenção para um desbalanço entre neuropeptídeos, especificamente entre os neurônios produtores do polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e substância P. Considerando suas funções, VIP além de induzir o relaxamento da musculatura lisa (ROBBERECHT *et al.*, 1998; VANNESTE *et al.*, 2004), também é dotado de propriedades antiinflamatórias. Estas propriedades caracterizam-se por diminuir a produção de citocinas como interleucina-6 (IL-6) e TNF- α por monócitos (KOJIMA *et al.*, 2005); diminuir a produção de quimiocinas e mediadores inflamatórios (prostaglandinas e óxido nítrico) por macrófagos, células dendríticas e micróglia (DELGADO AND GANEA 2001; GONZALEZ-REY AND DELGADO 2008; CHORNY AND DELGADO 2008); aumentar a síntese de IL-10 em macrófagos (DELGADO *et al.*, 1999); diminuir a síntese de IL-16 em eosinófilos e conseqüentemente, inibir a quimiotaxia de linfócitos (DUNZENDORFER *et al.*, 2003); inibir a citotoxicidade dependente de anticorpo em neutrófilos (PALERMO *et al.*, 1996); induzir a produção de CCL22 (quimicina que induz a migração de células Th2) e inibir a produção de CXCL10 (quimicina que induz a migração de células Th1) em células dendríticas (DELGADO *et al.*, 2004); diminuir a expressão de receptores tipo Toll em células sinoviais (GUTIÉRREZ-CAÑAS *et al.*, 2006; ARRANZ *et al.*, 2008), macrófagos, células dendríticas e linfócitos (GOMARIZ *et al.*, 2005); e induzir a expressão de FoxP3 em células T reguladoras (POZO *et al.*, 2009; ANDERSON AND GONZALEZ-REY 2010). A substância P, por sua vez, tem função oposta ao VIP. Ela além de induzir a contração da musculatura lisa (WOOD 2007; SHIMIZU *et al.*, 2008), é dotada de propriedades pró-inflamatórias. A ação pró-inflamatória de substância P é evidenciada pela sua capacidade de estimular, a síntese de IFN- γ (WEINSTOCK *et al.*, 2003; BLUM *et al.*, 2003) e MIP-1 β em linfócitos T (GUO *et al.*, 2002); TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 em linfócitos T, macrófagos e neutrófilos (DELGADO *et al.*, 2003); desgranulação de mastócitos (LI *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013); migração e desgranulação de eosinófilos (EL-SHAZLY *et al.*, 1997); migração e citotoxicidade de células natural killer (FEISTRITZER *et al.*, 2003; FU *et al.*, 2011).

Nesse contexto tem sido proposto que, na doença de Chagas, a perda em maior intensidade de neurônios produtores de VIP, possa contribuir para a reativação e ou exacerbação do processo inflamatório da fase crônica. Além da diminuição de VIP,

outros fatores locais têm sido considerados relevantes na exacerbação do processo inflamatório da forma digestiva, dentre eles o aumento de mastócitos que expressam a enzima triptase (MARTINS *et al.*, 2014). Dentre as várias ações inflamatórias da triptase, citamos a sua capacidade de clivar, intra e extracelularmente, o pro-fator de crescimento neural (pro-NGF) em NGF, tornando a neurotrofina ativa (SPINNLER *et al.*, 2011). O NGF, por sua vez, tem sido apontado, em trabalhos anteriores, como uma neurotrofina com importante atuação em processos inflamatórios no trato GI. Esta atuação seria evidenciada pelo papel do NGF em manter a comunicação entre neurônios e células do sistema imune (DI MOLA *et al.*, 2000). Além disso, o aumento da densidade desta neurotrofina tem sido observado em diversas doenças do trato GI (DI MOLA *et al.*, 2000; TSUNODA *et al.*, 2006; WILLOT *et al.*, 2012; SHIEH *et al.*, 2010; 2014; YANG *et al.*, 2015; DOTHEL *et al.*, 2015), do trato respiratório (WU *et al.*, 2006, HUANG *et al.*, 2015) e doenças autoimunes (LISI *et al.*, 2014).

3. Fator de Crescimento Neural e Receptor Tirosina Quinase A

O Fator de crescimento neuronal (NGF) compõe a família das neurotrofinas, as quais são essenciais para o desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Mais além, estas neurotrofinas atuam na proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte de todas as células do organismo (CHAO *et al.*, 2006).

A síntese do NGF ocorre a partir da clivagem proteolítica de seu precursor, pró-NGF (FAHNESTOCK *et al.*, 2004). O pró-NGF, recém traduzido, é translocado para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE), transportado através da via exocítica. Nesta organela ele é convertido à sua forma biológica madura ativa através de clivagens proteolíticas. Esta neurotrofina é primariamente conhecida por atuar na sobrevivência e na formação do sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário. Em adultos, no entanto, também atua de outras maneiras, como protegendo neurônios após trauma cerebral e na geração da sensação de dor. Além disso, também pode ser dinamicamente regulado em resposta a danos teciduais e em resposta a patologias inflamatórias (MARLIN E LI, 2015).

O caminho de sinalização desempenhado por NGF pode ser mediado pela interação com dois receptores - o receptor de neurotrofina p75 (p75^{NTR}), o qual é membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF); e o receptor tirosina quinase A (TrkA), também conhecido como NTRK1, que pertence à família dos receptores tirosina quinase (Trk) (SKAPER, 2008; 2012). O p75^{NTR} é um receptor pan-neurotrofina. Ele é um co-receptor dos receptores Trk e por isso, pode aumentar ou suprimir a atividade de TrkA. A interação de NGF com p75^{NTR} resulta na ativação de fator nuclear kappa beta (NF-κβ), proteína quinase B (Akt) e Jun quinase, bem como outros caminhos de sinalização. Além desse receptor ativar estas cascatas, responsáveis pela sobrevivência celular, ele também pode sinalizar a apoptose da célula. A apoptose é mediada pela interação do p75^{NTR} com o precursor do NGF. Entretanto sua interação com o receptor ocorre com baixa afinidade. A interação se torna estável na presença do receptor de neurotrofina, sortilina. A sortilina é um co-receptor e trocador molecular tanto para o receptor p75^{NTR}, quanto para os receptores Trk. Ela se liga a parte pró do pró-NGF com alta afinidade. Esta interação permite que o pró-NGF, por sua vez, interaja com o p75^{NTR}, formando assim um complexo de alta afinidade. Portanto a sinalização de apoptose celular só será desencadeada quando a interação sortilina-pró-NGF-p75^{NTR} ocorrer (ROUX E BARKER, 2002; BRADSHAW *et al.*, 2015). Apesar de desencadear muitas cascatas, a interação do NGF com o receptor p75 ocorre em menor frequência, pelo fato do mesmo ser um receptor de baixa afinidade com esta e outras neurotrofinas (REICHARDT, 2006).

O TrkA, receptor específico para NGF, quando recém produzido, se insere na membrana do RE, tendo sua parte N-terminal virada para o lúmen da organela e a parte C-terminal voltada para o citoplasma da célula. Após a clivagem do peptídeo sinal, o TrkA é transportado do RE para o complexo de Golgi e em seguida para a superfície da célula, pela via exocítica. Na membrana plasmática o TrkA se encontra desfosforilado e livre na bicamada lipídica. Isto permite que o receptor se mova pela membrana, aumentando assim as chances dele interagir com o NGF (MARLIN E LI, 2015).

O NGF se liga ao TrkA através do domínio membrana proximal semelhante à imunoglobulina, da porção extracelular do TrkA de duas maneiras: 1) por intermédio de um padrão ligante inespecífico, conservado em outras neurotrofinas, ou 2) por intermédio dos resíduos 2-13 N-terminais, específico apenas para a interação

NGF/TrkA (CHUENKOVA E PEREIRAPERRIN, 2004). A ligação NGF-TrkA gera a ativação do receptor através de sua autofosforilação da tirosina, presente no domínio intracelular e a dimerização do receptor (PENG *et al.*, 2013). Essa modificação impede a mobilidade do TrkA através da membrana celular, o que facilita o recrutamento de intermediários de sinalização e a transdução de sinais. Essa ligação gera uma sinalização que desencadeia cascatas intracelulares como, as vias de fosfolipase C- γ (PLC- γ), de proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e de Fosfatidilinositol-4,5-bifosfatado-3quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) propagando sinais de sobrevivência e divisão celular. Posteriormente, o complexo NGF/TrkA é internalizado por endocitose mediada por clatrina ou por macropinocitose (MARLIN E LI, 2015). O microambiente ácido do endossomo pode causar a dissociação do complexo NGF/TrkA, diminuindo assim sua sinalização. Entretanto, mesmo se houver a dissociação do complexo NGF/TrkA o receptor TrkA, não necessariamente será degradado. Ele pode ser reciclado para a membrana celular (LI *et al.*, 2015; MARLIN AND LI, 2015).

O NGF é produzido por diversos tipos celulares e estudos realizados *in vitro* por imunohistoquímica ou por hibridização *in situ* têm demonstrado que sua produção ocorre em neurônios (DI MOLA *et al.*, 2000), células enterogliais (VON BOYEN *et al.*, 2006), glândulas salivares, células epiteliais, fibroblastos, mastócitos e em células imunes como eosinófilos, macrófagos ativadas e linfócitos T e B (ALOE *et al.*, 2012; BERRY *et al.*, 2012). Já a expressão de TrkA tem sido observada em nervos sensoriais, células epiteliais, células musculares lisas (ZHANG E QIAO, 2012), glândulas submucosas (WU *et al.*, 2006), células enterogliais (VON BOYEN *et al.*, 2006), mastócitos (NILSSON *et al.*, 1997) e em algumas células imunes como eosinófilos (NOGA *et al.*, 2002), linfócitos T (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2011) e células *natural killer* (RALAINIRINA *et al.*, 2010).

Poucos são os estudos que tem avaliado a expressão de NGF e do receptor TrkA no trato GI saudável, principalmente quando se trata de esôfago humano. Até agora, dados da literatura têm demonstrado a expressão de ambas as moléculas apenas no epitélio do esôfago (ZHU *et al.*, 2000; TSUNODA *et al.*, 2006). Por outro lado, no intestino, os eosinófilos, os mastócitos, as células enteroendócrinas têm sido apontadas como as principais fontes de NGF, enquanto a expressão de TrkA, tem sido observada

em eosinófilos, mastócitos, neurônios e células enterogliais (DI MOLA *et al.*, 2000; DOTHEL *et al.*, 2015). Em trabalho realizado em esôfago de porco foi demonstrado a expressão de NGF em neurônios, fibras nervosas, células enterogliais, epitélio e células endoteliais. A expressão de TrkA, por sua vez, foi observada principalmente em corpos neuronais e filetes nervosos (SAMARASENA *et al.*, 2015).

A função do NGF tem sido avaliada por meio de experimentos *in vitro*. Em neurônios simpáticos e sensoriais, NGF está envolvido com o controle da síntese de neurotransmissores e neuropeptídeos, tais como norepinefrina (OTTEN *et al.*, 1977), substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MEAROW *et al.*, 1995). Além disso, ele tem sido utilizado *in vivo* como terapia regenerativa em lesões no SNC, proporcionando crescimento de neuritos em células PC12 (LICHVÁROVÁ *et al.*, 2012), células neuronais NG 108-15 (TOMITA *et al.*, 2013) e em células do gânglio pélvico (STEWART *et al.*, 2008). Outros estudos também têm demonstrado que o NGF é capaz de induzir *in vitro* a diferenciação de determinadas células-tronco em células com fenótipo neuronal (DOUGLAS-ESCOBAR *et al.*, 2012; BERCU *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi demonstrado que sobrenadantes da mucosa de tecidos de indivíduos com síndrome do intestino irritável (IBS), contendo NGF, induziram altos níveis de neuritogênese em cultura de neurônios entéricos (DOTHEL *et al.*, 2015). Mais além, o NGF também é capaz de induzir a síntese de IGF-1 em células musculares lisas da bexiga, fator este que estimula a proliferação e regula o desenvolvimento e a sobrevivência dessas células (ZHANG E QIAO, 2012). Além disso, o NGF induz a síntese de IL-10 em células epiteliais intestinais (PISSETI *et al.*, 2009).

Adicionalmente, o NGF também pode exercer influência sobre células do sistema imune e mastócitos induzindo e regulando sua função e diferenciação. Trabalhos *in vitro* têm demonstrado que o NGF é capaz de promover a sobrevivência (HAHN *et al.*, 2006; RAAP *et al.*, 2008), migração (HAMADA *et al.*, 1996), síntese de IL-4 (NOGA *et al.*, 2002) e liberação de peroxidase eosinofílica (EPO) em eosinófilos (SOLOMON *et al.*, 1998). Em células *Natural Killer* ele inibe sua desgranulação (RALAINIRINA *et al.*, 2010). Em linfócitos T ele promove a proliferação e sobrevivência da célula (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2011). Com relação aos mastócitos, NGF é capaz de induzir o aumento de mRNA para IL-3, IL-4, IL-10, TNF- α , fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), além de induzir a sua

sobrevivência (BULLOCK AND JOHNSON, 1996). Também atua no aumento da expressão do mRNA para os marcadores como, triptase e quimase (sendo esse mais tardio), receptor TrkA, c-kit, receptor de IgE (FCεRI) nesta célula. Ainda em mastócitos, atua no aumento da produção de triptase, aumento no conteúdo de histamina intracelular (WELKER *et al.*, 1998; 2000) e aumento na migração de células progenitoras CD117⁺ (PENG *et al.*; 2013).

Em relação à análise do aumento da densidade tanto da neurotrofina quanto de seu receptor em patologias, estudos têm demonstrado por meio de imunohistoquímica, Northern e Western Blot aumento de NGF e TrkA em mastócitos e neurônios, em amostras de tecido de cólon de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (DI MOLA *et al.*, 2000). Através de ELISA, PCR e imunohistoquímica também foi demonstrado aumento de NGF e TrkA em células epiteliais de amostras de tecido do reto de pacientes com IBS (WILLOT *et al.*, 2012; DOTHEL *et al.*, 2015) e em cultura e em amostras de tecido de câncer esofageal (TSUNODA *et al.*, 2006). O aumento de NGF, mas não o de TrkA, foi demonstrado, por meio de PCR, em amostras de tecido do esôfago de pacientes com esofagite (SHIEH *et al.*, 2010; 2014; YANG *et al.*, 2015).

Na doença de Chagas são escassos os trabalhos avaliando o papel do NGF e do receptor TrkA. Em estudo realizado por MARTINELLI *e cols.* (2006) foi demonstrado através de ELISA e imunohistoquímica aumento de NGF no atrio e ventrículo, bem como nos vasos do coração de ratos infectados com *T. cruzi*. ARIDGIDES *e cols.* (2013) em estudo *in vitro* demonstraram através de ELISA que a infecção por *T. cruzi* em fibroblastos cardíacos de ratos leva ao aumento da expressão NGF e TrkA.

JUSTIFICATIVA

A participação de neuropeptídeos no desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas vem ganhando foco nos últimos tempos. Estudos vêm demonstrando que o desbalanço quantitativo entre neurônios e filetes nervosos imunorreativos (IR) à VIP e substância P pode ser evidenciado tanto no megacólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2007), quanto no megaesôfago chagásico (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Juntamente à desnervação seletiva, o aumento de mastócitos imunorreativos à triptase em indivíduos infectados (MARTINS *et al.*, 2014), parecem comparecer como potenciais fatores indutores ou estimuladores da inflamação da fase crônica (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2013), o que poderia favorecer o desenvolvimento de lesões teciduais.

Em outras doenças do trato GI, alguns estudos têm chamado a atenção para o aumento, tanto de NGF, quanto de TrkA, nos focos inflamatórios. Têm sido demonstrado ainda que essa neurotrofina desempenha importante papel na homeostase do microambiente, permitindo a interação entre diversos tipos celulares (DI MOLA *et al.*, 2000; TSUNODA *et al.*, 2006; WILLOT *et al.*, 2012; SHIEH *et al.*, 2010; 2014; DOTHEL *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015). Na doença de Chagas, estudos em animais já demonstraram o aumento da neurotrofina e do receptor TrkA no coração de ratos chagásicos (MARTINELLI *et al.*, 2006; ARIDGIDES *et al.*, 2013).

O papel do NGF no esôfago humano ainda não é bem conhecido e tem sido pouco avaliado. Então, será que a densidade dessa neurotrofina está alterada no esôfago de humanos infectados com *T. cruzi*? Quais células poderiam ser fonte dessa neurotrofina no esôfago desses indivíduos? E quais células poderiam ser moduladas pelo NGF? Sendo assim, a identificação do NGF na forma digestiva da doença de Chagas poderia, em parte, ilustrar outros mecanismos que pudessem estar envolvidos com o desenvolvimento dessa patologia.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar evidências da participação do NGF na patologia do megaesôfago chagásico induzido pela infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos:

Na porção inferior do esôfago de indivíduos infectados com *T. cruzi* e indivíduos não infectados:

- 1- Identificar as populações celulares imunorreativas a NGF e ao seu receptor TrkA.
- 2- Fazer a análise quantitativa de mastócitos, eosinófilos e células epiteliais imunorreativas a NGF.
- 3- Fazer a análise quantitativa de mastócitos, eosinófilos, células epiteliais e células musculares imunorreativas a TrkA.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Grupos Estudados

As amostras de tecidos de esôfago foram obtidas de 6 indivíduos não infectados, 6 indivíduos infectados sem megaesôfago e 6 indivíduos infectados com megaesôfago submetidos a necropsia ou a cirurgia na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Uberaba, Minas Gerais, Brasil). O consentimento para a pesquisa foi obtido dos membros da família antes do recolhimento dos tecidos e este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, No.0313.0.203.000-10.

O diagnóstico para infecção chagásica foi baseado na positividade das seguintes reações: Elisa, hemaglutinação e imunofluorescência indireta para o *T. cruzi*. Todos os indivíduos infectados deixaram a área endêmica há mais de 20 anos antes de serem realizados os procedimentos de coleta dos tecidos. Nenhum deles recebeu transfusão de sangue e nem tratamento específico contra o parasito e todos eles moravam em Uberaba, Minas Gerais, Brasil, onde a transmissão natural foi interrompida há mais de 30 anos antes da coleta das amostras.

O diagnóstico para o megaesôfago foi estabelecido a partir de dados clínicos e estudos radiológicos. As características dos indivíduos estão descritas na Tabela 1. Os indivíduos infectados sem megaesôfago tinham a média de idade de 55 ± 11 anos e a média de diâmetro do esôfago de $1,4 \pm 0,2$ cm. Já indivíduos infectados com megaesôfago tinham a média de idade de 52 ± 9 anos e a média de diâmetro do esôfago de $3,3 \pm 0,8$ cm. O grupo “não infectado”, composto por indivíduos oriundos de Minas Gerais, apresentou idade média de 62 ± 20 anos e a média de diâmetro do esôfago de $1,4 \pm 0,1$ cm.

Tabela 1. Caracterização dos grupos estudados

	Idade (anos)	Diâmetro do esôfago (cm)	Sexo
Indivíduos não infectados			
E2	76	1.6	M
E5	54	1.4	M
E17	79	1.6	M
HE12-94	34	1.5	M
HE83-93	85	1.2	M
HE 93-93	47	1.3	M
Indivíduos infectados sem megaesôfago			
E3	49	1.1	F
E9	47	1.3	F
E14	70	1.7	M
E4	61	1.6	M
E7	66	1.4	M
E15	40	1.2	M
Indivíduos infectados com megaesôfago			
E12	57	2.7	M
HE30-00	52	4.5	M
HE45-93	53	4.1	M
HE46-01	43	3.0	F
ML10-86	43	2,6	M
HE71-00	67	2.9	M

Abreviações: M, masculino; F, feminino.

Amostras de tecidos foram coletadas da porção inferior do esôfago a 5 cm da cárdia (parte do estômago ligada ao esôfago). Os tecidos coletados foram processados em uma solução neutra tamponada de formaldeído a 4% e embebidos em parafina. Após esses procedimentos, os anéis do esôfago foram cortados em seções seriadas de 7 μ m e submetidos à estudos imunohistoquímicos.

2. Análise de Imunohistoquímica

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

A atividade da peroxidase endógena foi inibida por incubação dos cortes com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 4% + 0,05M de azida sódica em PBS por 30 min. O bloqueio de ligação inespecífica foi obtido com uma solução de albumina de soro suíno (Sigma, St Louis, MO) a 2% em PBS por 30 minutos, subsequentemente incubadas com anticorpo policlonal específico para NGF (ABCAM, Cambridge, MA, USA, Code ab6199, anti-rabbit, 1:200) e com anticorpo monoclonal específico para TrkA (ABCAM, Cambridge, MA, USA, Code ab76291, anti-rabbit, 1:50). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o conjugado biotina (anti-mouse / anti-rabbit; DAKO) por 1 hora. Depois de lavadas em PBS, as lâminas foram incubadas com estreptoavidina-peroxidase (DAKO) por 1 hora. Antes de prosseguir para a revelação, as lâminas foram lavadas novamente com PBS. Em seguida, foi realizada a incubação com a solução de diaminobenzidina (DAB) e 0,5% de H₂O₂ (30v) em PBS por 10 minutos. Finalmente as lâminas foram lavadas com PBS e contra-coradas com hematoxilina de Gill (Sigma). As mesmas passaram pelo processo de desidratação (álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto II e álcool absoluto I) e diafanização (xilol I, xilol II, xilol III) sendo montadas com lamínulas e Entellan (Merck).

3. Análise Morfométrica

Para cada amostra de esôfago de indivíduos infectados e indivíduos não infectados, o número total de mastócitos NGF-IR, mastócitos TrkA-IR, eosinófilos

NGF-IR, eosinófilos TrkA-IR foi avaliado nas regiões de lâmina própria, muscular interna e plexo mioentérico. A contagem foi realizada em 50 campos selecionados aleatoriamente, utilizando microscópio de luz no aumento de 1000 vezes – em imersão (área total de $2076 \times 10^3 \mu\text{m}^2$).

Análises morfométricas das áreas coradas foram feitas utilizando o sistema de análise de imagem (Kontron KS300 version 2.0; Kontron, Port Coquitlam, Canada), em 20 campos selecionados aleatoriamente, utilizando microscópio de luz no aumento de 400 vezes (área total de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{indivíduo}$) na camada de células epiteliais e na camada de muscular interna em uma única lâmina por indivíduo. Em seguida as imagens foram analisadas pelo programa Image J.

4. Análises estatísticas

Todos os dados foram paramétricos, de acordo com o teste de normalidade. Análises estatísticas foram feitas utilizando o teste ANOVA ONE-WAY e o pós-teste de comparação TURKEY para diferenças nas respostas entre diferentes grupos relacionados a dados paramétricos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises de correlação foram feitas utilizando o teste paramétrico de PEARSON. As diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Em toda a extensão da parede do órgão foram encontrados eosinófilos, mastócitos e células epiteliais imunorreativos a NGF e a TrkA. Além disso, a imunorreatividade a TRKA foi observada também nas células musculares lisas e neurônios.

1. Análise qualitativa

Estruturas imunorreativas a NGF

Eosinófilos e mastócitos imunorreativos à NGF foram encontrados na lâmina própria, na muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados e infectados (Figura 1). Essas células foram encontradas próximo aos capilares sanguíneos e dispersas por todas as camadas analisadas. No caso dos indivíduos infectados, essas células foram encontradas também próximas a focos inflamatórios. Eosinófilos NGF-IR foram encontrados em maior densidade apenas nos tecidos de indivíduos infectados com megaesôfago, mas não naqueles sem megaesôfago. Mastócitos NGF-IR, por sua vez, foram observados em maior densidade em ambos os grupos de indivíduos infectados, com e sem megaesôfago.

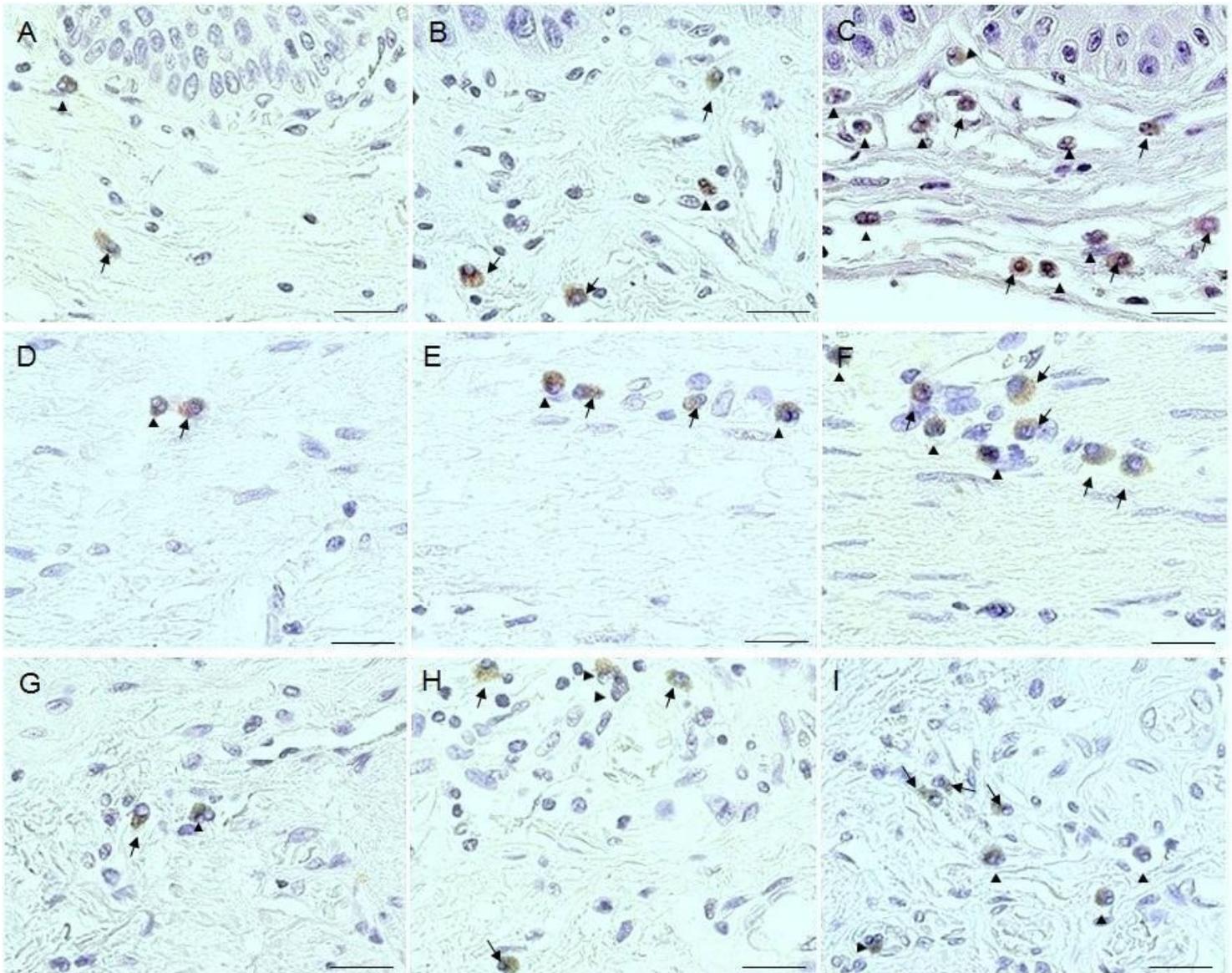


Figura 1: Perfil de marcação de mastócitos (seta) e eosinófilos (ponta de seta) imunorreativos à NGF no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Lâmina própria do esôfago de indivíduos não infectados (A), indivíduos infectados sem megaesôfago (B), indivíduos infectados com megaesôfago (C). Muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados (D), indivíduos infectados sem megaesôfago (E), indivíduos infectados com megaesôfago (F). Plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados (G), indivíduos infectados sem megaesôfago (H), indivíduos infectados com megaesôfago (I). Aumento de 1000x (imersão).

A imunorreatividade para NGF foi observada nas células epiteliais da mucosa do esôfago de todos os grupos analisados, sendo mais abundantes no epitélio do grupo de indivíduos infectados com megaesôfago, quando comparados tanto ao grupo controle, quanto aos indivíduos infectados sem megaesôfago. Em todos os grupos analisados, as

células epiteliais NGF-IR encontram-se, na porção central do epitélio da mucosa (Figura 2).

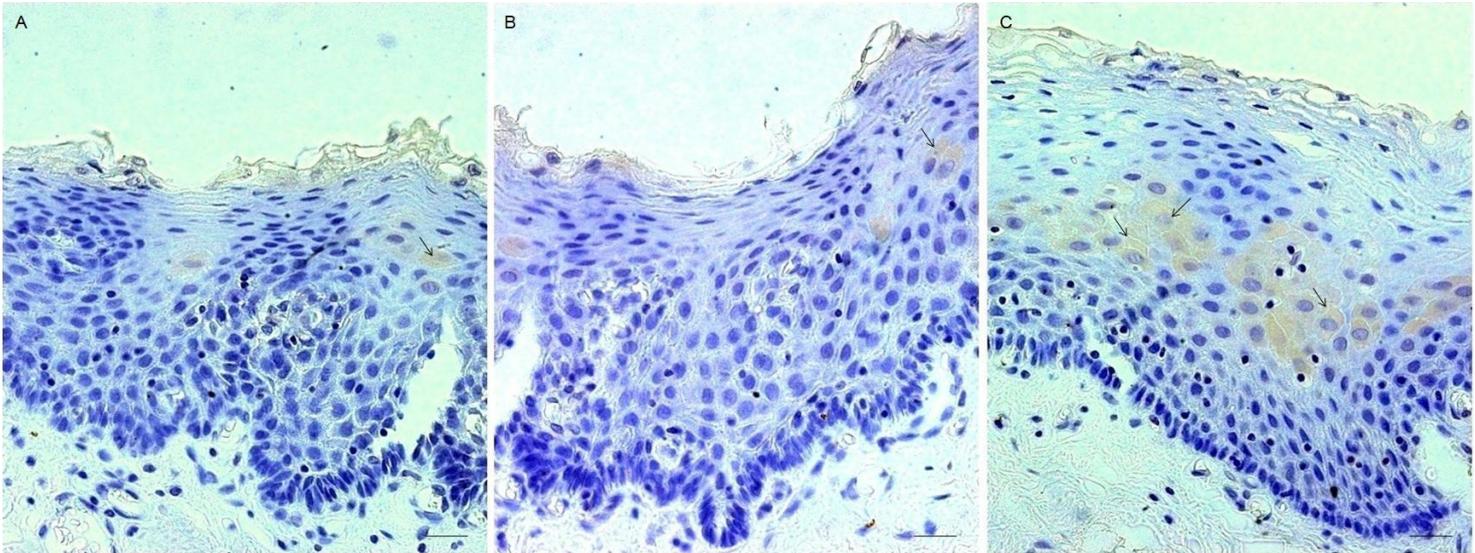


Figura 2: Perfil de marcação de células epiteliais (seta) imunorreativas à NGF no esôfago de indivíduos não infectados (A), indivíduos infectados sem megaesôfago (B), indivíduos infectados com megaesôfago (C). Aumento de 400x.

Estruturas imunorreativas a TrkA

Eosinófilos e mastócitos imunorreativos à TrkA foram encontrados na lâmina própria, na muscular interna e no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados e infectados com *T. cruzi* (Figura 3). Essas células foram encontradas próximo aos capilares sanguíneos e isoladas por todas as camadas analisadas do esôfago de todos os indivíduos. Além disso, ambas as células foram observadas próximas a focos inflamatórios principalmente nos tecidos de indivíduos infectados com *T. cruzi*. Eosinófilos e mastócitos TrkA-IR apresentaram-se em maior densidade nos tecidos de indivíduos infectados com megaesôfago.

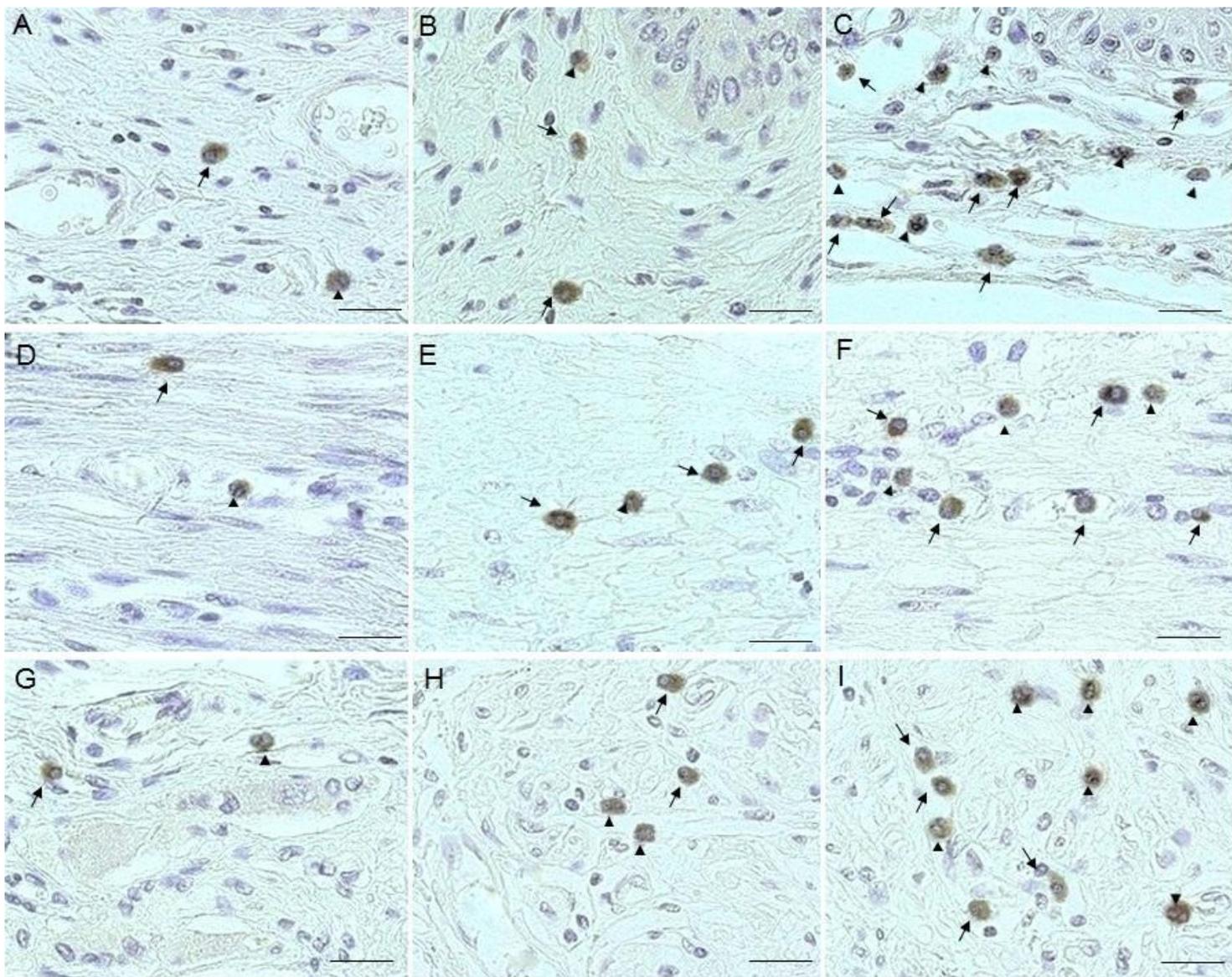


Figura 3: Perfil de marcação de mastócitos (seta) e eosinófilos (ponta de seta) imunorreativos à TrkA no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Lâmina própria do esôfago de indivíduos não infectados (A), indivíduos infectados sem megaesôfago (B), indivíduos infectados com megaesôfago (C). Muscular interna do esôfago de indivíduos não infectados (D), indivíduos infectados sem megaesôfago (E), indivíduos infectados com megaesôfago (F). Plexo mioentérico do esôfago de indivíduos não infectados (G), indivíduos infectados sem megaesôfago (H), indivíduos infectados com megaesôfago (I). Aumento de 1000x (imersão).

A imunorreatividade para TrkA também foi observada nas células epiteliais do esôfago de todos os grupos analisados, sendo mais abundantes no epitélio dos dois grupos de indivíduos infectados com *T. cruzi*, quando comparado ao grupo controle.

Células epiteliais TrkA-IR foram encontradas dispersas entre as porções central e apical do epitélio (Figura 4).

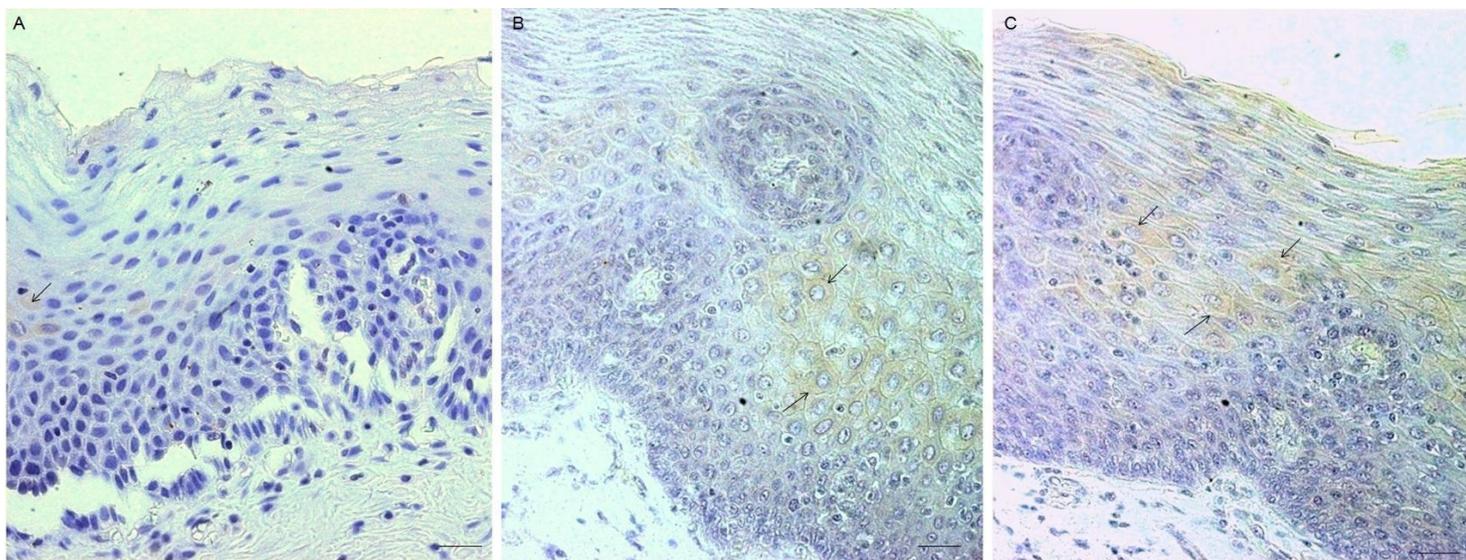


Figura 4: Perfil de marcação de células epiteliais (seta) imunorreativas à TrkA no esôfago de indivíduos não infectados (A), indivíduos infectados sem megaesôfago (B), indivíduos infectados com megaesôfago (C). Aumento de 400x.

A camada muscular interna demonstrou imunorreatividade para TrkA, a qual foi mais intensa nos indivíduos infectados, com e sem megaesôfago, comparados ao grupo controle. As células musculares TrkA-IR foram encontradas dispersas ao longo de toda a camada muscular interna (Figura 5).

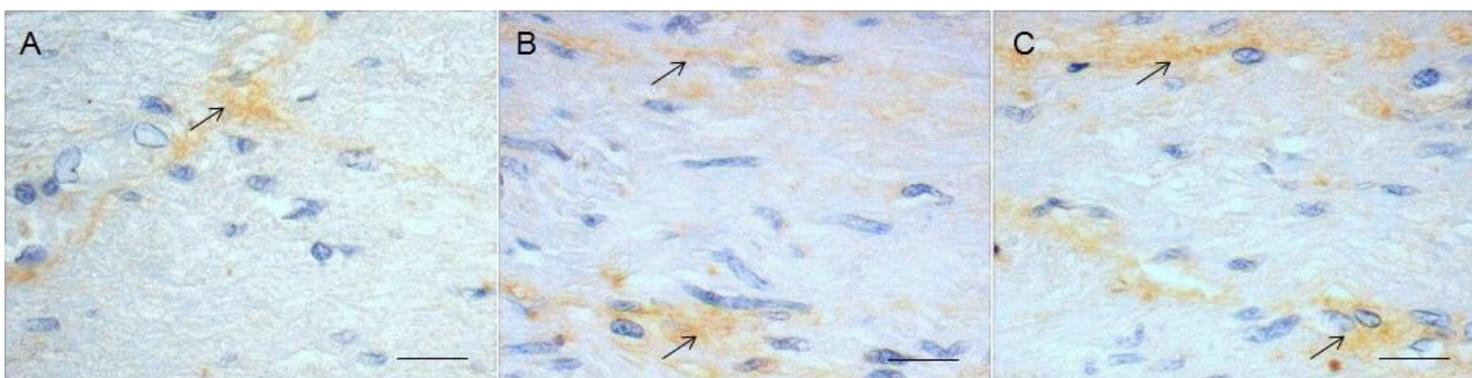


Figura 5: Perfil de marcação de células musculares lisas, da camada muscular interna (seta), imunorreativas à TrkA no esôfago de indivíduos não infectados (A), indivíduos infectados sem megaesôfago (B), indivíduos infectados com megaesôfago (C). Aumento de 1000x (imersão).

No esôfago de indivíduos não infectados e de alguns indivíduos infectados sem megaesôfago foram observados, em alguns gânglios do plexo mioentérico, neurônios TrkA-IR. Não foi observado neurônio TrkA-IR em indivíduos infectados com megaesôfago (Figura 6).

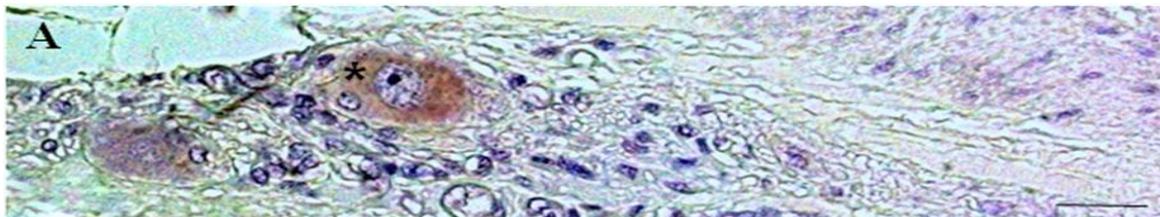


Figura 6: Perfil de marcação de neurônio (asterisco) imunorreativo à TrkA no esôfago de indivíduo infectado sem megaesôfago. Aumento de 400x.

2. Análise quantitativa de células imunorreativas à NGF

Mastócitos e Eosinófilos

O número total de mastócitos NGF-IR foi significativamente maior nas três camadas analisadas do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $4,50 \pm 1,04$; muscular interna: $4,16 \pm 1,32$; plexo mioentérico: $4,50 \pm 1,04$) e de indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $9,33 \pm 2,16$; muscular interna: $7,33 \pm 1,96$; plexo mioentérico: $4,66 \pm 1,21$) em relação aos indivíduos não infectados (lâmina própria: $1,33 \pm 0,81$; muscular interna: $1,16 \pm 0,98$; plexo mioentérico: $1,16 \pm 0,75$). Além disso, foi observado aumento significativo dessas células na lâmina própria e na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago em relação aos indivíduos infectados sem megaesôfago (Gráfico 1).

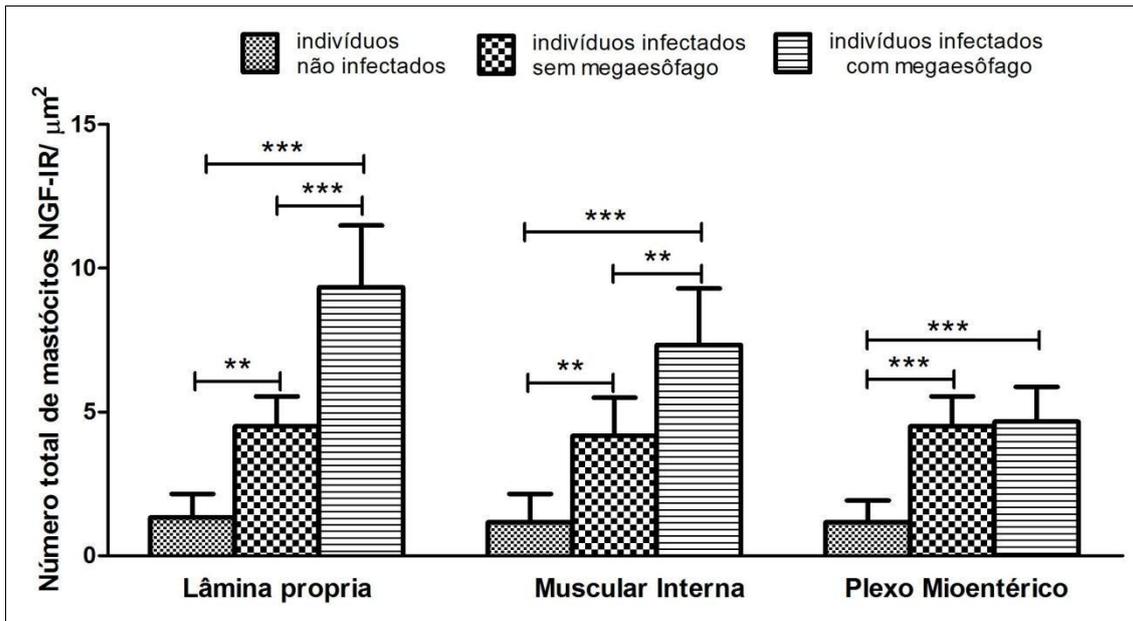


Gráfico 1: Número total de mastócitos NGF-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Os valores foram expressos como médias \pm DP (Desvio Padrão). ** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,01$). *** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,001$). Área total de $2076 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ analisadas por indivíduo.

Os dados estatísticos demonstraram aumento significativo do número total de eosinófilos NGF-IR nas três camadas analisadas do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $20,50 \pm 6,71$; muscular interna: $8,50 \pm 1,04$; plexo mioentérico: $15,83 \pm 6,40$) em relação aos indivíduos não infectados (lâmina própria: $1,83 \pm 1,47$; muscular interna: $1,00 \pm 0,89$; plexo mioentérico: $1,16 \pm 0,75$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $2,33 \pm 1,50$; muscular interna: $2,16 \pm 2,13$; plexo mioentérico: $4,66 \pm 4,22$) (Gráfico 2).

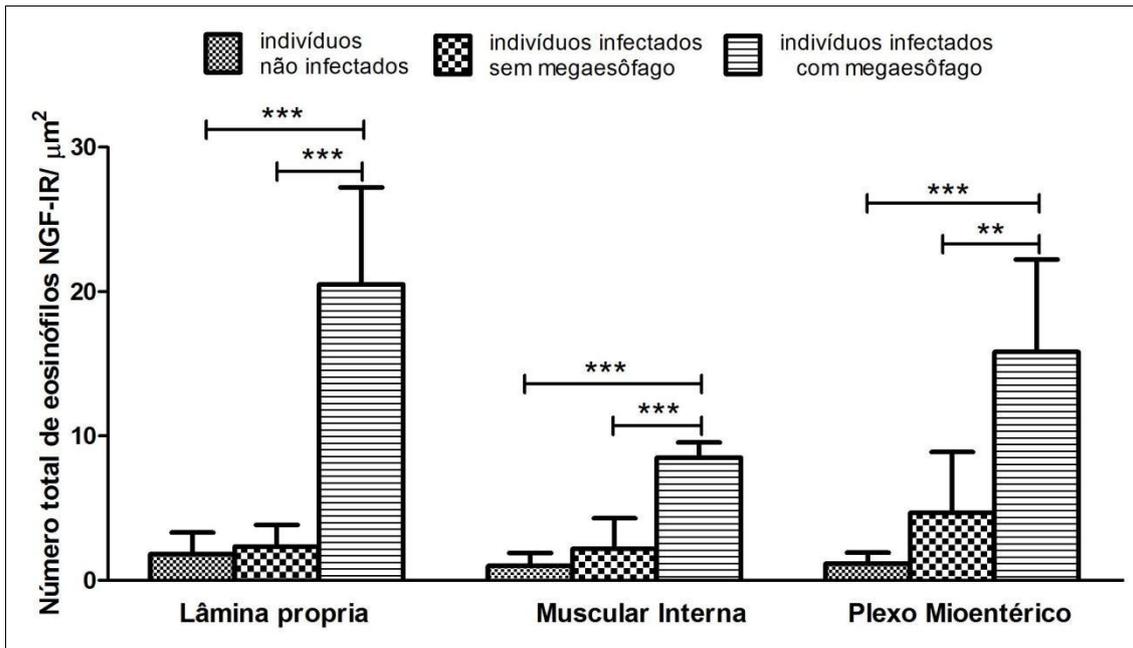


Gráfico 2: Número total de eosinófilos NGF-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Os valores foram expressos como médias \pm DP. ** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,01$). *** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,001$). Área total de $2076 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ analisadas por indivíduo.

Células epiteliais

Análises estatísticas comprovaram aumento significativo da densidade de células epiteliais NGF-IR no esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago ($735,2 \pm 149,8$) em relação aos outros aos indivíduos não infectados ($135,8 \pm 37,66$) e indivíduos infectados sem megaesôfago ($247,0 \pm 67,8$) (Gráfico 3).

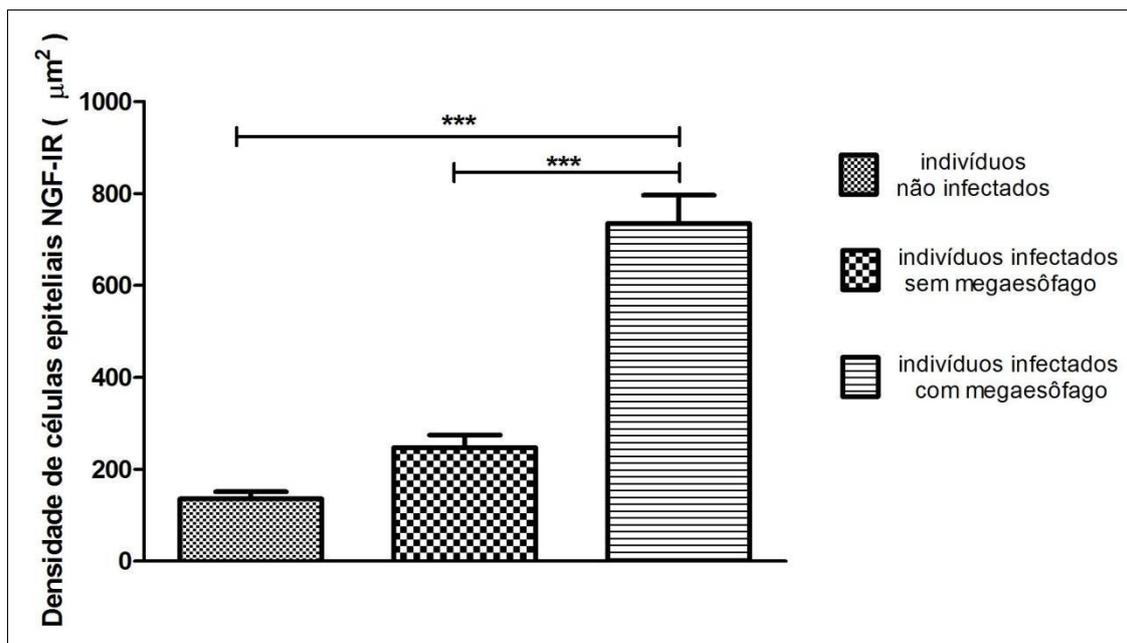


Gráfico 3: Densidade de células epiteliais NGF-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Os valores foram expressos como médias \pm DP. *** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,001$). Área total de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ analisadas por indivíduo.

3. Análise quantitativa de células imunorreativas à TrkA

Mastócitos e Eosinófilos

O número total de mastócitos TrkA-IR foi significativamente maior nas três camadas do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $23,67 \pm 7,84$; muscular interna: $13,00 \pm 2,44$; plexo mioentérico: $11,50 \pm 3,20$) comparado aos indivíduos controle (lâmina própria: $2,83 \pm 1,94$; muscular interna: $1,83 \pm 1,47$; plexo mioentérico: $2,83 \pm 1,83$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $7,66 \pm 2,50$; muscular interna: $9,16 \pm 1,60$; plexo mioentérico: $5,66 \pm 1,75$). Por outro lado, na muscular interna, também foi observado aumento no número total dessas células em indivíduos infectados sem megaesôfago comparado aos indivíduos não infectados (Gráfico 4).

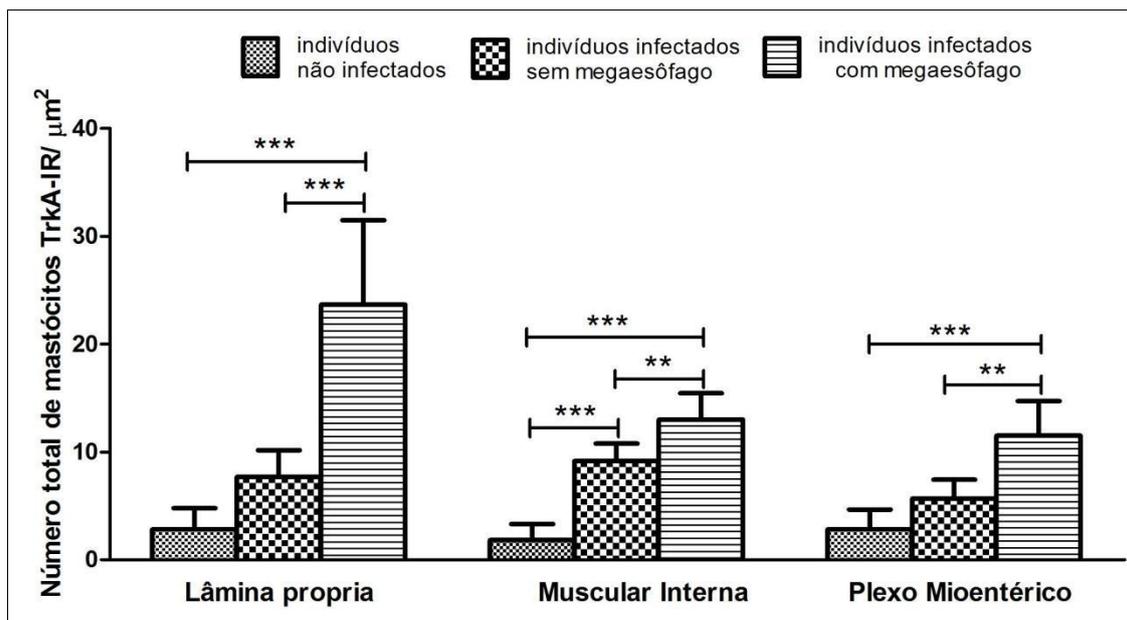


Gráfico 4: Número total de mastócitos TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Os valores foram expressos como médias \pm DP. ** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,01$). *** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,001$). Área total de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ analisadas por indivíduo.

Já em relação aos eosinófilos TrkA-IR, a análise estatística confirmou aumento significativo no número total de eosinófilos TrkA-IR nas três camadas analisadas do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago (lâmina própria: $26,67 \pm 8,80$; muscular interna: $10,17 \pm 1,32$; plexo mioentérico: $15,67 \pm 6,91$) comparado aos indivíduos não infectados (lâmina própria: $1,50 \pm 1,04$; muscular interna: $1,33 \pm 1,03$; plexo mioentérico: $1,66 \pm 1,36$) e aos indivíduos infectados sem megaesôfago (lâmina própria: $2,83 \pm 2,22$; muscular interna: $2,83 \pm 2,78$; plexo mioentérico: $5,16 \pm 4,66$) (Gráfico 5).

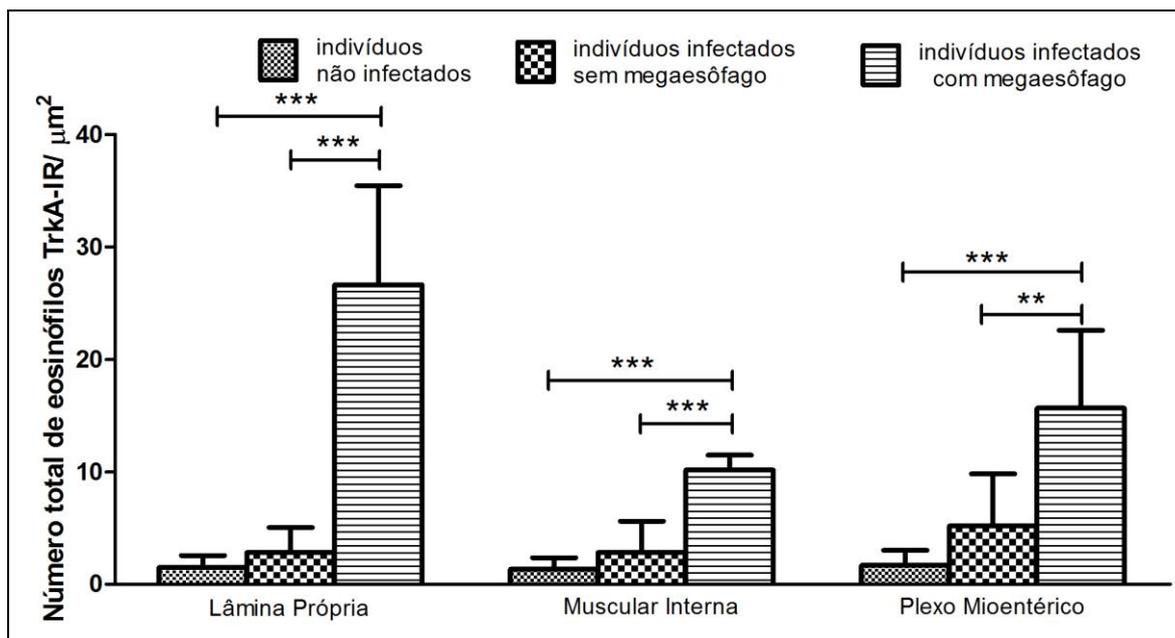


Gráfico 5: Número total de eosinófilos TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Os valores foram expressos como médias \pm DP. ** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,01$). *** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,001$). Área total de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ analisadas por indivíduo.

Células epiteliais

Em relação à densidade de células epiteliais TrkA-IR foi visto um aumento significativo nos grupos de indivíduos infectados com megaesôfago ($3822,0 \pm 1082,0$) e sem megaesôfago ($2983,0 \pm 533,4$) em relação aos indivíduos não infectados ($454,7 \pm 126,2$) (Gráfico 6).

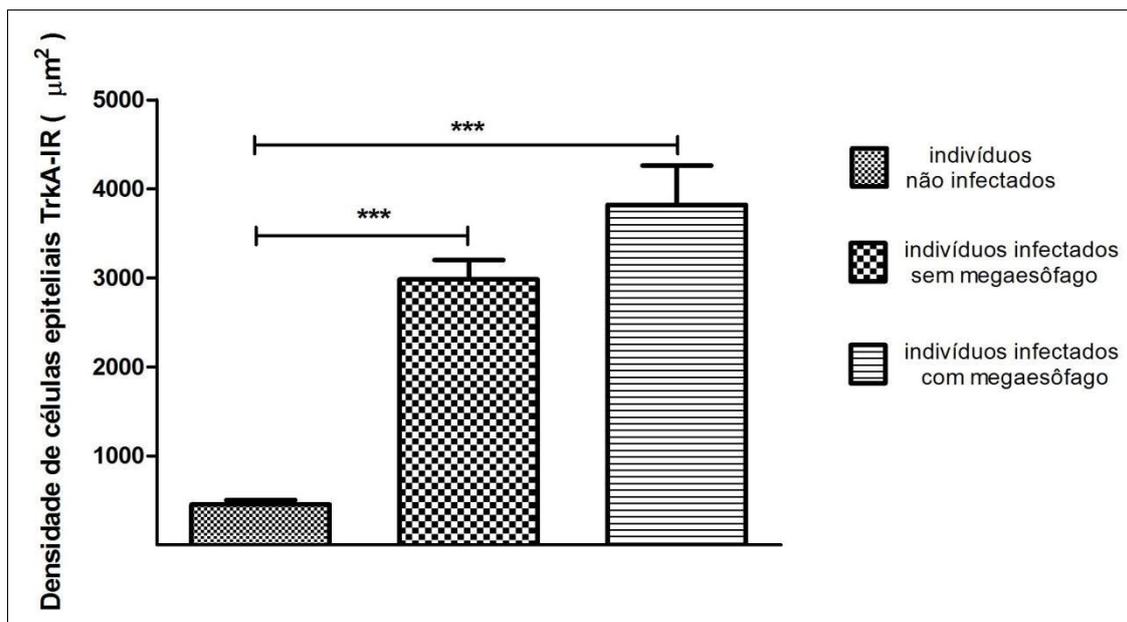


Gráfico 6: Densidade de células epiteliais TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e infectados com *T. cruzi*. Os valores foram expressos como médias \pm DP. *** Diferença estatística significante entre os grupos analisados ($P < 0,001$). Área total de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ analisadas por indivíduo.

Células musculares

Análise estatística demonstrou aumento significativo da densidade de células musculares TrkA-IR na camada muscular interna do esôfago de indivíduos infectados com megaesôfago ($2578,0 \pm 1055,0$) e indivíduos infectados sem megaesôfago ($1921,0 \pm 109,4$) em relação aos indivíduos não infectados ($358,0 \pm 135,5$) (Gráfico 7).

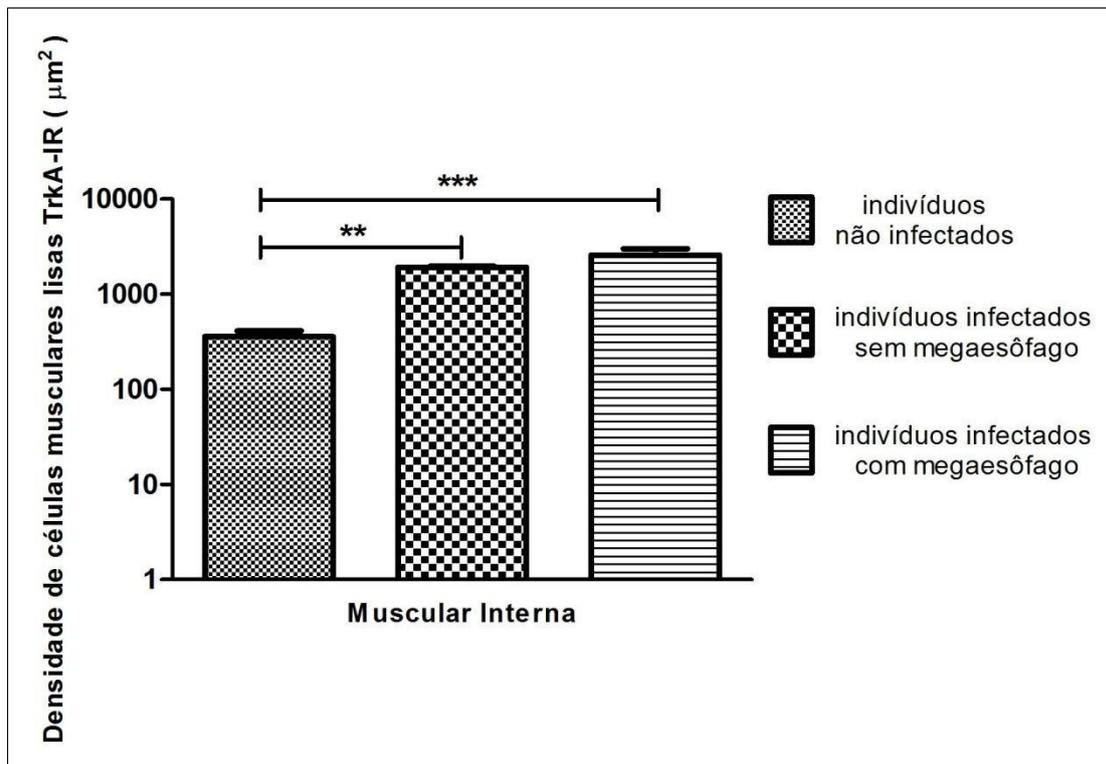


Gráfico 7: Densidade de células musculares lisas TrkA-IR no esôfago de indivíduos não infectados e indivíduos infectados com *T. cruzi*. Os valores foram expressos como médias \pm DP. ** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,01$). *** Diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($P < 0,001$). Área total de $1180 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ analisadas por indivíduo.

4. Análises de correlação

Neurônios imunorreativos à TrkA

Foi demonstrado estatisticamente correlação negativa entre o número de neurônios e o número de mastócitos NGF-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (Gráfico 8).

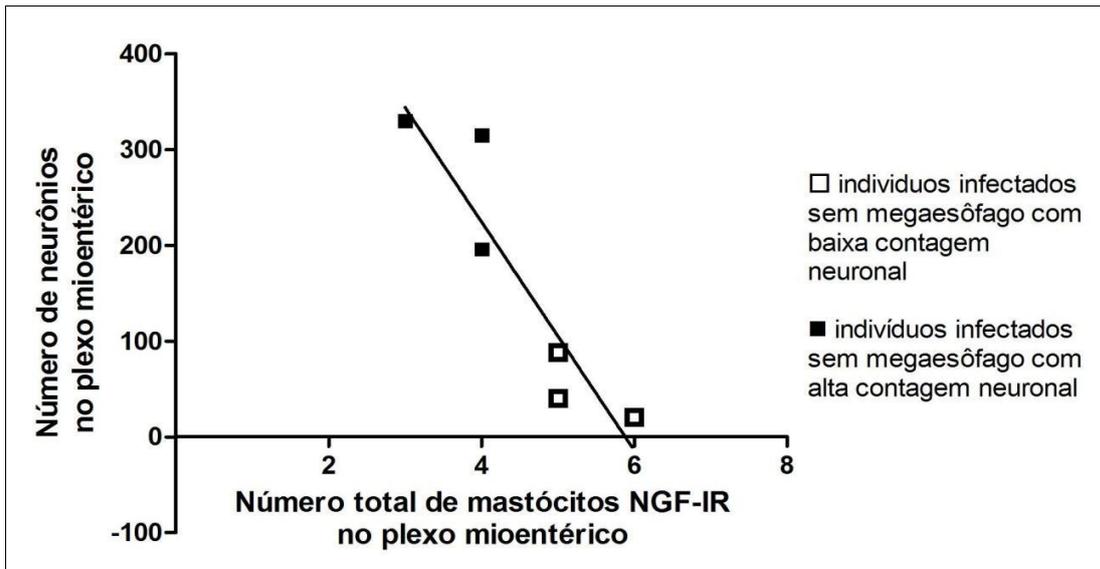


Gráfico 8: Correlação entre o número de neurônios e o número total de mastócitos NGF-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago ($r = -0,9166$ e $p < 0,05$). Contagem de neurônios realizada por NASCIMENTO *et al.* (2013).

Foi demonstrado estatisticamente correlação negativa entre o número de neurônios e o número de eosinófilos NGF-IR no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago (Gráfico 9).

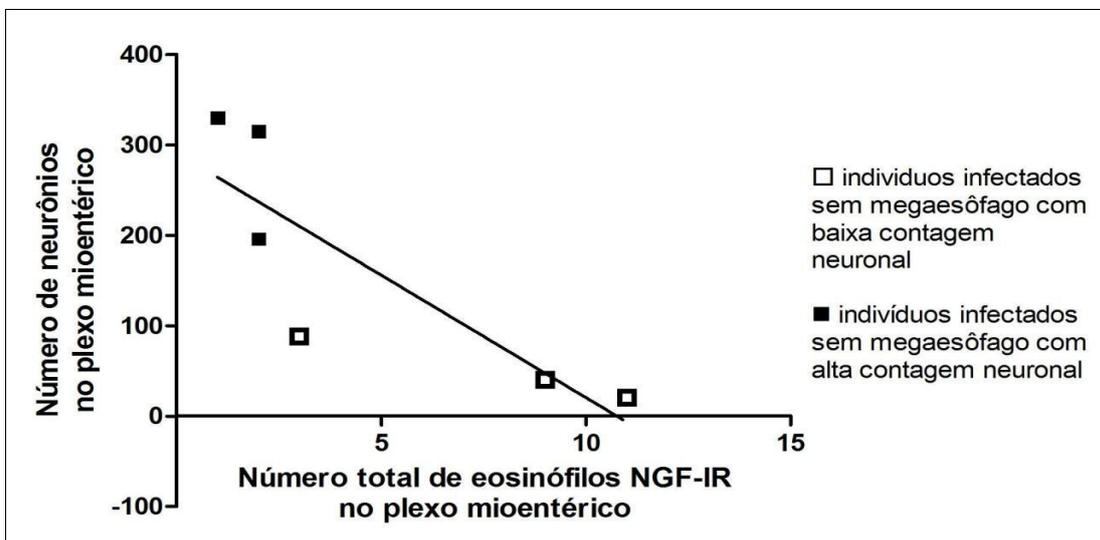


Gráfico 9: Correlação entre o número de neurônios e o número total de eosinófilos NGF-IR no plexo mioentérico ($r = -0,8382$ and $p < 0,05$). Contagem de neurônios realizada por NASCIMENTO *et al.* (2013).

DISCUSSÃO

A forma digestiva da doença de Chagas é caracterizada pelo aumento da espessura da parede e do lúmen dos órgãos ocos do trato GI, principalmente do esôfago e do cólon (OLIVEIRA *et al.*, 1998; MENEGHELLI, 2004). Acredita-se que esse distúrbio seja decorrente de um intenso processo de desnervação, que se revela tanto pela baixa contagem de neurônios (KOBBERLE *et al.*, 1968; ADAD *et al.*, 1991), quanto pela diminuição da densidade de filetes nervosos (SILVEIRA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2013). A desnervação, por sua vez, parece ser resultado do processo inflamatório decorrente da infecção pelo *T. cruzi* (ADAD *et al.*, 1991; DA SILVEIRA *et al.*, 2005).

Em relação ao foco inflamatório da fase crônica, anteriormente, já havia sido demonstrada a presença significativa de mastócitos e de eosinófilos no megaesôfago chagásico (D'ÁVILA REIS *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2014), células sabidamente produtoras de NGF (DI MOLA *et al.*, 2000; DOTHEL *et al.*, 2015).

O NGF é uma neurotrofina importante para a modulação de doenças inflamatórias. Tanto por isso o aumento de sua densidade já havia sido demonstrado correlacionado com o processo inflamatório em algumas doenças do trato GI como, doença inflamatória intestinal, carcinoma esofageal, IBS e esôfago inflamado (DI MOLA *et al.*, 2000; TSUNODA *et al.*, 2006; WILLOT *et al.*, 2012; SHIEH *et al.*, 2010; 2014; DOTHEL *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015). No entanto, em relação à doença de Chagas, a avaliação do aumento da densidade dessa neurotrofina só havia sido realizada no coração de ratos infectados (MARTINELLI *et al.*, 2006; ARIDGIDES *et al.*, 2013).

Buscando avaliar o papel do NGF na infecção humana pelo *T. cruzi*, demonstramos no esôfago de indivíduos infectados, aumento no número e na densidade, respectivamente, de mastócitos e eosinófilos, e de células epiteliais com imunorreatividade à NGF. O modelo experimental aqui utilizado não nos permite estabelecer relações de causa e/ou consequência, mas ousamos especular que esse aumento seja decorrente da inflamação, uma vez que estudos anteriores demonstraram que o processo inflamatório leva ao aumento da expressão tanto de NGF quanto de

TrkA (DI MOLA *et al.*, 2000; TSUNODA *et al.*, 2006; DOTHEL *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

Muitos fatores como, IL-1, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), TNF- α , fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante- α (TGF- α) e TGF- β já foram descritos como estimuladores da produção de NGF (LEVI-MONTALCINI *et al.*, 1996). Mais especificamente no megaesôfago chagásico, dois fatores parecem ter um papel relevante no aumento da densidade do NGF, visto nesse trabalho, a substância P e a triptase. A expressão das duas moléculas parece estar aumentada no megaesôfago chagásico, como relatado em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014). A substância P via receptor neuroquinina-1(NK1), é capaz de induzir a produção e liberação de NGF, tanto nas células epiteliais, quanto em eosinófilos e mastócitos (DALLOS *et al.*, 2006; FRIEDMAN E LEVI-SCHAFFER, 2015). A triptase por sua vez, atua na ativação dessa neurotrofina nessas células, uma vez que essa enzima via receptor ativado por protease-2 (PAR-2), cliva o pró-NGF em NGF (SPINLER *et al.*, 2011).

Neste trabalho demonstramos, pela primeira vez no esôfago aumento da densidade de células epiteliais da mucosa e de células musculares, bem como, aumento do número de eosinófilos e mastócitos imunorreativos ao receptor TrkA. Baseado nos nossos dados de aumento de células imunorreativas a NGF, acreditamos que o aumento de células imunorreativas a TrkA possa ser explicado, pelo menos parcialmente, pelo aumento dos níveis locais dessa neurotrofina. Considerando que o receptor TrkA é uma molécula expressa de forma constitutiva na membrana plasmática na forma inativa, sabe-se que, quando na interação do NGF, o receptor se autofosforila e sofre dimerização, tornando-se ativo. A interação também desencadeia na célula sinais para a síntese de novos receptores TrkA (WELKER *et al.*, 2000; MARLIN AND LI, 2015). Mais além de atuar na ativação e síntese do TrkA, o NGF também está relacionado com a reciclagem desse receptor, como demonstrado por estudo anterior (KOBAYASHI E FUKUDA, 2013).

A presença da imunorreatividade para NGF e TrkA, demonstrada nesse trabalho, em células do esôfago de indivíduos chagásicos, aponta uma interação entre elas mediada pela neurotrofina, bem como, sugere uma ampla atuação do NGF nesse quadro

patológico. Essa atuação parece ocorrer principalmente em indivíduos portadores de megaesôfago, nos quais tanto a densidade das células imunorreativas a NGF quanto a TrkA estão aumentadas. Adicionalmente, o NGF já parece em níveis aumentados nos indivíduos não portadores de megaesôfago chagásicos. Conforme trabalhos anteriores que apontam uma atuação dessa neurotrofina na sobrevivência neuronal (SOFRONIEW *et al.*, 2001), supomos que ela atue na tentativa de reduzir o processo de desnervação no esôfago, contribuindo assim para proteger esses indivíduos do processo de desnervação. Buscando evidências para esta especulação, demonstramos uma correlação negativa entre o número total de neurônios e o número total de mastócitos e eosinófilos imunorreativos a NGF no plexo mioentérico do esôfago de indivíduos infectados sem megaesôfago.

Ainda tratando da atuação do NGF sobre neurônios, sabe-se que ele está envolvido com o controle da síntese de neurotransmissores e neuropeptídeos como a substância P (MEAROW *et al.*, 1995). Por outro lado, como já mencionado anteriormente, o inverso também procede, ou seja, substância P induz o aumento de NGF. Como em trabalho anterior do nosso grupo, demonstramos aumento da área relativa de filetes nervosos substância P-IR no esôfago de indivíduos chagásicos com megaesôfago (NASCIMENTO *et al.*, 2013) poderíamos especular uma relação de causa e consequência com NGF. Uma vez que a substância P, semelhantemente ao NGF, apresenta propriedades pró inflamatórias (DELGADO *et al.*, 2003; EL-SHAZLY *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 2013), a atuação de ambas as moléculas parece contribuir para a sobrevivência celular, e para a manutenção do microambiente próinflamatório.

Tomando como foco a atuação de NGF sobre outras células no esôfago de indivíduos chagásicos, nesse trabalho demonstramos, semelhantemente a estudo anterior (TSUNODA *et al.*, 2006) a presença de células epiteliais imunorreativas a NGF e TrkA na mucosa do esôfago. Nessas células, como nas demais, o NGF exerce um papel protetor, impedindo sua morte através da sinalização das cascatas de sobrevivência PLC- γ , MAPK e PI3K/Akt. Essas cascatas são deflagradas a partir da interação do NGF com o TrkA expresso pelas células (OTHUMPANGAT *et al.*, 2009). Além disso, o NGF também pode induzir a produção de IL-10 por essas células (MA *et al.*, 2003). Tais dados apontam para uma tentativa do NGF em manter as células da

mucosa do esôfago vivas, bem como de controlar o processo inflamatório na região da mucosa.

Demonstramos também células musculares imunorreativas à TrkA. Estudo anterior realizado *in vivo* e *in vitro* demonstrou que o NGF leva ao aumento do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) em células musculares lisas, fator este que estimula a proliferação e regula a sobrevivência destas células (ZHANG E QIAO, 2012). A proliferação é mediada pela ativação de PI3K, PDK-1 e p70S6 quinase (KUEMMERLE, 2003). O aumento do nível de atuação de NGF nas células musculares do esôfago de indivíduos portadores de megaesôfago poderia, de certa maneira, justificar o quadro hiperplásico comumente observado nesta camada (ADAD *et al.*, 1991; PEREIRA E GONÇALVES, 1958; PINAZO *et al.*, 2014).

Com relação à atuação de NGF em eosinófilos, trabalhos *in vitro* têm demonstrado que essa neurotrofina pode induzir migração, diferenciação, sobrevivência e estimular a sua desgranulação (HAMADA *et al.*, 1996). De acordo com NASCIMENTO, 2013, em sua tese, foi demonstrado nos mesmos indivíduos estudados neste trabalho, aumento significativo no número de eosinófilos totais em indivíduos infectados com megaesôfago. Esse aumento tardio de eosinófilos nos permite especular, que tal fato, poderia ser induzido pelo NGF produzido por mastócitos, uma vez que indivíduos infectados sem megaesôfago já apresentam aumento do número de mastócitos NGF-IR. Já na fase mais tardia, após o desenvolvimento no megaesôfago, a atividade dos eosinófilos poderia ser influenciada por mecanismos tanto parácrinos, quanto autócrinos.

Nos mastócitos, o NGF pode induzir a sua sobrevivência (BULLOCK AND JOHNSON, 1996) e a expressão de receptores como TrkA, c-kit, receptor de IgE (FCεRI), além de estimular sua desgranulação e o aumento de produção histamina e da enzima triptase (WELKER *et al.*, 2000). Interessantemente, como visto em relação à NGF e substância P, também há uma modulação cruzada entre NGF e triptase. Enquanto a enzima atua na ativação da neurotrofina, como mencionando anteriormente, a neurotrofina estimula a produção da enzima. Isto aponta para uma influência de ambas as moléculas nos mastócitos do esôfago de indivíduos chagásicos. Uma vez que já é visto um aumento precoce tanto no número de mastócitos NGF-IR, quanto no número

de mastócitos tripase-IR (MARTINS *et al.*, 2014) em indivíduos chagásicos sem megaesôfago.

Por meio da análise de células imunorreativas a NGF e TrkA, esse trabalho vem se juntar a vários outros que discutem a participação dessa neurotrofina em doenças inflamatórias do trato GI (DI MOLA *et al.*, 2000; TSUNODA *et al.*, 2006; WILLOT *et al.*, 2012; SHIEH *et al.*, 2010; 2014; YANG *et al.*, 2015; DOTHEL *et al.*, 2015). No campo da patologia da doença de Chagas, nossos dados vieram complementar trabalhos em camundongos que já demonstravam o seu aumento bem como de seu receptor no desenvolvimento da doença (MARTINELLI *et al.*, 2006; ARIDGIDES *et al.*, 2013). O aumento de células imunorreativas à NGF na infecção causada pelo *T. cruzi*, poderia ser interpretado de uma forma bem ampla e baseado em uma resposta local. Os efeitos do NGF, além de neurotróficos, impedindo a desnervação, poderiam também estar relacionados a proteção do epitélio, e até mesmo contribuindo para o aumento da inflamação, induzindo a sobrevivência, ativação, migração e desgranulação de eosinófilos e mastócitos. Mais além, a neurotrofina também poderia contribuir para o aumento da espessura da camada muscular do órgão, e conseqüentemente, resultar no desenvolvimento do quadro clínico da doença. Análises futuras de receptores de substâncias que modulam o NGF, tais como, o receptor de substância P, NK1 e o receptor de triptase, PAR-2; bem como de fatores de reciclagem de seu receptor TrkA, só farão complementar nossos estudos, bem como reforçar o papel dessa neurotrofina no desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas.

CONCLUSÃO

Demonstramos que o NGF aparece ser um importante mediador das alterações no esôfago de indivíduos chagásicos, uma vez que a imunorreatividade, tanto dele quanto de seu receptor TrkA parecem aumentar ao longo do desenvolvimento da doença. Os mecanismos de ação do NGF parecem ser amplos, atuando não apenas em células neuronais, mas também em outras células efetoras, como eosinófilos, mastócitos, células epiteliais e musculares. O aumento de células imunorreativas à NGF na infecção causada pelo *T. cruzi*, poderia ser interpretada de uma forma bem ampla e baseada em uma resposta local. Seus efeitos, além de neurotróficos, impedindo a desnervação, poderiam também estar relacionados à proteção do epitélio, e até mesmo contribuindo para o aumento da inflamação, induzindo a sobrevivência, ativação, migração e a atividade citotóxica de eosinófilos e mastócitos. Mais além o NGF também pode contribuir para o aumento da espessura da camada muscular.

PERSPECTIVAS

1. Quantificar o receptor NK1 em indivíduos infectados com e sem megaesôfago, através de imunohistoquímica de amostra de esôfago.
2. Quantificar o receptor PAR2 em indivíduos infectados com e sem megaesôfago, através de imunohistoquímica de amostra de esôfago.
3. Quantificar a co-localização de Rab11 e ARF6 em indivíduos infectados com e sem megaesôfago, através de imunofluorescência de amostra de esôfago.

REFERÊNCIAS

1. Adad SJ, Andrade DCS, Lopes ER, Chapadeiro E. Contribution to the study of the pathology and pathogenesis of the chagasic megaesophagus. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:443-50.
2. Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JC, Junqueira AC, Coura JR. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 47-56.
3. Aloe L, Roccom L, Bianchi P. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med* 2012; 10: 239.
4. Anderson P, Gonzalez-Rey. Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple levels. *Mol Cell Biol* 2010; 30:2537-51.
5. Aridgides D, Salvador R, PereiraPerrin M. *Trypanosoma cruzi* coaxes cardiac fibroblasts into preventing cardiomyocyte death by activating nerve growth factor receptor TrkA. *PLoS One* 2013; 8: e57450.
6. Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C, Gomariz RP. VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mol Immunol* 2008; 45:3065-73.
7. Bercu MM, Arien-Zakay H, Stoler D, et al. Enhanced Survival and Neurite Network Formation of Human Umbilical Cord Blood Neuronal Progenitors in Three-Dimensional Collagen Constructs. *J Mol Neurosci* 2012; 51:249-61.
8. Blum AM, Metwali A, Elliott DE, Weinstock JV. T cell substance P receptor governs antigen-elicited IFN-gamma production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284:G197-204.
9. Brener Z. Recent developments in the Field of Chagas' disease. *Bull World Health Organ* 1982; 60:463-73.
10. Berry A, Bindocci E, Alleva E. NGF, Brain and Behavioral Plasticity. *Neural Plast* 2012: 784040 doi: 10.1155/2012/784040.
11. Bradshaw R, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Advances in Biological Regulation* 2015; 58: 16-27.

12. Brito, TDe and Vasconcelos E. Arterite necrotizante no megaesôfago: histopatologia de noventa e uma biópsia da cárdia. Ver Inst Med Trop S Paulo 1959; 1: 195-206.
13. Bullock ED and Johnson EM Jr. Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 mast cells. Potential role insurvival promotion. J Biol Chem 1996; 271:27500-8.
14. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. Clin Sci (Lond) 2006;110:167-73.
15. Chorny A, Delgado M. Neuropeptides rescue mice from lethal sepsis by down-regulating secretion of the late-acting inflammatory mediator high mobility group box 1. Am J Pathol 2008; 172:1297-307.
16. Chuenkova MV and PereiraPerrin M. Chagas' disease parasite promotes neuron survival and differentiation through TrkA nerve growth factor receptor. Journal of Neurochemistry 2004; 91: 385-3.
17. Coura JR. Chagas disease: What is known and what is needed – A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102: 113-22.
18. Coura JR and Viñas PA. Chagas' disease: a new worldwide challenge. Nature 2010; 456: s6-7.
19. Coura JR and Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106: 641-5.
20. Crema E, Monteiro IO, Gomes MGZ, Silva AA, Rodrigues Júnior V. Evaluation of cytokines (MIG, IFN- γ , TNF-A, IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. Clinical Immunology 2006; 119: 213-8.
21. Da Mata JR, Camargos MR, Chiari E, Machado CR. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. Brain Res Bull 2000; 53: 153-62.
22. Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. Neuropeptides. 2006; 40:251-63.

23. D'Avila Reis D, Lemos EM, Silva GC, Adad SJ, Mccurley T, Correa-Oliveira R, Machado CR. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:177-8.
24. Da Silveira AB, Arantes RME, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Avila Reis D. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 2005; 131: 627–34.
25. Da Silveira AB, D'Ávila Reis D, De Oliveira EC, et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in Chagasic patients with megacolon. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2877-83.
26. De Lima MA, Cabrine-Santos M, Tavares MG, Gerolin GP, Lages-Silva E, Ramirez LE. Interstitial cells of Cajal in chagasic megaesophagus. *Ann Diagn Pathol* 2008; 12: 271-4.
27. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 1999; 162:1707-16.
28. Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol* 2001; 167:966-75.
29. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 2003; 37:355-61.
30. Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D. VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. *Faseb J* 2004; 18:1453-5.
31. Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 603-12.
32. Dias JC. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 370-5.

33. Di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, et al. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 46: 670-8.
34. Dothel G, Barbaro MR, Boudin H, et al. Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2015; 148:1002-11.
35. Douglas-Escobar M, Rossignol C, Steindler D, Zheng T, Weiss MD. Neurotrophin-induced migration and neuronal differentiation of multipotent astrocytic stem cells in vitro. *PLoS One* 2012; 7:e51706.
36. Dunzendorfer S, Feistritzer C, Enrich B, Wiedermann CJ. Neuropeptide-induced inhibition of IL-16 release from eosinophils. *Neuroimmunomodulation* 2003; 10:217-23.
37. El-Shazly AE, Masuyama K, Ishikawa T. Mechanisms involved in activation of human eosinophil exocytosis by substance P: an in vitro model of sensory neuroimmunomodulation. *Immunol Invest* 1997; 26:615-29.
38. Fahnstock M, Yu G, Coughlin MD. ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog Brain Res* 2004; 146:101-10.
39. Feistritzer C, Clausen J, Sturn DH, Djanani A, Gunsilius E, Wiedermann CJ, Kähler CM. Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul Pept* 2003; 116:119-26.
40. Friedman S and Levi-Schaffer F. Substance P and eosinophils: an itchy connection. *Experimental Dermatology* 2015 DOI: 10.1111/exd.12806.
41. Fu WX, Qin B, Zhou AP, Yu QY, Huang QJ, Liang ZF. Regulation of NK92-M1 cell cytotoxicity by substance P. *Scand J Immunol* 2011; 74:107-13.
42. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81:87-96.
43. Furness JB. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Auton Neurosci* 2006; 30:81-5.
44. Furness JB. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20 Suppl 1:32-8.

45. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9:286-94.
46. Gabella G. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat* 1972; 111:69-97.
47. Gomariz RP, Arranz A, Abad C, Torroba M, Martinez C, Rosignoli F, Garcia-Gómez M, Leceta J, Juarranz Y. Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. *J Leukoc Biol* 2005; 78:491-502.
48. Gonzalez-Rey E, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia and dendritic cells. *Brain Behav Immun* 2008; 22:35-41.
49. Guo CJ, Lai JP, Luo HM, Douglas SD, Ho WZ. Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1beta expression in human T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2002; 131:160-7.
50. Gutiérrez-Canãs I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martinez C, Galindo M, Payá M, Gomariz RP, Pablos JL. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45:527-32.
51. Hamada A, Watanabe N, Ohtomo H, Matsuda H. Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *British Journal of Haematology* 1996; 93: 299–302.
52. Hahn C, Islamian AP, Renz H, Nockher WA. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117: 787-94.
53. Hoyle CH and Burnstock G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat* 1989; 166: 7-22.
54. Huang LW, Sun G, Wang DL, Kong LF. Inhibition of nerve growth factor/tyrosine kinase receptor A signaling ameliorates airway remodeling in chronic allergic airway inflammation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2015; 19: 2261-8.
55. Kamińska B, Landowski P, Gonkowski S, Majewski M, Renke J, Korzon M. Changes in the number of neuroprotective transmitter containing mucosal nerve fibres in children with ulcerative colitis. *Med Wieku Rozwoj* 2006; 10: 483-91.

56. Kobayashi H e Fukuda M. Arf6, Rab11 and transferrin receptor define distinct populations of recycling endosomes. *Communicative & Integrative Biology* 2013; 6:5, e25036.
57. Koberle F. Hiperplasia muscular no megaesôfago chagásico. *Rev. Goiana Med* 1960; 6: 147-53.
58. Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968; 6:63-116.
59. Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, Kawabe K, Coy DH, Jensen RT, Nawata H. VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas* 2005; 30:62-70.
60. Kuemmerle JF. IGF-I elicits growth of human intestinal smooth muscle cells by activation of PI3K, PDK-1, and p70S6 kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284:411–22.
61. Lemos EM, D'Avila Reis D, ADAD SJ, Silva GC, Crema E, Correia-Oliveira R. Decreased CD41 Circulating T Lymphocytes in Patients with Gastrointestinal Chagas Disease. *Clinical immunology and immunopathology* 1998; 88: 150–5.
62. Levi-Montalcini R, Skapen SD, Dal Toso R, *et al.* Nerve growth factor: From neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 1996;19:514–20.
63. Li WW, Guo TZ, Liang DY, Sun Y, Kingery WS, Clark JD. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology* 2012; 116:882-95.
64. Li X, Lavigne P, Lavoie C. GGA3 Mediates TrkA Endocytic Recycling to Promote Sustained Akt Phosphorylation and Cell Survival. *Mol Biol Cell* 2015; Oct 7.
65. Lichvárová L, Jašková K, Lacinová L. NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of calcium entry through L-type calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 2012; 31: 473-8.
66. Lisi S, Sisto M, Ribatti D, et al. Chronic inflammation enhances NGF-β/TrkA system expression via EGFR/MEK/ERK pathway activation in Sjögren's syndrome. *J Mol Med* 2014; 92: 523-37.

67. Ma D, Wolvers D, Stanisiz AM, Bienenstock J. Interleukin-10 and nerve growth factor have reciprocal upregulatory effects on intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: 1323-9.
68. Marlin MC and Li G. Biogenesis and function of the ngf/trka signaling endosome. *Int Rev Cell Mol Biol* 2015; 314: 239-57.
69. Martinelli PM, Camargos ERS, Azevedo AA, Chiari E, Morel G, Machado, CRS. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2006; 130: 32-40.
70. Martins PR, Nascimento RD, Lisboa AS, Martinelli PM, D'Avila Reis D. Neuroimmunopathology of *Trypanosoma cruzi*-induced megaesophagus: Is there a role for mast cell proteases? *Human Immunology* 2014; 75: 302-5.
71. Mearow KM, Kril Y. Anti-NGF treatment blocks the upregulation of NGF receptor mRNA expression associated with collateral sprouting of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 1995; 184: 55-58.
72. Meneghelli UG. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 252-60.
73. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for chagas disease in latin america and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2009; 104: 17-30.
74. Nascimento RD, Lisboa AS, Fujiwara RT, et al. Characterization of enteroglia cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. *Human Pathology* 2010; 41:528:34.
75. Nascimento, RD. Avaliação da possível participação do polipeptídeo intestinal vasoativo e substância P na patologia do megaesôfago induzido pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Julho de 2013: 108. Tese (Doutorado) – Pós Graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
76. Nascimento RD, Martins PR, Lisboa AS, Adad SJ, Da Silveira ABM, D'Avila Reis D. An imbalance between substance P and vasoactive intestinal polypeptide might contribute to the immunopathology of megaesophagus after *Trypanosoma cruzi* infection. *Human Pathology* 2013; 44: 269 – 76.

77. Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, Xiang Z, Hallbook F, Nilsson K, Metcalfe DD. Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2295-301.
78. Noga O, Englmann C, Hanf G, Grutzkau A, Guhl S, Kunkel G. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1348-54.
79. Oliveira RB, Trocon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 44: 407-10.
80. Othumpangat S, Gibson LF, Samsell L, Piedimonte G. NGF is an essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One* 2009; 4: e6444.
81. Otten U, Schwab M, Gagnon C, Thoenen H. Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase by nerve growth factor: comparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats. *Brain Res* 1977, 133: 291-303.
82. Palermo MS, Vermeulen ME, Giordano MN. Human antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by interferon gamma-activated neutrophils is impaired by vasoactive intestinal peptide. *J Neuroimmunol* 1996; 69:123-8.
83. Peng WM, Maintz L, Allam JP, et al. Increased circulating levels of neurotrophins and elevated expression of their high-affinity receptors on skin and gut mast cells in mastocytosis. *Blood* 2013; 122: 1779-88.
84. Pereira PF and Gonçalves RP. Megaesôfago: hipertrofia ou hiperplasia? *Ver Goiana Med* 1958; 4: 17-28.
85. Pinazo MJ, Lacima G, Elizalde JI, et al. Characterization of digestive involvement in patients with chronic *T. cruzi* infection in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3105.
86. Pinheiro SW, Rua AMO, Etchebehere RM, Cançado CG, Chica JEL, Lopes ER, Adad SJ. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003,36: 461-6.
87. Pissetti CW, Correia D, Braga T, et al. Association between the plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of

chronic Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; 42:425-30.

88. Pozo D, Anderson P, Gonzalez-Rey E. Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *J Immunol* 2009; 183:4346-59.

89. Raap U, Deneka N, Bruder M, Kapp A, Wedi B. Differential up-regulation of neurotrophin receptors and functional activity of neurotrophins on peripheral blood eosinophils of patients with allergic rhinitis, atopic dermatitis and nonatopic subjects. *Clinical and Experimental Allergy* 2008; 38: 1493–8.

90. Ralainirina N, Brons NH, Ammerlaan W, Hoffmann C, Hentges F, Zimmer J. Mouse natural killer (NK) cells express the nerve growth factor receptor TrkA, which is dynamically regulated. *PLoS One* 2010; 5:e15053.

91. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 3243-52.

92. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361:1545-64.

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

94. Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 203-33.

95. Samarasena JB, Ahluwalia A, Tarnawski AS, Shinoura S, Choi KD, Lee JG, Chang KJ. Expression of nerve growth factor, its trka receptor, and several neuropeptides in porcine esophagus. implications for interactions between neural, vascular and epithelial components of the esophagus. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66: 415-20.

96. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 55-9.

97. Shieh KR, Yi CH, Liu TT, Tseng HL, Ho HC, Hsieh HT, Chen CL. Evidence for neurotrophic factors associating with TRPV1 gene expression in the inflamed human esophagus. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 971–7.

98. Shieh KR, Yang SC, Tseng HL, Yi CH, Liu TT, Chen CL. Evidence for up-regulation of purinergic receptor genes associating with TRPV1 receptors and neurotrophic factors in the inflamed human esophagus. *Curr Mol Med* 2014; 14: 1205-14.
99. Shimizu Y, Matsuyama H, Shiina T, Takewaki T, Furness JB. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 295-311.
100. Silveira AC, Pimenta Junior F. Institutional insertion of Chagas' disease control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44: 19-24.
101. Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008; 7: 46-62.
102. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* 2012; 846: 1-12.
103. Spinnler K, Frohlich T, Arnold GJ, Kunz L, Mayerhofer A. Human tryptase cleaves Pro-NGF Growth Factor (Pro-NGF): Hints of local, mast cell-dependent regulation of NGF/pro-NGF action. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 31707-13.
104. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:1217-81.
105. Solomon A, Aloe L, Pe'er J, Frucht-Pery J, Bonini S, Bonini S, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor is performed in and activates human peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 454-60.
106. Stewart AL, Anderson RB, Kobayashi K, Young HM. Effects of NGF, NT-3 and GDNF family members on neurite outgrowth and migration from pelvic ganglia from embryonic and newborn mice. *BMC Dev Biol* 2008; 8:73.
107. Tafuri WL and Raso P. Anatomia patológica. In: RAIA, A. A.- Manifestações digestivas da moléstia de Chagas 1983; 61-79.
108. Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec* 2001; 1: 71-8.

109. Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G, Hosokawa K. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: Implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience* 2013; 236C: 55-65.
110. Tsunoda S, Okumura T, Ito T, et al. Significance of nerve growth factor overexpression and its autocrine loop in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2006; 95:322-30.
111. Vanneste G, Robberecht P, Lefebvre RA. Inhibitory pathways in the circular muscle of rat jejunum. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 107-18.
112. Villanacci V, Annese V, Cuttitta A, et al. An immunohistochemical study of the myenteric plexus in idiopathic achalasia. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 407-10.
113. von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Nerve growth factor secretion in culture enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 820-5.
114. Weinstock JV, Blum A, Metwali A, Elliott D, Arsenescu R. IL-18 and IL-12 signal through the NF-kappa B pathway to induce NK-1R expression on T cells. *J Immunol* 2003; 170:5003-7.
115. Welker P, Grabbe J, Grutzkau A, Henz BM. Effects of nerve growth factor (NGF) and other fibroblast-derived growth factors on immature human mast cells (HMC-1). *Immunology* 1998; 94: 310-7.
116. Welker P, Grabbe J, Gibbs B, Zuberbier T, Henz BM. Nerve growth factor-beta induces mast-cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells. *Immunology* 2000; 99: 418-26.
117. Willot S, Gauthier C, Patey N, Faure C. Nerve growth factor content is increased in the rectal mucosa of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24: 734-9.
118. Who, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 02 nov. 2015.
119. Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; 45: II6-16.
120. Wood JD. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2007; 7:1313-32.

121. Wu XQ, Myler AC, Goldstone AC, Togias A, Sanico AM. Localization of nerve growth factor and its receptors in the human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:428-33.
122. Yang SC, Chen CL, Yi CH, Liu TT, Shieh KR. Changes in gene expression patterns of circadian-clock, transient receptor potential Vanilloid-1 and nerve growth factor in inflamed human esophagus. *Sci Rep* 2015; 5: 13602.
123. Zhang QL and Qiao LY. Regulation of IGF-1 but not TGF- β 1 by NGF in the smooth muscle of the inflamed urinary bladder. *Regulatory Peptides* 2012; 177: 73-8.
124. Zhao P, Dong L, Luo JY, Guan HT, Ma H, Wang XQ. Possible role of mast cells and neuropeptides in the recovery process of dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Chin Med Sci J* 2013; 28:28-33.
125. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Di Mola FF, Zimmermann A, Buchler MW. Down-regulation of nerve growth factor in poorly differentiated and advanced human esophageal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 125-32.

ANEXO 1



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

Parecer nº. ETIC 0313.0.203.000-10

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

DECISÃO

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

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

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