

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

Patrícia Rocha Martins

**ANÁLISE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL E DE
MASTÓCITOS NO ESÔFAGO DE PACIENTES CHAGÁSICOS**

BELO HORIZONTE

2011

Patrícia Rocha Martins

**ANÁLISE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL E DE
MASTÓCITOS NO ESÔFAGO DE PACIENTES CHAGÁSICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Linha de Pesquisa: Imunopatologia

Orientador: Profa. Dra. Débora d'Ávila Reis

Co-orientador: Alexandre Barcelos de Moraes da Silveira

BELO HORIZONTE

2011

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório do Sistema Linfóide e regeneração do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

COLABORADORES:

Dra. Sheila Jorge Adad¹

1.Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais

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

Orientadora: Débora d'Ávila Reis

Co-orientador: Alexandre Barcelos Morais da Silveira

BELO HORIZONTE

2011

Dedico esse trabalho aos meus pais e minhas irmãs, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, razão da minha existência e fonte de inspiração para a minha vida.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, apoio e força nos momentos difíceis durante essa caminhada.

A Dra. Débora D'Avila Reis pelos ensinamentos, pela recepção ao laboratório, confiança e paciência.

A Dra. Lamara Laguardia Valente Rocha pelos ensinamentos, incentivo e confiança durante a graduação.

Ao Dr. Alexandre Barcelos da Silveira pela contribuição.

A Dra. Sheila Adad pela colaboração.

Ao Rodolfo Duarte Nascimento pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

Aos alunos André e Marcela pela ajuda e amizade.

Aos companheiros dessa caminhada Luana, Thalita e Andrei pela amizade e apoio.

Aos colegas e professores do laboratório do Sistema Linfóide e da Regeneração e do laboratório Professora Conceição Machado, pela agradável convivência.

Aos colegas e professores da Pós - Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do ICB, pela convivência e amizade.

A Sibebe pela ajuda e incentivo.

As minhas irmãs Juliane, Emanuelli e Julyette pela amizade.

Aos amigos pelo incentivo, apoio, momentos de descontração que me ajudaram nessa caminhada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Comparação entre densidades de ICC-c-Kit-IR e filetes nervosos PGP 9.5-IR.....	45
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01. Análise morfométrica da área de ICC-c-kit-IR na camada muscular interna da porção inferior do esôfago.....	42
Gráfico 02. Análise morfométrica da área de ICC-c-kit-IR na região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago.....	43
Gráfico 03. Correlação entre densidade de ICC-c-kit - IR e de filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular interna da porção inferior do esôfago.....	44
Gráfico 04- Quantificação de mastócitos na camada muscular interna da porção inferior do esôfago corados em giemsa.	46
Gráfico 05- Quantificação de mastócitos na região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago corado em giemsa.....	46
Gráfico 06. Quantificação de mastócitos triptase-IR na camada muscular interna da porção inferior do esôfago.....	47
Gráfico 07. Quantificação de mastócitos triptase-IR na região de plexo mioentérico na porção inferior do esôfago.....	48
Gráfico 08. Quantificação de mastócitos quimase-IR na camada muscular interna da porção inferior do esôfago.....	49
Gráfico 09. Quantificação de mastócitos quimase-IR na região de plexo mioentérico na porção inferior do esôfago.....	49
Gráfico 10. Quantificação de mastócitos triptase e quimase-IR.....	50
Gráfico 11. Correlação entre a densidade de ICC-c-kit-IR e mastócitos quimase-IR na região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago.....	51

Gráfico 12. Correlação entre mastócitos e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR.....	52
--	----

LISTA DE FOTOMICROGRAFIAS

- Figura 1A** – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina.....54
- Figura 1B** – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina.54
- Figura 1C** – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina.54
- Figura 1D** – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle corado por giemsa.....54
- Figura 1E** – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago corado por giemsa.....54
- Figura 1F** – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago corado por giemsa.....54
- Figura 2A** – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle, submetida à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina.....55
- Figura 2B** – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago, submetida à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina.55
- Figura 2C** – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago, submetida à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina.....55

Figura 2D – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle corado por giemsa.....	55
Figura 2E – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico corado por giemsa.....	55
Figura 2F – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago corado por giemsa.....	55
Figura 3A – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle corado por giemsa.....	57
Figura 3B – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago corado por giemsa.....	57
Figura 3C – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente chagásico com megaesôfago corado por giemsa.....	57
Figura 3D – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle corado por giemsa.....	57
Figura 3E – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago corado por giemsa.....	57
Figura 3F – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente chagásico com megaesôfago corado por giemsa.....	57
Figura 4A – Secção da camada muscular interna da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina.....	60

- Figura 4B** – Secção da camada muscular interna da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina.60
- Figura 4C** – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina.60
- Figura 4D** – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina.....60
- Figura 4E** – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina.60
- Figura 4F** – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-triptase e contra coradas por Hematoxilina.60
- Figura 5A** – Secção da camada muscular interna da porção inferior do esôfago de indivíduo do grupo controle, submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina.62
- Figura 5B** – Secção da camada muscular interna da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago, submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina.....62
- Figura 5C** – Secção da camada muscular interna da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago, submetida à reação de imunoperoxidade com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina.....62

Figura 5D – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle, submetida à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina.....62

Figura 5E – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico sem megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina.....62

Figura 5F – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo chagásico com megaesôfago, submetida à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina.....62

LISTA DE ABREVIATURAS

ICC- Células Intersticiais de Cajal (Interstitial Cajal Cell)
ICC-MY- Células Intersticiais de Cajal do Plexo Mioentérico
ICC-IM- Células Intersticiais de Cajal intramusculares
NC- não chagásico
CSM- chagásico sem megaesôfago
CCM- chagásico com megaesôfago
TGI- Trato Gastrointestinal
T. cruzi- Trypanosoma cruzi
SNC- Sistema Nervoso Central
SNE- Sistema Nervoso Entérico
c-KIT - Receptor tirosina quinase
SCF- Fator de Célula Tronco (stem cell factor)
IR- Imunorreativo
TIA-1-IR - antígeno intracelular de célula T
PGP 9.5- Proteína Gene Produzida 9.5
VIP- Peptídeo Intestinal Vasoativo
VIP-1 Receptor do Peptídeo Intestinal Vasoativo 1
NO- Óxido Nítrico
NOS- Sintase de Óxido Nítrico
kDNA- DNA mitocondrial do Cinetoplasto
W/W^v – Camundongo mutante para ICC
M1- Receptor Muscarínico 1
M3- Receptor Muscarínico 3
NK1- Receptor de Neurocinina 1
NK3 Receptor de Neurocinina 3
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral
TGF- β 1- Fator de crescimento tumoral
LTB4- Leucotrieno B4
IFN- γ - Interferon gama
IL- Interleucina
CCL- Quimiocina Ligante da família de Cisteína
SII- Síndrome do Intestino Irritável

CD34 - Marcador de superfície de células da linhagem hematopoiética

IgE- Imunoglobulina do tipo E

IgG- Imunoglobulina do tipo G

PAR-2- Receptor Ativador de Protease

PBS- Phosphate Buffer Salina

DAB- 3,3' Diaminobenzidine

BSA- Albumina de soro bovino

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* e, em sua fase crônica, pode levar os pacientes a desenvolverem as formas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. O megaesôfago chagásico é uma das complicações mais comuns da forma digestiva da doença, caracterizado por transtornos na motilidade e aumento do diâmetro do esôfago. As principais alterações histológicas observadas são hiperplasia e hipertrofia das túnicas musculares, degeneração do sistema nervoso entérico (SNE), acompanhadas do processo inflamatório. Neste contexto, hipotetizamos que alterações nas redes de células intersticiais de Cajal (ICC) e no número de mastócitos, células importantes para motilidade do TGI, poderiam contribuir de alguma forma para o desenvolvimento do megaesôfago chagásico. Assim, os objetivos deste estudo foram analisar a distribuição das ICC e quantificar mastócitos triptase e mastócitos quimase imunorreativos (IR) na túnica muscular interna e na região de plexo mioentérico do esôfago de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago e indivíduos não infectados, através de técnicas de imunohistoquímica. Além disso, propusemos verificar a existência de correlação entre estas células e a inervação da camada muscular circular. Os resultados demonstraram que os pacientes chagásicos não portadores de megaesôfago apresentaram diminuição da densidade de ICC-c-kit-IR na camada muscular e aumento de mastócitos triptase-IR e quimase-IR na camada muscular e na região de plexo mioentérico. Por outro lado, os pacientes chagásicos portadores de megaesôfago apresentaram diminuição da densidade de ICC-c-kit-IR e aumento apenas de mastócitos triptase-IR na camada muscular e no plexo mioentérico. A correlação entre ICC-c-kit-IR e filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular se mostrou positiva e parece preceder ao processo de desnervação, assim como entre a densidade de ICC-c-kit-IR e mastócitos quimase-IR no plexo mioentérico. No entanto, a correlação entre filetes nervosos PGP 9.5-IR e mastócitos triptase-IR é inversamente proporcional. Esses resultados sugerem que alteração do perfil entre mastócitos triptase / quimase-IR possa contribuir para diminuição da densidade de ICC-c-kit-IR e de filetes nervosos PGP 9.5-IR, conduzindo ao megaesôfago chagásico.

Palavras chave: megaesôfago chagásico, células intersticiais de Cajal, mastócitos triptase-IR e mastócitos quimase-IR.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. In the chronic phase, some patients may develop symptoms with cardiac, digestive or cardiodigestive involvement. Chagasic megaesophagus is one of the most common complications of the digestive form of the disease characterized by disturbances in motility and increase of the esophagus diameter. The main histological changes observed are hyperplasia and hypertrophy of the tunica muscular and degeneration of the enteric nervous system (ENS), associated with an inflammatory process. In this context, we hypothesized that the interstitial cells of Cajal (ICC) and mast cells could contribute for the development of the chagasic megaesophagus. The objectives of this study were to analyze the distribution of ICC and the number of mast cells tryptase-immunoreactive (IR) and mast cells chymase- IR in the muscle layers and myenteric plexus of the esophagus from chagasic patients with and without megaesophagus and noninfected individuals, through immunohistochemical techniques. Furthermore, we proposed to verify the correlation between these cells and innervation of the muscle layers. The results demonstrated that chagasic patients without megaesophagus presented a decrease of the ICC-c-kit- IR area in the muscle layers and an increase in the number of tryptase-IR and chymase-IR mast cells in the muscle layers and myenteric plexus. On the other hand, chagasic patients with megaesophagus showed a decrease of the ICC-c-kit-IR area and an increase in the number of mast cells tryptase-IR in the muscle layers and myenteric plexus. The correlation between ICC-c-kit-IR and nerve fibers PGP 9.5-IR was positive in the muscle layers, as well as, between ICC-c-kit-IR and mast cells chymase-IR in the myenteric plexus. However, the correlation between nerve fibers PGP 9.5-IR and mast cells tryptase-IR was negative. These results suggest that changes in the profile or the number of mast cells tryptase-IR / chymase-IR might contribute to the decrease in the ICC-c-kit-IR area and density of the nerve fibers PGP 9.5-IR, consequently leading to the development of the chagasic megaesophagus.

Key words: chagasic megaesophagus, interstitial cells of Cajal, mast cells, tryptase and chymase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Doença de Chagas	19
1.2 Células Intersticiais de Cajal	22
1.3 Mastócitos	28
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos Gerais	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Pacientes	37
4.2 Imuno-histoquímica para análise das células intersticiais de Cajal, mastócitos e filetes nervosos.....	38
4.3 Análise morfométrica para ICC, mastócitos e filetes nervosos.....	39
4.4 Análise estatística	40
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

Descoberta em 1909, na cidade mineira de Lassance, pelo pesquisador Carlos Chagas, “O mal de Chagas”, ou tripanossomíase americana, é uma doença endêmica causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e transmitida por um inseto conhecido no Brasil como barbeiro. Carlos Chagas observou, na época, que o barbeiro se alojava nas frestas das paredes de barro (pau a pique) das casas da população pobre. Assim, o risco de contrair a doença estava associado às precárias habitações nas áreas rurais. Conhecida mais tarde como “doença de Chagas”, tal moléstia se tornou tema de várias pesquisas, desde sua descoberta até os dias atuais, tanto no Brasil como no exterior; sendo considerado um importante problema de saúde pública, principalmente no continente sul-americano (CHAGAS, 1909; KOBERLE, 1961; KOBERLE, 1963; KOBERLE, 1968, KOBERLE, 1970; KROPF, 2005).

Estima-se que de 15 a 16 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* na América Latina, e essa doença pode ser transmitida de várias maneiras (COURA & DIAS, 2009). Os principais mecanismos de infecção da doença são: 1) através dos vetores, na qual a contaminação se dá a partir da picada do inseto transmissor; 2) pela via sanguínea ou transfusional; 3) por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados; e 4) por via placentária. Os mecanismos secundários podem ser acidentes laboratoriais ou transplantes de órgãos (COURA, 2007).

Na forma vetorial, após o ato de sugar o sangue, o que ocorre na maioria das vezes durante a noite, o inseto elimina fezes contaminadas com a forma tripomastigota do parasita, próximo ao local da picada. Os tripomastigotas conseguem penetrar ativamente através da mucosa, podendo então invadir vários tipos celulares do hospedeiro, dentre elas: macrófagos, células da glia, adiposas, endoteliais, fibras musculares lisas, estriadas esqueléticas e cardíacas, fibroblastos, células de Schwann e neurônios (KOBERLE, 1968; BRENER, 1982). Dentro das células, os parasitos diferenciam-se em amastigotas, reproduzem-se e dão origem a novas formas tripomastigotas, as quais retornam à circulação sistêmica, reiniciando o ciclo. Durante o rompimento das células infectadas, células do sistema imune são ativadas e citocinas são liberadas para controlar o parasitismo, dando início à fase aguda da doença de Chagas. A presença do parasito e as reações inflamatórias decorrentes da infecção

causam destruição tecidual em diversos órgãos, levando a complicações da doença (KOBBERLE, 1970; DIAS, 2001).

Os sintomas da fase aguda da doença de Chagas consistem de febre, adenomegalia e hepatoesplenomegalia. Os níveis de parasita no sangue e no tecido geralmente são altos nesta fase. Alguns pacientes podem desenvolver miocardite, meningoencefalite e/ou broncopneumonia, complicações que podem levar ao óbito. Em outros pacientes, a fase aguda pode evoluir para a fase crônica, sendo esta assintomática (forma indeterminada), com resultados normais do eletrocardiograma e radiografia do coração, esôfago e cólon; ou sintomática, com comprometimento cardíaco, digestivo ou cardiodigestivo (COURA, 2007).

A primeira suspeita da existência da forma digestiva da doença de Chagas surgiu em 1916, quando o próprio Carlos Chagas observou que, durante a infecção aguda, alguns adultos exibiam uma acentuada disfagia, ou seja, dificuldade na deglutição dos alimentos, a qual se mantia na fase crônica e que foi denominada por ele de “Mal do Engasgo” (CHAGAS, 1916). Já na fase crônica, a forma digestiva da doença de Chagas destaca-se pela formação dos “megas”, caracterizados pelo aumento do diâmetro da parede do órgão. O esôfago e o cólon são, freqüentemente, as porções do trato gastrointestinal (TGI) mais acometidas, originando o megaesôfago e megacólon, respectivamente (KOBBERLE, 1961).

As manifestações do megaesôfago chagásico são similares às observadas na acalásia idiopática, como relaxamento parcial ou ausente do esfíncter inferior do esôfago, seja pela abertura antecipada ou retardada em relação à onda peristáltica, aliada a uma dismotilidade do corpo esofágico (aperistalse) e disfagia, seguida pela regurgitação, pirose e dor torácica (DANTAS, 2003).

Exames clínicos e radiológicos são utilizados para realizar o diagnóstico da forma digestiva da doença de Chagas. O exame radiológico permite observar retenção do meio de contraste no esôfago, incoordenação no trânsito, afilamento regular da transição esofagogástrica e dilatação do órgão. O esôfago pode apresentar diferentes graus de envolvimento, que vão do mais leve distúrbio motor, detectável apenas através de exames especiais, até uma grande dilatação que caracteriza as formas mais avançadas do megaesôfago chagásico (REZENDE *et al.*, 1960). A literatura propõe considerar a presença de megaesôfago em casos em que o órgão, permanentemente dilatado, apresenta diâmetro acima de 2,5cm (ADAD *et al.*, 1991).

Dentre as alterações histológicas observadas nos pacientes portadores de megaesôfago e megacólon, destacam-se o espessamento da parede do órgão, em virtude de acentuada hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares, em especial da camada circular, geralmente acompanhadas de um processo inflamatório (PEREIRA, 1958). A redução do número de neurônios nos plexos entéricos e de filetes nervosos nas camadas musculares de pacientes chagásicos com megaesôfago, associados ou não ao processo inflamatório, tem sido demonstrada em diversos trabalhos (KOBBERLE 1968; ADAD *et al.*, 1991; DA SILVEIRA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2010). Utilizando um marcador pan-neuronal, da Silveira e cols. (2007a) observaram intensa diminuição da densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR nas musculares do cólon de pacientes com e sem megacólon. Já os neurônios dos plexos submucoso e mioentérico, da parede do esôfago e cólon de pacientes com a forma digestiva, podem apresentar-se hipertrofiados e/ou com sinais de degeneração (TAFURI *et al.*, 1971). Assim, são observadas inúmeras alterações microscópicas no Sistema Nervoso Entérico (SNE), as quais consistem em: ganglionite, periganglionite, neurite e peri-neurite, chegando muitas vezes à destruição completa dos gânglios mioentéricos e fibrose. Acredita-se que tais alterações sejam os principais fatores que levam aos transtornos de motilidade e desenvolvimento do megaesôfago e megacólon (ANDRADE & ANDRADE, 1966; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Em 1968, Koberle já descrevia a intensidade da desnervação como um fator indispensável para a formação do megaesôfago ou megacólon. Em contrapartida, Adad e cols. (1991) observaram intensa desnervação no esôfago de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago, mas estes últimos não desenvolveram a doença mesmo apresentando desnervação. Assim, a heterogeneidade neuronal observada nos pacientes chagásicos que não desenvolveram o megaesôfago poderia levantar a possibilidade de outras causas na gênese da doença, além do processo degenerativo neuronal.

Diante disso, da Silveira e cols. iniciaram a caracterização imunohistoquímica do SNE em pacientes chagásicos, com o objetivo de avaliar a associação da doença com a possível destruição seletiva de classes neuronais (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b). Seus resultados apontaram para uma destruição preferencial de neurônios motores inibitórios dos plexos submucoso e mioentérico nos pacientes portadores de megacólon. Os neurônios imunorreativos ao peptídeo intestinal vasoativo (VIP-IR) e à sintase de óxido nítrico (NOS-IR) foram preferencialmente destruídos pelo *T. cruzi* e/ou processo

inflamatório nesses pacientes. Entretanto, ainda não foi investigado se ocorre destruição preferencial de neurônios inibitórios no desenvolvimento do megaesôfago chagásico.

A degeneração dos gânglios do SNE, aparentemente tem seu início na fase aguda e persiste até a fase crônica da doença (ANDRADE & ANDRADE, 1996; KOBERLE, 1968; ANDRADE & ANDRADE, 1969). Esse processo poderia ocorrer em função da parasitemia que é alta na fase aguda, e mesmo sabendo-se que decai drasticamente a nível plasmático na fase crônica, o kDNA do parasita pode ser detectado nas musculares do esôfago de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago, o qual poderia contribuir para a manutenção do processo inflamatório (Da SILVEIRA *et al.*, 2005).

Deste modo, as alterações no SNE descritas acima podem ocorrer, ao menos em parte, em decorrência do processo inflamatório. Análises de porções do esôfago de pacientes chagásicos crônicos, portadores e não portadores de megaesôfago demonstraram que o perfil inflamatório é composto por linfócitos T, linfócitos B, eosinófilos, macrófagos e mastócitos, diferenciando apenas na sua intensidade. As células *Natural Killers* e linfócitos citotóxicos TIA-1-IR (antígeno intracelular de célula T), também foram descritos e são conhecidos por induzir apoptose em células infectadas e cancerígenas (D'ÁVILA REIS *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005). Assim, a participação do processo inflamatório comparece como um dos fatores responsáveis pelas lesões no SNE na fase crônica da doença de Chagas o que ocasiona as alterações peristálticas.

1.2 Células Intersticiais de Cajal

Além dos neurônios do SNE, outras células, como as Células Intersticiais de Cajal (ICC), contribuem para a atividade motora peristáltica (FARRUGIA, 2008). As ICC foram descritas em 1911 por Santiago Ramón & Cajal, através de técnicas histoquímicas utilizando azul de metileno e coloração pela prata. Estas células mostram-se sobrepostas a diversas outras células, incluindo neurônios entéricos, células do sistema imune e células do músculo liso (HUIZINGA *et al.*, 2009).

As características morfológicas e o padrão de distribuição das ICC dependem da localização anatômica. A forma e o arranjo apresentados pelas ICC variam, dependendo se elas estão localizadas na região de plexos nervosos ou nas camadas musculares (KOMURO, 2006). Nas túnicas musculares, podem ser encontrados pequenos corpos de

células ovóides ramificadas, com região nuclear proeminente, bipolares ou multipolares, as quais se associam entre si para formar uma rede complexa (JESSEN & THUNEBERG, 1991). No esôfago, as ICC são mais numerosas no esfíncter inferior do órgão e muito raras na porção gástrica, ou seja, porção distal do esfíncter inferior do esôfago (FAUSSONE-PELLEGRINI & CORTESINI, 1985).

As ICC expressam c-Kit, que é um receptor de superfície tirosina quinase. C-Kit é o produto de um proto-oncogene que regula o desenvolvimento e diferenciação de células progenitoras das linhagens de melanócitos, células germinativas e hematopoéticas (WARD *et al.*, 1994). O desenvolvimento e a sobrevivência de ICC dependem da ativação celular mediada pela ligação de c-Kit ao fator de crescimento de células tronco (stem cell factor – SCF) (FOX *et al.*, 2002). Sabe-se que SCF pode estar sob a forma solúvel ou preso à membrana das células produtoras, através de um domínio transmembrana. Assim, a ativação celular via c-Kit é mediada pela interação com outras células no ambiente que expressam SCF. Nesse contexto, destacam-se as células musculares lisas, neurônios e mastócitos, as quais produzem SCF e estão em contato estreito com as ICC. O SCF solúvel parece não sustentar a sinalização via c-Kit, sendo que o acoplamento entre as células, observado com SCF preso à membrana celular parece ser mais eficiente para a ativação celular (ZSEBO *et al.*, 1990).

A importância da expressão de c-Kit no desenvolvimento das ICC foi descrita por Maeda e cols. (1992), os quais demonstraram que o bloqueio deste receptor em camundongos BALB/c neonatos conduziu a redução do número de ICC e, segundo esses autores, por consequência à falta dessas células, ocorreu uma anomalia severa do movimento intestinal com formação de íleo paralítico e dilatação da porção proximal do intestino delgado. A partir desses dados, os autores evidenciaram a importância da expressão de c-Kit para o desenvolvimento e manutenção de ICC e, conseqüentemente a importância destas células para o desenvolvimento intestinal normal. Mais tarde, Takaki (2003) realizando experimentos utilizando camundongos mutantes W/W^v , os quais expressam o receptor Kit em baixa afinidade, observou a presença de ICC-intramuscular (ICC-IM) no jejuno e íleo, mas não na região de plexo mioentérico, assim, esses experimentos demonstraram que c-Kit parece ser fator indispensável à sobrevivência de todas de algumas, mas não todas as classes de ICC (TAKAKI, 2003).

As ICC participam do controle da motilidade do TGI. Essas células associadas ao SNE geram e propagam “ondas lentas”, espontaneamente, para as camadas musculares, constituindo o que é chamado por sistema de marcapasso (HUIZINGA *et*

al., 2009). A atividade de marcapasso controla o potencial de membrana da célula muscular lisa, pois aumenta a possibilidade de abertura dos canais de Ca^{2+} e de iniciar o potencial de ação nessas células. Deste modo, a onda de despolarização gerada se propaga nas camadas do músculo liso, resultando em excitabilidade muscular (MAZZONE & FARRUGIA, 2007). Assim, sob condições de estímulo tais como uma refeição, distensão e/ou excitação neural, a ativação peristáltica tem início. As ondas de contração possuem ritmicidade, frequência e amplitude de contração, as quais são determinadas pela atividade elétrica de ondas lentas, geradas e propagadas por ICC à musculatura lisa (SANDERS *et al.*, 2000).

O mecanismo celular envolvido na atividade espontânea ainda é controverso. Tem sido descrito que a atividade elétrica de marcapasso muscular tem início através de correntes internas no citoplasma de ICC. Isso se deve a alterações em canais iônicos, seguido de despolarização da membrana plasmática. A condutância responsável por tais ondas de marcapasso é seletiva a canais de cloro, os quais são ativados por canais de cálcio (Ca^{2+}), com possível participação de íons de potássio, acionados por um processo dependente de voltagem. A corrente interna iniciada por despolarização nas ICC parece ser dependente de Ca^{2+} . Sendo assim, a entrada de Ca^{2+} e, eventualmente, liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, pode ser o sinal que ativa a grande corrente interna nas ICC (ZHU *et al.*, 2009). Tais ondas elétricas governam fases de atividade contrativa ou de repouso na célula muscular lisa e as redes formadas pelas ICC fornecem vias necessárias para propagação nas musculares de modo indispensável à peristalse (MAZZONE & FARRUGIA, 2007).

Assim, o termo “ondas lentas” faz referência ao ciclo de despolarização e repolarização induzido na célula muscular lisa. As ICC contribuem também para a manutenção do potencial de repouso negativo, no período entre a formação de uma onda lenta e outra, o qual assegura uma fase de relaxamento entre as contrações, permitindo assim a mistura e movimento do bolo alimentar no TGI. Essa função também impede que outras vias, como de neurotransmissores excitatórios, gerem correntes internas, levando a contração do órgão neste período (SANDERS *et al.*, 1999). Portanto, a atividade elétrica espontânea através de ICC é uma importante via de ativação do músculo liso do TGI, mas não é a única e ocorre sobreposta a impulsos regulatórios nervosos, hormonais e parácrinos (SANDERS, 2000).

A fim de elucidar a participação de ICC na eletrofisiologia do TGI, diversos estudos *in vivo* e *in vitro* tem sido realizados. Em observações no íleo de camundongos

selvagens, a atividade elétrica é tipicamente consistente com o ritmo de ondas lentas, sobrepostas a potenciais de ação, com contrações sincronizadas das camadas musculares. Entretanto, em camundongos mutantes W/W^V , em que a atividade de marcapasso intestinal foi totalmente depletada, devido ao fato de que estes animais não apresentam ICC na região mioentérico, a atividade elétrica de ondas lentas não foi detectada, daí o ritmo de ondas elétricas e a atividade de contração mostraram-se irregulares, apresentando potenciais de ação sobrepostos e intermitentes, associados a períodos quiecentes nesses animais (MATSUYOSHI *et al.*, 2010). As ICC em cultura, isoladas do intestino delgado de camundongos, apresentam-se ritmicamente ativas, produzindo ondas lentas e despolarizações regulares com propriedades semelhantes às ondas lentas em tecidos intactos (KOH *et al.*, 1998).

Além da atividade de marcapasso, tem sido descrito na literatura que as ICC poderiam mediar alguns tipos de neurotransmissão entre neurônios entéricos e as células musculares lisas gastrointestinais. Ou seja, a ICC seria a primeira a receber o impulso nervoso e posteriormente estimular a célula muscular lisa. Nesse sentido, destacam-se basicamente duas vias pelas quais nervos entéricos regulam a atividade muscular, uma por contato direto com a célula muscular lisa e outra através de ICC (MAZZONE & FARRUGIA, 2007). A idéia de que ICC poderiam mediar a neurotransmissão entérica é sustentada, em parte, pela observação de que essas células apresentam-se “intercaladas” entre a musculatura lisa do TGI. As ICC se encontram fisicamente interpostas entre varicoses de terminais nervosos e fibras musculares lisas adjacentes. Assim, as ICC estabelecem contatos “sinápticos” (*synapse-like*) com neurônios de um lado e formam junções comunicantes com as células musculares lisas do outro e, ainda entre uma ICC e outra, o qual facilitaria a neurotransmissão (BECKETT *et al.*, 2005; SANDERS & WARD, 2006). Além disso, tem sido observado nas camadas musculares do intestino de cobaias o intervalo de 20 e 25nm entre as ICC e as varicoses de neurônios NOS e substância P imunorreativos, demonstrando que o contato espacial estreito entre ICC e fibras neuronais, poderia facilitar a possível neurotransmissão por ICC (WANG *et al.*, 1999).

A atividade das ICC é influenciada por neurônios motores do SNE, colinérgicos ou nitrérgicos, através da liberação de neurotransmissores (TORIHASHI *et al.*, 1999a). Assim, as ICC parecem possuir maquinaria para receber informações neuroquímicas. Isoladas e/ou em cultura, ICC da região de plexo mioentérico do intestino delgado e da camada muscular do fundo gástrico de camundongos, expressam alguns receptores,

dentre eles muscarínicos (M1 e M3), para neurocininas (NK1 e NK3) e receptor inibitório VIP-1 (EPPERSON *et al.*, 2000). As ICC do plexo mioentérico no intestino de camundongos internalizam o receptor NK1 após exposição à substância P exógena, assim como neurônios entéricos e células musculares lisas (IINO *et al.*, 2004). A substância P ativa as ICC, aumentando a probabilidade de abertura de canais iônicos não seletivos nestas células, sugerindo que as ICC participem da comunicação entre os componentes do SNE (EPPERSON *et al.*, 2000).

Segundo Ward, (2000) as ICC atuam como um elo fundamental na neurotransmissão inibitória entérica e o autor descreve o mecanismo de ação mediado por ICC:

“Quando os neurotransmissores são liberados por neurônios entéricos, ligam-se principalmente aos receptores expressos por ICC. A ativação (despolarização ou hiperpolarização) da célula muscular lisa vizinha, ocorre por condução, excitatória ou inibitória, do potencial de ação ao longo de junções comunicantes entre ICC e células musculares lisas. Assim, os terminais de motoneurônios entéricos, ICC e células musculares lisas formam unidades funcionais, o qual libera o neurotransmissor, medeia e traduz impulsos nervosos em respostas mecânicas (WARD, 2000)”.

A literatura descreve vários trabalhos, os quais sugerem que as ICC participem da neurotransmissão dependente de NO (BURNS *et al.*, 1996; WARD *et al.*, 1998; FARRÉ *et al.*, 2007; LINO *et al.*, 2009). Essa idéia é pautada em experimentos em que a deleção de ICC nas musculares de camundongos mutantes W/W^V foi associada à diminuição da resposta inibitória por neurônios dependentes de NO, comprometendo a hiperpolarização e conseqüente relaxamento da célula muscular lisa. As ICC expressam seletivamente os canais de íons e sistemas de segundos mensageiros, que são necessários para a transdução de sinais de NO liberado por neurônios nitrérgicos, e que poderiam ativar vias inibitórias em células pós-juncionais (BURNS *et al.*, 1996; WARD *et al.*, 1998; FARRÉ *et al.*, 2007). Além disso, baseado em experimentos em cultura, os autores sugerem que NO derivado de neurônios nNOS-IR desencadeia importante papel na sobrevivência de ICC, atuando como molécula citoprotetora. O tratamento com doadores de NO promove o aumento do número de ICC, enquanto que o tratamento com inibidores do NO leva a diminuição destas células (CHOI *et al.*, 2007).

Entretanto, segundo alguns autores as evidências do papel de ICC na neurotransmissão são indiretas e circunstanciais. O fato das ICC possuírem receptores e

vias de sinalização intracelular para neurotransmissores entéricos, representa apenas que as ICC respondem ao SNE, mas não quer dizer que estas células são reponsáveis por traduzir sinais neuronais para células musculares lisas e não provam que ICC medeiam a neurotransmissão (GOYAL & CHAUDHURY, 2010).

Além do contato físico direto das ICC com neurônios entéricos, as ICC células interagem fisicamente também com várias células do sistema imune. O contato físico estreito entre ICC, mastócitos e macrófagos foi observado na camada muscular externa intestinal de roedores (WANG *et al.*, 2007). É possível que essa interação além de espacial possa ser funcional (FAUSSONE-PELLEGRINI, 2009; MIKKELSEN, *et al.*, 2010). Sabe-se que os mastócitos produzem fatores de crescimento e de sobrevivência, como SCF e IL-9, os quais interagem via c-Kit com as ICC. A resposta de ICC sob o estímulo de IL-9 foi testada em cultura. Essa interleucina induz a proliferação e a manutenção das redes de ICC; além disso, de maneira dose-dependente, promove aumento e estabilização da frequência da atividade de contração espontânea de ICC (YE *et al.*, 2006). Em algumas condições patológicas foi observada a correlação positiva entre densidade de ICC e o número de mastócitos (ZARATE *et al.*, 2006). Daí, os autores sugerem que os mastócitos e outras células imunes, possam secretar fatores de crescimento, os quais promovam a sobrevivência de ICC em doenças humanas (YE *et al.*, 2006; ZARATE *et al.*, 2006).

A redução do número de ICC ou lesões na rede formada por estas células tem sido descrita em quase todas as perturbações da motilidade do TGI, do esôfago ao reto. Existem evidências significativas para o envolvimento de ICC na fisiopatologia da gastroparesia, doença de Hirschsprung, constipação, acalásia, desordens inflamatórias intestinais e doença de Chagas. Todas essas condições apresentam anormalidades da atividade motora levando à insuficiência de trânsito local e vários sintomas (HUIZINGA *et al.*, 2009). A diminuição na densidade de ICC leva à anormalidade na formação das ondas elétricas lentas, causando uma contratilidade diminuída das células musculares lisas, que por sua vez resultaria em diminuição no trânsito intestinal (ROLLE *et al.*, 2002).

Na gastroparesia é observado diminuição de ICC quando são comparados indivíduos saudáveis e doentes (LIN, *et al.*, 2009). Em doenças congênitas como a atresia do esôfago congênito e atresia do intestino delgado, em que ocorre estreitamento de parte do órgão, foi observado, em recém-nascidos, além de baixa densidade de redes de ICC nas camadas musculares e plexo mioentérico, uma imaturidade na morfologia da

ICC nas regiões proximais e distais do órgão atrésico (GFROERER *et al.*, 2010; MIDRIO *et al.*, 2010). Do mesmo modo, na acalásia idiopática, é observada redução severa à ausência completa de células c-Kit-IR, associada à morte de neurônios nitrérgicos (n-NOS-IR) do plexo mioentérico, no esfíncter inferior esofágico (ZARATE *et al.*, 2006). A correlação entre a densidade de ICC-c-Kit e a inervação nitrérgica demonstrou-se diminuída em 60 a 72% dos pacientes com acalásia submetidos a biópsias esofágicas. Portanto, os autores sugerem que o esgotamento das redes de ICC e neurônios inibitórios na acalásia levariam a possíveis alterações na atividade elétrica das células musculares lisas, as quais poderiam ser responsáveis pela falta de relaxamento do esfíncter inferior do esôfago (GOCKEL *et al.*, 2008).

Do mesmo modo, na doença de Chagas, foi observada diminuição de ICC nas camadas musculares e no plexo mioentérico de pacientes com megaesôfago (DE LIMA *et al.*, 2008) e megacólon (HAGGER *et al.*, 2000; GERALDINO *et al.*, 2006) em relação aos indivíduos não chagásicos. Além disso, são observadas alterações anatomo-patológicas muito similares a acalásia idiopática, também no megaesôfago chagásico como reação inflamatória intensa, com participação de mastócitos e perda de neurônios entéricos e, como anteriormente descrito, perda de ICC (DA SILVEIRA *et al.*, 2005; ZARATE *et al.*, 2006; DE LIMA *et al.*, 2008).

1.3 Mastócitos

A interação dinâmica entre diferentes sistemas celulares como, ICC, neurônios, células musculares lisas e células imunes determinam o comportamento fisiopatológico no TGI (VAN NASSAUW *et al.*, 2007). Deste modo, além das ICC, os mastócitos também são objeto de interesse deste trabalho, pois as células interagem entre si e ambas com neurônios do SNE, os quais são importantes alvos de estudo na patologia do megaesôfago chagásico.

Os mastócitos originam-se de células pluripotentes CD34⁺ presentes na medula óssea vermelha. Seus precursores são encaminhados aos diversos tecidos, onde se diferenciam e amadurecem. Estas células adotam um fenótipo determinado pelo seu microambiente e não pré-determinado no local de origem (RODEWALD *et al.*, 1996). Uma vez nos tecidos, os mastócitos sofrem influência de fatores de crescimento e citocinas. Essas moléculas são importantes na regulação dos mesmos, pois promovem o desenvolvimento dos estágios progenitores até a diferenciação completa, mantém a

sobrevivência e regulam a liberação de seus mediadores. O principal fator de crescimento descrito na literatura para mastócitos é o SCF, o qual ao se ligar ao c-kit expresso em mastócitos humanos e de roedores, propicia a diferenciação celular. SCF também promove a adesão dos mastócitos às proteínas da matriz extracelular (OKAYAMA & KAWAKAMI, 2006).

A morfologia típica dos mastócitos nos tecidos é caracterizada por células relativamente grandes, fusiformes, poligonais ou ovais. O núcleo é basofílico, levemente excêntrico e relativamente grande. Apresentam citoplasma bem corado pela presença de grânulos no seu interior, que ocupam de 50 a 55% do espaço interno e são importantes para diferenciar os mastócitos das demais células, pois são metacromáticos quando apropriadamente corados (YONG, 1997). Devido aos seus grânulos, os mastócitos possuem muitas funções fisiológicas e patológicas no TGI. Tais estruturas armazenam inúmeras substâncias biologicamente ativas, as quais determinam a função dos mastócitos quando liberadas. Assim, em condições normais, os mastócitos representam 2-3% de células da lâmina própria do TGI, mas frente a alterações locais ou sistêmicas, tornam-se ativados e podem aumentar muito em número (BISCHOFF, 2009).

Dentre as funções dos mastócitos destacam-se a interferência na biologia de células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas, neurônios e células T reguladoras. Assim, eles participam do controle do fluxo do sangue e da coagulação, contração do músculo liso e peristaltismo, secreção de ácidos, eletrólitos e muco das células epiteliais e, ainda, de processos inflamatórios. Além de mediar reações alérgicas, os mastócitos tomam parte da homeostase do tecido, pois seus mediadores regulam o tecido local e os processos de cicatrização de feridas. Estes mediadores podem ativar a resposta imune inata ou interagir com o sistema imune adaptativo ou, ainda, induzir e regular a inflamação atraindo granulócitos e linfócitos para o local (GALLI *et al.*, 2008; BISCHOFF, 2009).

Grande variedade de moléculas biologicamente ativas dos mastócitos, como a histamina, heparina, triptase e quimase, podem ser liberadas como mediadores pré-formados, armazenados em seus grânulos. Outras são sintetizadas e liberadas no momento da ativação do mastócito, incluindo mediadores lipídicos e citocinas. Alguns mediadores liberados pelos mastócitos são: o fator de necrose tumoral (TNF- α); leucotrienos (LTB₄, envolvido no recrutamento de neutrófilos); interleucinas (IL-5, atua no recrutamento de eosinófilos) e quimiocinas (BISCHOFF, 2009). Além desses, outros

mediadores, como serotonina foram observados em ratos e camundongos (METCALFE, 1997), e em humanos com colite ulcerativa (STOYANOVA, 2002).

O fenótipo dos mastócitos é principalmente determinado pelo seu perfil de proteases. Os mastócitos humanos podem conter em seus grânulos as proteases triptase e quimase simultaneamente, sendo encontrados principalmente no tecido conjuntivo da pele e submucosa intestinal. Em contrapartida, existem mastócitos que são ricos em triptase e relativamente deficientes em quimase, os quais se localizam predominantemente nas superfícies da lâmina própria (IRANI *et al.*, 1989). Há ainda um terceiro fenótipo de mastócitos, que contém apenas quimase, detectado recentemente por dupla marcação em imunofluorescência (YU *et al.*, 2009).

As proteases triptase e quimase podem possuir ações similares ou diferenciadas. Ambas possuem ações pró-inflamatórias tais como: degradação direta e indireta da matriz extracelular; recrutamento de neutrófilos e eosinófilos e proliferação de fibroblastos. As duas também possuem ação protetora ao participar da resposta imune inata, sendo a primeira linha de defesa para o *clearance* de parasitas (PEJLER *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que tanto a triptase como quimase possuem a capacidade de clivar neuropeptídeos. A triptase, ao ser liberada pelos mastócitos, cliva o neuropeptídeo VIP, o qual tem sido descrito atuar como neuroprotetor e possuir ação antiinflamatória, além de estimular o relaxamento da musculatura lisa. No entanto, a quimase cliva também, além de VIP, a substância P, cuja ação é excitatória e pró-inflamatória. Assim, a ação dessas proteases degradando VIP e substância P, poderiam limitar a ação desses neuropeptídeos e mediar o microambiente inflamatório (CAUGHEY *et al.*, 1987). Além disso, a triptase também cliva outros substratos extracelulares, dentre eles, colágeno tipo IV, imunoglobulina do tipo E (IgE) e fibronectina (HEUTINCK *et al.*, 2010).

A triptase se liga ao receptor ativador de protease (PAR-2), o qual está presente em diversas células, tais como, células musculares lisas, endoteliais, neurônios, fibroblastos e mastócitos. Sugere-se que a ativação de PAR-2, via triptase, possua diversas ações, dependendo da célula estimulada. Em fibroblastos, a ativação de PAR-2 via triptase poderia conduzir a síntese de colágeno tipo I e participar do desenvolvimento de fibrose (FRUNGIERI *et al.*, 2002). Entretanto, em neurônios cultivados em presença de mastócitos, a ativação de PAR-2 pela triptase induziu a morte neuronal (SAND *et al.*, 2009).

Do mesmo modo, quimase também possui ações exclusivas. Ela está envolvida na manutenção da barreira intestinal, pois promove a degradação de junções celulares para aumentar a permeabilidade de membrana. Cliva formas inativas de moléculas inflamatórias, ativando-as, como citocinas e quimiocinas IL-1, IL-18, CCL6 e CCL9 (LAKHAN & KIRCHGESSNER, 2010; PEJLER *et al.*, 2010). Em adição, quimase constitui uma importante via alternativa na produção de angiotensina nos tecidos, pois cliva angiotensina I em angiotensina II (RESENDE & MILL, 2002). Segundo Andoh (2006), a angiotensina induzida por quimase, poderia estimular a proliferação e diferenciação de fibroblastos e secreção de matriz extracelular.

Independentemente do seu fenótipo, os mastócitos apresentam-se em constante interação com outras células. Existe uma comunicação entre mastócitos com SNE e mastócitos com células do sistema imune, que se dá através dos inúmeros mediadores secretados por essa população. Por meio da sinalização parácrina através da histamina, proteases, mediadores lipídicos e moléculas de adesão, ocorre a transferência da informação química para as redes nervosas do SNE. Do mesmo modo, os mastócitos apresentam receptores para citocinas secretadas por células do sistema imune, bem como receptores para neuromediadores do SNE (JACOB *et al.*, 2005).

Os mastócitos desempenham ainda um importante papel na comunicação funcional entre SNE e o SNC, uma vez que fatores psicológicos ativam vias nervosas que podem afetar direta ou indiretamente mastócitos da mucosa. Assim, sob condições de estresse, pode ocorrer o aumento do número dessas células (mastocitose) ou simplesmente o aumento da intensidade de desgranulação (JACOB *et al.*, 2005; LAKHAN & KIRCHGESSNER, 2010).

Segundo Bischoff (2009), ainda não se sabe se os mastócitos contribuem para a regulação da peristalse intestinal em condições normais. Contudo, existe uma via de sinalização entre mastócitos e fibras nervosas extrínsecas do (SNA), tais como as terminações nervosas dos neurônios aferentes, vago e espinhal, que possuem receptores para mediadores dos mastócitos. Essa via, quando ativada, conduz à dor visceral e reflexos extrínsecos contribuindo para o distúrbio motor e secretório intestinal (LAKHAN & KIRCHGESSNER, 2010).

Quando mastócitos interagem com anticorpos do tipo IgE ou IgG presos em sua superfície e antígenos intestinais locais endógenos ou não, eles tornam-se sensibilizados e induzem mudanças intestinais através do SNE. Uma bactéria patogênica, por exemplo, irá induzir uma série de reações, as quais promoverão a ativação de mastócitos e

conseqüentemente do SNE, pois este sistema interpreta os sinais dos mastócitos como uma ameaça. Assim, o SNE promove respostas protetoras como o comportamento motor de propulsão e secreção para eliminar a ameaça de forma rápida e eficaz, mas se dá a custa de sintomas que incluem dor abdominal e diarreia (DEMAUDE *et al.*, 2006).

Na Síndrome do Intestino Irritável (SII), os pacientes apresentam aumento no número de mastócitos na mucosa do cólon. A desgranulação dos mastócitos é intensa, com liberação principalmente de histamina e triptase. Tais mediadores celulares são conhecidos por alterar a fisiologia do SNE e induzir uma hipersensibilidade visceral. A gravidade e frequência de percepção dolorosa foram correlacionadas com a presença de mastócitos ativados em proximidade a terminações nervosas na parede do intestino, sugerindo que esses mediadores contribuam para a função sensório-motora que se apresenta perturbada na SII (BARBARA *et al.*, 2004). Foi descrito também o aumento na secreção de interferon gama (IFN-gama) pelos mastócitos em pacientes com SII, o qual se relaciona a disfunções e cólicas intestinais (BISCHOFF, 2009). Já na colite ulcerativa, os mastócitos apresentaram-se triptase/substância P/serotonina-IR. Nesses pacientes, esse fenótipo de mastócitos foi encontrado em quantidades mais elevadas do que nas amostras controle, em estreita aposição à lâmina basal das glândulas entre as células epiteliais e outras camadas da parede do intestino (STOYANOVA, 2002).

Na doença de Crohn foi observada intensa área de inflamação com inúmeros mastócitos. Além disso, esses pacientes apresentaram, também, diminuição na densidade de ICC. Os mastócitos apresentavam-se em contato direto, membrana a membrana, com ICC, exibindo desgranulação, observada ao microscópio eletrônico. Como anteriormente descrito, sugere-se que tal associação promova a manutenção das redes de ICC, pela produção de SFC pelos mastócitos nesses pacientes (WANG *et al.*, 2007). Contudo, os mastócitos possuem inúmeras ações teciduais, tanto anti como pró-inflamatórias. Assim, a liberação de mediadores antiinflamatórios pode levar a remodelação dos tecidos e a homeostase. Entretanto, os mediadores pró-inflamatórios podem resultar em danos ao tecido, bem como na rede de ICC inserida nele. Assim, a relação entre mastócitos e ICC ainda é pobremente entendida (MIKKELSEN, 2010).

Os primeiros trabalhos na literatura sobre a participação dos mastócitos na doença de Chagas, realizados por Lima Pereira, datam de 1972. Esse autor verificou o aumento na quantidade de mastócitos na camada muscular do esôfago em pacientes chagásicos crônicos e correlacionou a mastocitose a áreas com aumento de colágeno intersticial, sugerindo assim, a participação dos mastócitos no processo de fibrinogênese

(LIMA PEREIRA, 1972). Trabalhos mais recentes como de Pinheiro e *cols.* (2008) descreveram que o esôfago apresenta normalmente um maior número de mastócitos quando comparado ao cólon, porém não foi observado aumento do número de mastócitos em pacientes chagásicos portadores de megaesôfago e megacólon em relação aos indivíduos não infectados. Os autores sugerem que a diferença estrutural dos órgãos quanto ao número de mastócitos poderia amplificar a resposta inflamatória.

O megacólon chagásico é marcado por uma seqüência contínua de danos celulares, nas quais existe ativa participação, além de mastócitos, dos eosinófilos e macrófagos. Atividade destas células mostrou correlação direta com a densidade da fibrose nas alterações do cólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2007). A fibrose de substituição e fibrose intersticial foi observada com maior freqüência no grupo chagásico com megaesôfago e megacólon em relação aos chagásicos que não desenvolveram o mega (PINHEIRO *et al.*, 2008). Contudo, ainda não foi descrito na literatura a participação dos diferentes fenótipos de mastócitos no microambiente inflamatório observado no megaesôfago chagásico, bem como a relação entre estas células, neurônios e as ICC no desenvolvimento do megaesôfago.

2. JUSTIFICATIVA

As ICC e os mastócitos são células que participam da fisiologia do TGI. As primeiras atuam como células de marcapasso, as quais contribuem para a atividade motora peristáltica. Já os mastócitos atuam como mediadores da comunicação entre SNE e sistema imune (MAZZONE & FARRUGIA, 2007). Além disso, ICC e mastócitos estabelecem íntimo contato espacial, associadas a neurônios entéricos nas camadas musculares (ZARATE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007). Assim, os mastócitos se comunicam com ICC através da liberação de fatores de crescimento e citocinas (IINO *et al.*, 2009) e com SNE, pois possuem receptores para neurotransmissores e secretam neuromediadores (KULKA *et al.*, 2008; SAND *et al.*, 2009). Desse modo, a interação dinâmica entre estas células, neurônios e células musculares lisas determinam o comportamento fisiopatológico do TGI (VAN NASSAUW *et al.*, 2007).

Em diversas condições patológicas caracterizadas por distúrbios da motilidade observam-se alterações nas redes de ICC e/ou no fenótipo dessas células, bem como o aumento do número de mastócitos, os quais podem ou não estar associados à processos degenerativos do SNE (ZARATE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; GOCKEL *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2009; MOSTAFA *et al.*, 2010; GFROERER *et al.*, 2010; MIDRIO *et al.*, 2010). Na forma digestiva da doença de chagas, as lesões no SNE compõem como um importante fator responsável pelas alterações peristálticas e aumento do diâmetro do órgão, observado no megaesôfago e megacólon chagásicos (KOBERLE 1968; ADAD *et al.*, 1991). No entanto, não podemos deixar de considerar que outras células envolvidas na fisiopatologia do TGI, como ICC e mastócitos, juntamente com neurônios entéricos, possam de alguma forma contribuir para o desenvolvimento do “mega” chagásico.

Neste contexto, alguns trabalhos demonstraram diminuição na densidade de ICC em pacientes portadores de megaesôfago (DE LIMA *et al.*, 2008) e megacólon (HAGGER *et al.*, 2000; GERALDINO *et al.*, 2006), bem como aumento do número de mastócitos nestes pacientes, os quais correlacionavam ao desenvolvimento da doença (PINHEIRO *et al.*, 2008). Entretanto, ainda nos questionamos se na gênese do megaesôfago poderia estar implicada a diminuição das ICC, o aumento do número de mastócitos ou ambas as condições, as quais podem preceder ou ocorrerem posteriormente ao processo de desnervação observado na patologia do megaesôfago chagásico.

A participação dos mastócitos no desenvolvimento do mega chagásico tem sido sugerida em inúmeros trabalhos (DE LIMA PEREIRA *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; PINHEIRO *et al.*, 2003), os quais correlacionam a intensidade do processo inflamatório e fibrose à presença de mastócitos. No entanto, apenas o aumento do número de mastócitos ou mastocitose nesses pacientes não reflete diretamente a ação destas células. Visto que inúmeras funções as quais possam ser atribuídas aos mastócitos se devam a complexidade de seus mediadores determinado por seu fenótipo (METCALFE *et al.*, 1997; BISCHOFF, 2009). Assim, torna-se importante caracterizar a distribuição de mastócitos triptase e/ou quimase-IR nas camadas musculares e plexo mioentérico de indivíduos portadores e não portadores de megaesôfago chagásico.

Por isso, pretendemos neste trabalho caracterizar a distribuição de ICC e dos mastócitos triptase e quimase-IR na porção inferior do esôfago de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago e indivíduos não infectados e correlacioná-las com a densidade de filetes nervosos nas camadas musculares. Acreditamos que essas células possam estar direta ou indiretamente envolvidas no desenvolvimento do megaesôfago chagásico.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Caracterizar a distribuição das células intersticiais de Cajal e de mastócitos triptase-IR e quimase-IR no esôfago de pacientes chagásicos.

3.2 *Objetivos específicos*

Estudar na porção inferior do esôfago de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago e indivíduos não infectados os seguintes parâmetros:

- a) A presença de células intersticiais de Cajal c-kit imunorreativa (IR), na camada muscular circular e no plexo mioentérico, através de técnica de imuno-peroxidase indireta
- b) A distribuição e quantificação de mastócitos corados por giemsa na camada muscular circular e no plexo mioentérico.
- c) A quantificação de mastócitos triptase-IR e quimase-IR na camada muscular circular e no plexo mioentérico através de técnica de imuno-peroxidase indireta.
- d) Verificar a presença de correlação entre ICC-c-kit-IR e filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular circular e no plexo mioentérico da porção inferior do esôfago.
- e) Verificar a presença de correlação entre ICC-c-kit-IR e mastócitos triptase-IR e/ou quimase-IR na camada muscular circular e no plexo mioentérico da porção inferior do esôfago.
- f) Verificar a presença de correlação entre mastócitos triptase-IR e/ou quimase-IR e filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular circular e no plexo mioentérico da porção inferior do esôfago.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Nesse estudo foram utilizados tecidos de seis pacientes chagásicos portadores de megaesôfago em diferentes graus de desenvolvimento (CCM); de seis pacientes que não desenvolveram megaesôfago (CSM) e de seis indivíduos não infectados representando o grupo controle. Os tecidos foram coletados por cirurgia ou necropsia no Hospital Escola da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pela Dra. Sheila Adad.

Os pacientes foram incluídos no projeto, após consentimento dos mesmos, pais ou responsáveis. Os critérios para inclusão foram: 1) participar do acompanhamento médico do Hospital Escola; 2) ter saído da área endêmica há mais de 20 anos; 3) possuir diagnóstico positivo em duas das três reações no sangue: fixação do complemento, hemaglutinação e imunofluorescência indireta para *T. cruzi*; 4) possuir diagnóstico negativo para as mesmas reações em indivíduos controle. Os pacientes nunca receberam qualquer tratamento específico contra o parasito.

O grupo não infectado foi composto de indivíduos com idade entre 62 ± 20 anos e o diâmetro máximo do esôfago de 1.4 ± 0.1 cm. Os pacientes chagásicos sem megaesôfago não apresentaram previamente nenhum sintoma relacionado ao TGI. Este grupo tem em média 55 ± 11 anos de idade e diâmetro máximo do esôfago de 1.4 ± 0.2 cm. Pacientes chagásicos com megaesôfago apresentaram média de 52 ± 9 idade e diâmetro máximo do esôfago de 3.3 ± 0.8 cm. O diagnóstico de megaesôfago foi estabelecido baseando-se em dados clínicos e estudos radiológicos. Estudos manométricos também foram realizados, os quais demonstraram diminuição da peristalse e relaxamento incompleto do esfíncter esofágico inferior durante o engolimento. Amostras do esôfago dos indivíduos não infectados foram retiradas para compor o grupo controle. Estes apresentaram dentre as causa de morte, infarto agudo do miocárdio, doença hipertensiva e aneurisma cerebral. Dos seis pacientes chagásicos não portadores de megaesôfago analisados, todos morreram de cardiopatia chagásica crônica. Já todos os pacientes chagásicos com megaesôfago, apresentaram como causa de morte megaesôfago com ou sem megacólon e desnutrição.

Nesse trabalho, utilizamos amostras dos mesmos pacientes os quais já foram estudados anteriormente em nosso laboratório. Assim, é importante descrever que os

pacientes chagásicos portadores de megaesôfago, como anteriormente descrito por Nascimento *et cols.* (2010) apresentaram intensa desnervação em relação aos indivíduos controle (343 a 436 neurônios) apresentando variação de 0 a 70 neurônios. O grupo chagásico não portador de megaesôfago se destaca por sua heterogeneidade na contagem neuronal, o qual possui pacientes com alta contagem neuronal, chamado de CSM1 e pacientes com baixa contagem neuronal, CSM2, tais como, os portadores de megaesôfago (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

De cada paciente foram coletadas amostras da porção inferior do esôfago e fixados em solução de paraformaldeído 4% tamponado, embebidos em parafina e processados em micrótomo, obtendo-se cortes de 5µm de espessura. Posteriormente, o material foi enviado ao Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração / UFMG onde os tecidos aderidos em lâminas histológicas foram destinados a coloração por giemsa e técnica de imuno-histoquímica. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP, parecer n° ETIC 0313.0.203.000-10 (ANEXO).

4.2 Imuno-histoquímica para análise das células intersticiais de Cajal, neurônios e mastócitos

Tecidos do esôfago de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados foram utilizados para caracterização de ICC, neurônios e mastócitos. Após a microtomia, as lâminas foram mantidas em estufa a 40° C, durante 12 horas. A retirada da parafina das lâminas foi realizada com três banhos de xilol de 20 minutos cada. Em seguida as lâminas foram hidratadas em sucessivos banhos de concentrações decrescentes de álcool (álcool absoluto II e I, álcool 90%, 80% 70%), por 10 minutos cada banho. Na etapa posterior o material foi embebido em PBS (phosphate buffer saline) pH 7,2 – 7,4, durante 30 minutos. A lâminas foram incubadas com tampão citrato (pH 6.0) no microondas por 8 minutos para reativação antigênica e mantidas nessa solução até retornarem a temperatura ambiente.

O bloqueio de ligação inespecífica foi obtido com a solução de albumina de soro bovino (BSA) a 2% em PBS por 30 minutos. Os anticorpos foram apropriadamente diluídos em PBS-BSA e aplicados 150 µl / secção, as quais foram incubadas *overnight* a 4°C. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-CD117/c-kit, policlonal de coelho anti-humano, marcador do receptor transmembrana tirosina Kinase, fornecido pela empresa Dako (Califórnia USA), utilizado na diluição 1:25, código A4502; os anticorpos anti-triptase e anti-quimase, marcadores para as proteases triptase e quimase

presentes nos grânulos intracitoplasmáticos de mastócitos. O anti-triptase é um anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano, fornecido pela empresa Dako (Dinamarca), utilizado na diluição 1:100, clone AA1, isotipo IgG1, código M 7052; O anti-quimase também é um anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano, fornecido pela empresa Abcam (Cambridge, MA), utilizado na diluição 1:100, clone CC1, isotipo IgG1, código ab2377. E por fim foi utilizado também o anticorpo anti-PGP 9.5-IR policlonal de coelho, para marcar filetes nervosos nas camadas musculares, fornecido pela Dako e utilizado na diluição de 1:100, (CA USA), código Z5116.

Após 24 horas de incubação, as lâminas foram lavadas com PBS-Tween e PBS durante 10 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 4% 0,05M de azida sódica em PBS por 30 minutos. A incubação do anticorpo secundário foi mantida à temperatura ambiente com o conjugado biotina anti-camundongo e anti-coelho do Kit-DAKO por 60 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS-Tween por 2x (10') e retornaram ao PBS por 10 minutos antes de aplicar-se a estreptoavidina-peroxidase, também por 60 minutos. Em seguida, foi realizada a incubação com a solução de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) e peróxido de hidrogênio em PBS por 10 minutos (150 μ l em cada lâmina). Finalmente as lâminas foram lavadas com PBS-Tween e contra-coradas com hematoxilina. As mesmas sofreram processos de desidratação (álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto I e II) e diafanização (xilol I, xilol II e xilol III) sendo cinco minutos cada banho e montadas em meio sintético.

4.3 Análise morfométrica para ICC, mastócitos e filetes nervosos

Foi realizada análise morfométrica através de microscopia de luz para ICC, mastócitos e filetes nervosos. Obtivemos 20 imagens de campos aleatórios de cada camada muscular circular e da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago. As imagens foram capturadas em objetiva de 40x e digitalizadas em microscópio Olympus BX50 acoplado a uma vídeo-câmera conectada a um computador utilizando o programa analisador de imagens *Q capture pro* (Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração, ICB / UFMG).

Para a análise de mastócitos submetidas à coloração por giemsa e imuno-histoquímica com os anticorpos anti-triptase e anti-quimase foi realizada contagem em cada campo, o qual possui área total de 59.683 μ m². Como foram fotografados de cada

paciente 20 campos, totalizou-se uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. Para a análise das ICC foi calculada a área de marcação de cada campo em $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ utilizando o software Image J.

Para identificarmos as ICC foi utilizado o anticorpo anti-c-kit, o qual identifica o receptor kit presente em ICC, mas também, em mastócitos. Assim, para cada campo foi capturada uma imagem com marcação para c-kit e uma imagem nas secções coradas em giemsa, para a coloração de mastócitos, sendo os cortes consecutivos. Desse modo, foram comparados os mesmos campos, possibilitando a identificação e exclusão dos mastócitos c-Kit-IR. Foram consideradas como ICC aquelas células c-kit-IR, as quais possuíam núcleo, contendo ou não ramificações, as quais não correspondiam à posição de mastócitos corados em giemsa. Portanto, a análise da área de marcação das ICC foi realizada por exclusão, eliminando a possibilidade de considerarmos mastócitos c-kit-IR como ICC.

4.4 Análise estatística

Foi realizada análise de variância através do teste *Anova One-way* paramétrico, seguido pelo pós teste de Newman-Keuls, o qual compara todos os grupos. Utilizamos o *test t* para comparar o fenótipo de mastócitos nas camadas musculares e plexo mioentérico. A correlação entre os parâmetros estudados foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson e teste de regressão linear simples. Resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de $p \leq 0,05$. Dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o GRAPHPAD PRISM (Graphpad Software Inc., San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Análise qualitativa e morfométrica da distribuição de células intersticiais de Cajal

Foram analisadas amostras da porção inferior do esôfago de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago e indivíduos não chagásicos. Nestes, as ICC apresentaram-se distribuídas nas camadas musculares e na região do plexo mioentérico. Entre as células musculares lisas, as ICC-c-Kit-IR mostraram-se alongadas, com núcleo proeminente de forma oval e ramificações bipolares, associadas ou não entre as outras ICC, representadas na figura 1A e 1B. Na região de plexo mioentérico foram observados pequenos corpos de células ovóides imuno-reativas entre gânglios e mastócitos (figuras 2A e 2D). As ICC no plexo mioentérico, diferentemente daquelas encontradas nas camadas musculares, apresentaram-se distantes entre se, dispersas ao redor dos gânglios neuronais, sem formarem redes (Pranchas 01 e 02).

Os pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago apresentaram menor densidade de ICC-c-Kit-IR nas camadas musculares em relação aos indivíduos não infectados. Podemos observar a diminuição da área ocupada por ICC nos pacientes em relação ao grupo controle nas figuras 1A, 1B e 1C, confirmado pela análise morfométrica representada no gráfico abaixo (Gráfico 1).

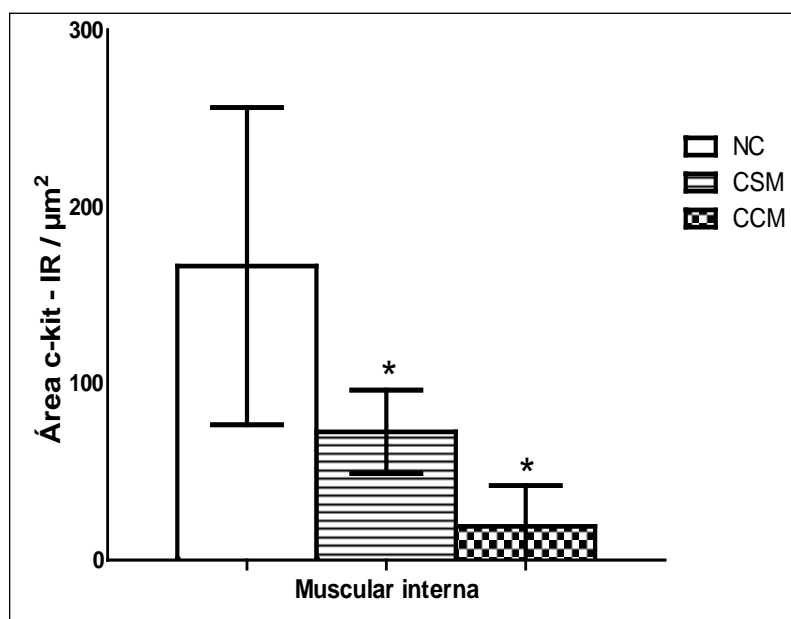


Gráfico 01. Análise morfométrica da área de ICC-c-kit-IR na camada muscular interna da porção inferior do esôfago. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo NC ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=4, CSM-chagásico sem megaesôfago n=4, CCC-chagásico com megaesôfago n=5.

Na região de plexo mioentérico, verificamos que a densidade de ICC-c-kit-IR foi menor nos pacientes portadores de megaesôfago em relação aos indivíduos chagásicos sem mega e aos indivíduos não infectados. Esses dados foram representados nas figuras 2A, 2B e 2C e por análise morfométrica no gráfico 02. Curiosamente, observamos corpos neuronais marcados com o anticorpo anti-c-kit, os quais também foram desconsiderados para análise da densidade de ICC (Figura 2A e 2B). Na figura 2C, podemos observar muitos mastócitos expressando c-Kit na região de plexo mioentérico. Na morfometria para ICCs, a área ocupada por mastócito foi excluída dos cálculos.

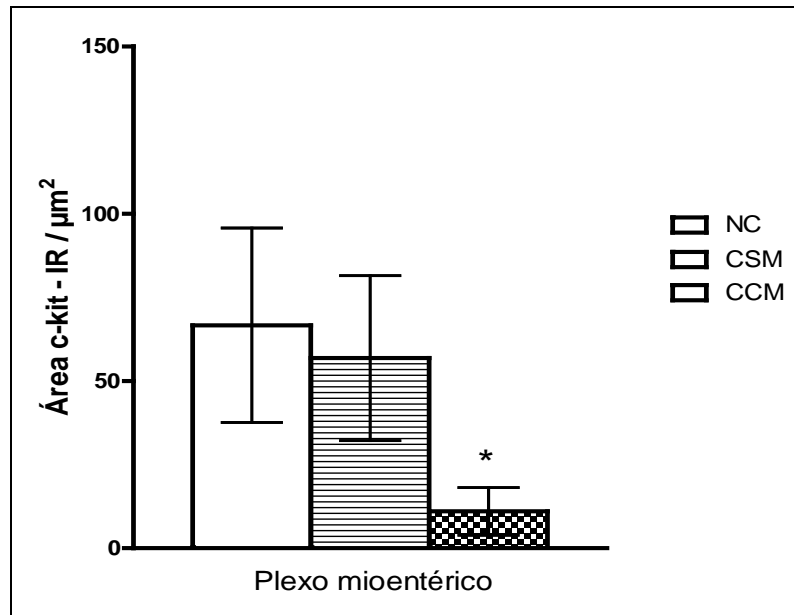


Gráfico 02. Análise morfológica da área de ICC-c-kit-IR na região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e os outros dois grupos ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=4, CSM-chagásico sem megaesôfago n=4, CCC- chagásico com megaesôfago n=5.

5.2 Análise da correlação entre densidade de ICC-c-Kit-IR e área de filetes nervosos PGP 9.5-IR

Através do cálculo de coeficiente de Pearson, observamos correlação positiva entre área de ICC-c-Kit-IR e a área de filetes nervosos PGP 9.5-IR representada no gráfico abaixo.

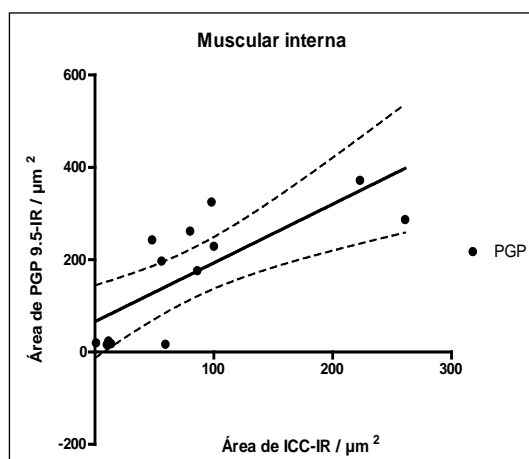


Gráfico 03. Correlação entre densidade de ICC-c-kit-IR e de filetes nervosos PGP 9.5⁺ na camada muscular interna da porção inferior do esôfago. Valor de Pearson $r=0,7657$ e $p<0,05$. Número de casos (n), NC- não chagásico $n=4$, CSM-chagásico sem megaesôfago $n=4$, CCC- chagásico com megaesôfago $n=5$.

A correlação positiva entre área de filetes nervosos PGP 9.5-IR e a densidade de ICC-c-Kit-IR na camada muscular interna foi apresentada acima. Entretanto, o grupo de pacientes chagásicos sem megaesôfago, como anteriormente descrito na metodologia, possui heterogeneidade na contagem neuronal, ou seja, alguns pacientes mantêm a inervação nas camadas musculares e no plexo e outros não, o qual se reflete na densidade de filetes nervosos. Apresentamos na tabela 1 a densidade de ICC-c-Kit-IR nos dois grupos de chagásicos sem megaesôfago: CSM1 representa aqueles pacientes que mantêm a densidade de filetes nervosos a níveis normais, enquanto que o grupo CSM2 corresponde aos casos que apresentaram redução significativa da área de inervação de filetes nervosos. Como pode ser observado, a densidade de ICC-c-Kit-IR nos grupos CSM1(73 ± 35) e CSM2(71 ± 21), se mantém independente da contagem neuronal, entretanto, em comparação com a densidade de PGP 9.5-IR, apenas o grupo CSM2 (baixa contagem neuronal), apresenta diminuição na inervação da túnica muscular interna.

Tabela 01. Comparação entre densidades de ICC-c-Kit-IR e filetes nervosos PGP 9.5 -IR

Número de casos (n)	Pacientes			
	NC	CSM1	CSM2	CCM
	n=4	n=2	n=2	n=5
PGP 9.5-IR	MI 279±64	272±45	189±11	19±3
ICC-c-Kit-IR	MI 195 ± 84	73±35	71 ± 21	19 ± 22

NC- não chagásico, CSM1-chagásico sem megaesôfago com alta contagem neuronal, CSM2-chagásico sem megaesôfago com baixa contagem neuronal, CCC- chagásico com megaesôfago. MI- Muscular internam (Média ± Desvio padrão, $p < 0,05$).

5.3 Análise qualitativa e morfológica de mastócitos corados pela técnica de giemsa

Realizamos análise qualitativa da distribuição dos mastócitos nos cortes histológicos que foram submetidos à coloração por Giemsa. Observamos que os mastócitos distribuem-se de forma difusa por todo o tecido muscular e região de plexo mioentérico, tanto em pacientes chagásicos como em indivíduos não infectados. No entanto, foram observados mastócitos concentrados principalmente nas camadas musculares de pacientes que apresentavam focos de inflamação, sobretudo nos pacientes chagásicos portadores de megaesôfago. Os mastócitos apresentaram-se mais freqüentemente na periferia dos fascículos musculares e em menor número entre as fibras, distribuídos principalmente ao redor de vasos sanguíneos e em torno dos gânglios nervosos (Prancha 3).

Na análise quantitativa, observamos, nos pacientes chagásicos, aumento significativo do número de mastócitos, tanto nas camadas musculares como na região de plexo mioentérico (gráficos 04 e 05 e figuras 3A, 3B, 3C, 3D, 3E e 3F).

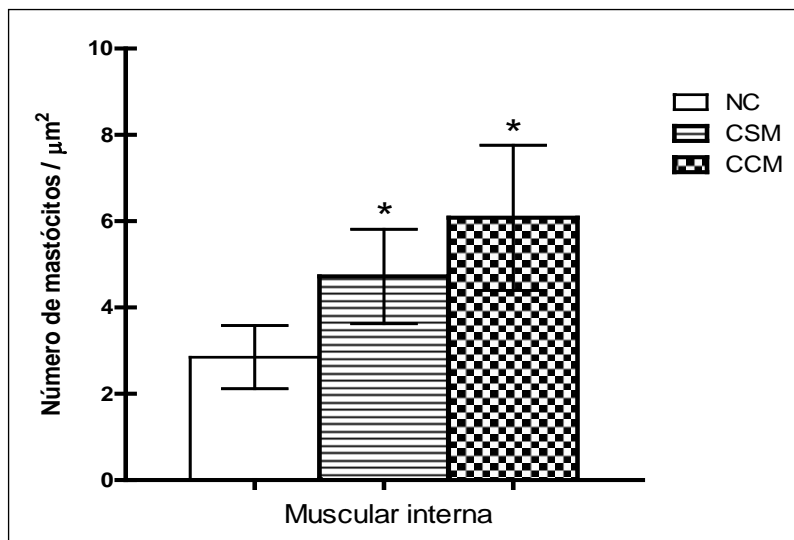


Gráfico 04- Quantificação de mastócitos nas camadas musculares da porção inferior do esôfago corados em Giemsa. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo NC ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=6, CSM-chagásico sem megaesôfago n=6, CCC-chagásico com megaesôfago n=6.

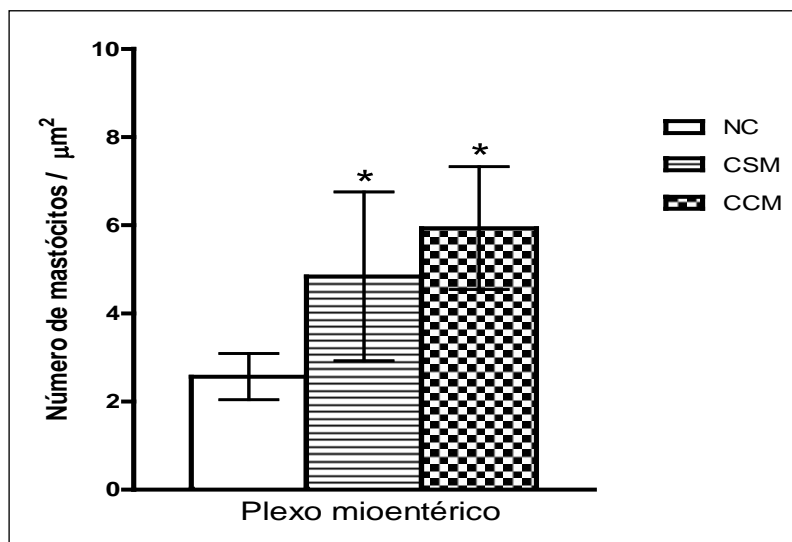


Gráfico 05- Quantificação de mastócitos no plexo mioentérico da porção inferior do esôfago corado em Giemsa. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo NC ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=6, CSM-chagásico sem megaesôfago n=6, CCC- chagásico com megaesôfago n=6.

5.4 Análise morfométrica de mastócitos triptase-IR e quimase-IR

O fenótipo de mastócitos nas camadas musculares e região de plexo mioentérico nos pacientes chagásicos e indivíduos controle foi determinado por reações de imunohistoquímica, utilizando os anticorpos anti-triptase e anti-quimase. Observamos aumento do número de mastócitos triptase-IR naqueles pacientes chagásicos portadores ou não de megaesôfago em relação aos indivíduos não infectados. Este aumento ocorreu tanto nas camadas musculares (figuras 4A, 4B e 4C), como no plexo mioentérico (figuras 4D, 4E e 4F), da porção inferior do esôfago. Esta observação foi confirmada pela análise morfométrica, representada nos gráficos 06 e 07.

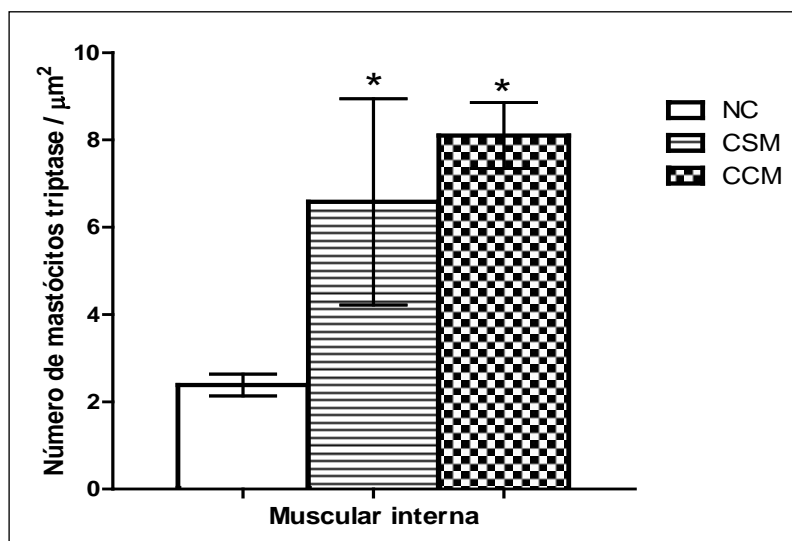


Gráfico 06. Quantificação de mastócitos triptase-IR na camada muscular interna da porção inferior do esôfago. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo NC ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=6, CSM-chagásico sem megaesôfago n=6, CCC- chagásico com megaesôfago n=6.

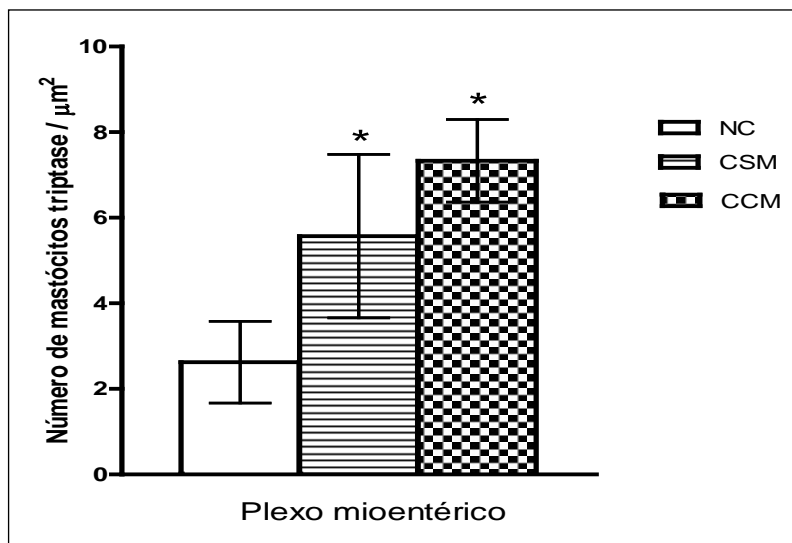


Gráfico 07. Quantificação de mastócitos triptase-IR no plexo mioentérico na porção inferior do esôfago. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo NC ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=6, CSM-chagásico sem megaesôfago n=6, CCC- chagásico com megaesôfago n=6.

No entanto, a quantificação de mastócitos quimase-IR demonstrou aumento significativo do número dessas células apenas nos pacientes sem megaesôfago. Nas figuras 5A, 5B e 5C podemos observar que os pacientes sem megaesôfago apresentaram maior número de mastócitos quimase-IR nas camadas musculares em relação aos indivíduos não infectados e aos pacientes portadores de megaesôfago (Gráfico 08). Dados similares foram encontrados na região de plexo mioentérico, evidenciando aumento de mastócitos quimase-IR nos pacientes sem mega (figuras 5D, 5E e 5F e gráfico 09).

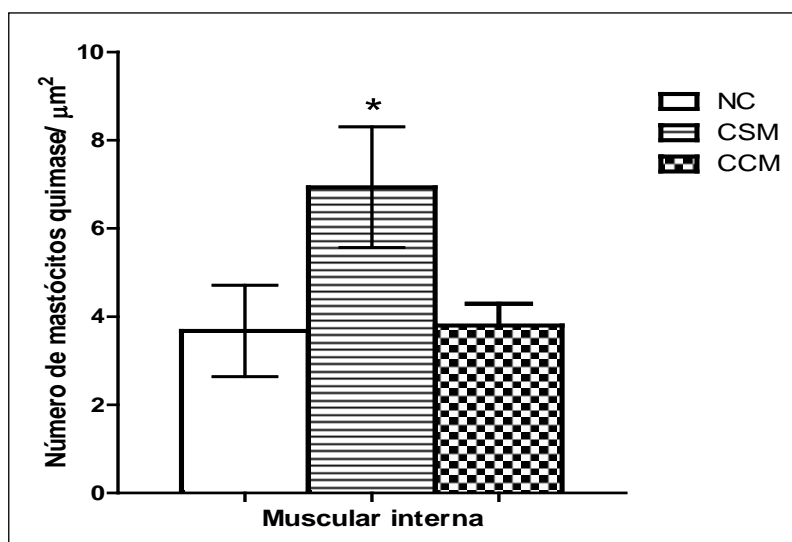


Gráfico 08. Quantificação de mastócitos quimase-IR na camada muscular interna da porção inferior do esôfago. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e os outros dois grupos ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=6, CSM-chagásico sem megaesôfago n=6, CCC- chagásico com megaesôfago n=6.

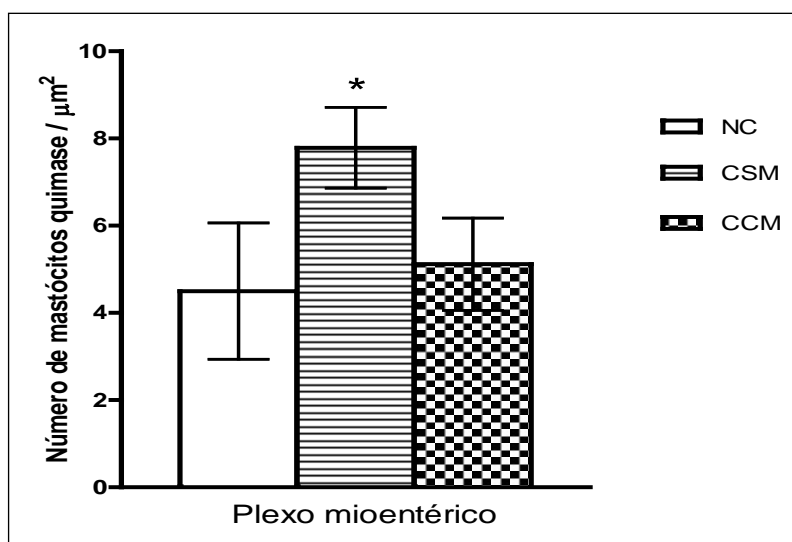


Gráfico 09. Quantificação de mastócitos Quimase-IR no plexo mioentérico na porção inferior do esôfago. Diferença significativa entre o grupo chagásico com megaesôfago e os outros dois grupos. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre este grupo e os outros dois grupos ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=6, CSM-chagásico sem megaesôfago n=6, CCC- chagásico com megaesôfago n=6.

Quando comparamos o número de mastócitos triptase-IR e quimase-IR em indivíduos controle, podemos observar que, tanto nas camadas musculares como na

região de plexo mioentérico, os mastócitos quimase-IR predominam. Em pacientes chagásicos portadores de megaesôfago, no entanto, essa relação se inverte, com predomínio de mastócitos triptase-IR. Nos pacientes sem megaesôfago, não foi observada qualquer diferença significativa entre os números de mastócitos triptase-IR e quimase-IR (gráficos 10A e 10B).

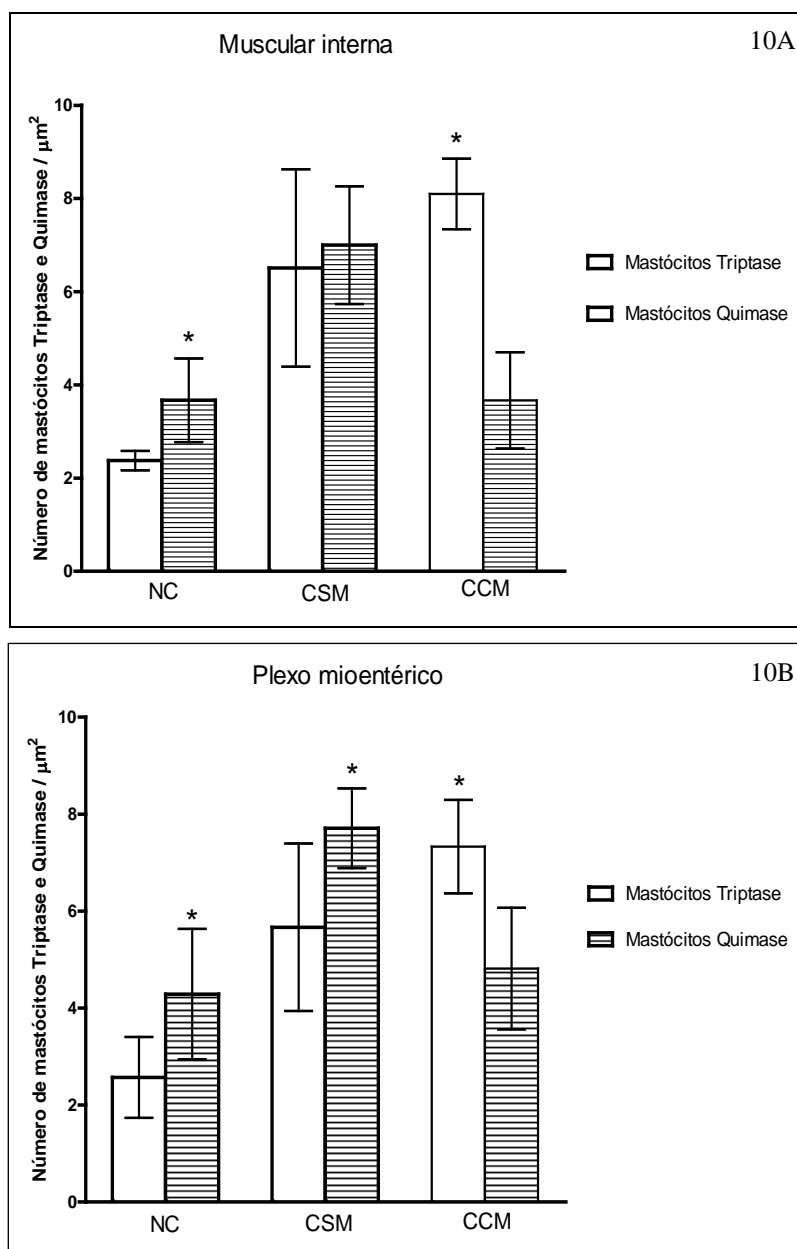


Gráfico 10. Quantificação de mastócitos triptase e quimase-IR. Gráfico 10A da camada muscular interna e gráfico 10B do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago. De cada paciente foram analisados 20 campos, com a objetiva de 40X, totalizando uma área de $1193 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre mastócitos triptase e quimase no grupo NC e CCM ($p < 0,05$). Número de casos (n), NC- não chagásico n=6, CSM-chagásico sem megaesôfago n=6, CCC- chagásico com megaesôfago n=6.

5.5 Análise da correlação entre densidade de ICC-c-Kit-IR e mastócitos

A densidade de ICC-c-Kit-IR foi correlacionada ao número de mastócitos triptase-IR e mastócitos quimase-IR, quantificados nas camadas musculares e no plexo mioentérico da porção inferior do esôfago. Observamos uma correlação positiva entre o número de mastócitos quimase-IR e a densidade de ICC no plexo mioentérico foi positiva, como pode ser observado no gráfico abaixo.

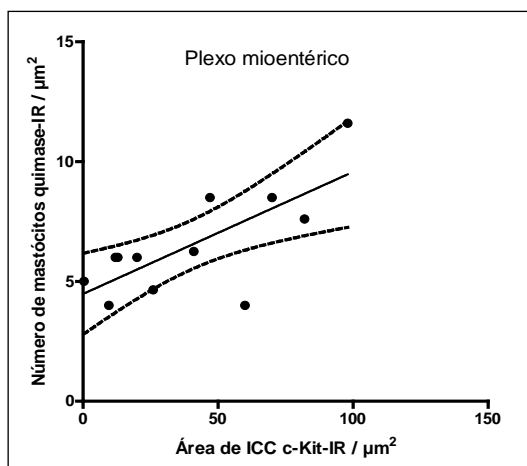


Gráfico 11. Correlação entre a densidade de ICC-c-kit-IR e mastócitos quimase-IR no plexo mioentérico da porção inferior do esôfago. Os valores de Pearson $r= 0,7284$ e $p<0,05$. Número de casos (n), não chagásico $n=4$, chagásico sem megaesôfago $n=4$ e, chagásico com megaesôfago $n=5$.

5.6 Análise da correlação entre o número de mastócitos e densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR

Observamos uma correlação negativa, ou seja, inversamente proporcional, entre o número de mastócitos triptase-IR e a área de filetes nervosos PGP 9.5-IR, como representado nos gráficos abaixo, 12A e 12B. Entretanto, não foi observada qualquer correlação significativa entre mastócitos quimase-IR e área PGP-9.5-IR.

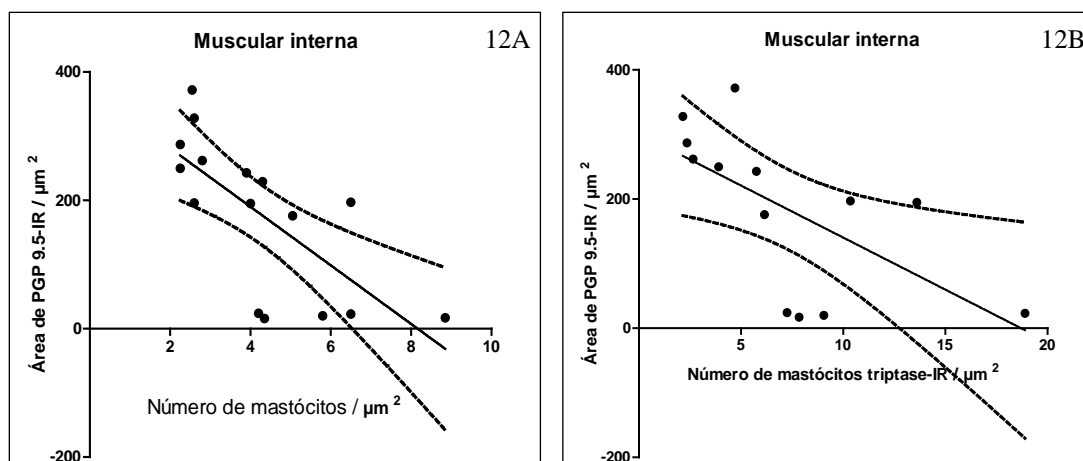


Gráfico 12. Correlação entre mastócitos e a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR. O gráfico A apresenta a correlação negativa entre mastócitos corados por giemsa e filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular interna (valores de Pearson $r = -0,7130$). O gráfico B apresenta correlação negativa entre mastócitos triptase-IR e filetes nervosos PGP 9.5-IR na camada muscular interna. (valor de Pearson $r = -0,6248$), $p < 0,05$. Número de casos (n), não chagásico $n = 6$, chagásico sem megaesôfago $n = 5$ e, chagásico com megaesôfago $n = 5$.

ILUSTRAÇÕES

Prancha 01

Figura 1A – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. ICC-c-Kit-IR (setas)

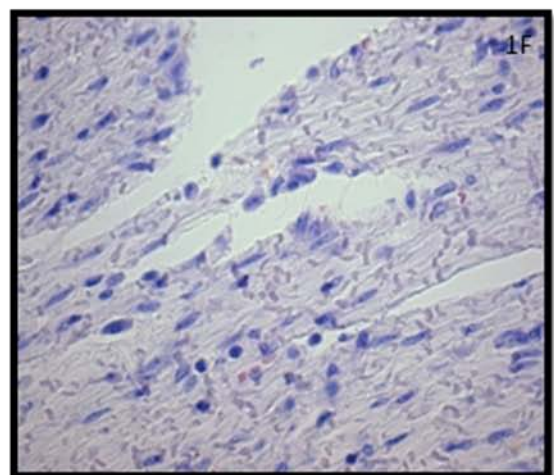
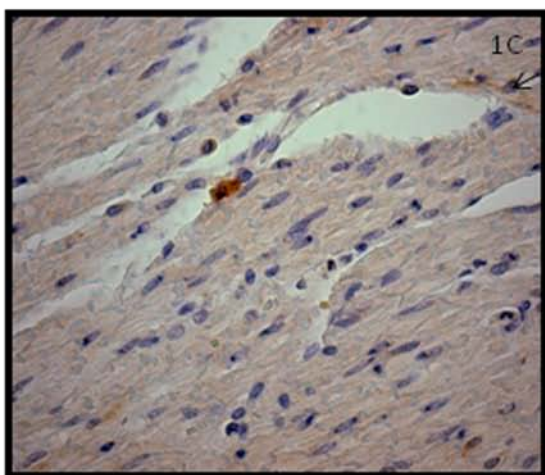
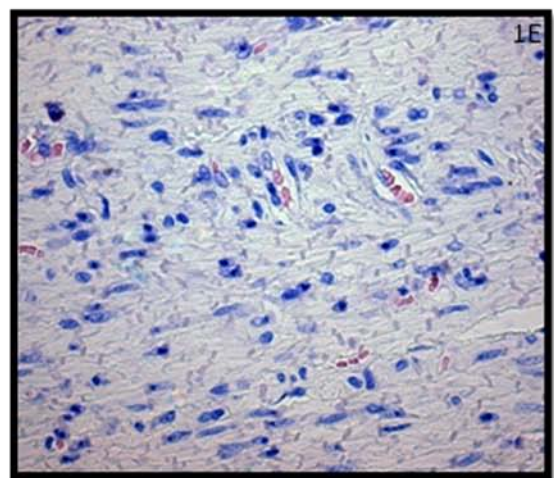
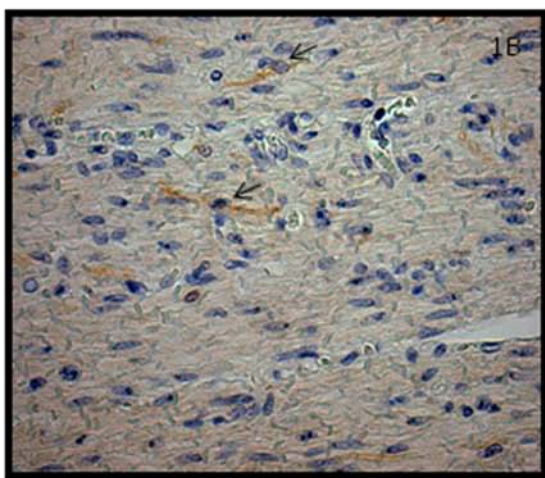
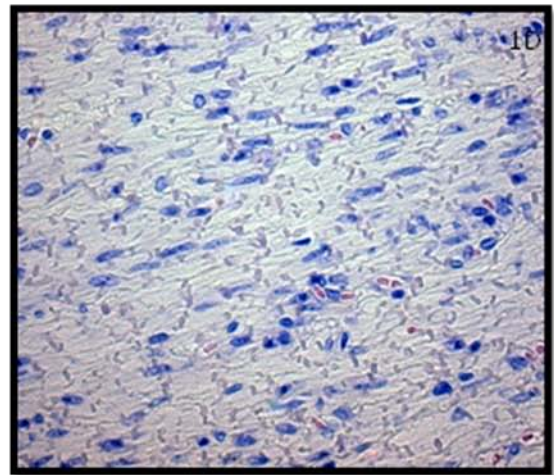
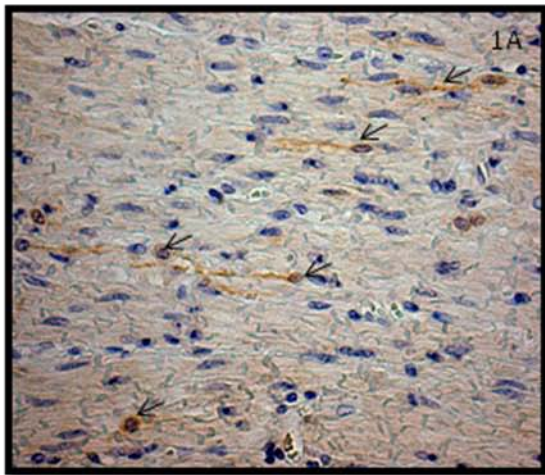
Figura 1B – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. ICC-c-Kit-IR (setas) e mastócitos (ponta de seta).

Figura 1C – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (ponta de seta).

Figura 1D – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle, corado por giemsa. Objetiva de 40x.

Figura 1E – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago, corado por giemsa. Objetiva de 40x. Mastócitos (ponta de seta).

Figura 1F – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago, corado por giemsa. Objetiva de 40x. Mastócitos (ponta de seta).



Prancha 02

Figura 2A – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. ICC-c-Kit-IR (setas), neurônios (ponta de seta) e mastócitos (asterisco).

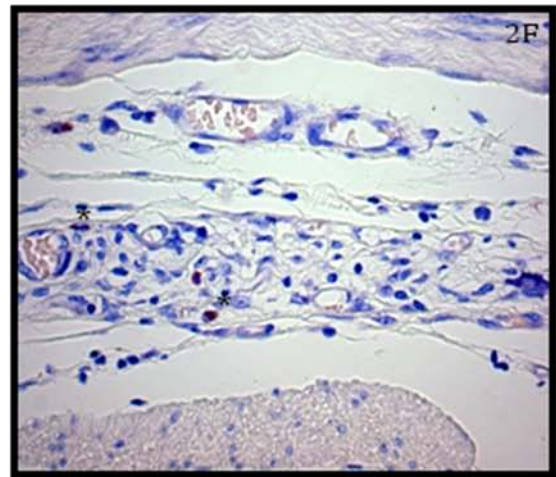
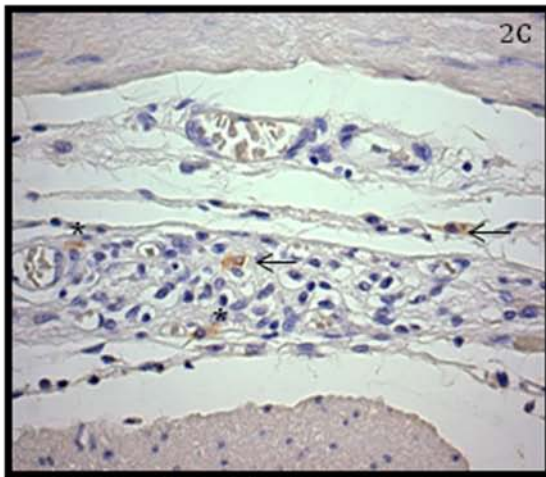
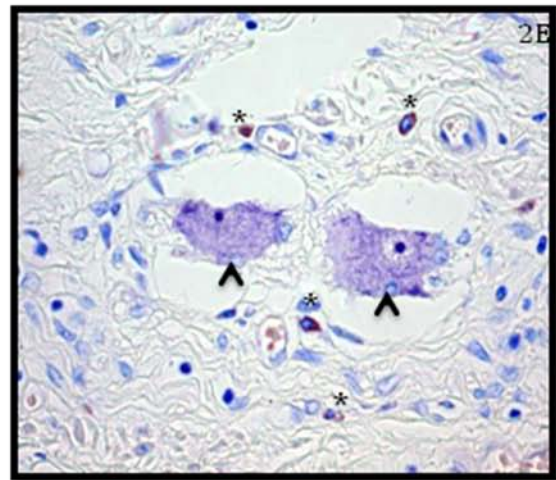
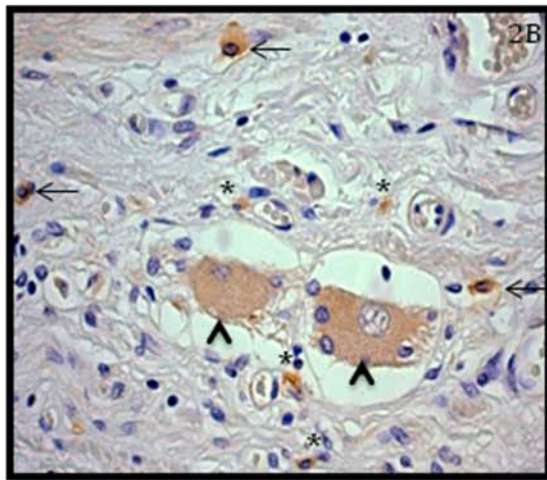
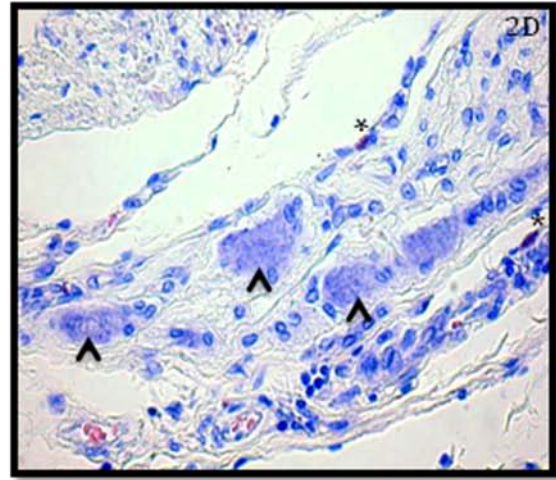
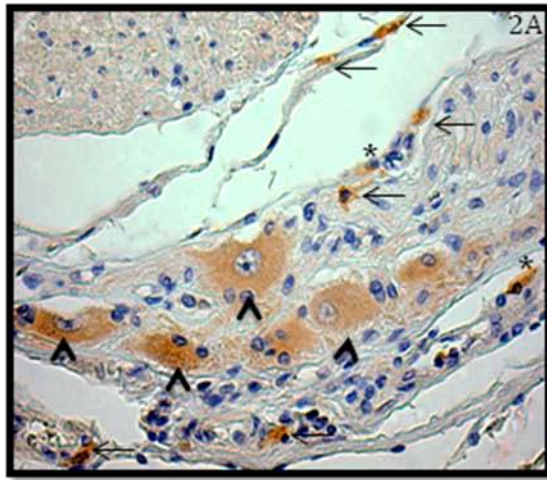
Figura 2B – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. ICC-c-Kit-IR (setas), neurônios (ponta de seta) e mastócitos (asterisco).

Figura 2C – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-c-Kit e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. ICC-c-Kit-IR (setas)

Figura 2D – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle, corado por giemsa. Objetiva de 40x. Neurônios (ponta de seta) e mastócitos (asterisco).

Figura 2E – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico, corado por giemsa. Objetiva de 40x. Neurônios (ponta de seta) e mastócitos (asterisco).

Figura 2F – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago, corados por giemsa. Objetiva de 40x.



Prancha 03

Figura 3A – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle corado por giemsa. Objetiva de 10x. Mastócitos (setas).

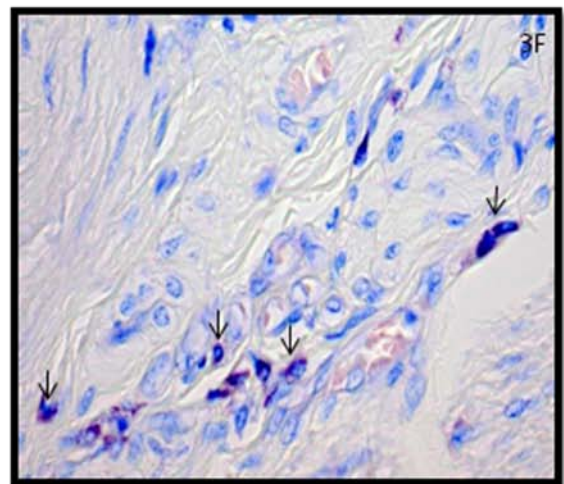
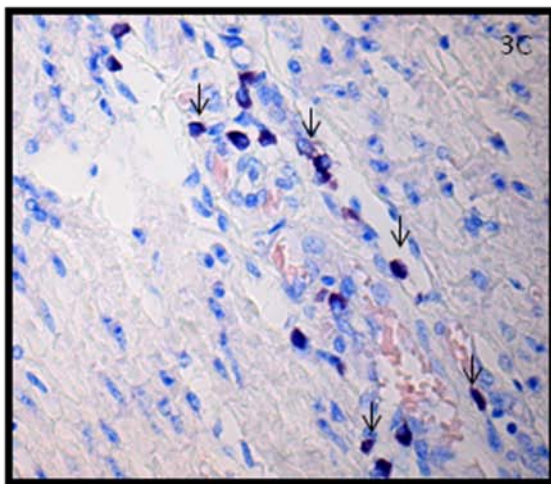
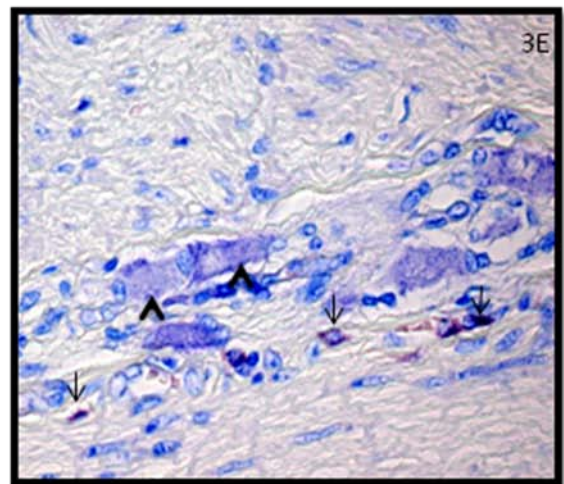
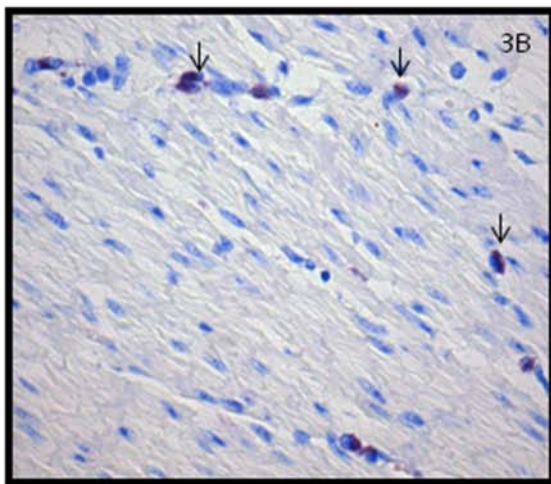
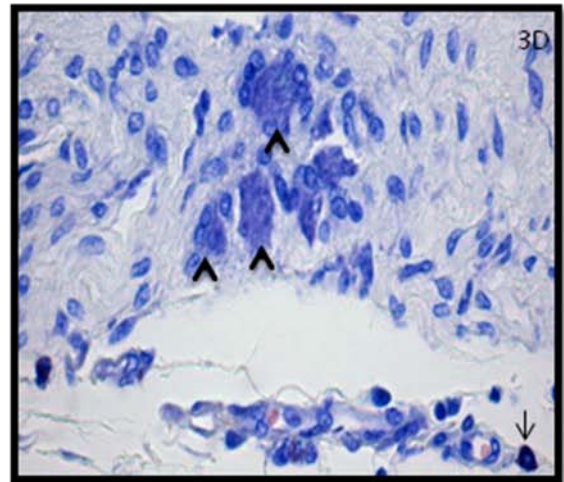
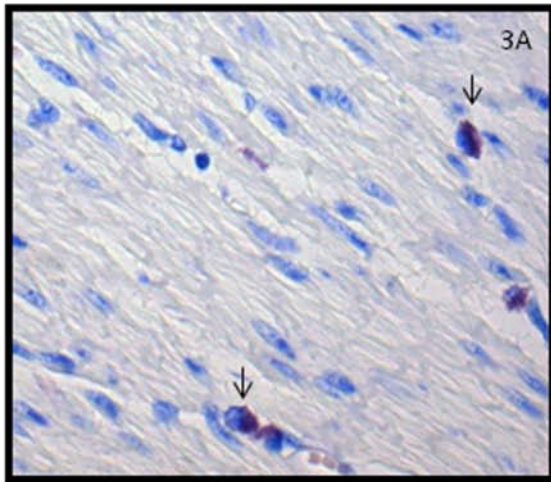
Figura 3B – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago corado por giemsa. Objetiva de 10x. Mastócitos (setas).

Figura 3C – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente chagásico com megaesôfago corado por giemsa. Objetiva de 10x. Mastócitos (setas).

Figura 3D – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle corado por giemsa. Objetiva de 10x. Mastócitos (setas) e neurônios (ponta de seta).

Figura 3E – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago corado por giemsa. Objetiva de 10x. Mastócitos (setas) e neurônios (ponta de seta).

Figura 3F – Secção da região de plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente chagásico com megaesôfago corado por giemsa. Objetiva de 10x. Mastócitos (setas).



Prancha 04

Figura 4A – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-triptase e contra coradas por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).

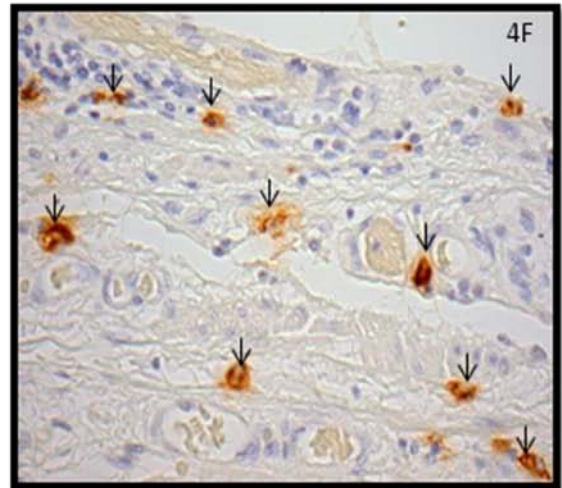
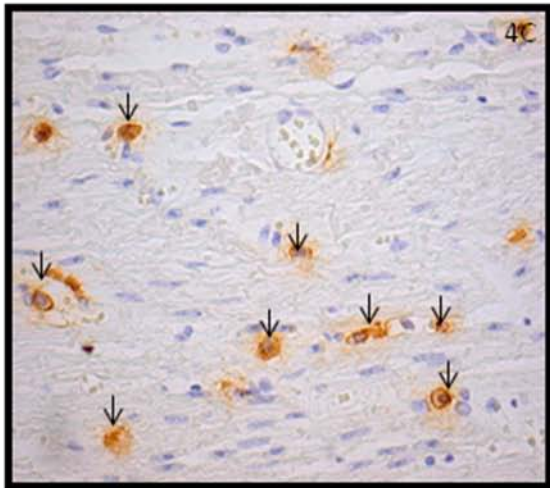
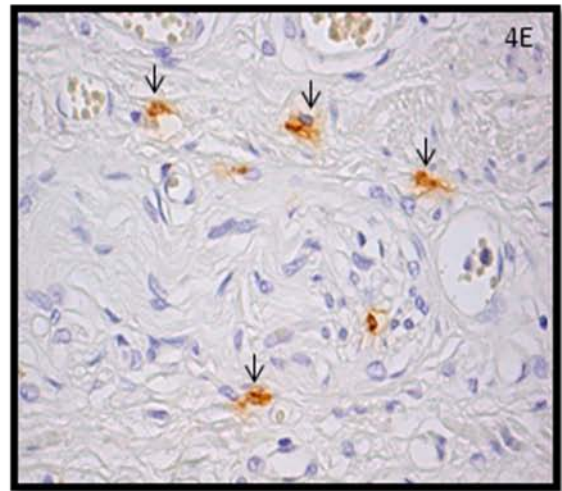
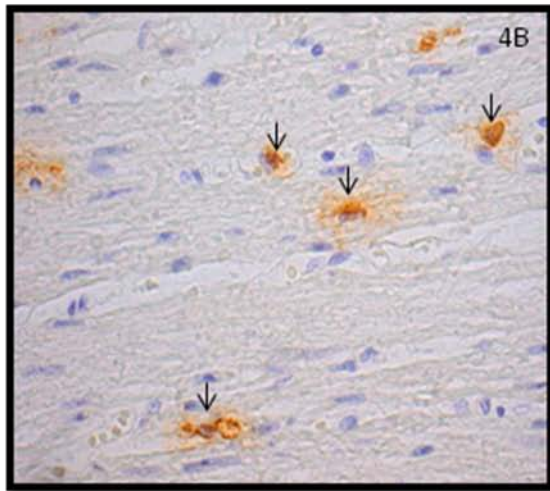
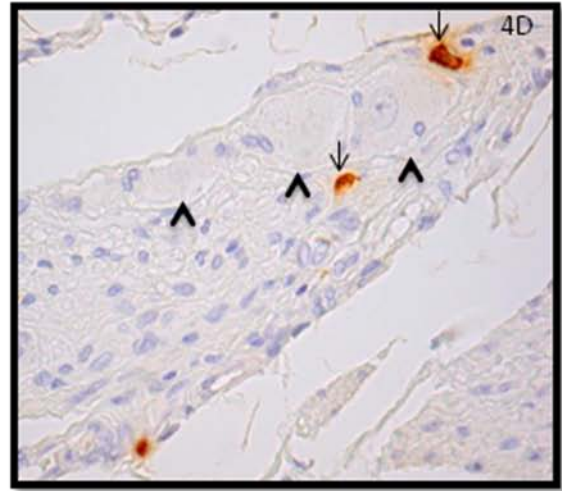
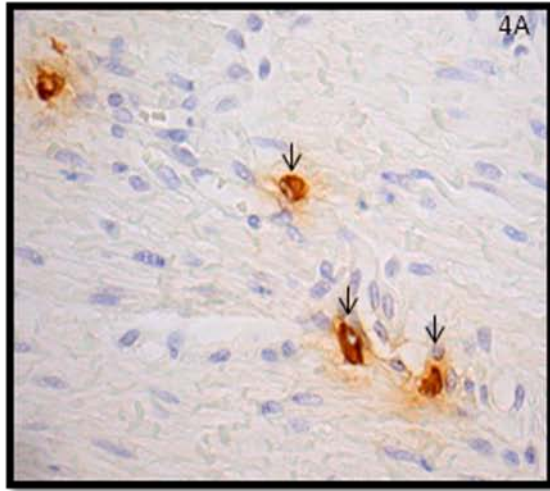
Figura 4B – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).

Figura 4C – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).

Figura 4D – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-triptase e contra coradas por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas) e neurônios (ponta de seta).

Figura 4E – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).

Figura 4F – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-triptase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).



Prancha 05

Figura 5A – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).

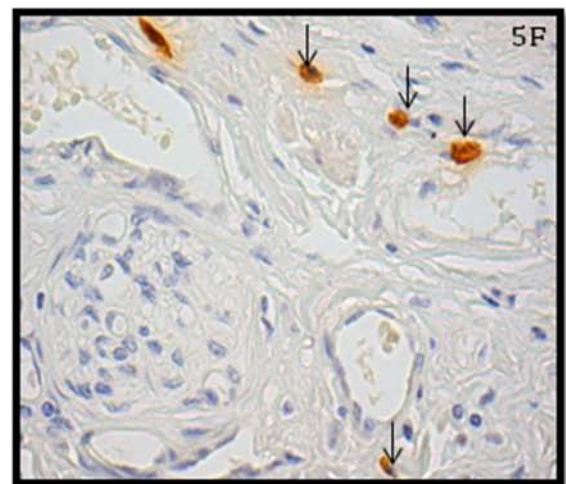
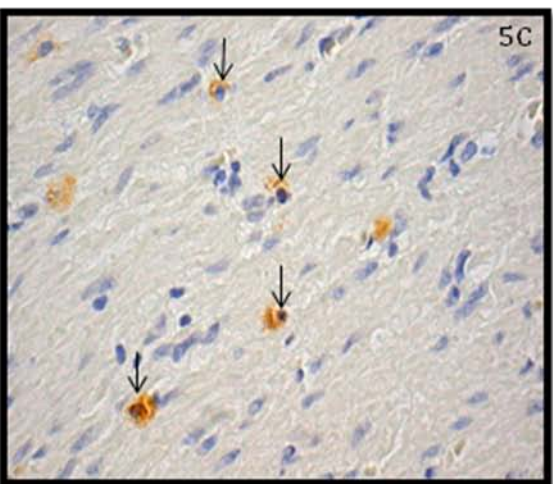
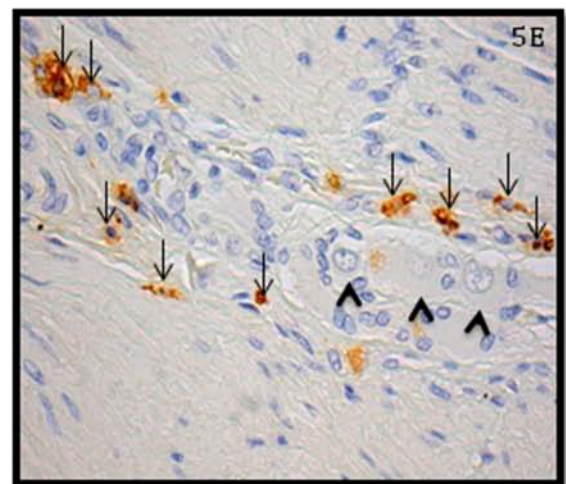
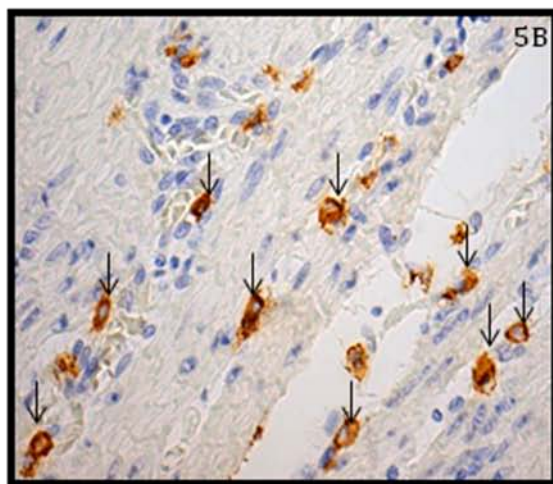
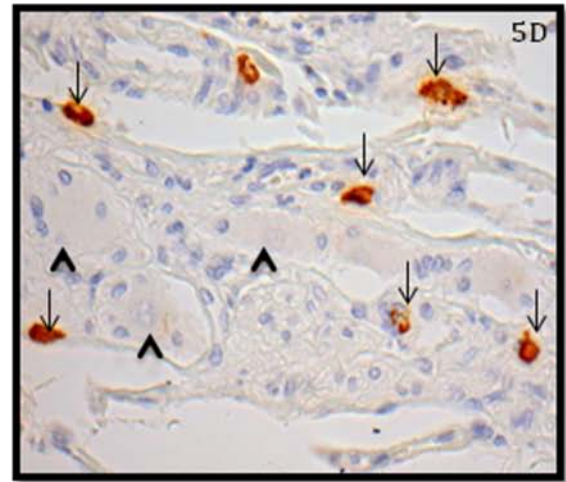
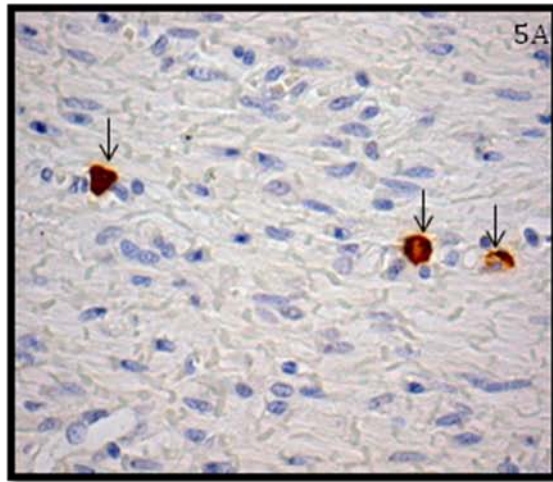
Figura 5B – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).

Figura 5C – Secção da camada muscular da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).

Figura 5D – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo controle, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas) e neurônios (ponta de seta).

Figura 5E – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico sem megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas) e neurônios (ponta de seta).

Figura 5F – Secção do plexo mioentérico da porção inferior do esôfago de paciente do grupo Chagásico com megaesôfago, submetidas à reação de imunoperoxidase com o anticorpo anti-quimase e contra corada por Hematoxilina. Objetiva de 40x. Mastócitos (setas).



6.0 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi o primeiro estudo a caracterizar a distribuição das células intersticiais de Cajal (ICC) e dos mastócitos triptase e/ou quimase-IR em pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago chagásico. Os resultados encontrados foram surpreendentes e dão continuidade aos estudos da imunopatologia da forma digestiva da doença de Chagas realizados em nosso laboratório.

Os resultados mostraram significativa redução na densidade de ICC-c-Kit-IR nas túnicas musculares e na região de plexo mioentérico dos pacientes chagásicos portadores de megaesôfago, confirmando dados anteriores da literatura (DE LIMA *et al.*, 2008) e também nas camadas musculares de indivíduos com sorologia positiva, mas que não apresentavam qualquer sintoma da doença digestiva. É possível que a diminuição de ICC possa prejudicar a atividade de marcapasso no esôfago (MIDRIO *et al.*, 2010; VILLANACCI *et al.*, 2010), reduzindo a resposta contrativa em pacientes chagásicos e contribuindo, assim, para o desenvolvimento do megaesôfago. Entretanto, em pacientes chagásicos que não desenvolveram a doença digestiva, a densidade de ICC na região de plexo mioentérico mostrou-se inalterada, o que sugere que a atividade de marcapasso ainda esteja presente nesses pacientes.

Dessa maneira, nos perguntamos o que poderia contribuir para diminuição da densidade de ICC-c-Kit-IR nos pacientes chagásicos, sabendo que nesse microambiente, já foram descritos processos de desnervação, parasitose, inflamação (D'AVILA REIS *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2007) e ainda hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas (PEREIRA, 1958). Como as ICC são observadas normalmente estabelecendo contato direto com neurônios, células musculares lisas e mastócitos (FAUSSONE-PELLEGRINI, 2009; MIKKELSEN, *et al.*, 2010), qualquer alteração nessa rede poderia levar à morte das ICC. Tanto neurônios como as células musculares lisas produzem SCF, o qual estimula a sobrevivência e interfere no processo de diferenciação de ICC (WARD & SANDERS, 2001).

Apesar de ainda não haver dados na literatura que comprovem o inverso do exposto acima, isto é, que as ICC são essenciais para a sobrevivência do neurônio, poderíamos especular que, a diminuição na densidade de ICC-c-Kit-IR observada nesse estudo seria não uma consequência, mas uma causa da morte neuronal. Demonstramos que a densidade de filetes nervosos PGP 9.5-IR se correlaciona positivamente com o número de ICC-c-Kit-IR em pacientes portadores de megaesôfago chagásico. No

entanto, a diminuição na densidade de ICC-c-Kit-IR na túnica muscular dos pacientes chagásicos não portadores de megaesôfago e que não apresentavam qualquer sintoma da doença digestiva, sugere que a alteração nessas células seja um evento precoce no desenvolvimento da doença. Reforçando esta hipótese, demonstramos ainda que mesmo os pacientes chagásicos sem megaesôfago, pertencentes ao grupo CSM1, com densidade de filetes nervosos e contagem neuronal comparável ao controle, já apresentaram redução significativa da densidade de ICC-c-Kit-IR na camada muscular.

Poderíamos ainda supor que, a diminuição de ICC nos pacientes chagásicos seria devido à morte dessas células por apoptose. O aumento do processo apoptótico poderia ter início ainda na fase aguda da doença, pela presença do parasita e sustentado na fase crônica pelo processo inflamatório. A demonstração nas lesões chagásicas da fase crônica, de linfócitos TIA-1+, células Natural Killer, eosinófilos, macrófagos e mastócitos (D'ÁVILA REIS *et al.*, 2001), todas estas células potencialmente citotóxicas, reforçam a hipótese da participação de mecanismos imunes na eliminação das ICC nesses casos. Contudo, Iantorno e cols. (2007), não detectaram qualquer fenômeno apoptótico em ICC nos tecidos de pacientes portadores de megacólon chagásico (IANTORNO *et al.*, 2007). No megaesôfago chagásico, análises futuras deverão ser desenvolvidas para que possamos estabelecer o possível papel da apoptose na diminuição da densidade de ICC no órgão desses pacientes.

A diminuição na densidade de ICC-c-kit-IR é observada em várias doenças associadas a transtornos na motilidade do TGI, dentre elas acalásia e megacólon idiopáticos, gastroparesia, doença de Hirschsprung's, constipação do trânsito lento e doenças inflamatórias intestinais (TONG *et al.*, 2004; SHAFIC *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007; BERNARDINI *et al.*, 2011). A inflamação comparece como um processo importante no desenvolvimento dessas doenças, dessa maneira o microambiente inflamatório poderia alterar o comportamento das ICC e levar a complicações da atividade peristáltica do TGI nessas patologias. Logo após a interrupção do processo inflamatório ocorre reposição de ICC demonstrando a plasticidade dessas células e o papel da inflamação na eliminação dessas células (DER *et al.*, 2000).

A diminuição da densidade de ICC-c-kit-IR nos pacientes chagásicos poderia estar refletindo ainda uma alteração no fenótipo celular, com eliminação ou diminuição da expressão de c-Kit na superfície celular, mas que não necessariamente significa morte dessas células. Estudos futuros em microscopia eletrônica são necessários para investigar essa possibilidade.

No presente trabalho, investigamos também a participação dos mastócitos no desenvolvimento do megaesôfago chagásico. Seu estudo em doença de Chagas justifica-se pela sua participação já comprovada em várias doenças inflamatórias crônicas (LAKHAN & KIRCHGESSNER, 2010), por seu papel como célula mediadora da comunicação entre sistema imune e SNE (VAN NASSAUW *et al.*, 2007) e ainda pela sua capacidade de produzir TGF- β 1 (WOODMAN *et al.*, 2008) substância com ação comprovada na contratilidade muscular (ACEVES *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostraram o aumento significativo de mastócitos em pacientes chagásicos portadores e não portadores de megaesôfago, tanto nas camadas musculares quanto na região de plexo mioentérico. Estes dados contrastam com os resultados encontrados por Pinheiro e *cols.* (2008) que não observaram aumento significativo de mastócitos nos pacientes chagásicos, mas confirmam os achados de outros pesquisadores que destacam que o aumento do número de mastócitos poderia ocorrer em função do processo inflamatório, que tem início na fase aguda da doença e se perpetua até o desenvolvimento do megaesôfago (LIMA PEREIRA, 1972; OLIVEIRA *et al.*, 1998; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a).

Para tentar especular sobre a causa da mastocitose observada, levantamos alguns dados da literatura. Constatamos que várias citocinas atuam na proliferação de mastócitos como as IL-3, IL-4, IL-10. A IL-4 juntamente com IL-3 e IL-10 em ação combinada com SCF atua como fator de crescimento para células progenitoras de mastócitos, proliferação e formação de colônia em cultura (RENNICK *et al.*, 1995). Nesse ponto vale salientar que células mononucleares de pacientes chagásicos portadores da forma digestiva, quando estimuladas *in vitro*, produzem níveis elevados de algumas citocinas, dentre elas a IL-4 (RIBEIRO *et al.*, 2008), o que explicaria, pelo menos em parte, a mastocitose que observamos nos pacientes portadores de megaesôfago.

Visto que algumas funções dos mastócitos são atribuídas ao conteúdo dos seus grânulos, analisamos também o número dessas células que expressam duas importantes proteases: triptase e quimase. Observamos aumento de mastócitos triptase-IR tanto em pacientes chagásicos portadores como naqueles não portadores de megaesôfago. A triptase cliva VIP, um neuromediador antiinflamatório, normalmente liberado por neurônios do SNE, limitando assim a ação deste neuropeptídeo nos tecidos (CAUGHEY *et al.*, 1987). Nesse contexto, torna-se importante salientar que dados ainda não publicados do nosso laboratório demonstraram uma diminuição da imunorreatividade a

VIP no esôfago de pacientes chagásicos portadores de megaesôfago. É possível que, no megaesôfago chagásico, a triptase possa ter um importante papel pró-inflamatório, que seria explicado, pelo menos em parte, pela sua capacidade de clivar VIP.

O aumento de mastócitos triptase-IR foi observado também em outras patologias do esôfago, tais como acalásia idiopática, esofagite eosinofílica e refluxo esofágico, relacionadas ao processo inflamatório (BOHL *et al.*, 2010; ACEVES *et al.*, 2010; DELLON *et al.*, 2011; QIU *et al.*, 2011). A alta expressão de triptase por mastócitos também foi observada em modelos animais de doenças inflamatórias intestinais (HAMILTON *et al.*, 2011) e artrites inflamatórias crônicas (MCNEIL *et al.*, 2008; SHIN *et al.*, 2009). Do mesmo modo, na colite ulcerativa a triptase liberada pela desgranulação de mastócitos induziu a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas de uma maneira autócrina (KIM *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, o aumento de mastócitos triptase-IR foi observado também em pacientes chagásicos que não desenvolveram o megaesôfago e que, na maioria das vezes, não apresentam inflamação significativa. Mas diferentemente dos portadores de megaesôfago, esse grupo apresentou também aumento significativo de mastócitos quimase-IR. Essa protease também cliva VIP, inativando-o. No entanto, a quimase tem a capacidade de clivar também substância P, um neuromediador com atividade pró-inflamatória, que também é produzido normalmente por neurônios do SNE (CAUGHEY *et al.*, 1987). Os dados acima sugerem que o equilíbrio entre a produção de quimase e de triptase seja importante para controlar o processo inflamatório no esôfago. Naqueles pacientes infectados com *T. cruzi*, que mantém o parasita no tecido até a fase crônica da infecção (DA SILVEIRA *et al.*, 2005), a quimase seria importante para controlar o processo inflamatório, agindo assim como uma molécula protetora no desenvolvimento do megaesôfago.

Sabe-se que o fenótipo dos mastócitos é determinado pelo seu microambiente (BISCHOFF *et al.*, 2009) e a função biológica de cada subtipo difere também na capacidade de produzir e gerar citocinas (BRADDING *et al.*, 1995; WELLE, 1997). Alguns estudos de mastócitos em cultura descreveram a participação de IL-4 no desenvolvimento de mastócitos triptase-IR, e demonstraram o envolvimento de TNF- α e IL-4 na regulação do receptor de triptase PAR-2 (ZHANG *et al.*, 2010). Desse modo, o aumento de TNF- α e IL-4 em pacientes portadores de megaesôfago (RIBEIRO *et al.*, 2008) poderia justificar o aumento de mastócitos triptase nesses pacientes e esse

fenótipo celular poderia estar envolvido preferencialmente em um microambiente tecidual rico em IL-4.

Por outro lado, o aumento de mastócitos quimase-IR, em indivíduos infectados não portadores da doença digestiva, poderia ser explicado, pelo menos parcialmente, pela ação da citocina IL-10. Esta interleucina estimula a expressão de RNAm de quimase em mastócitos de camundongos (GHILDYAL *et al.*, 1992; EKLUND *et al.*, 1993) e é produzida em grandes quantidades por pacientes chagásicos portadores da forma indeterminada da doença de chagas (SOUZA *et al.*, 2004).

Interessante notar que, de acordo com nossas análises, o número de mastócitos quimase-IR se correlaciona positivamente com a densidade de ICC-c-Kit-IR no plexo mioentérico. De acordo com dados da literatura, os mastócitos produzem fatores de crescimento como SFC e IL-9, que contribuem para a sobrevivência e manutenção das ICC (YE *et al.*, 2006; ZARATE *et al.*, 2006). O possível papel protetor dos mastócitos quimase-IR poderia contribuir para a permanência de ICC no plexo mioentérico dos pacientes chagásicos não portadores de megaesôfago.

Com relação às análises de correlação entre mastócitos e densidade de filetes nervosos, observamos que quanto maior o número dessas células triptase-IR, menor a área PGP 9.5-IR. O aumento de mastócitos triptase-IR é observado em pacientes chagásicos portadores de megaesôfago, os quais apresentaram intensa desnervação. Já os pacientes não portadores de megaesôfago apresentaram aumento tanto de mastócitos triptase-IR como de quimase-IR, mas o grupo CSM2, com diminuição da área PGP-9.5-IR e baixa contagem neuronal, apresentaram maior número de mastócitos triptase-IR. Esses resultados apontam para uma possível relação entre desnervação e mastócitos triptase-IR.

Essa relação foi observada também em outros estudos, os quais mostraram diminuição da sobrevivência neuronal associada à mastócitos *in vitro*. Em co-cultura, mastócitos induzem a morte neuronal através da liberação de triptase via ativação de PAR-2, expresso em neurônios. Os autores sugerem que o aumento excessivo de triptase poderia conduzir a uma hiper-excitação e morte neuronal observada em doenças inflamatórias com distúrbios de motilidade (SAND *et al.*, 2009). Assim, o processo inflamatório descrito como um dos fatores que possam contribuir para a desnervação no desenvolvimento do megaesôfago chagásico pode ser em parte coordenado por mastócitos triptase-IR.

Em suma, ainda se discute muito a real função de cada protease armazenada por mastócitos. Sabe-se que tanto a liberação de triptase como a de quimase pode estar envolvida em processos protetores e lesivos nos tecidos, sendo células imunoreguladoras da imunidade (GALLI *et al.*, 2008). Assim, os resultados do presente estudo mostraram que existe um equilíbrio fenotípico, entre mastócitos triptase e quimase-IR nos pacientes chagásicos não portadores de megaesôfago o qual pode se refletir na modulação do processo inflamatório nesses pacientes. Entretanto, esse equilíbrio não é mantido naqueles pacientes chagásicos portadores de megaesôfago.

7. CONCLUSÃO

O modelo humano não nos permite chegar a conclusões definitivas. No entanto, a descrição dos resultados nos permite elaborar hipóteses, as quais estão apresentadas abaixo.

1. As ICC participam de alguma forma do desenvolvimento do megaesôfago chagásico, uma vez que a densidade dessas células está diminuída nas túnicas musculares e na região de plexo mioentérico dos pacientes chagásicos portadores de megaesôfago.
2. As ICC do plexo mioentérico parecem contribuir para a manutenção da atividade contrativa do órgão, uma vez que, no plexo mioentérico, a densidade dessas células está diminuída em indivíduos portadores de megaesôfago, mas se mantêm inalterada em pacientes que não apresentam qualquer sintoma da forma digestiva da doença.
3. A diminuição da densidade de ICC-c-kit-IR parece preceder o processo de desnervação, considerando que em pacientes chagásicos não portadores de megaesôfago, que não apresentavam desnervação, já tinham diminuição da densidade de ICC-c-Kit-IR, sugerindo que a eliminação das mesmas seja um evento precoce no desenvolvimento do megaesôfago, anterior a perda de neurônios.
4. A protease quimase parece modular o processo inflamatório em pacientes chagásicos que não desenvolvem o megaesôfago, dado que mastócitos quimase-IR apresentam-se aumentados nesses pacientes. Além disso, dados preliminares do nosso laboratório, demonstrando o aumento da porcentagem de filetes nervosos substância-P-IR em pacientes portadores de megaesôfago, sugerem a participação dessa molécula na manutenção da inflamação na fase crônica. Partindo desse pressuposto e sabendo da capacidade de quimase degradar substância P, ousamos sugerir que o predomínio de mastócitos quimase-IR em pacientes sem megaesôfago, seja importante para a modulação do processo inflamatório no órgão. Isso explicaria, pelo menos em parte, a ausência da doença digestiva em alguns casos com k-DNA de *Trypanosoma cruzi* nas lesões da fase crônica.

5. A protease triptase parece, ao menos em parte, atuar como molécula pró-inflamatória, uma vez que, essa protease cliva VIP, substância antiinflamatória, inibindo a atuação dessa última nos tecidos e amplificando o processo inflamatório.
 6. O aumento de triptase pode contribuir para o processo degenerativo neuronal, pois observamos a correlação negativa entre mastócitos triptase-IR e área de inervação nas camadas musculares, o qual sugere que triptase contribua para o processo de desnervação característico da forma digestiva da doença de Chagas.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aceves SS, Chen D, Newbury RO, Dohil R, Bastian JF and Broide DH (2010) Mast cell infiltrate the esophageal smooth muscle in patients with eosinophilic esophagitis, Express TGF- β 1 and increase esophageal smooth muscle contraction. *J allergy clin immunol* **126**, 1198-204.

Adad SJ (1989) Contribuição ao estudo da anatomia patológica e da patogênese do megaesôfago chagásico. Tese (mestrado). Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Brasil.

Adad SJ (1996) Contribuição ao estudo da anatomia patológica e da patogênese do megacólon chagásico. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Brasil.

Adad SJ, Andrade DCS, Lopes ER and Chapadeiro E (1991) Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. *Ver Inst Med Trop* **33**, 443-450.

Andoh A, Deguchi Y, Inatomi O, Yagi Y, Bamba S, Tsujikawa T and Fujiyama Y (2006) Immunohistochemical study of ckinhymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease. *Oncology Reports* **16**, 103-107.

Andrade, SG and Andrade, ZA (1966) Chagas' disease and neuron changes in auerbach's plexus experimental study in mice. *Rev Inst Med Trop* **8**, 219-224.

Andrade, ZA and Andrade, SG (1969) immunochemical study of experimental chagas' disease. *Rev Inst Med Trop* **11**, 44-47.

Barbara G, Stanghellini V, Giorgio DER, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM and Corinaldesi R (2004) Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **126**, 693-702.

Beckett EA, Takeda Y, Yanase H, Sanders KM, Ward SM (2005) Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *J Comp Neurol* **493**,193-206.

Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, De Giorgio R, Colucci R, Fausone-Pellegrini MS, Chiarugi M, Campani D, Castagna M, Mattii L, Blandizzi C, Dolfi A (2011) Immunohistochemical Analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of cajal in ulcerative colitis. *J Cell Mol Med* doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01298.x. [Epub ahead of print]

Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R, Manns MP (1999) IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8080-8085.

Bischoff SC (2009) Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol* **31**, 185-205.

- Bohl JR, Junginger T, Eckardt VF, Lang H, Müller M, Gockel I (2010) Electron microscopic studies of esophageal wall structures in patients with achalasia: casting more light on unresolved aspects of pathogenesis. *Hepatogastroenterology* **100**, 501-12.
- Bornstein JC, Costa M, Grider JR (2004) Nenteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil SUPPL* **1**, 34-38.
- Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST (1995) Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* **1**, 297-307.
- Brener, Z (1982) Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bull World Health Organ* **60**, 463-473.
- Burns AJ, Lomax AEJ, Torihasit S, Sanders KM, Ward SM (1996) Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *PHYSIOLOGY* **93**, 12008-12013.
- Caughey GH, Leidig F, Viro NF, Nadel JA (1987) Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 133-7.
- Chagas C (1909) Nova tripanozomiaze humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1**, 159-218.
- Chagas C 1916. Processos patogênicos da tripanozo-miase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **8**, 5-35.
- Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, Lurken MS, Zhu J, Wouters MM, Miller SM, Szurszewski JH, Farrugia G (2007) Regulation of interstitial cells of cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil* **7**, 585-95.
- Coura JR (2007) Chagas disease: What is known and what is needed – a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**, 113-122.
- Coura JR, Dias JC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**, 31-40.
- Dantas RO (2003) Comparação entre acalásia idiopática e acalásia conseqüente à doença de chagas. *Arq Gastroenterol* **40**, 126-30.
- D'Avila reis D, Lemos EM, Silva GC, Adad SJ, Mccurley T, Correa- Oliveira R and Machado CR (2001) Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**, 177-178.
- Da Silveira ABM, Arantes RME, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R and D'Avila Reis D (2005) Comparative study of the presence of trypanosoma cruzi kdna, inflammation and denervation in Chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* **131**, 627-634.

Da Silveira AB, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D (2007) Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology* **134**, 789-96.

Da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D (2007B) Megacólon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol* **38**, 1256-1264.

Da Silveira AB, D Avila Reis D, Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Poole D, Correa-Oliveira R, Furness JB (2007c). Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Digestive Diseases and Sciences* **52**, 2877-2883.

De Lima MA, Cabrine-Santos M, Tavares Mg, Lages-Silva E, Ramirez LE (2008) Interstitial cells of cajal in chagasic megaesophagus. *Annals of diagnostic Pathology* **12**, 271-274.

De Lima Pereira SA, Dos Santos VM, Rodrigues DB, Da Cunha Castro EC, Dos Reis MA, De Paula Antunes Teixeira V (2007) Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. *Med mal infect* **37**, 229-33.

Dellon ES, Chen X, Miller CR, Fritchie KJ, Rubinas TC, Woosley JT, Shaheen NJ (2011) Tryptase staining of mast cells may differentiate eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. *Am J gastroenterology* **2**, 264-71.

De Resende MM, Mill J (2002) Vias alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. *Arq Bras Cardiol* **78**, 425-31.

Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L (2006) Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* **55**, 655-61.

Der T, Bercik P, Donnelly G, Jackson T, Berezin I, Collins SM, Huizinga JD (2000) Interstitial cells of cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology* **119**, 1590-9.

Dias, J C (2001) Chagas disease, environment, participation, and the state. *Cad Saude Publica* **17**, 165-169.

Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B (2000) Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, 529-39.

Etchebehere RM (2001) Estudo comparativo dos gânglios do plexo mioentérico do esôfago e cólon humano em relação à presença de vasos sanguíneos. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Brazil.

Eklund KK, Ghildyal N, Austen KF, Stevens RL (1993) Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases. *J Immunol* **8**, 4266-73.

Farré R, Wang XY, Vidal E, Domènech A, Pumarola M, Clave P, Huizinga JD, Jiménez M (2007) Interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission in the rat lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 484-96.

Farrugia, G (2008) Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 54–63.

Faussone-Pellegrini MS and Cortesini C (1985) Ultrastructural features and localization of the interstitial cells of Cajal in the smooth muscle coat of human esophagus. *J Submicrosc Cytol* **17**, 187-97.

Faussone-Pellegrini MS (2009) Interplay among enteric neurons, interstitial cells of cajal, resident and not resident connective tissue cells. *J Cel Mol Med* **10**, 1-2.

Fox EA, Phillips RJ, Byerly MS, Baronowsky EA, Chi MM, Powley TL (2002) Selective loss of vagal intramuscular mechanoreceptors in mice mutant for steel factor, the c-kit receptor ligand. *Anat Embryol* **205**, 325–342.

Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM and Mayerhofer A (2002) Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR: possible relevance to human fibrotic disorders. *Medical Sciences* **99**, 15072-15077.

Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M (2008) Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 478-86.

Geraldino RS, Ferreira AJ, Lima MA, Cabrine-Santos M, Lages-Silva E, Ramirez LE (2006) Interstitial cells of Cajal in patients with chagasic megacolon originating from a region of old endemicity. *Pathophysiology* **13**, 71–74.

Gockel I, Bohl JRE, Eckardt VF and Junginger T (2008) Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. *Am J Gastroenterol* **103**, 856–864.

Gomes-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, DE Rijn MV, West RB, Sarr MG, Kendrick ML, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T and Farrugia G (2009) ANO 1 is a selective marker of interstitial cells of cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, 1370-1.

Ghildyal N, McNeil HP, Stechschulte S, Austen KF, Silberstein D, Gurish MF, Somerville LL, Stevens RL (1992) IL-10 induces transcription of the gene for mouse mast cell protease-1, a serine protease preferentially expressed in mucosal mast cells of *Trichinella spiralis*-infected mice. *J Immunol* **6**, 2123-9.

Goyal RK and Chaudhury (2010) A mounting evidence against the role of icc in neurotransmission to smooth muscle in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, 10-13.

Gunn M (1968) Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *J Anat* **102**, 223-239.

Gfroerer S, Metzger R, Fiegel H, Ramachandran P, Rolle U (2010) differential changes in intrinsic innervation and interstitial cells of Cajal in small bowel atresia in newborns. *World J Gastroenterol* **45**, 5716-21.

Hagger R, Finlayson C, Kahn F, De Oliveira R, Chimelli L, Kumar D (2000) A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. *J Auton Nerv Syst* **12**, 108-11.

Hamilton MJ, Sinnamon MJ, Lyng GD, Glickman JN, Wang X, Xing W, Krilis SA, Blumberg RS, Adachi R, Lee DM, Stevens RL (2011) Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis *Proc Natl Acad Sci* ,**1** 290-5.

Hansen MB (2003) The enteric nervous system: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* **92**, 105-113.

Heutink KM, Berge IJM, Hack CE, Hamann J and Rowshani AT (2010) Serine proteases of the human immune in health and disease. *Mol Immunol* **47**, 1943-1955.

Hoyle CH, Burnstock G (1989) Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat* **166**, 7-22.

Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Milkkelsen HB, Bernstein A (1995) W/Kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* **26**, 347-9.

Huizinga JD, Zarate N and Farrugia G (2009) Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology* **20**, 1-9.

Hwang SJ, Blair PJ, Britton FC, O'driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, Rock JR, Harfe BD, Sanders KM, Ward SM (2009) Expression of anoctamin 1/tmem16a by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol* **587**, 4887-904.

Iantorno G, Bassotti G, Kogan Z, Lumi CM, Cabanne AM, Fisogni S, Varrica LM, Bilder CR, Munoz JP, Liserre B, Morelli A, Villanacci V (2007) The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. *Am J Surg Pathol* **31**, 460-8.

Iino S, Ward SM and Sanders KM (2004) Interstitial cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine. *J Physiol* **556.2**, 521-530.

Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y, Ward SM, Sanders KM (2009). Interstitial cells of Cajal contain signalling molecules for transduction of nitrergic stimulation in guinea pig caecum. *Neurogastroenterol Motil* **5**, 542-50.

Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB (1989) Detection of mct and mctc types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* **37**, 1509–15.

Jacob C, Yang PC, Darmoul D, Amadesi S, Saito T, Cottrell GS, Coelho AM, Singh P, Grady EF, Perdue M, Bunnett NW (2005) Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem* **280**, 31936-48.

Jessen H and Thuneberg L (1991) Intertitial cells of Cajal and auerbach's plexus. A scanning electron microscopical study of guinea-pig samall intestine. *J Submicrosc Cytol Pathol* **23**, 195-212.

Lakhan S and Kirchgessner A (2010) Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *J of Neuroinflammation* **7**, 1-12.

Kim JA, Choi SC, Yun KJ, Kim DK, Han MK, Seo GS, Yeom JJ, Kim TH, Nah YH, Lee YM (2003) Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis *Inflamm Bowel Dis* **4**, 224-9.

Koberle F (1961) Patologia e anatomia patologica de la enfermedad de Chagas. *Boletin de la oficina Sanitaria Panamericana*.

Köberle F (1963) Enteromegaly and cardiomegaly in Chagas disease. *Gut* **4**, 399-405.

Koberle, F (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of american trypanosomiasis. *Adv Parasitol* **6**, 63-116.

Koberle, F (1970) The causation and importance of nervous lesions in american trypanosomiasis. *Bull World Health Organ* **42**, 739-743.

Komuro T (2006) Structure and organizations of interticial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol* **576.3**, 653-658.

Koh SD, Sanders KM, Ward SM (1998) Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *J Physiol* **513**, 203-13.

Kropt SP (2005) Science, health and development: Chagas disease in Brazil, 1943-1962. *Parassitologia* **47**, 379-86.

Kunze WA, Furness JB (1999) The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* **61**, 117-142.

- Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP (2008) Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* **123**, 98-110.
- Lima Pereira FE, (1972) Estudo quantitativo dos mastócitos na musculatura do esôfago de chagásicos crônicos. *Rev Inst Med Trop* **14**, 30-32.
- Lin Z, Sarosiek I, Forster J, Damjanov I, Hou Q and McCallum R, W (2009) Association of the status of interstitial cells of Cajal and electrogastrogram parameters, gastric emptying and symptoms in patients with gastroparesis. *Neurogastroenterol Motil* **36**, 1-7.
- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K and Nishikawa Shin-Ichi (1992) Requirement of *c-kit* for development of intestinal pacemaker system. *The Company of Biologists Limited* **116**, 369-375.
- Maifrino LBM, Prates JC, De-souza RR, Liberti EA (1997) Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric plexus of the wild mouse *Calomys callosus*. *Bras J Med Biol Research* **30**, 627-632.
- Mark G, Buckley AR, Mceuen and Andrew FW (1999) The detection of mast cell subpopulations in formalin-fixed human tissues using a new monoclonal antibody specific for chymase. *J Pathol* **189**, 138-143.
- Matsuyoshi H, Nakagawa T, Zhang GX, Obata K, Misawa H, Kawahara I, Takaki M (2010) Changes in contractile and electrical activity in the ileum of dss-induced colitis model w/wv mutant mice. *J Smooth Muscle Res* **46**, 143-56.
- Mazzone A, Farrugia G (2007) Evolving concepts in the cellular control of gastrointestinal motility: neurogastroenterology and enteric sciences. *Gastroenterol Clin N Am* **36**, 499-513.
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori Y (1997) Mast cells. *Physiological Reviews* **77**, 1033-79.
- McNeil HP, Shin K, Campbell IK, Wicks IP, Adachi R, Lee DM, Stevens RL (2008) The mouse mast cell-restricted tetramer-forming tryptases mouse mast cell protease 6 and mouse mast cell protease 7 are critical mediators in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **58**, 2338-46.
- Midrio P, Alaggio R, Strojna A, Gamba P, Giacomelli L, Pizzi S, Faussone-Pellegrini MS (2010) Reduction of interstitial cells of Cajal in esophageal atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **5**, 610-7.
- Mikkelsen HB (2010) Interstitial cells of Cajal, macrophages and mast cells in the gut musculature: morphology, distribution, spatial and possible functional interactions. *J Cell Mol Med* **14**, 818-32.
- Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H (2010) Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World J Gastroenterol* **14**, 3239-48.

Nascimento RD, De Souza Lisboa A, Fujiwara RT, De Freitas MA, Adad SJ, Oliveira RC, D'Ávila Reis D, Da Silveira AB. Characterization of enteroglial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. *Hum Pathol* (EPUB AHEAD OF PRINT).

Qiu Z, Yu L, Xu S, Liu B, Zhao T, Lü H, Qiu Z (2011) Cough reflex sensitivity and airway inflammation in patients with chronic cough due to non-acid gastro-oesophageal reflux *Respirology* **4**, 645-52.

Van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans JP (2007) The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* **133**, 91-103.

Villanacci V, Annese V, Cuttitta A, Fisogni S, Scaramuzzi G, De Santo E, Corazzi N, Bassotti G (2010) An immunohistochemical study of the myenteric plexus in idiopathic achalasia. *J Clin Gastroenterol* **44**, 407-10.

Oliveira RB, Troncon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG (1998) gastrointestinal manifestations of chagas' disease. *Am J Gastroenterol* **93**, 884-9.

Okayama Y and Kawakami T (2006) Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* **34**, 97-115.

Payne V and Kam PCA (2004) Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* **59**, 695–703.

Pereira PF, Gonçalves RP (1958) Megaesôfago: hipertrofia ou hiperplasia? *Rev Goiana Med* **47**, 27-28.

Pejler G, Rönnerberg E, Waern I and Wernersson S (2010) Mast cell proteases multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* **115**, 4981-90.

Pinheiro SW, Rua AMO, Etchebehere RM, Cançado CG, Chica JEL, Lopes ER Adad SJ (2003) Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. *Rev Soc Brasil de Med Trop* **36**, 461-466.

Pinheiro SW, Micheletti AM, Crema VO, De Castro Côbo E, Da Silva, AC, Adad SJ (2008) The Different Concentrations of mast cells in the musculature of the esophagus and the colon. *Hum Pathol* **39**, 1256-64.

Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues V Jr (2008) Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol* **8**, 484-9.

Rezende JM, Lauer KM (1960) aspectos clínicos e radiológicos da aperistálsis do esôfago. *Rev Bras Gastroenterol* **12**, 274-262.

Resende MM, Mill JG (2002) Alternate angiotensin II-forming pathways and their importance in physiological or physiopathological conditions. *Arq Bras Cardiol* **78**, 425-38.

Rennick D, Hunte B, Holland G and Thompson-Snipes L (2011) Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood* **85**, 57-65.

Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues V Jr (2008) Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol* **69**, 484-9.

Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ (1996) Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* **271**, 818-22.

Rolle U, Piotrowska AP, Nemeth L, Puri P (2002) Altered distribution of interstitial cells of Cajal in hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med* **126**, 928-33.

Sand E, Themner-Persson A, Ekblad E (2009) Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture. *Neuropharmacology* **56**, 522-30.

Sanders KM, Ördög T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM (1999) development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* **11**, 11-38.

Sanders KM (2000) Postjunctional electrical mechanisms of enteric neurotransmission. *Gut* **47**, 23-5.

Sanders KM, Ördög T, Koh SD, Ward SM. A novel pacemaker (2000) mechanism drives gastrointestinal rhythmicity. *News Physiol Sci* **15**, 291-298.

Sanders KM and Ward SM (2006) Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* **576**, 721-6.

Shafi A, Ahmed I, Sibai OE, Shafi AA (2005) Interstitial cells of Cajal in reflux esophagitis: role in the pathogenesis of the disease. *Med Sci Monit* **12**, 452-456.

Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, Adachi R, Gurish MF, Gobeze R, Stevens RL, Lee DM (2009) Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase heparin complexes *J Immunol*. **1**, 647-56.

Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO (2004) Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* **9**, 5283-91.

Stoyanova II, Gulubova MV (2002) Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* **104**, 185-192.

Takaki M (2003) Gut pacemaker cells: the interstitial cells of cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* **39**,137-61.

Tafari WL, Maria TA, Lopes ER (1971) Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study. *Rev Inst Med Trp Sao Paulo* **13**, 76-91.

Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D (2001) Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec* **1**, 71-78.

Torihashi S, Ward SM, Sanders KM (1997) Development of c-kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology* **112**, 144-55.

Torihashi S, Horisawa M, Watanabe YJ (1999a) C-kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *Auton Nerv Syst* **75**, 38-50.

Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, Nishi T, Ward S, Sanders KM (1999b) Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* **117**, 140-8.

Tong WD, Liu BH, Zhang LY, Zhang SB, Lei Y (2004) Decreased interstitial cells of Cajal in the sigmoid colon of patients with slow transit constipation. *Int J Colorectal Dis* **19**, 467-473.

Wang XY, Sanders KM, Ward SM (1999) Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* **295**, 247-56.

Wang XY, Zarate N, Soderholm JD, Bourgeois JM, Liu LW, Huizinga JD (2007) Ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal and communication with mast cells in crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 349-64.

Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM (1994) Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol (lond)* **480**, 91-7.

Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY, Sanders KM (1998) Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* **115**, 314-29.

Ward SM (2000) Interstitial cells of cajal in enteric neurotransmission. *Gut* (SUPPL IV) **47**, IV40-IV43

Ward SM, Morris G, Reese L (1998) Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* **115**, 1-17.

Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoiyi M, Sanders KM (2000b) Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* **20**, 1393-403.

Ward SM and Sanders KM (2001) Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: From bench to bedside I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, 602-611.

Watanabe Y, Ando H, Seo T, Katsuno S, Marui Y, Ono Y and Torihashi S (2002) Attenuated nitrergic inhibitory neurotransmission to interstitial cells of Cajal in the lower esophageal sphincter with esophageal achalasia in children. *Pediatr Int* **44**, 145-8.

Welle M (1997) Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* **3**, 233-45.

Wood JD (2007) Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* **7**, 1313-1332.

Woodman L, Siddiqui S, Cruse G, Sutcliffe A, Saunders R, Kaur D, Bradding P, Brightling C (2008) Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-beta 1. *J Immunol* **7**, 5001-7.

Ye J, Zhu Y, Khan WI, Van Snick J, Huizinga JD (2006) IL-9 enhances growth of ICC, maintains network structure and strengthens rhythmicity of contraction in culture. *J Cell Mol Med* **3**, 687-94.

Yong LC (1997) The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Exp Toxicol Pathol* **49**, 409-24.

Yu S, Li Q, Cavanaugh S, Udem Bj, Ouyang A (2009) Characterization of mast cell subtypes, distribution, and antigen-induced activation in the guinea pig esophagus. *Dis Esophagus* **22**, 600-5.

Zarate N, Wang XY, Tougas G, Anvari M, Birch D, Mearin F, Malagelada JR, Huizinga JD (2006) Intramuscular interstitial cells of Cajal associated with mast cells survive nitrergic nerves in achalasia. *Neurogastroenterol Motil*, **18** 556-68.

Zhang Y, Carmichael SA, Wang XY, Huizinga JD, Paterson WG (2010) Neurotransmission in lower esophageal sphincter of W/W^v mutant mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, 14-24.

Zhu MH, Kim TW, Ro S, Yan W, Ward SM, Koh SD and Sanders KM (2009) A Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol* **587.20**, 4905-4918.

Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN (1990) Stem cell factor is encoded at the sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* **63**, 213-24.

9. ANEXOS

Anexo 1- Aprovação do comitê de ética em pesquisa – COEP



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

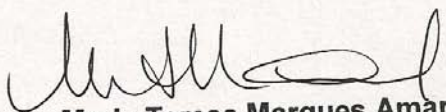
Parecer nº. ETIC 0313.0.203.000-10

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 aprovou, no dia 24 de setembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o 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"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG