

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA GERAL

**PRESERVAÇÃO SELETIVA DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS  
NITRÉRGICOS EM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL CRÔNICA  
PELO *Trypanosoma cruzi* (MEGACÓLON)**

Mayra Fernanda Ricci

BELO HORIZONTE

2016

MAYRA FERNANDA RICCI

**PRESERVAÇÃO SELETIVA DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS  
NITRÉRGICOS EM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL CRÔNICA  
PELO *Trypanosoma cruzi* (MEGACÓLON)**

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

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

**Co-orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Camila Megale de Almeida-Leite

Belo Horizonte/MG

2016



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre caminhar comigo e a Nossa Senhora por interceder em todas as escolhas da minha vida.

Agradeço à minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Esteves Arantes por desde o início confiar e acreditar no meu potencial. Por sempre me escutar e me aconselhar da melhor maneira possível, este trabalho é fruto da dedicação que sempre teve comigo.

Aos meus pais José e Maria, que não importa a decisão tomada estão caminhando ao meu lado, meu irmão Anderson, exemplo de pai e amigo e minha irmã Luciene, minha confidente em todos os momentos. À minha família que apesar da distância sempre se fizeram presentes com simples gestos e com muito amor. E ao Lipe, meu amado afilhado, que me alegrou muito nesses últimos meses.

Ao Ju, meu companheiro, que em todas as situações me acalentou, aconselhou e me mostrou que as coisas sempre podem ter outra perspectiva. Com você compartilho esta vitória.

Aos professores e colegas do Departamento de Patologia Geral, principalmente do LPL que sempre ajudaram.

Aos amigos do NIPE, todos os que passaram desde quando entrei no laboratório foram responsáveis pelo meu crescimento, guardo cada pessoa no meu coração, e apesar dos caminhos opostos que a vida nos leva, sempre me lembrarei de agradecer por todos que com certeza me tornaram uma pessoa melhor.

À CAPES e às agências financiadoras CNPq e FAPEMIG, pela infra-estrutura do NIPE e pela bolsa de mestrado.

E a todos que me ajudaram de alguma maneira - Muito obrigada!

## RESUMO

A doença de Chagas é uma das doenças tropicais mais importantes e negligenciada na América Latina, considerada endêmica, pois apresenta infectividade estimada em 5,7 milhões de pessoas em 21 países. Os custos globais anuais com assistência à saúde são da ordem de 627 milhões de dólares devido às incapacidades relacionadas à alta morbidade da doença. A doença progride cronicamente com alterações no sistema nervoso entérico que têm sido associadas ao desenvolvimento do megaesôfago e/ou megacólon. O papel do óxido nítrico derivado de neurônios nas desordens inflamatórias intestinais têm sido investigado, no entanto não existem estudos realizados em modelos com camundongos na doença de Chagas crônica. Esse trabalho teve como objetivo estudar o impacto da inflamação e desnervação induzida pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Utilizamos marcadores funcionais e estruturais tais como expressão de PGP 9.5 (produto gênico da proteína 9.5) e nNOS (sintase de óxido nítrico neuronal) e Sub P rec (receptor de substância P), ChAT (colina acetiltransferase) e VIP (polipeptídeo intestinal vasoativo) em neurônios do plexo mioentérico nas fases aguda e crônica da doença experimental. Para isso, secções consecutivas do cólon de camundongos não-infectados e infectados nas fases aguda e crônica foram marcados por PGP 9.5 e nNOS por imuno-histoquímica (IHQ) e avaliados quanto à morfologia por microscopia de luz. A documentação fotográfica das lâminas foi realizada e as imagens analisadas. Também foi realizado RT-PCR nas amostras congeladas para analisar expressão de VIP, nNOS, ChAT e receptor de Substância P. Os nossos resultados demonstram uma redução no número total de neurônios marcados para PGP 9.5 na fase crônica nos camundongos infectados em relação aos seus controles. A expressão imuno-histoquímica de neurônios nNOS positivos na fase aguda manteve-se inalterada, enquanto, na fase crônica, os neurônios inibitórios nitrérgicos apareceram em maior número. A expressão da proteína nNOS por RT-PCR mantém-se constante nos grupos em ambas as fases. Para o marcador de neurônios excitatórios (Substância P), a expressão por RT-PCR foi significativamente diminuída na fase crônica em relação ao controle de fase aguda. Apesar da necessidade de análises adicionais, nossos dados sugerem uma diminuição de neurônios excitatórios, enquanto os neurônios nitrérgicos parecem preservados, o que contribui para o entendimento das alterações funcionais que caracterizam o megacólon chagásico.

## ABSTRACT

Chagas disease is the important neglected tropical disease and in Latin America, considered endemic, it presents infectivity estimated 5.7 million people in 21 countries. The overall annual cost of health care is of the order of 627 million dollars due to disabilities related to high morbidity. The disease progresses chronically with changes in the enteric nervous system which have been associated with the development of esophageal achalasia and /or megacolon. The role of nitric oxide derived from intestinal inflammatory disorders in neurons has been investigated, but there are no studies in mice in models with chronic Chagas' disease. This work aimed to study the impact of inflammation and denervation induced by Y strain of *Trypanosoma cruzi* in mice. We use functional and structural markers such as PGP expression 9.5 (gene protein product 9.5) and nNOS (synthase neuronal nitric oxide) and Sub P rec (substance P receptor), ChAT (choline acetyltransferase) and VIP (vasoactive intestinal polypeptide) in neurons of the myenteric plexus in the acute and chronic phases of the experimental disease. For this purpose, consecutive sections of colon uninfected and infected mice in the acute and chronic phases were marked by PGP 9.5 and nNOS by immunohistochemistry (IHC) and assessed for morphology by light microscopy. Photographic documentation of slides was performed and the images analyzed. It was also performed RT-PCR on frozen samples to analyze expression of VIP, nNOS, ChAT and Substance P receptor. Our results demonstrate a reduction in the total number of neurons marked for PGP 9.5 in the chronic phase in infected mice compared to the controls. The immunohistochemically expressed nNOS positive neurons in the acute phase remained unchanged, while in the chronic phase, the inhibitory nitrenergic neurons appeared increased. The nNOS protein expression by RT-PCR remains constant in groups in both phases. To the marker of excitatory neurons (Substance P), the expression by RT-PCR was significantly decreased in chronic phase with the control. Despite the need for additional analysis, our data suggest a reduction of excitatory neurons, while nitrenergic neurons seem preserved, which contributes to the understanding of functional changes that characterize the megacolon.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Anticorpos utilizados	página 31
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para RT-PCR no cólon dos camundongos controles e infectados	página 36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução natural da doença de Chagas	página 19
Figura 2. Rolo do intestino grosso (cólon)	página 30
Figura 3. Delimitação da área imunomarcada dos gânglios (área total/ $\mu\text{m}$ ) para medida automática	página 33
Figura 4. Cortes consecutivos corados por PGP 9.5 e nNOS	página 34
Figura 5. Aspectos histopatológicos do cólon	página 38
Figura 6. Expressão de PGP 9.5 nos plexos mioentéricos dos Camundongos	página 39
Figura 7. Quantificação das imunomarcações para PGP 9.5 nos plexos mioentéricos de camundongos	página 40
Figura 8. Expressão de nNOS nos plexo mioentéricos dos Camundongos	página 41
Figura 9. Quantificação das imunomarcações para nNOS nos plexos mioentéricos de camundongos	página 42
Figura 10. Expressão de receptores excitatórios e inibitórios de neurônios saudáveis e neurônios aguda e cronicamente infectados por <i>T. cruzi</i>	página 43



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CETEA</b>	Comitê de ética em experimentação animal
<b>CFA</b>	Controle de fase aguda
<b>CFC</b>	Controle de fase crônica
<b>ChAT</b>	Colina acetiltransferase
<b>CLT</b>	Constipação de trânsito lento
<b>cNOS</b>	Sintase de óxido nítrico constitutiva
<b>d.a.i</b>	Dia após a infecção
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DNTP</b>	Deoxinucleotídeo trifosfato
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>eNOS</b>	Sintase de óxido nítrico endotelial
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>GMP cíclico</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>ICCs</b>	Células intersticiais de Cajal
<b>IFA</b>	Infectado de fase aguda
<b>IFC</b>	Infectado de fase crônica
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IPANs</b>	Neurônios aferentes primários intrínsecos
<b>i.p.</b>	Intra peritonal
<b>iNOS</b>	Sintase de óxido nítrico induzida
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>m.a.i.</b>	Meses após a infecção
<b>NANC</b>	Não adrenérgico e não colinérgico
<b>NK1R</b>	Receptor de taquicina 1

<b>NK2R</b>	Receptor de taquicinina 2
<b>NK3R</b>	Receptor de taquicinina 3
<b>nNOS</b>	Sintase de óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintase de óxido nítrico
<b>P</b>	Valor de probabilidade
<b>PACAP</b>	Peptídeo ativador de adenilciclase pituitária
<b>PC12</b>	Linhagem derivada de feocromocitoma da supra renal de ratos
<b>PBS</b>	Solução salina de fosfato tampão
<b>PDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do parasito
<b>PGP 9.5</b>	Produto proteico do gene 9.5
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNE</b>	Sistema nervoso entérico
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>SP</b>	Substância P
<b>Sub P rec</b>	Receptor de substância P
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TrKA</b>	Tirosina quinase A
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UFOP</b>	Universidade Federal de ouro Preto
<b>VaChT</b>	Transportador vesicular de acetilcolina
<b>VIP</b>	Polipeptídeo intestinal vasoativo
<b>Kg</b>	Quilogramas
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MG</b>	Miligramas
<b>G</b>	Gravitacional
<b>°C</b>	Graus Celsius

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	3
RESUMO ABSTRACT.....	4
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	9
SUMÁRIO.....	11
1.INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Sistema nervoso entérico .....	15
1.2 Óxido nítrico.....	20
1.3 Substância P.....	23
1.4 Polipeptídeo Intestinal Vasoativo .....	24
1.5 Colina acetiltransferase.....	25
2.OBJETIVO GERAL.....	28
2.1. Objetivos específicos.....	28
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Histórico dos blocos selecionados .....	29
3.2 Infecção com <i>T. cruzi</i> .....	29
3.3 Coleta e preparo do tecido .....	30
3.4 Coloração por HE .....	30
3.5 Imuno-histoquímica.....	31
3.6 Documentação fotográfica.....	33
3.7 Análise morfométrica .....	33
3.8 Expressão de PGP 9.5 e nNOS nos plexos mioentéricos .....	34
3.9 Extração de RNA.....	35
3.10 Síntese de cDNA .....	35
3.11 RT-PCR .....	36
3.12 Análise estatística .....	37
4.RESULTADOS .....	37
4.1 Aspectos histopatológicos do cólon dos camundongos do grupo controle e infectado .....	38
4.2 Expressão do PGP 9.5 em neurônios do plexo mioentérico.....	39
4.3 Expressão de nNOS em neurônios do plexo mioentérico .....	41

4.4 Expressão de neurotransmissores excitatórios e inibitórios do cólon dos camundongos do grupo controle e infectado .....	43
5.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	44
6.REFERÊNCIAS .....	48
ANEXO I.....	59

## 1.INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é a doença tropical mais importante e negligenciada na América Latina. Apresenta infectividade estimada em 5,7 milhões de pessoas distribuídas em 21 países. Esta parasitose é uma das 10 doenças tropicais prioritárias para controle e eliminação de acordo com a Declaração de Londres de 2020 (PETERSON et al., 2015). Os custos globais anuais com assistência à saúde são da ordem de 627 milhões de dólares devido às incapacidades geradas pela alta morbidade da doença, que está diretamente relacionada com o estabelecimento das formas crônicas que só podem ser evitadas eficientemente se tratadas na fase aguda (PETERSON et al., 2015).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado da família *Trypanosomatidae*, com dois estágios de desenvolvimento: extracelular, com as formas tripomastigotas na corrente sanguínea e intracelular, com as formas amastigotas no tecido do hospedeiro. As formas no vetor triatomíneo são extracelulares, sendo as formas epimastigotas que se desenvolvem no intestino médio e as formas tripomastigotas metacíclicas, forma infectante, na porção final do intestino do inseto (SOUZA et al., 2000). O *T. cruzi* invade músculo liso e estriado, fibroblastos e macrófagos de mamíferos. Há algumas evidências de que neurônios sejam raramente parasitados embora poucos investimentos tenham sido feitos para conhecer os potenciais mecanismos de tropismo ou de resistência neuronal à infecção (TANOWITZ et al., 1982).

A infecção humana é adquirida através do contato com as formas tripomastigotas do parasito contidas nas fezes do vetor que penetram a lesão de pele deixada pelo triatomíneo após o repasto sanguíneo ganhando acesso sistêmico (MONTGOMERY et al., 2014). Uma vez dentro das células hospedeiras, as formas tripomastigotas contidas do vacúolo parasitóforo vão subseqüentemente escapar, se diferenciar em amastigotas e replicar no citosol. Depois de nove ciclos de divisão binária, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigostas com alta motilidade sendo liberadas através da lise da célula hospedeira (DVORAK; HYDE, 1973). O

mecanismo pelo qual o *T. cruzi* rompe o vacúolo parasitóforo e escapa do citosol, envolve uma hemolisina ativada no ambiente ácido lisossomal (ANDREWS; WHITLOW, 1989; ANDREWS et al., 1990; LEY et al., 1990).

O ciclo está completo quando um triatomíneo se alimenta do sangue do hospedeiro infectado (ROSSI et al., 2003). A doença também pode ser transmitida através de mecanismos não vetoriais, tais como, transfusão de sangue ou verticalmente de mãe para filho e casos de transmissão oral direta também têm sido documentados (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

O processo de amplificação do parasito é responsável pela fase aguda da infecção, caracterizado pela alta parasitemia no sangue e parasitismo tecidual. Os sintomas da fase aguda são geralmente leves, mas pacientes imunossuprimidos e crianças podem desenvolver uma forma mais grave da infecção, com comprometimento cardíaco e encefalomielite. Após a fase aguda, a parasitemia cai drasticamente e o parasitismo tecidual também, mas níveis baixos e algum grau de inflamação ainda são detectados em determinados tecidos por toda a vida do hospedeiro (PITTELLA, 1991).

Após 10 a 30 anos de infecção a maioria dos pacientes podem continuar sem sintomas, na fase indeterminada da doença, ou podem desenvolver alterações patológicas no funcionamento do coração (forma cardíaca) e apresentar manifestações gastrointestinais, que caracterizam a forma digestiva da doença (ROMANA, 1956; KOBERLE, 1968; ALTCHER, 2010), como megaesôfago e megacólon. O envolvimento do sistema cardíaco e digestivo pode variar de leve a grave, dependendo da extensão do dano tecidual, e estes sintomas geralmente determinam a morbidade da doença (PRATA, 2001).

De acordo com Koberle (1968), a doença de Chagas crônica na sua forma cardíaca seria causada pela destruição dos gânglios autonômicos intramurais provocando despovoamento neuronal marcante no coração. Este fenômeno é conhecido como a Teoria Neurogênica Para a Patogênese da Cardiomiopatia Chagásica, a qual postula que o sistema parassimpático desregulado permite hiperatividade simpática sem oposição (KOBERLE, 1968). No entanto essa teoria não foi testada para a doença gastrointestinal e, mesmo para a DC cardíaca esta teoria esbarra em muitos obstáculos

conceituais e experimentais que incluem a sutileza da desnervação, a variabilidade da intensidade da desnervação cardíaca, a ausência de correlação entre a desnervação simpática e a extensão da disfunção do miocárdio.

### **1.1. Sistema nervoso entérico**

O sistema nervoso entérico (SNE) é composto por um componente extrínseco e um intrínseco. O componente extrínseco consiste em uma divisão parassimpática e simpática e o componente intrínseco contém cerca de 500 milhões de neurônios incorporados na parede do intestino (ALTAF; SOOD, 2008). O SNE apresenta na sua formação três tipos de neurônios. Os neurônios sensoriais que são neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs), os interneurônios e os neurônios motores (BORNSTEIN et al., 2004). Estes últimos são ainda subdivididos em neurônios motores excitatórios e inibitórios com base em suas funções de regulação (BORNSTEIN et al., 2004). Neurônios motores excitatórios produzem acetilcolina (ACh), substância P (SP) e glutamato. Os neurônios motores inibitórios produzem óxido nítrico (NO), adenosina trifosfato (ATP) e o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (DONG et al., 2015).

Inúmeros estudos caracterizaram mecanismos fundamentais no cólon de cobaias, ratos e coelhos, mostrando que as contrações subjacentes (peristaltismo), ou outros padrões motores de propulsão e propagação, requerem atividades no sistema nervoso entérico (CREMA et al., 1970; COSTA; FURNESS, 1976; D'ANTONA et al., 2001; LENTLE et al., 2008; HENNIG et al., 2010; DINNING et al., 2012). Durante a última década, o campo da pesquisa do peristaltismo gastrointestinal tem sido dominado pela Lei do intestino, descrita pela primeira vez por Bayliss e Starling (BAYLISS; STARLING, 1901), também denominado peristáltica ou reflexo mioentérico (COSTA; FURNESS, 1976)(CANNON, 1912).

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

A atividade dos vários neurônios mioentéricos aumenta ou diminui de maneira coordenada durante a peristalse, um reflexo propagado que é superimposto na fase

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

Os ritmos elétricos básicos no intestino são bem constantes e caracterizados por ondas lentas. No entanto, células musculares lisas não têm o mesmo mecanismo iônico necessário para regenerar essas ondas. O mecanismo preciso que dispara e ajusta o passo das ondas lentas não é conhecido e somente poucos estímulos afetam a frequência e a atividade de pico das ondas lentas, são conhecidos. A busca pela origem de ritmo na contração intestinal tem identificados regiões de marca-passo de ondas lentas, localizadas nas bordas mioentéricas e na submucosa de músculos circulares e contém uma rede de trabalho de células conhecidas como células intersticiais de Cajal (ICCs). Estas células são subpopulações distintas de células tipo musculares. Elas fazem contato entre si e com células musculares e terminais nervosos funcionando como marca-passo em músculos gastrointestinais pela iniciação de atividade elétrica rítmica. As ICCs têm receptores tanto para NO quanto para VIP, transmissor inibitório, como para transmissores excitatórios (HANSEN, 2003).

A contração ascendente é mediada pela ACh e pelas taquicininas, enquanto descendente é governada pelo VIP, NO, peptídeo ativador de adenilciclase pituitária (PACAP), e ATP (GRIDER; MAKHLOUF, 1986; SMITH; MCCARRON, 1998; BORNSTEIN et al., 2004). Além disso, músculos lisos circulares e longitudinais do cólon se movem em conjunto durante este processo, sendo o músculo circular mais determinante para a propagação comparado ao músculo longitudinal (SMITH;



MCCARRON, 1998; SPENCER; SMITH, 2001; SPENCER et al., 2003, 2006). No entanto, o processo fisiológico do peristaltismo do cólon é sem dúvida significativamente mais complexo e não se presta a uma explicação por reflexo único, (CANNON, 1912).

Das crianças com constipação crônica 39 a 58% apresentam trânsito colônico anormal (PAPADOPOULOU et al., 1994; BENNINGA et al., 1995). O atraso mais comum é no nível do reto, sendo considerada uma indicação de megareto pela relutância do movimento intestinal e pela dor antecipada. Neuropatia autonômica e sensorial foi reportada em adultos com constipação de trânsito lento (CTL), e nesses pacientes na maioria das vezes existe uma história positiva de constipação severa (KNOWLES et al., 1999). Estudos examinando a inervação do cólon em crianças com CLT, reportaram uma excessiva produção de óxido nítrico no plexo mioentérico destes pacientes (TOMITA et al., 2002). Tzavella e colaboradores em 1996 mostraram em um estudo com crianças com CLT a redução das fibras de substância P. A fibra de substância P é um neurotransmissor excitatório envolvido na coordenação do peristaltismo. A diminuição de elementos entéricos neuronais (neurônios e/ou neurofilamentos) e ICCs também foram observadas (TZAVELLA et al., 1996).

A dismotilidade resulta de neuropatias entéricas primárias, genéticas e por perda de neurônios motores inibidores (HANSEN, 2003). A desnervação extrínseca do intestino por vagotomia ou simpatectomia não teriam nenhum efeito sobre estes reflexos intrínsecos que regem o peristaltismo (DEBAS; MULVIHILL, 1991). Estudos em ratos e cobaias sugerem que neurônios sensoriais podem reduzir a entrada de microcircuitos entéricos e reduzir a motilidade (WADE; COWEN, 2004), portanto há importância de observar os neurônios que contêm SP e que esteja presente em nervos sensoriais de uma parte da população de neurônios motores excitatórios no músculo (SOUTHWELL et al., 2010). Estas evidências encontradas na literatura fornecem subsídios para nossas perguntas a respeito da participação de neurotransmissores envolvidos com a excitação e/ou inibição motora no modelo do megacólon humano e murino.

Em modelos animais de inflamação intestinal foi demonstrado o desenvolvimento acelerado do trânsito intestinal e da hiperreatividade do músculo liso, que retornou ao estado normal quando a inflamação não estava mais presente

(COLLINS, 1996). Embora isto sugira que o efeito da inflamação sobre os mecanismos de controle da motilidade intestinal é transitório e pode ser satisfeita com reparação adequada ou substituição de componentes celulares, os autores descobriram que alguns aspectos da estrutura intestinal sofrem alterações essencialmente irreversíveis que necessitam de adaptação funcional para a preservação da motilidade intestinal normal (BLENNERHASSETT; LOURENSSEN, 2000).

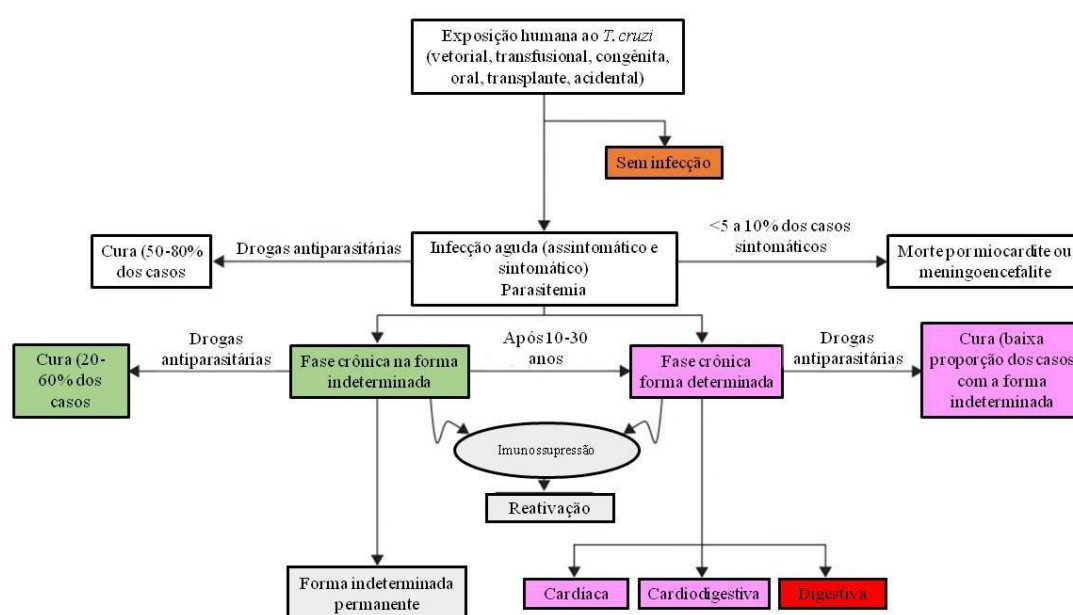
Uma vez que a inervação é um importante fator da manutenção da contratilidade (BLENNERHASSETT; LOURENSSEN, 2000), a inflamação intestinal, causando alterações neuronais intrínsecas e extrínsecas que afetam a musculatura lisa intestinal, pode interferir na motilidade normal. No caso do megacólon tais alterações inflamatórias agudas e crônicas poderiam contribuir para o processo da doença.

Estudos no passado, principalmente publicados por pesquisadores brasileiros, sugerem que os processos inflamatórios no intestino de pacientes humanos apresentando megacólon levariam à lesão neuronal no plexo mioentérico, com conseqüente diminuição do número de neurônios, o que estaria relacionado com alterações da função digestiva descritas em pacientes chagásicos (KÖBERLE, 1968; OLIVEIRA, DE et al., 1998).

De acordo com Köberle, a perda de células ganglionares associada com envelhecimento está também relacionada com o cólon e o esôfago, inclusive como explicação para quadros de constipação intestinal em pessoas idosas. Distúrbios similares de motilidade com dilatações são frequentemente observados em pacientes chagásicos crônicos cujas queixas são de meteorismo, irregularidade no peristaltismo e dificuldade de defecar (KÖBERLE, 1968).

Existem dois antiparasitários disponíveis para o tratamento da DC, benzonidazol e nifurtimox. Estes agentes são mais eficazes na fase aguda da doença, com as taxas de cura parasitológica de 60% para 80% (Figura 1). O tratamento é recomendado para os casos de doença aguda, reativação, transmissão congênita e crianças até a idade de 18 anos com infecção crônica (RASSI et al., 2010b). Estudos experimentais em ratos infectados com *T. cruzi* e tratados na fase aguda com benzonidazol mostraram que o

tratamento reduziu o parasitismo tecidual e os processos inflamatórios em todas as fases da infecção, e o número de reduções significativas variou de acordo com a fase da doença (GRUENDLING et al., 2015). Novas formulações do benzonidazol vêm sendo testadas em modelo murino e mostraram que elas aumentam em 27% a supressão da parasitemia com uma dose baixa de 25mg/dia sugerindo que essas formulações melhoram a biodisponibilidade do fármaco (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014). Nos modelos de cardiomiopatia chagásica o benzonidazol também previne danos cardíacos modulando a ativação endotelial (MOLINA-BERRÍOS et al., 2013).



**Figura 1:** Evolução natural da doença de Chagas. Adaptado de (RASSI et al., 2010a).

Diante das limitações para se estudar em humanos os efeitos da cronicidade da DC no sistema nervoso entérico e os fatores biológicos envolvidos no surgimento e manutenção de formas graves como o megacólon, nosso grupo desenvolveu um modelo experimental murino, que mimetiza o modelo humano (DUZ, 2009; CAMPOS et al., 2016). No intuito de garantir a sobrevivência e a cronificação da DC, nossa estratégia foi utilizar o tratamento parcial de animais infectados com grande carga parasitária na fase aguda da doença. Exploramos assim, de forma pioneira, o uso do benzonidazol em modelos murinos para cronificação da inflamação e obtenção de alterações estruturais semelhantes àsquelas do megacólon humano.

Nosso grupo (ARANTES et al., 2004), observou que a desnervação do trato gastrointestinal (TGI) na fase aguda de infecção em camundongos C57BL/6 é dependente da produção de NO, resultado da ativação de iNOS por IFN- $\gamma$  no foco inflamatório. Macrófagos ativados são responsáveis pela eliminação do *T. cruzi* a partir da produção de NO durante a fase aguda da doença (SILVA et al., 2003).

Entre os mediadores implicados na lesão neuronal aguda (ARANTES et al., 2004; MASAKA et al., 2014) em geral, e na DC (ARANTES et al., 2004) encontra-se o óxido nítrico que pode ser sintetizado por uma família de enzimas chamadas NO sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS de mamíferos: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS), e induzível (iNOS). Sob condições fisiológicas, o dominante da isoforma NOS na vasculatura é eNOS, e a iNOS presente em processos inflamatórios (RAFIKOV et al., 2011).

## 1.2. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso responsável por uma variedade de fenômenos fisiológicos. Ele pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que está e é rapidamente destruído pelo oxigênio (ARCHER, 1993), sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato (KIECHLE; MALINSKI, 1993). O NO apresenta inúmeras e diversificadas funções como: citotoxicidade; vasodilatação (MONCADA et al., 1991); modulação de reações inflamatórias ou anti-inflamatórias dependentes do tipo celular e do estímulo (ADAMS, 1996); mediador da inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano; regulação da pressão sanguínea basal e outros. A atividade do NO foi relatada em cerebelo, miocárdio, rins, mucosa gastrointestinal, endotélio, células epiteliais pulmonares, macrófagos, neutrófilos e nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC) (KIECHLE; MALINSKI, 1993; SHAPIRA et al., 1994; BARRACHINA et al., 2001). O NO também pode ser responsável pela vasodilatação presente na angiogênese fisiológica ou patológica, como no caso de tumores (ZICHE; MORBIDELLI, 2000).

No TGI especificamente, o NO medeia o relaxamento não adrenérgico não colinérgico da musculatura longitudinal e circular do esôfago, estômago, duodeno, intestino delgado e esfíncter anal interno (ADAMS, 1996). Evidências recentes sugerem

que o NO atua como um sinalizador inibitório (NANC) no TGI. O NO é um neurotransmissor primário entérico e inibitório no TGI e os neurônios nitrérgicos regulam o tônus intestinal, fase de contratilidade, amplitude, frequência, e ainda reflexos inibitórios (SANTER, 1994). No músculo liso do TGI, o NO ou seus doadores convocam diferentes repostas, incluindo relaxamento, efeitos contráteis, relaxamento seguido por contrações ou contrações seguidas por relaxamento, tudo dependendo do componente, tecido e a espécie (IZZO et al., 1996; MARTINEZ-CUESTA et al., 1996; TANOVIĆ et al., 2001). O próprio NO ou doadores de NO, por exemplo, nitroprussiato de sódio causam o relaxamento do músculo liso vascular pela acumulação de GMP cíclico ou ativação de canais  $K^+$ . Estudos sugerem que o NO pode diminuir o nível de  $Ca^{2+}$  intracelular ou reduzir elementos contráteis sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , resultando no relaxamento do músculo liso. A ação relaxante do NO vem sendo implicada indiretamente na inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios como ACh e SP (BOLOTINA et al., 1994). Abertura dependente de GMP cíclico, de canais de  $K^+$  sensíveis a apamina ou outros tipos de canais iônicos para produzir hiperpolarização e relaxamento, inibição indireta dos neurotransmissores como ACh e SP (GARCIA-VILLAR et al., 1996), e por fim, mecanismos independentes de GMP cíclico, como ações do NO sobre canais iônicos estão diretamente envolvidos na contratilidade muscular, ou através da hiperpolarização da membrana. A estimulação destes nervos induz hiperpolarização das membranas de músculo liso pós-juncional referidos como inibidores potenciais de junção e relaxamento (ALLESCHER et al., 1993; MOURELLE et al., 1993; SZILVASSY et al., 1996).

Os nervos cuja função depende do NO são chamados de nitrérgicos, e são reconhecidos com o papel de controle do tônus muscular liso e motilidade (ABRAHAMSSON, 1986). O NO é provavelmente o neurotransmissor inibitório do músculo liso longitudinal do jejuno, com ação via mecanismo da adenilciclase (ZYROMSKI et al., 2001). É sugerido que a liberação basal de NO cause padrões oscilatórios nas atividades elétricas e mecânicas. Vários dados mostram a hipótese do NO desempenha um papel fundamental na inibição ou relaxamento não adrenérgico e não colinérgico dos potenciais de junção associado com estimulação do campo elétrico ou agonistas nicotínicos no duodeno, jejuno e íleo de uma variedade de mamíferos, incluindo humanos e ratos (ZYROMSKI et al., 2001; YAMAJI et al., 2002). Van Geldre e colaboradores (2004), mostraram a habilidade dos neurotransmissores

nitrérgicos induzirem o relaxamento gástrico do rato influenciado pelo mecanismo usado para induzir o tônus muscular e o sarcoplasma do retículo endoplasmático através de  $\text{Ca}^{2+}$  e ATPase. (GELDRE, VAN; LEFEBVRE, 2004). Contrações em grande escala migram do cólon de ratos possivelmente mediadas pela liberação neuronal de ACh, parecendo ser parcialmente suprimida pela liberação de NO constitutivo (LI et al., 2002).

No reto de ratos a inervação nitrérgica contribuiu para o tônus do músculo liso (TAKEUCHI et al., 1998). No entanto o NO apresenta um comportamento duplo: em concentrações fisiológicas, liberados através da sintase constitutiva (cNOS) que regula as funções de manutenção e é responsável pela produção de NO, atua como um mediador endógeno modulando a reparação e a integridade dos tecidos e exibindo propriedades gastroprotetoras contra diferentes tipos de agentes agressivos. Em contraste, o seu excesso de produção pela isoenzima induzível (iNOS) exibe uma atividade citotóxica, pois interagindo com a produção de espécies reativas de peroxinitrito e outros compostos, que são muito prejudiciais para os tecidos, iNOS produz NO em condições fisiopatológicas. Elevadas concentrações de NO estão relacionados com vários processos patológicos do TGI incluindo úlcera péptica, gastrite crônica, câncer gastrointestinal, gastroenterite bacteriana, e celíaca ou doenças intestinais inflamatórias crônicas (CHO, 2001).

### **1.3. Substância P**

A substância P (SP) possui diversas atividades biológicas, sendo sintetizada nos ribossomos como proteína e convertida de maneira enzimática em um peptídeo ativo. Ela atua como neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de vertebrados. A SP participa da família das taquicininas onde já está estabelecido seu papel de neurotransmissor nos mamíferos, e sua ação como um neurotransmissor excitatório nos neurônios não colinérgicos e não adrenérgicos e é bem descrita em humano (LLEWELLYN-SMITH et al., 1988). Os receptores de SP apresentam graus diferentes de potenciais na transmissão do sinal, entre eles, o receptor de taquicininina 1 (NK1R) é o agonista natural mais potente, seguido pelos receptores NK2 e NK3. O NK1R é expresso pelos neurônios no sistema nervoso central, periférico e entérico; e

também é expresso por vários tipos de células não neuronais, incluindo células de músculo liso, células endoteliais, células epiteliais, células imunes e outros (GERARD et al., 1991).

A SP promove contração do músculo liso do íleo e como ação neurotransmissora da dor (PERNOW, 1983). As fibras nervosas que contêm SP representam o componente principal do sistema nervoso intestinal e participam na regulação das funções imunes (FELTEN et al., 1985; POPPER et al., 1988; LORTON et al., 1991), agindo através de diferentes células imunitárias e inflamatórias, tais como mastócitos, macrófagos, linfócitos T e B e células do plasma IgA<sup>+</sup> (STEAD et al., 1987; BOST; PASCUAL, 1992; COOK et al., 1994; PASCUAL et al., 1994; KOVSCA JANJATOVIC et al., 2012). No jejuno suíno tem sido demonstrado efeito estimulador de SP tanto através de uma via direta, onde as terminações nervosas liberaram SP e uma via indireta, com SP estimulando neurônios colinérgicos (BROWN et al., 1992; PARSONS et al., 1992). A ativação de células imunes e inflamatórias mediada por SP proporciona a libertação de citocinas durante o curso da inflamação e está associada a doenças diarreicas (KONN; POTHOUKAKIS, 2006).

Estudos sobre a forma digestiva da DC sugeriram que a expressão de SP apresenta correlação direta com a gravidade do megacólon chagásico. Da Silveira e colaboradores (2008), propuseram que a SP e a expressão dos seus receptores pode estar relacionada com a intensidade do processo inflamatório, destruição neuronal, fibrose e dilatação encontrada nos órgãos dos pacientes.

#### **1.4. Polipeptídeo intestinal vasoativo**

O intestino delgado possui uma rede de fibras nervosas que contém polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP). Este neuropeptídeo é também produzido por células linfóides e exerce uma grande variedade de funções imunológicas, incluindo o controle da homeostase do sistema imunitário por sinalização do receptor de ligante de células imunocompetentes, a regulação da produção dos mediadores anti ou pró-inflamatórios, mudança da expressão de moléculas co-estimuladoras da resposta imune e a

estimulação da diferenciação de células B e produção de anticorpos IgA (KIMATA; FUJIMOTO, 1994)(DELGADO et al., 2002).

O efeito anti-inflamatório de VIP é atribuído a sua capacidade de revogar fagocitose e quimiotaxia de macrófagos e para inibir a proliferação e migração de células T (DELGADO et al., 1995). Foi demonstrado que VIP também pode suprimir a libertação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , produção de IL-6 e IL-12, redução da sintase de óxido nítrico (NOS) (DELGADO et al., 1999) e aumentar a produção de citocina anti-inflamatória como a IL-10. O VIP isolado a partir do duodeno de suíno (SAID; MUTT, 1970) implica que este neuropeptídeo é liberado por neurônios que residem à pequena rede intestinal de fibras nervosas, que se estende por todas as camadas da mucosa e submucosa, particularmente dentro das placas de Peyer, de modo semelhante ao descrito em ratos (ROTHKÖTTER et al., 2002).

O SNE humano é importante para manter a barreira intestinal, sua função e homeostase, e podem estar envolvidos na proteção do organismo a agentes nocivos. Em modelos de co-cultura de neurônios da submucosa de humanos observou-se a regulação da proliferação de células epiteliais do intestino e permeabilidade paracelular através da modulação de proteínas associadas à junção adesiva mediada em parte através de neurônios VIPérgicos (TOUMI et al., 2003; NEUNLIST et al., 2003). Estes dados sugeriram que o aumento da expressão VIP na doença de Crohn e outros modelos de infecção pode ser interpretado como um mecanismo protetor contra danos inflamatórios (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004).

Jabari e colaboradores (2014), estudando a diferença nas proporções de neurônios VIP no plexo mioentérico e submucoso na DC crônica, mostraram que neurônios VIP (/nNOS) que podem co-localizar, são a minoria no plexo mioentérico saudável (JABARI et al., 2014). Em contraste, neurônios VIP (/calretinina) que também co-localizam no plexo submucoso, são a maioria na submucosa que sobrevive e são considerados saudáveis (JABARI et al., 2014). Os neurônios mioentéricos VIP podem contribuir para o desenvolvimento do megacólon, enquanto que neurônios VIP da submucosa podem permitir que os pacientes sobrevivam ao manter a barreira epitelial. Uma razão para a sobrevivência destes neurônios podem ser o próprio VIP, pois já está bem estabelecido que ele é um peptídeo neuroprotetor e pode desempenhar um papel-



chave na doença de Chagas. (EKBLAD; BAUER, 2004; BRENNEMAN, 2007; ARRANZ et al., 2008; BEN-HORIN; CHOWERS, 2008; JABARI et al., 2014).

Jabari e colaboradores (2014), também sugerem que durante a formação do megacólon na doença de Chagas crônica, a morte neuronal apenas, não explica completamente a perda de motilidade e a subsequente mudança do calibre. Outras células e tecidos, como células intersticiais de Cajal e células do músculo liso, podem também estar danificadas (JABARI et al., 2014).

### 1.5. Colina Acetiltransferase

A acetilcolina medeia a neurotransmissão no SNC e SNP. É essencial em diversas funções, mas em específico no SNP tem função importante na rapidez da neurotransmissão sináptica excitatória (GALLIGAN et al., 2000).

No SNE os neurônios mioentéricos colinérgicos são imunorreativos para a colina acetiltransferase (ChAT) e incluem neurônios aferentes primários e neurônios motores excitatórios em estudo realizado em cobaias (FURNESS, 2006).

A ChAT sintetiza ACh a partir de colina e acetil-CoA. Os genes que codificam para ChAT e VAcHT (transportador vesicular de acetilcolina) são co-localizados no mesmo locus "colinérgico", onde gene VAcHT é agrupado dentro do primeiro intron do gene da ChAT (EIDEN, 1998; GOIS, DE et al., 2000).

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

### Justificativa

A patogênese da Doença de Chagas crônica na forma intestinal e o desenvolvimento do megacólon são de grande importância; não só devido ao alto grau

de morbidade e incapacidade que a doença gera, mas também porque o entendimento dos mecanismos dos processos neurodegenerativos envolvidos na desnervação entérica e suas consequências necessitam de maiores estudos.

Acredita-se que as lesões do sistema nervoso também levariam ao desenvolvimento do megaesôfago e megacólon chagásico. Embora o envolvimento do sistema nervoso na doença esteja estabelecido, bem como alguns estudos da destruição neuronal no intestino os mecanismos e história natural das lesões no SNE permanecem obscuros. O mecanismo indutor de lesão dos elementos do sistema nervoso entérico durante a tripanossomíase ainda não estão esclarecidos, a despeito de vários trabalhos mais recentes em humanos, descritivos de elementos isolados, mas que não propõem um mecanismo de lesão compatível com a história natural da doença.

No entanto, os estudos humanos apresentam muitas limitações no que concerne a proposição de um mecanismo para as alterações morfofuncionais que caracterizam o megacólon. Compreender este mecanismo e conhecer a história natural das lesões crônicas intestinais pode oferecer melhor compreensão da fisiopatologia e potencial base racional para uma abordagem terapêutica.

De acordo com a problemática abordada, nossa hipótese é de que a alteração do balanço entre neurônios inibitórios e excitatórios do plexo mioentérico resultante do processo inflamatório afetaria de forma diferenciada os subtipos de neurônios envolvidos no desenvolvimento do megacólon chagásico. Dessa forma poderíamos sugerir um papel para a neurotransmissão inibitória e excitatória na gênese dos distúrbios de motilidade e alterações estruturais do megacólon chagásico reproduzido em modelo murino.

## **2.OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel dos tipos neuronais presentes no plexo mioentérico a partir de um modelo de infecção experimental crônica pelo *trypanosoma cruzi* (megacólon).

### **2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar neurônios do plexo mioentérico através de análise histológica por microscopia de luz seguida de morfometria;

Analisar os neurônios do plexo mioentérico através da marcação genérica para PGP 9.5 e nNOS pelo método de imuno-histoquímica, avaliando a frequência destas células por microscopia de luz e morfometria;

Realizar Real Time PCR (quantitativo) para avaliar expressão de VIP, nNOS, ChAT e receptor de substância P no tecido intestinal.

### 3.MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Modelo de infecção crônica pelo *T.cruzi* (Megacólon experimental)

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss de aproximadamente 4 semanas. Sendo um grupo controle de fase aguda e um grupo controle de fase crônica. Os camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* compuseram o grupo infectado de fase aguda (11 dias) e o grupo infectado de fase crônica (15 meses).

Para a infecção dos animais a contagem dos parasitos para a preparação do inóculo foi feita de acordo com a técnica descrita por Brener (1962) (BRENER, 1962). A infecção dos animais foi via intraperitoneal (i.p.) com 50.000 formas tripomastigotas. Após a confirmação da infecção de todos os animais inoculados pelo exame de sangue a fresco, os animais foram divididos em dois grupos: (1) camundongos foram destinados para o sacrifício no 11º dia após a infecção (d.a.i.), denominado grupo infectado de fase aguda; (2) no mesmo dia, outro grupo foi tratado com benzonidazol - Rochagan® (Roche, Rio de Janeiro, Brasil), numa única dose de 500 mg/kg de peso corporal por via oral no intuito de garantir a sobrevivência dos camundongos infectados e a cronificação da doença. A estratégia foi utilizar o tratamento em dose subterapêutica nos camundongos com grande carga parasitária na fase aguda da doença, imediatamente após o pico de parasitemia (11º dia), quando foi comprovado o parasitismo tecidual na parede intestinal. Os camundongos foram mantidos por 15 meses após a infecção (m.a.i.), denominado grupo infectado de fase crônica. Em paralelo, os 06 animais restantes foram observados diariamente para obtenção dos dados necessários para a confecção da curva de parasitemia.

Os camundongos foram mantidos no Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em gaiolas plásticas, em ambiente com temperatura e luminosidade controladas. Os animais receberam ração convencional para camundongos (Nuvilab® Nuvital, Curitiba, Brasil), água filtrada *ad libitum* e foram vermifugados, durante 7 dias, com Ivomec® (Merial, Paulínia, Brasil), via oral na diluição de 0,4ml/500ml de água filtrada.

Foram selecionados do laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental 33 blocos de parafina contendo o cólon dos camundongos controle e infectado com a cepa Y de *T. cruzi*, a saber: oito blocos de controle de fase aguda (CFA), oito blocos de infectado de fase aguda (IFA), oito blocos de controle de fase crônica (CFC) e nove blocos de infectado de fase crônica (IFC).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Laboratório de Ciência Animal e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (2006) ([disponível em: http://www.cobea.org.br/](http://www.cobea.org.br/)). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (CETEA 377/2012).

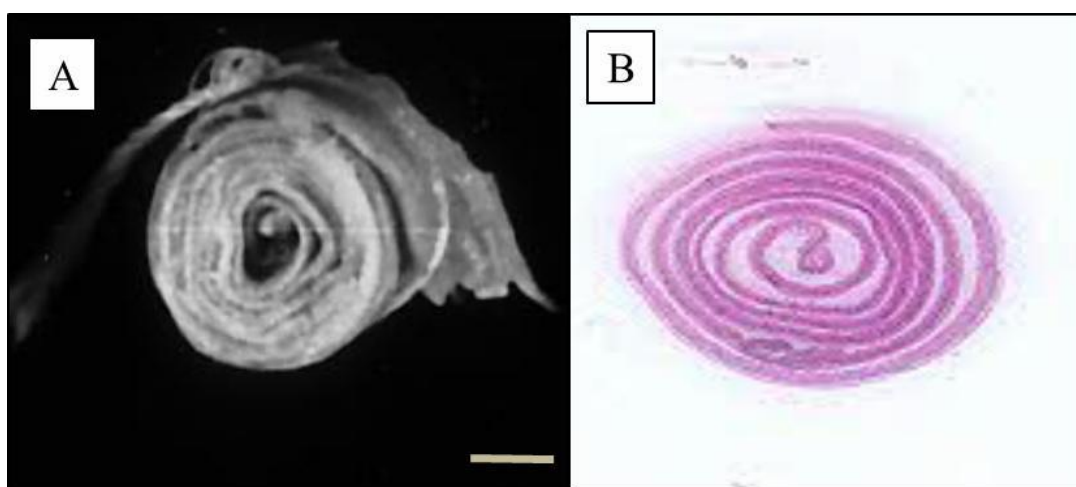
### **3.2. Coleta e preparo do tecido**

Após eutanásia dos camundongos nos tempos descritos acima, todo o intestino foi separado a partir do mesentério, lavado em PBS (solução salina de fosfato tampão 0,01 M, pH 7,2) parte foi destinada à histologia e parte congelada em tissue teck (O.C.T. Compound, Sakura, EUA) para posteriores análises de expressão gênica.

A parte de cólon destinada para histologia foi estendida com a serosa em contato com o papel filtro. Todo o seu conteúdo foi removido sem danificar a mucosa e os segmentos foram transferidos para solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial durante 10 minutos. O cólon pré-fixado foi enrolado em espiral com a mucosa virada para o interior de modo a formar rolos da porção distal (ânus) para a extremidade proximal (ceco), com adaptações da técnica descrita por Calvert e colaboradores (1989) (CALVERT et al., 1989). Tal como descrito por Arantes e Nogueira (1997), esse procedimento permite amostrar a totalidade do comprimento do cólon dos animais. Os rolos de cólon (Figura 2 A) foram processados rotineiramente para inclusão em parafina (ARANTES; NOGUEIRA, 1997).

### **3.3. Coloração por HE**

A partir dos blocos selecionados cortes histológicos não consecutivos de 4 $\mu$ m foram obtidos em lâminas (Figura 2 B). As lâminas previamente coradas (não seriadas) por HE de cada amostra foram examinadas quanto aos critérios histopatológicos para megacólon (espessamento da camada muscular), inflamação tecidual (presença de mononucleares), parasitismo (presença de amastigota) e degeneração (presença de ninhos de amastigotas) e lâminas em cortes seriados foram utilizadas para marcação de proteínas de interesse pela técnica de imuno-histoquímica.



**Figura 2: Rolo do intestino grosso (cólon).** Intestino grosso amarrado com uma linha (A). Imagem digitalizada de um corte histológico do rolo de cólon corado com hematoxilina e eosina (B). Barra em A representa 1 cm.

### 3.4. Imuno-histoquímica

Cortes histológicos consecutivos de 4 $\mu$ m do cólon de animais infectados e não infectados foram desparafinados e rehidratados em concentrações decrescentes de álcool. Posteriormente, os cortes foram submetidos aos bloqueios para peroxidase endógena com solução de metanol e peróxido de hidrogênio 30 volumes na concentração de 5% e para ligações inespecíficas com leite desnatado (Molico) 5% em PBS 10X, BSA 2% (Soro Albumina Bovina, Inlab, Brasil) em PBS 10X, Soro Fetal Bovino 10% em PBS 10X (SFB, 16140-071, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), soro normal de cabra 1:20 em PBS 10X (SNC, CriptonBiotechnology, Brasil). O tempo de incubação foi de 30 minutos para cada bloqueio seguido de lavagens com PBS 10X entre cada solução. Os cortes foram incubados posteriormente, sem lavagens

intermediárias, com os anticorpos primários (anti-PGP 9.5) (1:500, Cedarlane, EUA) e (anti-nNOS) (1:750, Epitomics, EUA) à 4°C overnight. Após banhos em PBS 10X, procedeu-se à incubação de ambos os anticorpos primários com o complexo estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) e incubação por 30 minutos em câmara úmida a 37 °C. A revelação da reação foi feita por DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato) e os cortes foram contra-corados em Hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram novamente desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan (Merck). As contagens de neurônios marcados para PGP 9.5 e nNOS foram realizadas tanto para o número total de neurônios quanto para o número de células por plexo mioentérico. A confirmação do tipo celular para nNOS foi feita pela marcação de PGP 9.5 em lâminas consecutivas. Na tabela abaixo (figura 3) estão indicadas as principais características dos anticorpos e seu uso.

**Tabela1:** Caracterização dos anticorpos primários e secundários e sistema de detecção utilizado nas reações de imuno-histoquímicas.

Nome do anticorpo	Marca e referência comercial	Origem e diluição	Sistema de detecção/anticorpo secundário	Diluição anticorpo secundário	Tipo celular
PGP 9.5 (produto gênico da proteína 9.5)	Cedarlane (CL95101)	Policlonal de coelho	-Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongobiotiniladapré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675) -Estreptavidina-peroxidapré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	1:500	Neurônio
nNOS (sintase de óxido nítrico neuronal)	Epitomics	Monoclonal de coelho	-Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongobiotiniladapré-diluída (Kit Dako) Estreptavidina-peroxidapré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)	1:750	Neurônio

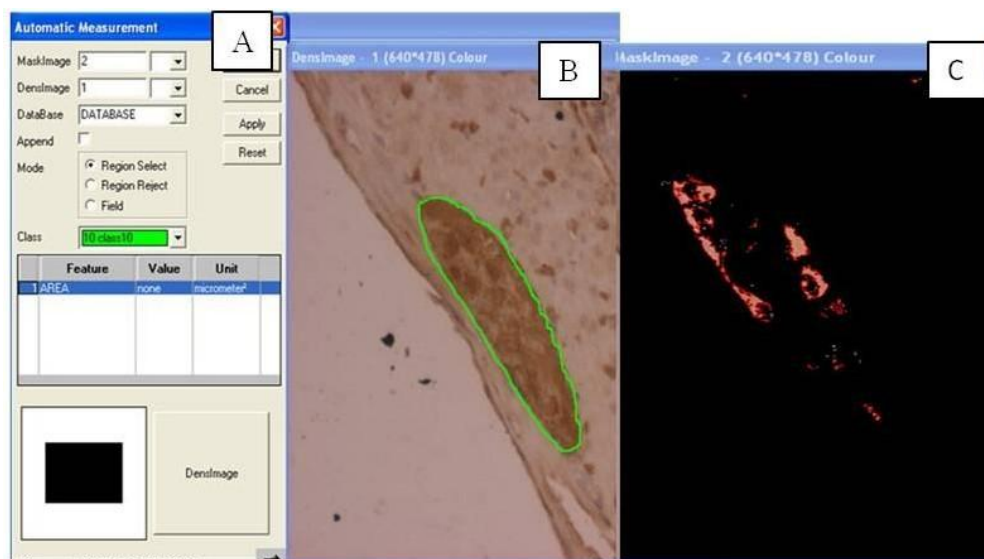
### 3.5. Documentação fotográfica

As lâminas foram fotografadas utilizando o microscópio óptico de luz direta Olympus BX51 equipado com o software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, EUA). Foram estudadas 8 amostras para os grupos CFA, IFA e CFC e 9 amostras do grupo IFC. Para isso, de cada lâmina foram capturadas 15 imagens aleatórias de plexos mioentéricos compreendendo toda a extensão do corte, com resolução de 1392x1040 pixels e transferidas via câmera de vídeo colorida Cool SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) para um sistema de vídeo acoplado a um computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Todas as análises foram feitas em imagens obtidas com objetiva de 20X.

### **3.6. Análise morfométrica**

As áreas selecionadas para a contagem dos neurônios marcados e não marcados também foram definidas como regiões do plexo mioentérico. Através do programa KS300 (Zeiss, Jena, Germany) no laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), foram excluídas de cada imagem as áreas não marcadas. Áreas imunomarcadas do plexo e área total dessa região foram medidas em  $\mu\text{m}^2$  para cortes marcados com anti-nNOS e anti-PGP 9.5.



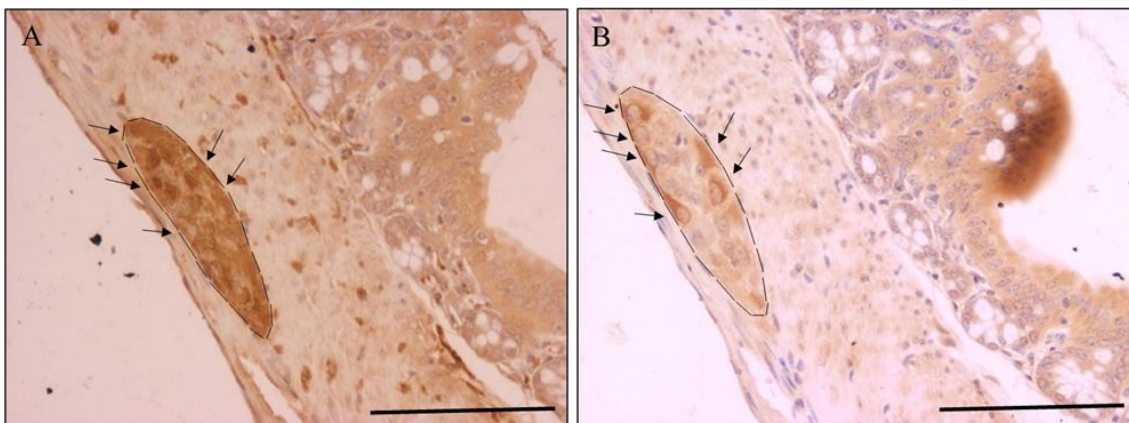


**Figura 3: Delimitação da área imunomarcada dos gânglios (área total/ $\mu\text{m}$ ) para medida automática.** Delimitação da área total do plexo (A), seguida pela marcação dos neurônios PGP 9.5, subsequentemente neurônios seletivamente marcados para nNOS foram medidos automaticamente (C) nos cortes histológicos imediatamente consecutivos.

### 3.7. Expressão de PGP e nNOS nos plexos mioentéricos

Inicialmente a análise quantitativa foi realizada pelo Software gratuito ImageJ 1,48. (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA (disponível on line no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>)). Foi realizada a contagem dos corpos neuronais marcados por nNOS em relação ao total de neurônios marcados por PGP 9.5, tanto em números absolutos de neurônios quanto por plexo, em cortes consecutivos (Figura 4).

Para confirmação dos resultados encontrados, foi realizada a análise quantitativa pelo programa KS300. Para essa análise, foram usados cortes não consecutivos marcados pelos anticorpos já mencionados e para a medida da área imunomarcada por nNOS em relação área total marcada por PGP 9.5, cada área foi automaticamente medida através da digitalização das imagens pelo Programa KS300 (Figura 3).



**Figura 4: Cortes consecutivos corados por PGP 9.5 (A) e nNOS (B).** Plexo mioentérico identificado por marcação para PGP 9.5 delimitado pela linha preta tracejada (A) e plexo mioentérico na ausência da marcação por PGP 9.5 delimitado pela linha preta tracejada (B). Setas pretas em ambas as micrografias indicam neurônios marcados para PGP 9.5 (A) e nNOS (B). Aumento de 40X. Barra=10 $\mu$ m.

### 3.8. Extração de RNA

As amostras de cólon dos camundongos congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (5 CFA, 10 IFA, 3 CFC e 6 IFC) foram inicialmente preparadas para a extração de RNA adicionando 500  $\mu\text{l}$  de trizol (*Trizol Reagent*, Invitrogen #15596) e, com o auxílio de um homogenizador, as amostras foram trituradas. Em seguida, foi adicionado 100  $\mu\text{l}$  de clorofórmio seguido de homogeneização por 15 segundos, incubação por 3 minutos no gelo e centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol, com posterior incubação em gelo por 15 minutos e centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 75% gelado, seguido homogeneização no vórtex e centrifugação a 7500 x g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O *pellet*, seco por inversão, foi ressuspenso em 30 $\mu\text{L}$  de água livre de RNase e DNase e seguido de banho seco a  $55^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

A quantificação do tecido intestinal extraído foi realizada através do equipamento Nanodrop (*GE Nano Vue Plus Spectrometer*) em ng l. O material foi armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### 3.9. Síntese do cDNA

Para a transcrição de RNA em cDNA utilizou-se um mix de 0,5 $\mu\text{L}$  de Oligo dT 15 primer (Promega #C1101), 1 $\mu\text{L}$  de RNA e 3,5 $\mu\text{L}$  de água livre de RNase

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

### 3.10. RT-PCR

O cDNA sintetizado foi amplificado e utilizado para a realização da RT-PCR. Utilizamos placas de 96 poços onde foram pipetados 2 $\mu$ L da amostra e 13 $\mu$ L de mix contendo 7,5 $\mu$ L Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technology, Inglaterra, 4267659), 0,2 $\mu$ L de primer forward, 0,2 $\mu$ L de primer reverse e 5 $\mu$ L de água livre de RNase.

A amplificação foi realizada em sistema Applied Biosystems, StepOnePlus Real-time PCR em 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 minutos e 60°C por 1 minuto seguido por uma fase final de dissociação. A análise foi realizada através do *software StepOne* v2.3. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e normalizadas pelo gene GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores,  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , foram expressos pela quantidade de gene amplificado em comparação ao gene controle.

**Tabela 2:** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para RT-PCR no cólon dos camundongos controles e infectados

Gene	Sequência foward	Sequência reverse
GAPDH	GACACCTTTGGCATTGTGG	ATGCAGGGATGATGTTCTG
nNOS	ATGAAGTGACCAACCGCCTT	AGCTGAAAACCTCATCTGTGTC
ChAT	AGGGCAGCCTCTCTGTATGA	ATCCTCGTTGGACGCCATTT
VIP	GCAAGATGTGGGACAACCTC	CAGTCTGTTGCTGCTCATCC
Sub P rec	GGTCTGACCGCAAATCGAAC	AGAGCCTTTAACAGGGCCAC

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; **nNOS** – sintase de óxido nítrico neuronal; **ChAT** – colina acetiltransferase; **VIP** – polipeptídeo intestinal vasoativo; **Sub p rec** – receptor de substância P.

### 3.11. Análise estatística

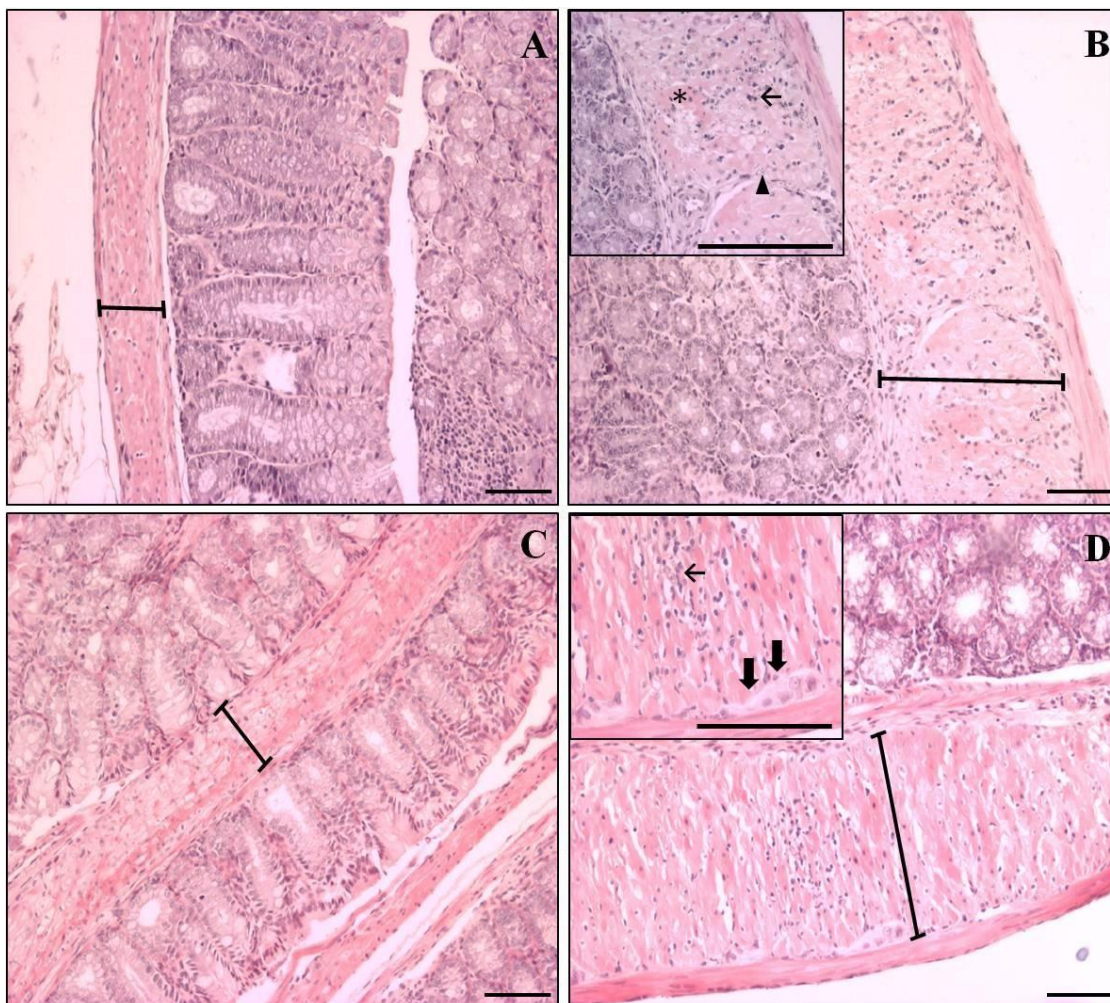
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism (v 5.0) (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Os resultados obtidos para PGP 9.5 e nNOS foram classificados pela análise de distribuição normal em dados paramétricos ou não paramétricos. A comparação entre os grupos de camundongos infectados de fase aguda, crônica e respectivos controles foi feita através do teste *t* para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos. Na RT-PCR a análise dos neurotransmissores ChAT, nNOS, VIP e receptor de substância P e a comparação entre os grupos de camundongos infectados de fase aguda, crônica e respectivos controles foi feita através do teste de Mann-Whitney de acordo com a classificação dos dados pela distribuição de Gauss. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 4.RESULTADOS

### 4.1. Aspectos histopatológicos do cólon dos camundongos do grupo controle e infectado

Aspectos histopatológicos do intestino após a infecção pelo parasito *T. cruzi* já são bem conhecidos e descritos na literatura. Nossa ênfase foi na análise de amostras do intestino de camundongos cronicamente infectados. Em comparação com o controle de fase crônica (figura 5 C) e o infectado de fase crônica (Figura 5 D) observamos o visível espessamento da camada muscular e submucosa devido a edema que disseca as células musculares e à presença de infiltrado inflamatório que acomete todas as camadas do intestino. O infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, está distribuído em focos ao longo de toda a extensão do cólon e se interpõe, por vezes formando fileiras entre as células musculares lisas, ou delineando e interrompendo os plexos mioentéricos. No detalhe da figura 5 B observamos no interior dos plexos e nos seus limites presença de células inflamatórias próximas a neurônios degenerados com núcleos aumentados de volume e células acessórias com núcleos picnóticos. Ninhos íntegros e rotos de amastigotas são frequentes nos focos inflamatórios. Alguns plexos apresentam perda de neurônios (figura 5 D, detalhe).

Em relação aos animais controle de fase crônica (figura 5 C) os animais IFC apresentam aumento considerável da espessura da parede muscular, neste caso em função de aumento do volume das células musculares lisas que estão hipertrofiadas e apresentam acidofilia do citoplasma. Os focos de infiltrado inflamatório são predominantemente mononucleares e menos frequentes que nos animais de fase aguda. Há diminuição do volume dos plexos mioentéricos em alguns focos, e visível rarefação de corpos de neurônios dos plexos.



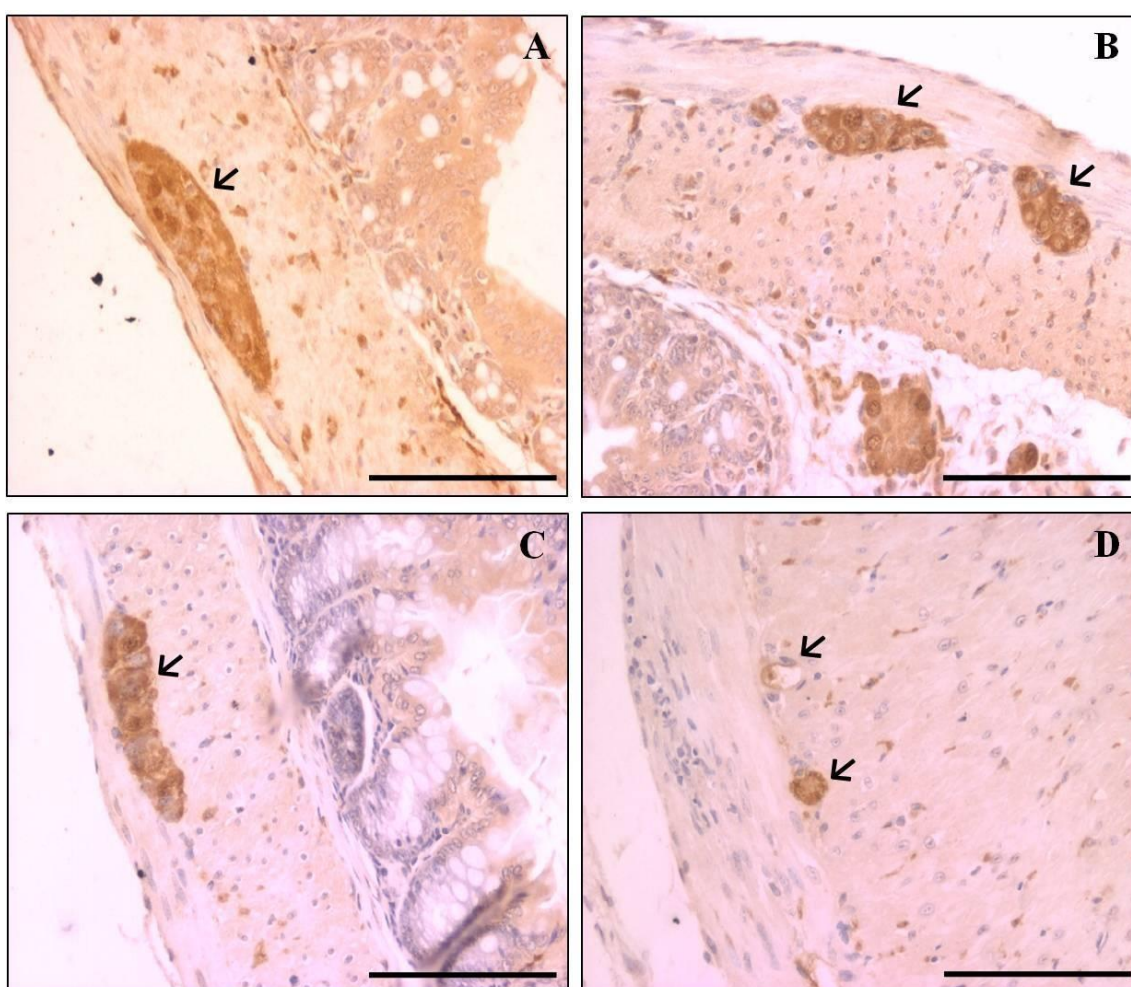
**Figura 5. Aspectos histopatológicos do cólon.** (A) Controle de fase crônica, CFA; (B) Infectado de fase aguda, IFA; (C) Controle de fase crônica, CFC; (D) Infectado de fase crônica, IFC. Espessamento da camada muscular (↔), infiltrado inflamatório mononuclear (←), sinais de degeneração (\*), ninhos de amastigotas ▲ e rarefação neuronal (▸). Micrografia com aumento de 10X. Detalhe com aumento de 20X. Barra=10µm.

#### 4.2. Expressão do PGP 9.5 em neurônios do plexo mioentérico

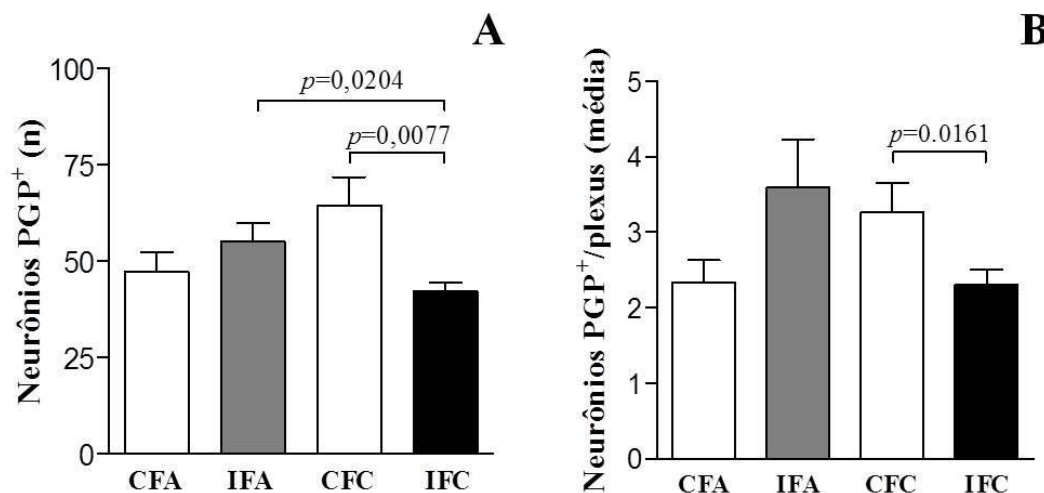
Os segmentos colônicos consecutivos, representados na Figura 6 apresentam plexos mioentéricos imunomarcados para PGP 9.5 dos grupos: CFA (6A); IFA (6B); CFC (6C) e IFC (6D). O grupo IFC apresentou menor marcação, em análise quantitativa, de imunomarcção em relação ao seu controle CFC e ao grupo IFA. Os dados quantitativos do número total de neurônios contados em todas as imagens capturadas na fase aguda e na fase crônica encontram-se representados na Figura 7. Na fase aguda não houve diferença estatística entre os grupos controle e infectado. Na fase

crônica ocorreu menor marcação estatisticamente significativa ( $p=0,0077$ ) de neurônios PGP 9.5<sup>+</sup> quando comparado ao controle de fase crônica e o infectado de fase aguda.

Como os plexos são constituídos não apenas de neurônios, mas também de células da glia à infecção não se manifesta de forma homogênea, então nos perguntamos se a diferença encontrada no número total de neurônios persistiria na análise por plexo mioentérico. Na Figura 8 representamos a análise da média do número de neurônios PGP 9.5<sup>+</sup>, por plexo, nos grupos estudados. Observamos menor quantidade de células marcadas ( $p=0,0161$ ) entre o grupo IFC e seu controle.



**Figura 6. Expressão de PGP 9.5 nos plexos mioentéricos dos camundongos.** (A) Controle de fase crônica, CFA; (B) Infectado de fase aguda, IFA; (C) Controle de fase crônica, CFC; (D) Infectado de fase crônica, IFC. Plexos mioentéricos dos segmentos intestinais marcados por imunohistoquímica para PGP 9.5 (←). Micrografia com aumento de 20X. Barra=10 $\mu$ m.



**Figura 7. Quantificação das imunomarcações para PGP 9.5 nos plexos mioentéricos de camundongos.** (A) Quantificação do número total de neurônios PGP 9.5<sup>+</sup>. (B) Quantificação do número neurônios PGP 9.5<sup>+</sup> por plexo. Controle de fase aguda, **IFA** - Infectado de fase aguda, **CFC** - Controle de fase crônica e **IFC** - Infectado de fase crônica. As barras são representativas da média dos resultados obtidos de 8 (CFA, IFA, CFC) ou 9 (IFC) animais por grupo. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ . Teste *t* Student.

#### 4.3. Expressão de nNOS em neurônios do plexo mioentérico

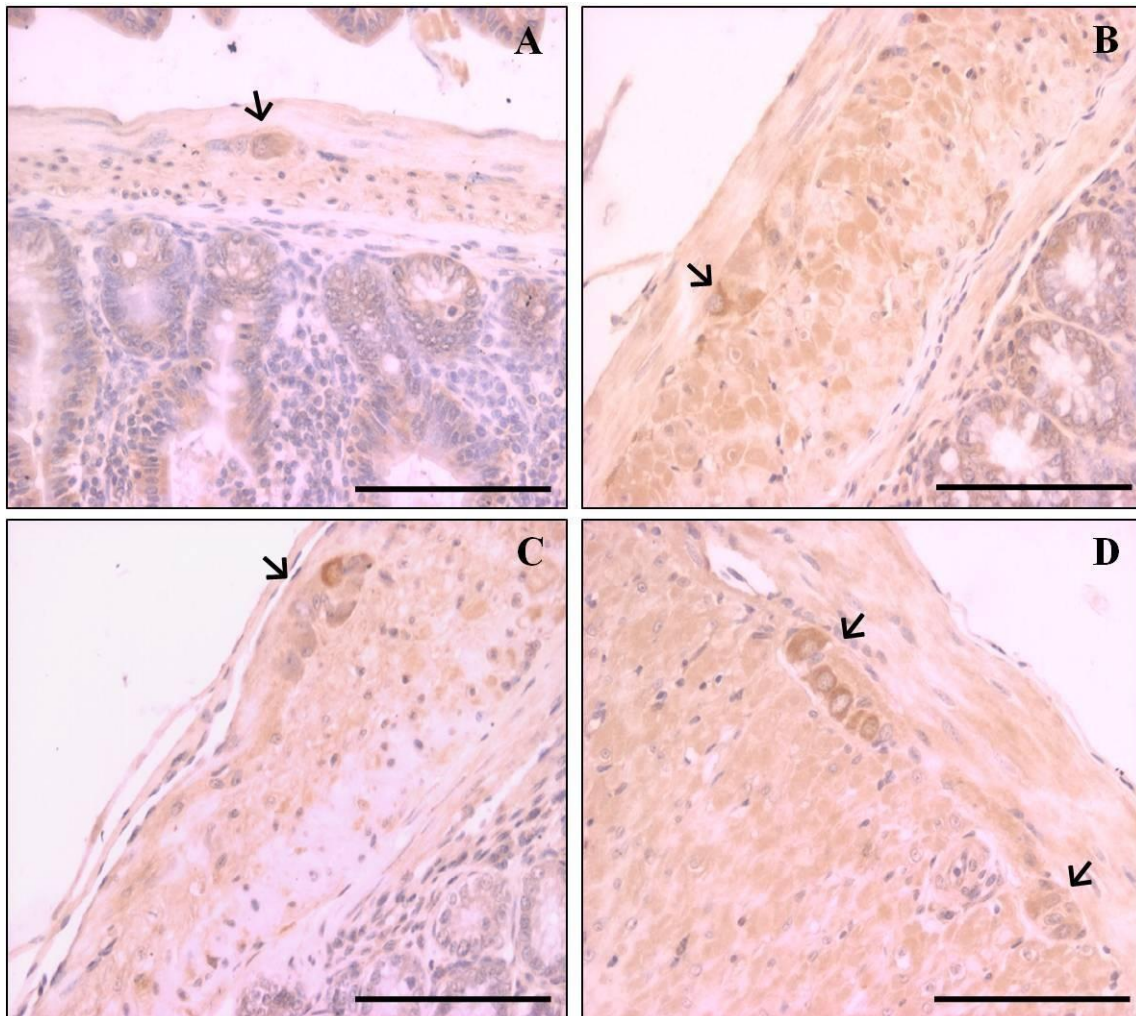
Os segmentos colônicos consecutivos, representados na figura abaixo (Figura 9) demonstram os plexos mioentéricos imunomarcados para nNOS dos grupos: CFA (9A); IFA (9B); CFC (9C) e IFC (9D). O grupo IFC apresenta maior marcação, em análise quantitativa em relação ao seu controle (CFC).

Os dados quantitativos quanto ao número total de neurônios contados em todas as imagens capturadas nas fases aguda e na fase crônica encontram-se representadas na Figura 10. Não houve diferença estatística quando comparados grupos infectados com seus respectivos controles e nem entre os grupos controle de ambas as fases da infecção, aguda e crônica.

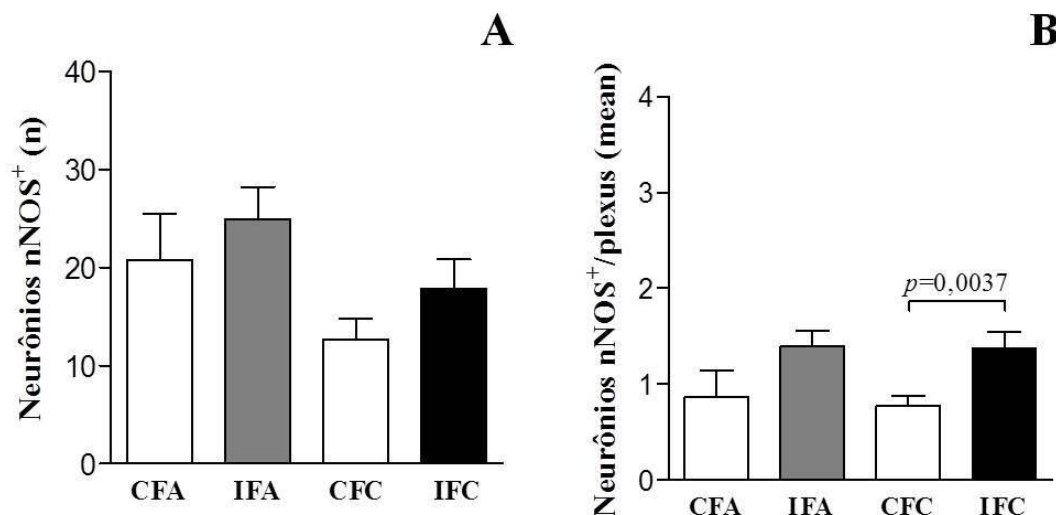
Como citado anteriormente à infecção não se manifesta de forma homogênea devido a diversidade celular encontrada nos plexos e da mesma maneira, analisamos a distribuição da marcação através da análise por plexo. Ao analisarmos a média do número de neurônios nNOS positivo por plexo nos grupos estudados, observamos maior frequência de imunomarcação ( $p=0,0037$ ) entre os grupos IFC e seu respectivo controle



(Figura 11). Porém, o mesmo não foi observado para o grupo de animais na fase aguda da doença quando comparados aos seus controles (Figura 11).



**Figura 8. Expressão de nNOS nos plexo mioentéricos dos camundongos. (A) Controle de fase crônica, CFA; (B) Infectado de fase aguda, IFA; (C) Controle de fase crônica, CFC; (D) Infectado de fase crônica, IFC. Plexos mioentéricos dos segmentos intestinais marcados por imunohistoquímica para nNOS 9.5 (←). Micrografia com aumento de 20X. Barra=10 $\mu$ m.**



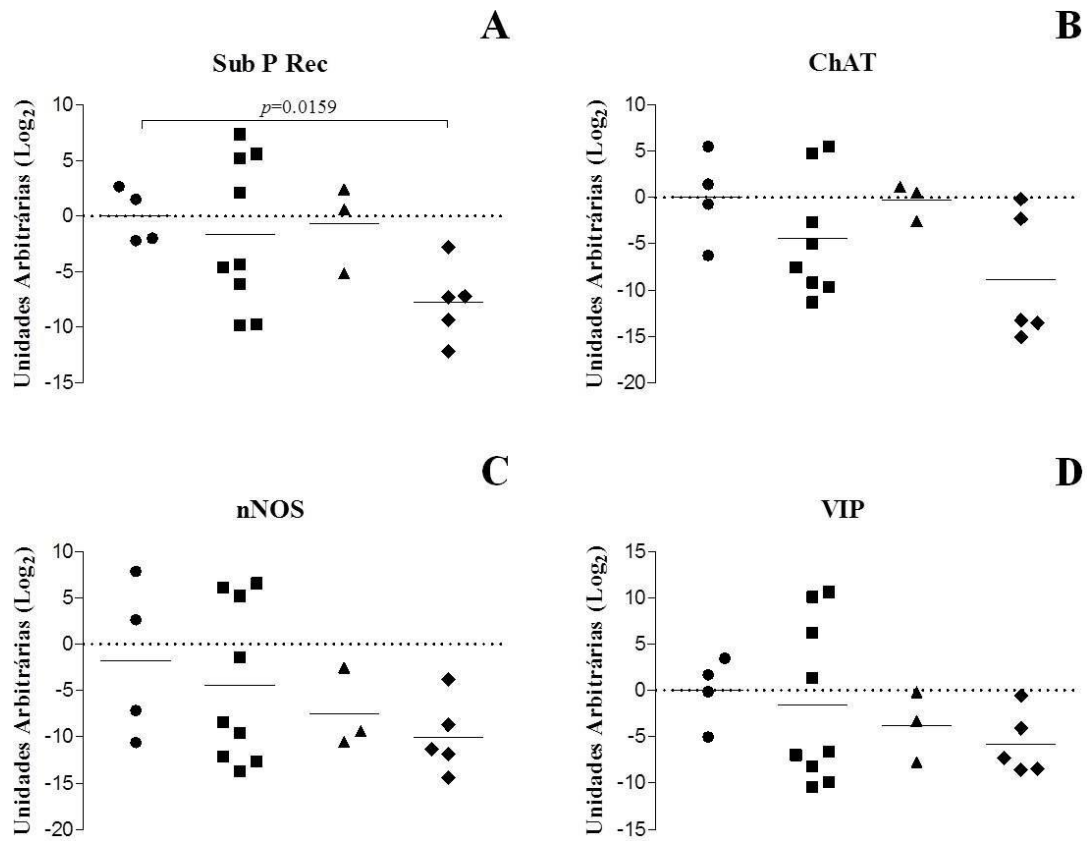
**Figura 9. Quantificação das imarcações para nNOS nos plexos mioentéricos de camundongos.** (A) Quantificação do número total de neurônios nNOS<sup>+</sup>. (B) Quantificação do número neurônios nNOS<sup>+</sup> por plexo. Controle de fase aguda, **IFA** - Infectado de fase aguda, **CFC** - Controle de fase crônica e **IFC** - Infectado de fase crônica. As barras são representativas da média dos resultados obtidos de 8 (CFA, IFA, CFC) ou 9 (IFC) animais por grupo. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ . Teste *t* Student.

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

Para melhor identificarmos a proporção dos tipos neuronais presentes no segmento tecidual analisado e compararmos entre os grupos estudados, nós verificamos a expressão dos receptores para neurotransmissores excitatórios (Substância P e ChAT) e dos receptores para neurotransmissores inibitórios (nNOS e VIP) através da técnica de RT-PCR.

Quando analisamos a expressão tecidual do receptor excitatório para substância P observamos uma redução significativa quando comparamos o grupo IFC em relação ao grupo CFA (Figura 12 A). Para o outro receptor excitatório ChAT não houve diferença na comparação de quaisquer grupos (Figura 12 B).

Para o receptor do neurotransmissor inibitório nNOS não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 12 C), assim como também não houve diferença entre os grupos para o receptor inibitório VIP (Figura 12 D).



**Figura 10. Expressão de receptores excitatórios e inibitórios de neurônios saudáveis e neurônios aguda e cronicamente infectados por *T. cruzi*.** Os resultados expressos em dispersão apresentam a expressão gênica dos receptores de neurotransmissores mensurada através do ensaio de Real Time PCR. **Sub P rec** - Receptor de Substância P, **ChAT** - Colina Acetiltransferase, **nNOS** - Sintase de Óxido Nítrico Neuronal, **VIP** - Polipeptídeo Intestinal Vasoativo. Os grupos são representados pelos símbolos, **CFA** - Controle de fase aguda (●, 4); **IFA** - Infectado de fase aguda (■, 8); **CFC** - Controle de fase crônica (▲, 3); **IFC** - Infectado de fase crônica (◆, 5) e cada símbolo corresponde a um indivíduo. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ . Teste de Mann-Whitney.

## 5.DISSCUSSÃO

Os componentes celulares do sistema nervoso entérico são um grande alvo de estudo para alterações da dilatação, dismotilidade e hiperplasia muscular lisa intestinal. Uma vez que a inervação é um importante fator na manutenção da contratilidade intestinal (BLENNERHASSETT; LOURENSSEN, 2000), a inflamação causada pela infecção ao parasito, provoca alterações neuronais intrínsecas e extrínsecas que afetam a musculatura lisa intestinal, podem estar intimamente relacionada com o desenvolvimento do megacólon chagásico. Ao mesmo tempo, discrepâncias entre a intensidade e frequência das lesões inflamatórias e ausência de parasitos na fase crônica permitem questionar a relação direta entre a presença do parasito, a inflamação e a desnervação. Em nosso trabalho, utilizando o modelo de megacólon chagásico desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, demonstramos a desnervação neuronal no plexo mioentérico. Além disso, nossos resultados nesse estudo, demonstram ocorrer um desbalanço entre neurônios excitatórios e inibitórios culminando com a preservação de neurônios nNOS inibitórios e diminuição de neurônios substância P excitatórios.

Os resultados são inéditos e consistentes, e não foram revelados em outros estudos que avaliaram o TGI e o desenvolvimento do megacólon (YOUNÈS-CHENNOUFI, BEN et al., 1988; GUILLÉN-PERNÍA et al., 2001; MOREIRA et al., 2011). Ainda que o envolvimento do sistema nervoso na doença esteja estabelecido, e que alguns mecanismos da destruição neuronal no intestino já tenham sido estudados (ARANTES et al., 2004), os mecanismos e história natural das lesões SNE permanecem obscuros (ADAD et al., 1991)(SOUZA, DE et al., 1996).

No trabalho demonstramos a perda neuronal significativa na fase crônica, provavelmente devido ao intenso processo inflamatório associado ao parasitismo tecidual que se inicia na fase aguda da doença e se transforma em uma consistente inflamação crônica. A perda neuronal só foi possível ser detectada no modelo murino devido ao método por nós utilizado, que se vale de extensiva amostragem (ARANTES; NOGUEIRA, 1997).

Além da perda geral de neurônios por área intestinal e por plexo intestinal, observamos um aumento de neurônios nitrérgicos nNOS plexo, sugerindo que ocorra uma preservação desta classe de neurônios inibitórios, uma vez que não exista a possibilidade de multiplicação destas células, em detrimento da perda de outros subtipos

de neurônios no plexo mioentérico. Embora alguns tipos de neurônios mioentéricos não nitrérgicos (BREHMER; BLASER; et al., 2004; BREHMER; CRONER; et al., 2004; BREHMER et al., 2005), já tenham sido caracterizados morfo-quimicamente, o nosso conhecimento de diversos tipos de neurônios entéricos no intestino humano e murino ainda é fragmentário (BREHMER et al., 2006). A perda de neurônios colinérgicos acarretaria na sobrevivência seletiva dos neurônios nitrérgicos (JABARI et al., 2011).

Em específico, os neurônios nNOS medeiam a maioria das respostas inibitórias no TGI e regulam muitos reflexos fisiológicos importantes, tais como o relaxamento do esfíncter inferior do esôfago após a deglutição, relaxamento receptivo do estômago proximal durante a alimentação e inibição descendente em resposta à distensão (TAKAHASHI, 2003). A maior parte dos estudos, apresentam uma diminuição da expressão de nNOS no plexo mioentérico em situações de inflamação aguda como é o caso dos modelos experimentais de colites e envelhecimento (TAKAHASHI et al., 2000; PELLETIER et al., 2010). Esses estudos atribuem ao óxido nítrico um papel inibitório que seria perdido com o dano neuronal induzido durante o processo inflamatório, resultando em diminuição da função inibitória e resultando em liberação das fibras musculares para proliferação. Nossos resultados, no entanto, mostram que os neurônios nitrérgicos estão relativamente aumentados e é de se esperar que sua função inibitória prevaleça no intestino. Por outro lado, observamos que as fibras musculares estão aumentadas de volume (CAMPOS et al., 2016) embora não haja evidências de que exista hiperplasia.

Estudos sobre a proporção de fibras nervosas em cobaia (WILSON et al., 1987) e em humanos (UEMURA et al., 1998) revelaram uma relação muito equilibrada entre fibras excitatórias e inibitórias (LLEWELLYN-SMITH et al., 1988). As alterações nas proporções de NOS e VIP (ambos inibitórios) e substância P (excitatório) foram encontrados também nas fibras nervosas de crianças com constipação lenta e obstrução crônica idiopática (KOCH et al., 1988; HUTSON et al., 1996; KING et al., 2010). Jabari et al. em 2012 observaram que na doença de Chagas crônica a preponderância de sobrevivência de neurônios nitrérgicos inibitórios conduz a uma dilatação crônica do cólon. Investigaram também o equilíbrio/desequilíbrio de fibras intramusculares nervosas NOS, ChAT e VIP. O neuropeptídeo VIP é parcialmente colocalizado com NOS nos neurônios mioentéricos em humano (BREHMER et al., 2006; SCHUY et al., 2011) e tem, em conjunto com a NOS, uma influência inibitória sobre o músculo liso

intestinal (GRIDER, 1993). Assim, a dominância de nervos inibidores poderia explicar a dilatação crônica no megasegmento. Em nossos resultados observamos a preservação de neurônios nitrérgicos nNOS<sup>+</sup> corroborando com o resultados de Jabari et al. 2011.

Estudos com foco em efeitos relacionados à idade sobre o sistema nervoso entérico descreveram um aumento relativo de NOS<sup>+</sup> em contraste com neurônios ChAT<sup>+</sup> do plexo mioentérico (BERNARD et al., 2009), resultando em um predomínio de elementos inibidores do nervo. Em nosso trabalho a expressão de ChAT não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. A doença de Chagas acelera efeitos relacionados com a idade resultando na sobrevivência desproporcional de neurônios mioentéricos nitrérgicos. No entanto, em algumas circunstâncias a perda desproporcional de neurônios nitrérgicos também ocorre (RIVERA et al., 2011). Entretanto no modelo de megacólon chagásico utilizado neste trabalho, demonstramos um aumento de neurônios nNOS<sup>+</sup> pela imunomarcagem e não conseguimos resultado semelhante pela técnica de RT-PCR. Porém essa discrepância teria que ser verificada com outro experimento e aumento da amostra. Corroborando que a desnervação está associada a danos intestinais Boyer et al. 2007, em estudos com pacientes com doença de Crohn, detectaram aumento significativo de NOS, demonstrando que a inflamação está associada a uma expressão diferencial de subpopulações de nNOS (BOYER et al., 2007).

A perda e a regeneração de subpopulações de neurônios mioentéricos é seletiva e a regeneração das classes de neurônios seletivos seria essencial para o desenvolvimento megacólon. Um estudo sistemático que teve como objetivo avaliar a perda neuronal seletiva mostrou que o aumento de regeneração ocorre devido à destruição seletiva de tipos neuronais, particularmente dos tipos inibidores (VIP e NOS) (MOREIRA et al., 2013).

Em contraste, reinervação foi observada em alguns estudos experimentais da doença intestinal inflamatória, em associação com hiperexcitabilidade neuronal (diarreia) (LOURENSSEN et al., 2009; ADAD et al., 2013). No entanto, pacientes com megacólon chagásico não apresentam hiperexcitabilidade, e sim hipocontratilidade (constipação), que tem sido atribuída a diferenças de perda de neurônios motores inibitórios (VIP<sup>+</sup> e NOS<sup>+</sup>) (MOREIRA et al., 2013).

Ao analisarmos a substância P, outro neurotransmissor excitatório, encontramos uma diminuição da expressão entre o grupo infectado de fase crônica e o grupo controle da fase aguda. Esse resultado mostra-se muito interessante, mas nos leva a necessidade de novas análises para o entendimento do papel da substância P no modelo murino de megacólon chagásico.

Comparando neurônios nitrérgicos com colinérgicos, no modelo de megacólon chagásico humano, Jabari e colaboradores mostraram que os neurônios nitrérgicos eram mais frequentes nos gânglios lesados, sugerindo que fossem mais resistentes contra os fatores patológicos que causam perda neuronal (JABARI et al., 2011). Também tem sido observada uma perda relativa de neurônios entéricos nitrérgicos como consequência da perda seletiva dos neurônios colinérgicos com o envelhecimento em modelos animais e estudos em humanos (SANTER, 1994; PHILLIPS et al., 2003; BERNARD et al., 2009).

Portanto, utilizando este modelo, que apresenta alterações estruturais descritas no megacólon, no plexo mioentérico e nas terminações nervosas intramusculares, acreditamos em uma alteração no balanço entre neurônios inibitórios e excitatórios do plexo mioentérico resultante do processo inflamatório crônico decorrente da infecção pelo *T. cruzi*. Sendo assim, nossos resultados sugerem um papel para a neurotransmissão inibitória e excitatória na gênese dos distúrbios de motilidade e alterações estruturais do megacólon chagásico reproduzido em modelo murino.

Em conclusão, este estudo demonstrou pela primeira vez em camundongos com infecção chagásica crônica, a preservação seletiva de neurônios nitrérgicos inibitórios, podendo ser explicada pela perda dos neurotransmissores excitatórios. Compreender melhor este mecanismo e conhecer a história natural das lesões crônicas intestinais pode oferecer melhor compreensão da fisiopatologia e potencial base racional para uma abordagem terapêutica no megacólon chagásico.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, H. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 280, n. 2 Suppl, p. 50–61, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3524491>>.
- ADAD, S. J.; ANDRADE, D. C.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Pathological anatomy of chagasic megaesophagus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 33, n. 6, p. 443–450, 1991.
- ADAD, S. J.; E SILVA, G. B.; JAMMAL, A. A. The development of chagasic megacolon requires severe denervation and the reduction in interstitial cells of Cajal number might be a contributing factor. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 462, n. 1, p. 127, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224119>>.
- ADAMS, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 7, p. 1297–1302, 1996.
- AKPAN, N.; CARADONNA, K.; CHUENKOVA, M. V; PEREIRAPERRIN, M. Chagas' disease parasite-derived neurotrophic factor activates cholinergic gene expression in neuronal PC12 cells. **Brain research**, v. 1217, p. 195–202, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502403>>.
- ALLESCHER, H. D.; LU, S.; DANIEL, E. E.; CLASSEN, M. Nitric oxide as putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the opossum sphincter of Oddi. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 525–30, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7902198>>.
- ALTAFF, M. A.; SOOD, M. R. The nervous system and gastrointestinal function. **Developmental disabilities research reviews**, v. 14, n. 2, p. 87–95, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18646012>>.
- ALTCHEH, J. Chagas disease, 100 years after its identification. **Archivos argentinos de pediatria**, v. 108, n. 1, p. 4–5, 2010.
- ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, 1990.
- ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemolysin active at low pH. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 33, n. 3, p. 249–256, 1989.
- ARANTES, R. M. E.; MARCHE, H. H. F.; BAHIA, M. T.; et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in Trypanosoma cruzi-infected mice. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 4, p. 1361–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039223>>.
- ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and tissue research**, v. 290, n. 1, p. 61–9, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377643>>.
- ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 2, p. 349–360, 1993.
- ARRANZ, A.; ABAD, C.; JUARRANZ, Y.; et al. Vasoactive intestinal peptide as a



- healing mediator in Crohn's disease. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 46–53, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667799>>.
- BARRACHINA, M. D.; PANÉS, J.; ESPLUGUES, J. V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 1, p. 31–48, 2001.
- BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. The movements and innervation of the small intestine. **The Journal of physiology**, v. 26, n. 3-4, p. 125–138, 1901.
- BEN-HORIN, S.; CHOWERS, Y. Neuroimmunology of the gut: physiology, pathology, and pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 490–5, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675937>>.
- BENNINGA, M. A.; BÜLLER, H. A.; STAALMAN, C. R.; et al. Defaecation disorders in children, colonic transit time versus the Barr-score. **European journal of pediatrics**, v. 154, n. 4, p. 277–84, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607277>>.
- BERNARD, C. E.; GIBBONS, S. J.; GOMEZ-PINILLA, P. J.; et al. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 21, n. 7, p. 746–e46, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220755>>.
- BLENNERHASSETT, M. G.; LOURENSSEN, S. Neural regulation of intestinal smooth muscle growth in vitro. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 3, p. G511–G519, 2000.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, 1994.
- BORNSTEIN, J. C.; COSTA, M.; GRIDER, J. R. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. **Neurogastroenterology and Motility. Anais**. v. 16, p.34–38, 2004.
- BOST, K. L. E; PASCUAL, D. W. Substance P: a late-acting B lymphocyte differentiation cofactor. **The American journal of physiology**, v. 262, n. 3 Pt 1, p. C537–45, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372476>>.
- BOYER, L.; SIDPRA, D.; JEVON, G.; BUCHAN, A. M.; JACOBSON, K. Differential responses of VIPergic and nitrergic neurons in paediatric patients with Crohn's disease. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 134, n. 1-2, p. 106–14, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17466601>>.
- BREHMER, A.; BLASER, B.; SEITZ, G.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. **Histochemistry and cell biology**, v. 121, n. 1, p. 13–20, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14663589>>.
- BREHMER, A.; CRONER, R.; DIMMLER, A.; et al. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 112, n. 1-2, p. 49–59, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233930>>.
- BREHMER, A.; LINDIG, T. M.; SCHRÖDL, F.; et al. Morphology of enkephalin-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. **Histochemistry and cell biology**, v. 123, n. 2, p. 131–8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15776249>>.
- BREHMER, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W. Morphology of VIP/nNOS-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. **Histochemistry and cell biology**,

- v. 125, n. 5, p. 557–65, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16328433>>.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389–96, 1962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14015230>>.
- BRENNEMAN, D. E. Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. **Peptides**, v. 28, n. 9, p. 1720–6, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513014>>.
- BROWN, D. R.; PARSONS, A. M.; O'GRADY, S. M. Substance P produces sodium and bicarbonate secretion in porcine jejunal mucosa through an action on enteric neurons. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 261, n. 3, p. 1206–12, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376357>>.
- CALVERT, R. J.; OTSUKA, M.; SATCHITHANANDAM, S. Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. **The Journal of nutrition**, v. 119, n. 11, p. 1610–6, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2600666>>.
- CAMPOS, C. F.; DUZ, A. L. C.; CANGUSSÚ, S. D.; et al. O modelo de inflamação crônica induzida por *Trypanosoma cruzi* na parede intestinal de camundongos como plataforma experimental para compreender mecanismos de plasticidade do sistema nervoso entérico e musculatura lisa intestinal. , 2016.
- CANNON, W. B. Peristalsis, segmentation, and the myenteric reflex. **Am J Physiol**, v. 30, p. 114–28, 1912.
- CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of physiology, Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 253–6, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595446>>.
- COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1683–99, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8942751>>.
- COOK, G. A.; ELLIOTT, D.; METWALI, A.; et al. Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis *mansoni* express an authentic substance P (NK-1) receptor. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 4, p. 1830–5, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8120392>>.
- COSTA, M.; FURNESS, J. B. The peristaltic reflex: An analysis of the nerve pathways and their pharmacology. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 294, n. 1, p. 47–60, 1976.
- CREMA, A.; FRIGO, G. M.; LECCHINI, S. A pharmacological analysis of the peristaltic reflex in the isolated colon of the guinea-pig or cat. **British journal of pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 334–345, 1970.
- D'ANTONA, G.; HENNIG, G. W.; COSTA, M.; HUMPHREYS, C. M.; BROOKES, S. J. H. Analysis of motor patterns in the isolated guinea-pig large intestine by spatio-temporal maps. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 13, n. 5, p. 483–492, 2001.
- DEBAS, H. T.; MULVIHILL, S. J. Neuroendocrine design of the gut. **American journal of surgery**, v. 161, n. 2, p. 243–9, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671322>>.
- DELGADO, M.; ABAD, C.; MARTINEZ, C.; et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 80, n. 1, p. 16–24, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11862320>>.
- DELGADO, M.; LA FUENTE, M. DE; MARTÍNEZ, C.; GOMARIZ, R. P. Pituitary

- adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP27 and PACAP38) inhibit the mobility of murine thymocytes and splenic lymphocytes: comparison with VIP and implication of cAMP. **Journal of neuroimmunology**, v. 62, n. 2, p. 137–46, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499501>>.
- DELGADO, M.; MUNOZ-ELIAS, E. J.; GOMARIZ, R. P.; GANEA, D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 162, n. 8, p. 4685–96, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10202009>>.
- DINNING, P. G.; COSTA, M.; BROOKES, S. J.; SPENCER, N. J. Neurogenic and myogenic motor patterns of rabbit proximal, mid, and distal colon. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2012.
- DONG, H.; JIANG, Y.; DONG, J.; MITTAL, R. K. Inhibitory motor neurons of the esophageal myenteric plexus are mechanosensitive. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 308, n. 5, p. C405–C413, 2015. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpcell.00159.2014>>.
- DUZ, A. L. C. Estudo da Patogênese do megacólon chagásico em modelo murino: alterações morfológicas da parede intestinal e do sistema nervoso entérico. , 2009.
- DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental parasitology**, v. 34, n. 2, p. 268–283, 1973.
- EIDEN, L. E. The cholinergic gene locus. **Journal of neurochemistry**, v. 70, n. 6, p. 2227–40, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603187>>.
- EKBLAD, E.; BAUER, A. J. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Suppl 1, p. 123–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066017>>.
- FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L.; OLSCHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 135, n. 2 Suppl, p. 755s–765s, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2861231>>.
- FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. Blackwell, Oxford., 2006.
- GALLIGAN, J. J.; LEPARD, K. J.; SCHNEIDER, D. A.; ZHOU, X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 81, n. 1-3, p. 97–103, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869707>>.
- GARCIA-VILLAR, R.; DUPUIS, C.; MARTINOLLE, J. P.; FIORAMONTI, J.; BUÉNO, L. Functional evidence for NO-synthase activation by substance P through a mechanism not involving classical tachykinin receptors in guinea-pig ileum in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 5, p. 1253–61, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8818351>>.
- GELDRE, L. A. VAN; LEFEBVRE, R. A. Nitrgergic relaxation in rat gastric fundus: influence of mechanism of induced tone and possible role of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase. **Life sciences**, v. 74, n. 26, p. 3259–74, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15094326>>.
- GERARD, N. P.; GARRAWAY, L. A.; EDDY, R. L.; et al. Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. **Biochemistry**, v. 30, n. 44, p. 10640–6, 1991. Disponível

em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1657150>>.

GOIS, S. DE; HOUHOU, L.; ODA, Y.; et al. Is RE1/NRSE a common cis-regulatory sequence for ChAT and VACHT genes? **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36683–90, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973977>>.

GRIDER, J. R. Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. **The American journal of physiology**, v. 264, n. 2 Pt 1, p. G334–40, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8447417>>.

GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. Colonic peristaltic reflex: identification of vasoactive intestinal peptide as mediator of descending relaxation. **The American journal of physiology**, v. 251, n. 1 Pt 1, p. G40–G45, 1986.

GRUENDLING, A. P.; MASSAGO, M.; TESTON, A. P. M.; et al. Impact of benzimidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 6, p. 1178–89, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940197>>.

GUILLÉN-PERNÍA, B.; LUGO-YARBUH, A.; MORENO, E. [Digestive tract dilation in mice infected with *Trypanosoma cruzi*]. **Investigación clínica**, v. 42, n. 3, p. 195–209, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11552508>>.

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

HENNIG, G. W.; GREGORY, S.; BROOKES, S. J. H.; COSTA, M. Non-peristaltic patterns of motor activity in the guinea-pig proximal colon. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 22, n. 6, 2010.

HUTSON, J. M.; CHOW, C. W.; BORG, J. Intractable constipation with a decrease in substance P-immunoreactive fibres: is it a variant of intestinal neuronal dysplasia? **Journal of pediatric surgery**, v. 31, n. 4, p. 580–3, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8801318>>.

IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; MAIOLINO, P.; CAPASSO, F. Nitric oxide-donating compounds and cyclic GMP depress the spontaneous contractile activity of the isolated rabbit jejunum. **Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 109–13, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8902875>>.

JABARI, S.; OLIVEIRA, E. C. DE; BREHMER, A.; SILVEIRA, A. B. M. DA. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochemistry and cell biology**, v. 142, n. 3, p. 235–44, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059649>>.

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

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, 1993.

KIMATA, H.; FUJIMOTO, M. Vasoactive intestinal peptide specifically induces human IgA1 and IgA2 production. **European journal of immunology**, v. 24, n. 9, p. 2262–5, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522170>>.

KING, S. K.; SUTCLIFFE, J. R.; ONG, S.-Y.; et al. Substance P and vasoactive intestinal peptide are reduced in right transverse colon in pediatric slow-transit constipation. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 22, n. 8, p. 883–92, e234, 2010.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20529207>>.

KNOWLES, C. H.; SCOTT, S. M.; WELLMER, A.; et al. Sensory and autonomic neuropathy in patients with idiopathic slow-transit constipation. **The British journal of surgery**, v. 86, n. 1, p. 54–60, 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027360>>.

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

KOCH, T. R.; CARNEY, J. A.; GO, L.; GO, V. L. Idiopathic chronic constipation is associated with decreased colonic vasoactive intestinal peptide. **Gastroenterology**, v. 94, n. 2, p. 300–10, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2446945>>.

KONN, W.; POTHOUKAKIS, C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, p. 23–40, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192554>>.

KOVSCA JANJATOVIC, A.; VALPOTIC, H.; KEZIC, D.; et al. Secretion of immunomodulating neuropeptides (VIP, SP) and nitric oxide synthase in porcine small intestine during postnatal development. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, n. 3, p. 30, 2012. Disponível em: <<http://ejh.it/index.php/ejh/article/view/ejh.2012.e30>>.

LENTLE, R. G.; JANSSEN, P. W. M.; ASVARUJANON, P.; et al. High-definition spatiotemporal mapping of contractile activity in the isolated proximal colon of the rabbit. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 178, n. 3, p. 257–268, 2008.

LEY, V.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N. W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **The Journal of experimental medicine**, v. 171, n. 2, p. 401–413, 1990.

LI, M.; JOHNSON, C. P.; ADAMS, M. B.; SARNA, S. K. Cholinergic and nitrenergic regulation of in vivo giant migrating contractions in rat colon. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 283, n. 3, p. G544–52, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181166>>.

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

LORTON, D.; BELLINGER, D. L.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L. Substance P innervation of spleen in rats: nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the spleen. **Brain, behavior, and immunity**, v. 5, n. 1, p. 29–40, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1712652>>.

LOURENSEN, S.; MILLER, K. G.; BLENNERHASSETT, M. G. Discrete responses of myenteric neurons to structural and functional damage by neurotoxins in vitro. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 297, n. 1, p. G228–G239, 2009.

MARTINEZ-CUESTA, M. A.; ESPLUGUES, J. V.; WHITTLE, B. J. Modulation by nitric oxide of spontaneous motility of the rat isolated duodenum: role of tachykinins. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 6, p. 1335–40, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8832054>>.

MASAOKA, T.; VANUYTSEL, T.; VANORMELINGEN, C.; et al. A spontaneous animal model of intestinal dysmotility evoked by inflammatory nitrenergic dysfunction.

**PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

MOLINA-BERRÍOS, A.; CAMPOS-ESTRADA, C.; LAPIER, M.; et al. Benznidazole prevents endothelial damage in an experimental model of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 127, n. 1, p. 6–13, 2013.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MONTGOMERY, S. P.; STARR, M. C.; CANTEY, P. T.; EDWARDS, M. S.;

MEYMANDI, S. K. Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 814–818, 2014. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.13-0726>>.

MOREIRA, M. D.; BREHMER, A.; OLIVEIRA, E. C. DE; et al. Regenerative process evaluation of neuronal subclasses in chagasic patients with megacolon. **Human immunology**, v. 74, n. 2, p. 181–8, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220499>>.

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

MOURELLE, M.; GUARNER, F.; MONCADA, S.; MALAGELADA, J. R. The arginine/nitric oxide pathway modulates sphincter of Oddi motor activity in guinea pigs and rabbits. **Gastroenterology**, v. 105, n. 5, p. 1299–305, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693540>>.

NEUNLIST, M.; TOUMI, F.; ORESCHKOVA, T.; et al. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 285, n. 5, p. G1028–36, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881224>>.

OLIVEIRA, R. B. DE; TRONCON, L. E. A.; DANTAS, R. O.; MENEGHELLI, U. G. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **American Journal of Gastroenterology**, 1998.

PALMEIRO-ROLDÁN, R.; FONSECA-BERZAL, C.; GÓMEZ-BARRIO, A.; et al.

Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1-2, p. 110–117, 2014.

PAPADOPOULOU, A.; CLAYDEN, G. S.; BOOTH, I. W. The clinical value of solid marker transit studies in childhood constipation and soiling. **European journal of pediatrics**, v. 153, n. 8, p. 560–4, 1994. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957401>>.

PARSONS, A. M.; SEYBOLD, V. S.; CHANDAN, R.; et al. Neurokinin receptors and mucosal ion transport in porcine jejunum. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 261, n. 3, p. 1213–21, 1992. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376358>>.

PASCUAL, D. W.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R. The enteric nervous and immune systems: interactions for mucosal immunity and inflammation. **ImmunoMethods**, v. 5, n. 1, p. 56–72, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531102>>.

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

- PERNOW, B. Substance P. **Pharmacological reviews**, v. 35, n. 2, p. 85–141, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6196797>>.
- PETERSON, J. K.; BARTSCH, S. M.; LEE, B. Y.; DOBSON, A. P. Broad patterns in domestic vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission dynamics: synanthropic animals and vector control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 537, 2015. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/537>>.
- PHILLIPS, R. J.; KIEFFER, E. J.; POWLEY, T. L. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 106, n. 2, p. 69–83, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878075>>.
- PITTELLA, J. E. Central nervous system involvement in experimental Trypanosomiasis cruzi. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1991.
- POPPER, P.; MANTYH, C. R.; VIGNA, S. R.; MAGGIO, J. E.; MANTYH, P. W. The localization of sensory nerve fibers and receptor binding sites for sensory neuropeptides in canine mesenteric lymph nodes. **Peptides**, v. 9, n. 2, p. 257–67, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2453853>>.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.
- RAFIKOV, R.; FONSECA, F. V.; KUMAR, S.; et al. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **Journal of Endocrinology**, v. 210, n. 3, p. 271–284, 2011.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979>>.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010b.
- RIVERA, L. R.; POOLE, D. P.; THACKER, M.; FURNESS, J. B. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 23, n. 11, p. 980–8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21895878>>.
- ROMANA, C. The developmental cycle of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas 1909. in its tissular and hematic phases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 1, p. 255–269, 1956.
- ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G.; BESTETTI, R. B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 8, p. e94–e109, 2003.
- ROTHKÖTTER, H. J.; SOWA, E.; PABST, R. The pig as a model of developmental immunology. **Human & experimental toxicology**, v. 21, n. 9-10, p. 533–6, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458912>>.
- SAID, S. I.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 169, n. 3951, p. 1217–8, 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5450698>>.
- SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 49, n. 2, p. 115–21, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7806764>>.
- SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system.

- Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Suppl 1, p. 55–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066006>>.
- SCHUY, J.; SCHLABRAKOWSKI, A.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Quantitative estimation and chemical coding of spiny type I neurons in human intestines. **Cells, tissues, organs**, v. 193, n. 3, p. 195–206, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975253>>.
- SHAPIRA, S.; KADAR, T.; WEISSMAN, B. A. Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. **Brain Research**, v. 668, n. 1-2, p. 80–84, 1994.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir956>>.
- SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 8, p. s314–s325, 2003.
- SILVEIRA, A. B. M. DA; FREITAS, M. A. R.; OLIVEIRA, E. C. DE; et al. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1154–6, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554673>>.
- SMITH, T. K.; MCCARRON, S. L. Nitric oxide modulates cholinergic reflex pathways to the longitudinal and circular muscle in the isolated guinea-pig distal colon. **Journal of Physiology**, v. 512, n. 3, p. 893–906, 1998.
- SOUTHWELL, B. R.; KOH, T. L.; WONG, S. Q.; et al. Decrease in nerve fibre density in human sigmoid colon circular muscle occurs with growth but not aging. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 22, n. 4, p. 439–45, e106, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840272>>.
- SOUZA, A. P.; OLIVIERI, B. P.; CASTRO, S. L. DE; ARAÚJO-JORGE, T. C. Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. **Parasitology research**, v. 86, n. 10, p. 800–808, 2000.
- SOUZA, M. M. DE; ANDRADE, S. G.; BARBOSA, A. A.; et al. *Trypanosoma cruzi* Strains and Autonomic Nervous System Pathology in Experimental Chagas Disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 217–224, 1996.
- SPENCER, N. J.; DICKSON, E. J.; HENNIG, G. W.; SMITH, T. K. Sensory elements within the circular muscle are essential for mechanotransduction of ongoing peristaltic reflex activity in guinea-pig distal colon. **The Journal of physiology**, v. 576, n. Pt 2, p. 519–531, 2006.
- SPENCER, N. J.; HENNIG, G. W.; SMITH, T. K. Stretch-activated neuronal pathways to longitudinal and circular muscle in guinea pig distal colon. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 284, n. 2, p. G231–G241, 2003.
- SPENCER, N. J.; SMITH, T. K. Simultaneous intracellular recordings from longitudinal and circular muscle during the peristaltic reflex in guinea-pig distal colon. **Journal of Physiology**, v. 533, n. 3, p. 787–799, 2001.
- STEAD, R. H.; TOMIOKA, M.; QUINONEZ, G.; et al. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**



- America**, v. 84, n. 9, p. 2975–9, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2437589>>.
- SZILVASSY, Z.; NAGY, I.; SZILVASSY, J.; et al. Impaired nitrergic relaxation of the sphincter of Oddi of hyperlipidaemic rabbits. **European journal of pharmacology**, v. 301, n. 1-3, p. R17–8, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8773472>>.
- TAKAHASHI, T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. **Journal of gastroenterology**, v. 38, n. 5, p. 421–30, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12768383>>.
- TAKAHASHI, T.; QOUBAITARY, A.; OWYANG, C.; WILEY, J. W. Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. **Brain research**, v. 883, n. 1, p. 15–21, 2000.
- TAKEUCHI, T.; NIIOKA, S.; KISHI, M.; et al. Nonadrenergic, noncholinergic relaxation mediated by nitric oxide with concomitant change in Ca<sup>2+</sup> level in rectal circular muscle of rats. **European journal of pharmacology**, v. 353, n. 1, p. 67–74, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721041>>.
- TANOVIĆ, A.; JIMÉNEZ, M.; FERNÁNDEZ, E. Actions of NO donors and endogenous nitrergic transmitter on the longitudinal muscle of rat ileum in vitro: mechanisms involved. **Life sciences**, v. 69, n. 10, p. 1143–54, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11508347>>.
- TANOWITZ, H. B.; BROSNAN, C.; GUASTAMACCHIO, D.; et al. Infection of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with *Trypanosoma cruzi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 31, n. 6, p. 1090–1097, 1982.
- TOMITA, R.; FUJISAKI, S.; IKEDA, T.; FUKUZAWA, M. Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation. **Diseases of the colon and rectum**, v. 45, n. 5, p. 593–600, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12004206>>.
- TOUMI, F.; NEUNLIST, M.; CASSAGNAU, E.; et al. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 15, n. 3, p. 239–42, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787332>>.
- TZAVELLA, K.; RIEPL, R. L.; KLAUSER, A. G.; et al. Decreased substance P levels in rectal biopsies from patients with slow transit constipation. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 8, n. 12, p. 1207–11, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980942>>.
- UEMURA, S.; HURLEY, M. R.; HUTSON, J. M.; CHOW, C. W. Distributions of substance P- and VIP-immunoreactive nerve fibres in the colonic circular muscle in children. **Pediatric surgery international**, v. 14, n. 1-2, p. 66–70, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880700>>.
- WADE, P. R.; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Suppl 1, p. 19–23, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15065999>>.
- WILSON, A. J.; LLEWELLYN-SMITH, I. J.; FURNESS, J. B.; COSTA, M. The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig. **Cell and tissue research**, v. 247, n. 3, p. 497–504, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3568095>>.

YAMAJI, M.; OHTA, M.; YAMAZAKI, Y.; et al. A possible role of neurotensin in NANC relaxation of longitudinal muscle of the jejunum and ileum of Wistar rats.

**British journal of pharmacology**, v. 137, n. 5, p. 629–36, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381676>>.

YOUNÈS-CHENNOUFI, A. BEN; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; TRICOTTET, V.; et al. Persistence of Trypanosoma cruzi antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 77–83, 1988. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3140446>>.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. Nitric oxide and angiogenesis. **Journal of neuro-oncology**, v. 50, n. 1-2, p. 139–48, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245273>>.

ZYROMSKI, N. J.; DUENES, J. A.; KENDRICK, M. L.; et al. Mechanism mediating nitric oxide-induced inhibition in human jejunal longitudinal smooth muscle. **Surgery**, v. 130, n. 3, p. 489–96, 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562674>>.

**ANEXO I****UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) ROSA MARIA ESTEVES ARANTES,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Modelo experimental murino de megacólon chagásico, submetido a esta comissão pelo protocolo 377 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado com a recomendação em relação ao tempo de 24 meses até outubro de 2015.  
Aprovado com recomendação na reunião do dia 30/09/2013

Para acessar ao seu projeto clique no link:  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>  
Belo Horizonte, 01/10/2013.

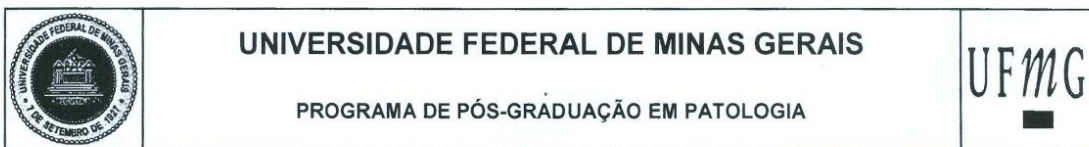
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## ANEXO II



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**PRESERVAÇÃO SELETIVA DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NITRÉRGICOS EM  
MODELO MURINO DE MEGACÓLON CHAGÁSICO**

**MAYRA FERNANDA RICCI**

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Rosa Maria Esteves Arantes - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid  
UFMG

  
Prof(a). Andre Talvani Pedrosa da Silva  
UFOP

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2016.