

Nívia Carolina Nogueira de Paiva

Avaliação do Trato Digestório de Cães *Beagle* Infectados com as
Cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* nas Fases Aguda ou
Crônica da Doença de Chagas Experimental

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto - 2011

Nívia Carolina Nogueira de Paiva

**Avaliação do Trato Digestório de Cães *Beagle* Infectados com as
Cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* nas Fases Aguda ou
Crônica da Doença de Chagas Experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Prof^a Cláudia Martins Carneiro

Co-orientadora: Prof^a Vanja Maria Veloso

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto - 2011

P149a Paiva, Nívia Carolina Nogueira de.
Avaliação do trato digestório de cães *Beagle* infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* nas fases aguda ou crônica da doença de chagas experimental [manuscrito] / Nívia Carolina Nogueira de Paiva. – 2011. xi, 75 f.: il., color; graf.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanja Maria Veloso.

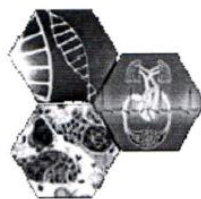
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Chagas, Doença de - Teses. 3. Cão - Teses. 4. Sistema nervoso entérico - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.9.37:616.3

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Avaliação do Trato Digestório de Cães *Beagle* Infectados com as Cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* nas Fases Aguda ou Crônica da Doença de Chagas Experimental”

Aos 24 dias do mês de fevereiro de 2011, às 14:00h, na Sala de Seminários do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Nívia Carolina Nogueira de Paiva. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovada a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Cláudia Martins Carneiro

Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro
Presidente

Eliane Lages Silva

Prof^a. Dr^a. Eliane Lages Silva
Examinadora (UFTM)

Evandro Marques

Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 24/02/2011

*“Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

(Fernando Pessoa)

“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão... que o AMOR existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim... e que valeu a pena!”

(Luís Fernando Veríssimo)

Enfim, nada foi em vão; o amor e a amizade existem e vale a pena se doar às pessoas; existem pedras no caminho, mas a vida é bela sim e SEMPRE VALE A PENA.

A todos que fizeram parte dessa história

“O Senhor é meu pastor: nada me faltará” (Salmo 22)

Obrigada pela presença e luz em todos os momentos.

À professora Cláudia Martins Carneiro, pela oportunidade e carinho. Por guiar meus passos, compreender minhas limitações e acima de tudo pela incrível orientação. Obrigada por mais essa etapa, minha eterna mestre.

À professora Vanja, pela disponibilidade e generosidade durante a co-orientação desse trabalho.

À minha querida Maria, pelo carinho e paciência durante os meus primeiros passos e sempre.

À Paula pela disponibilidade e cumplicidade. Obrigada por fazer parte de cada capítulo dessa história. Eterna gratidão da sua eterna aprendiz!!!!

A Kátia, amiga de todos os momentos.

À Amandinha, minha designer preferida... Obrigada por alegrar esse caminho!!!!

À Juju e Nadinha pela amizade, apoio e todas as *happy hours* com bolos e tortas.

À professora Sandra, pelo carinho, disponibilidade e pela contribuição durante a realização deste trabalho.

À Lauren pelo apoio e agradável companhia durante a realização da PCR.

À Thaís, Flávia e Luiza pela disponibilidade e carinho com que sempre me ajudaram durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colaboradores, por tornarem esse trabalho possível.

À todos os amigos do LIMP pelo constante apoio: Lucilene, Ana, Tânia, Phillipe, Sheler, Samuca e Mi, Bruno, Rodrigo, Caio, Caroline, Henrique, Wendel, Kélvinson, Gleice, Fernando, Levi, Jamille, Lígia, Liliane, Larissa, Samantha, Gisele, Rori, João Paulo, Fábio, Daiane.

Aos professores Rodolfo Giunchetti e Wanderson Lima, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos.

Ao professor Alexandre Reis, exemplo de paixão pelo que faz. Obrigada por inspirar, desde o início, a minha caminhada acadêmica.

À Cida pela disponibilidade e carinho.

Ao meu pai, exemplo de perseverança. Obrigada por tornar meus sonhos possíveis! E à minha mãe, meu anjo.

À minha família, por compreenderem minha ausência e nunca se esquecerem desta prima-irmã, sobrinha, neta que ama muito vocês!!!!!!

Ao meu irmão “Dri”, maior razão da minha vida.

À alguém muito especial, pela compaixão e solidariedade. Obrigada por devolver vida às cores e cores à minha vida!!!

À minhas irmãs Alquimistas, pela amizade e segurança. É muito bom saber que vocês estão aqui!!!!!!

A Joyce e a Deborinha por me acolherem com tanto carinho. Amizade à primeira vista também existe!!!!!!

Ao meu amor, Carlos Henrique, por estar sempre ao meu lado e tornar tudo mais leve.

Laboratório de Imunopatologia
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Prof^a. Cláudia Martins Carneiro
Prof^a. Vanja Maria Veloso
Prof^a. Sandra Aparecida de Lima Moura
Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Mestranda Kátia da Silva Fonseca

Laboratório de Doença de Chagas
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Prof^a. Maria Terezinha Bahia
Msc. Ivo Caldas
Msc. Lívia Figueiredo

Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Centro de Biociências - UFRN

Prof. Paulo Marcos da Matta Guedes

1. Introdução	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	2
1.2 Patogênese da DC e a Variabilidade Intraespecífica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.3 Trato Gastrointestinal e o Sistema Nervoso Entérico.....	8
1.4 Envolvimento do Trato Gastrointestinal na Doença de Chagas	14
2. Objetivo	19
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. Material e Métodos.....	21
3.1 Atividades Previamente Realizadas.....	22
3.1.1 Animais.....	22
3.1.2 Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
3.1.3 Infecção dos Cães e Parasitemia.....	23
3.1.4 Necropsia, Coleta, Fixação e Processamento do Material para Microscopia Óptica	23
3.1.5 Avaliações Parasitológicas e Histopatológicas.....	24
3.2 Atividades Realizadas neste Estudo	26
3.2.1 Parasitismo Tecidual.....	26
3.2.2 Processo Inflamatório	27
3.2.3 Neoformação de Colágeno	28
3.2.4 Plexo de Auerbach.....	29
3.2.5 Análises Estatísticas	30
4. Resultados	33
4.1 Parasitismo Tecidual	34
4.2 Processo Inflamatório	35
4.3 Neoformação de Colágeno	38
4.4 Plexo de Auerbach.....	40
4.5 Análises de Correlação e Associação	49
5. Discussão	50
6. Conclusões	62
7. Referências Bibliográficas	64

- Figura 1:** Organização histológica geral do trato gastrointestinal, evidenciando as quatro túnicas (mucosa, submucosa, muscular e serosa) e sua inervação intrínseca, representada pelos principais plexos do sistema nervoso entérico (Plexo de Meissner e Plexo de Auerbach) e extrínseca, incluindo as fibras nervosas do sistema nervoso simpático e parassimpático..... 13
- Figura 2:** Delineamento experimental, ilustrando as atividades previamente realizadas... 25
- Figura 3:** Delineamento experimental, ilustrando as atividades realizadas neste estudo... 32
- Figura 4:** Parasitismo tecidual no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda ou crônica da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 34
- Figura 5:** Gel de poliacrilamida representativo da amplificação, pela PCR, do kDNA do *Trypanosoma cruzi* obtido em amostras de esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 34
- Figura 6:** Análise morfométrica do processo inflamatório no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fase agudas ou crônica da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 35
- Figura 7:** Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados ou infectados com as cepa Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Hematoxilina-Eosina..... 36
- Figura 8:** Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon de cães *Beagle* não-infectados ou infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Hematoxilina-Eosina.. 37
- Figura 9:** Avaliação quantitativa de colágeno total solúvel no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda ou crônica da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 38
- Figura 10:** Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago e cólon de cães *Beagle* não-infectados ou infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Picrosírius-Red..... 39
- Figura 11:** Avaliação morfométrica da área PGP 9.5-IR no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda ou crônica da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. 40

- Figura 12:** Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados ou infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5..... 41
- Figura 13:** Avaliação quantitativa de neurônios ganglionares do plexo de Auerbach no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda ou crônica da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 42
- Figura 14:** Avaliação morfométrica da área nuclear, citoplasmática e do corpo celular de neurônios ganglionares do plexo de Auerbach no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda ou crônica da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 44
- Figura 15:** Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados ou infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5. 45
- Figura 16:** Avaliação morfométrica dos componentes enterogliais GFAP-IR nos gânglios do plexo de Auerbach no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda ou crônica da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..46
- Figura 17:** Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados ou infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Imuno-histoquímica anti-GFAP. 47
- Figura 18:** Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon de cães *Beagle* não-infectados ou infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Imuno-histoquímica anti-GFAP.. 48

- Be-78:** Cepa Berenice-78
- DAI:** Dias Após a Infecção
- DC:** Doença de Chagas
- DNA:** Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP:** Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
- DTU:** *Discret Typing Units*
- EGC:** Células Gliais Entéricas
- GFAP:** Proteína Acídica Fibrilar da Glia
- H₂O₂:** Peróxido de Hidrogênio
- HCl:** Ácido Clorídrico
- HE:** Hematoxilina-Eosina
- ICC:** Células Intersticiais de Cajal
- IPANS:** Neurônios Intrínsecos Aferentes Primários
- IR:** Imunorreativo
- KCl:** Cloreto de Potássio
- MgCl:** Cloreto de Magnésio
- NaOH:** Hidróxido de Sódio
- NI:** Não-infectados
- NPY:** Neuropeptídeo Y
- pb:** Pares de Base
- PBS:** Tampão Salina-Fosfato
- PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase
- PGP 9.5:** Proteína Gene Produzida 9.5
- SMF:** Sistema Mononuclear Fagocitário
- SNA:** Sistema Nervoso Autônomo
- SNE:** Sistema Nervoso Entérico
- SNP:** Sistema Nervoso Parassimpático
- SNS:** Sistema Nervoso Simpático
- TGI:** Trato Gastrointestinal
- TH:** Tirosina Hidroxilase
- TS:** Tripomastigostas Sanguíneas

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, apresenta uma ampla variabilidade intraespecífica que determina a existência de subpopulações com características genéticas, morfológicas, moleculares e bioquímicas distintas. Este polimorfismo tem sido associado ao desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas e suas implicações epidemiológicas. Neste contexto, a forma digestiva parece estar ausente na América Central, México e Venezuela, porém em países como Brasil e Bolívia pode ocorrer sozinha ou em associação com a forma cardíaca. O megaesôfago e o megacólon, manifestações mais comuns da forma digestiva, são caracterizados por acalásia e obstrução parcial/total do cólon, respectivamente. Achados histopatológicos demonstram o envolvimento do sistema nervoso entérico na patogênese dessas visceromegalias, porém poucos estudos têm abordado qual é o limite de desnervação necessário para as alterações da motilidade. Neste trabalho, cães da raça *Beagle* foram infectados com as cepas Y ou Berenice-78 do *T. cruzi* e necropsiados durante as fases aguda (30 dias após infecção-DAI) ou crônica (730 DAI) da doença experimental para avaliação histopatológica do esôfago e cólon. Ambas as cepas foram capazes de infectar o esôfago e o cólon e provocar resposta inflamatória durante a fase aguda. Na fase crônica, a PCR convencional detectou parasitismo tecidual apenas no grupo infectado com a cepa Be-78 o que poderia estar relacionado com a manutenção do processo inflamatório neste grupo. Apenas nos animais infectados com a cepa Y foi observada fibrose na fase crônica. Desnervação dos gânglios mientéricos foi observada na infecção com ambas as cepas durante a fase aguda, porém na fase crônica a desnervação foi persistente apenas nos animais infectados com a cepa Be-78. O comprometimento das células gliais foi precoce nos animais infectados com a cepa Y enquanto os animais infectados com a cepa Be-78 apresentaram redução de células gliais entéricas GFAP-IR apenas na fase crônica. Estes resultados sugerem que embora as duas cepas sejam capazes de provocar lesões no trato digestório, a cepa Y controla precocemente essas alterações, enquanto a cepa Be-78 sustenta as alterações ao longo da infecção experimental, sugerindo o desenvolvimento de lesões digestivas crônicas.

The flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, presents a wide intraspecific variability that determines the existence of subpopulations with distinct genetic, morphological, molecular and biochemical features. This polymorphism has been associated with the development of different clinical forms of Chagas disease and its epidemiological implications. In this context, the digestive form seems to be absent in Central America, Mexico and Venezuela, but in countries like Brazil and Bolivia may occur alone or in combination with the cardiac form. Megaesophagus and megacolon, the most common manifestations of the digestive form, are characterized by achalasia and colon partial /total obstruction, respectively. Histopathologic findings demonstrate the involvement of enteric nervous system in these visceromegalies pathogenesis, but few studies have addressed the limit of what is necessary for denervation changes in motility. In this study, *Beagle* dogs were infected with strains Y or Berenice-78 of *T. cruzi* and necropsied during the acute phase (30 days post infection-DPI) or chronic (730DPI) of the experimental disease for esophagus and colon *post-mortem* histopathological evaluation. Both strains were able to infect the esophagus and colon and cause an inflammatory response during the acute phase. In the chronic phase, the conventional PCR detected only tissue parasitism in the group infected with Be-78 strain that is associated with the inflammatory process maintenance in this group. Only in animals infected with the Y strain was observed fibrosis in chronic phase. Denervation of myenteric ganglia was observed in infection with both strains during the acute phase, but in chronic phase, denervation was persistent only in animals infected with Be-78 strain. The glial cells involvement was earlier in animals infected with Y strain while animals infected with Be-78 strain showed a reduction in enteric glial cells GFAP-IR only in the chronic phase. These results suggest that although the two strains are capable of causing injury in the digestive tract, the Y strain control these changes earlier, while the Be-78 strain sustain alterations throughout the experimental infection, suggesting the development of chronic digestive lesions.

1. Introdução

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC), é um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Tripanosomatidae que infecta o homem e uma ampla variedade de mamíferos domésticos e silvestres. Os principais hospedeiros invertebrados, vetores da DC, são insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Durante seu repasto sanguíneo, o triatomíneo elimina formas tripomastigotas metacíclicas que podem penetrar no hospedeiro vertebrado através da pele ou mucosa adjacente infectando, principalmente, células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). No interior dessas células, as formas tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em formas amastigotas, arredondadas e com flagelo involuído, que dão início a uma série de replicações. Após vários ciclos de multiplicação as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberadas na corrente sanguínea prontas para infectar outras células hospedeiras e dar início a novas replicações, disseminando a infecção para os diferentes tecidos e órgãos. O ciclo biológico do *T. cruzi* continua quando o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas sanguíneas durante hematofagia em mamíferos infectados. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas se transformam nas formas epimastigotas (não-infectivas) e seguem para o intestino onde se reproduzem extracelularmente por divisão binária simples. Uma vez que elas alcançam o reto, as epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que podem ser eliminadas nas fezes do triatomíneo durante o seu repasto sanguíneo reiniciando o ciclo (BRENER, 1987).

A via de transmissão vetorial, descrita acima, representa a principal e mais frequente forma de transmissão, sendo o *Triatoma infestans*, o *Rhodnius prolixus* e o *Triatoma dimidiata* os mais importantes vetores no ciclo doméstico da DC (WHO, 2002; ZELEDÓN & RABINOVICH, 1981). O *Triatoma infestans*, embora atualmente considerado erradicado no Brasil (ROCHA-SILVA & RODRIGUES, 2000; DIAS, 1997), é historicamente associado às regiões endêmicas sub-amazônicas, enquanto as espécies *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* geralmente são encontradas ao norte da América do Sul e Central, sendo que o último alcança o norte do México (WHO, 2002; ZELEDÓN, 1981). No entanto, a DC ainda pode ser transmitida por mecanismos não-vetoriais através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão vertical da mãe para o feto,

acidentes de laboratório e ainda por via oral (BERN *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2006; PRATA, 2001).

No contexto epidemiológico, segundo a Organização Mundial de Saúde, o número estimado de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* é de aproximadamente 10 milhões, distribuídas em 21 países da América Latina, onde a doença ainda é considerada endêmica com predomínio da transmissão vetorial, como Argentina, Chile, Bolívia, Venezuela e Colômbia, e em regiões não-endêmicas como Canadá, Estados Unidos, Austrália, Japão, França, Itália, Espanha, Portugal e Bélgica (WHO, 2010). Nesses últimos a incidência da DC está relacionada a mecanismos de transmissão não-vetoriais facilitados por fenômenos de mobilidade populacional (SCHMUNIS *et al.*, 2007; WHO 2010). No Brasil, um inquérito sorológico nacional para DC, realizado entre os anos 1975 e 1980, estimou uma soroprevalência de 4,22%, no entanto, com o controle da transmissão vetorial, a incidência da DC no país caiu para 1,3% no ano de 1995 (BOCANEGRA, 2008; AKHAVAN, 2000). As maiores prevalências foram encontradas no Rio Grande do Sul (8,84%), Minas Gerais (8,83%), Goiás (7,40%), Sergipe (5,97%) e Bahia (5,44%) (BOCANEGRA, 2008; CAMARGO *et al.*, 1984).

Na doença humana ocorrem duas fases distintas. A fase aguda, que dura aproximadamente dois a quatro meses, é geralmente assintomática, entretanto, os sinais e sintomas, quando presentes, estão mais frequentemente relacionados ao estado imunológico e nutricional do hospedeiro, a cepa do parasito e inóculo (quantidade e fonte) entre outros fatores. Esta fase é caracterizada por uma elevada parasitemia e parasitismo tecidual, processo inflamatório intenso, quadro toxêmico febril e clínico fugaz (revisado por GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). Após a fase aguda, inicia-se a fase crônica da doença, que se perpetua por toda a vida do hospedeiro vertebrado. Nessa fase os níveis de parasitemia tornam-se subpatentes, devido ao controle da proliferação do parasito pelo sistema imune. A maioria dos indivíduos (70%) permanece na forma indeterminada que é caracterizada por positividade para anticorpos contra *T. cruzi* no soro e pela ausência de alterações nos exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen (DIAS, 1995; ANDRADE *et al.*, 1997). Porém, alguns indivíduos, cerca de 20 a 35%, desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo (SNA) do coração, esôfago e/ou cólon, podendo desenvolver formas clínicas caracterizadas pelo envolvimento desses órgãos (MONCAYO, 2003; PRATA, 2001).

A cardiomiopatia chagásica é caracterizada por alterações eletrocardiográficas como bloqueio atrioventricular, extra-sístoles ventriculares, síndrome do nódulo sinusal e taquicardia supraventricular (revisado por GASCÓN *et al.*, 2007). As manifestações clínicas incluem arritmias, tromboembolismo periférico, aneurisma de ponta, insuficiência cardíaca congestiva podendo ocorrer morte súbita (LARANJA *et al.*, 1956). Em relação à forma digestiva, embora lesões associadas ao intestino delgado (megaduodeno, megajejuno e/ou megaíleo) possam ocorrer, o megaesôfago e o megacólon são as manifestações gastrointestinais mais comuns da DC, ocorrendo em áreas endêmicas numa taxa de 15-20% dos pacientes chagásicos, associada ou não à forma cardíaca (PRATA, 2001). No megaesôfago pode-se observar relaxamento anormal do esfíncter esofageal e diminuição da peristalse caracterizando uma alteração motora conhecida como acalásia com disfagia, regurgitação, pirose e dor torácica, enquanto o megacólon está associado à constipação crônica, com obstrução parcial a total de segmentos colônicos (em especial, no segmento retossigmóide) e complicações como desnutrição e vólculo (torção) sigmóide (SÁNCHEZ-GUILLEN *et al.*, 2006; PRATA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1998; REZENDE, 1984).

A relação entre as alterações patofisiológicas observadas na doença crônica e as lesões desenvolvidas ainda na fase aguda e destas com os níveis de parasitemia e à carga parasitária tecidual ainda geram observações muito conflitantes (PARADA *et al.*, 1997). Resultados obtidos por Andersson e colaboradores (2003) mostraram que a gravidade das alterações da fase aguda não necessariamente define o eventual resultado da fase crônica. Nesse estudo, camundongos C57BL/6 infectados com a cepa CA-1 apresentaram níveis baixos de parasitemia e mortalidade, porém, desenvolveram inflamação crônica intensa, enquanto camundongos BALB/c infectados com a cepa Tulahuen tiveram maiores níveis de parasitemia e 50% de mortalidade, no entanto não desenvolveram inflamação crônica, o que sugeriria a participação de outros fatores relacionados, por exemplo, características inerentes à cepa e ao hospedeiro. Dessa forma, variação genotípica entre linhagens do *T. cruzi* poderia explicar a variabilidade na virulência, susceptibilidade à resposta imune do hospedeiro, tropismo tecidual e sintomas clínicos da DC (HIGO *et al.*, 2004).

1.2 Patogênese da DC e a Variabilidade Intraespecífica do *Trypanosoma cruzi*

A escassez de parasitos detectados pela microscopia óptica convencional nas lesões teciduais ou no sangue durante a fase crônica suscitou dúvidas sobre seu papel patogênico direto e, juntamente com a presença de auto-anticorpos, levantou a hipótese da autoimunidade na patogênese da DC. Contudo, essa teoria tem sido refutada experimentalmente através de técnicas mais sensíveis, como a imuno-histoquímica e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde uma forte correlação tem sido observada entre a presença do parasito e a ocorrência de lesões teciduais reforçando assim, a participação do parasito na patogênese da doença (VAGO *et al.*, 2003; LAGES-SILVA *et al.*, 2001; VAGO *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 1999; AÑES *et al.*, 1999; VAGO *et al.*, 1996; HIGUCHI *et al.*, 1993). No entanto, atualmente as teorias de autoimunidade e de manutenção de um parasitismo tecidual deixaram de ser mutuamente excludentes para se tornarem complementares (SOARES *et al.*, 2001). Neste contexto, parece que a persistência do parasito é indispensável, mas não necessariamente suficiente para causar a DC crônica (ANDERSSON *et al.*, 2003). Estudos mostram que a persistência a longo prazo do parasito parece ter um papel-chave para a manutenção de um processo inflamatório ativo capaz de causar lesões histológicas (DA SILVEIRA *et al.*, 2005; ANDERSSON *et al.*, 2003; LAGES-SILVA *et al.*, 2001; TARLETON & ZHANG, 1999), porém o mimetismo antigênico do *T. cruzi* capaz de induzir um ataque imunológico a células próprias também pode estar relacionado à patogênese das lesões (CUNHA-NETO & KALIL, 1995).

Enquanto a manutenção do parasitismo e a indução de autoimunidade estão associadas ao desenvolvimento das lesões crônicas da DC, uma característica biológica do parasito parece influenciar o histórico clínico da doença. A capacidade do *T. cruzi* de infectar vários tipos celulares garante a ele uma adaptação bem sucedida e determina a manifestação de fenômenos de cito/histotropismo (ANDRADE, 1985). A maioria das cepas apresenta preferência por células musculares (TARLETON *et al.*, 1999) e dessa forma, os principais órgãos afetados são o coração, o esôfago e o cólon, nos quais ocorrem as lesões mais graves que caracterizam as formas cardíaca e/ou digestiva da doença. No entanto, estudos comprovam a presença de alterações histológicas decorrentes da infecção

pelo *T. cruzi* no fígado, baço, pâncreas, intestino delgado, cérebro (ABREU-VIEIRA *et al.*, 2009; MENEGUELLI, 2004; HIRSCHBER *et al.*, 1994; SALDANHA *et al.*, 2001; TAFURI & BRENER, 1966a; TAFURI & RASO, 1962) entre outros órgãos. Esta habilidade do *T. cruzi* de infectar diferentes tecidos parece estar associada a variabilidade genética tanto do parasito quanto do hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 1999; VAGO *et al.*, 2000; ANDERSSON *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004).

A heterogeneidade intraespecífica do *T. cruzi* já observada por Carlos Chagas (1909) foi posteriormente estudada e confirmada por Brener & Chiari (1963). Os autores demonstraram a ocorrência de três grupos morfológicamente distintos do parasito, de acordo com a predominância de formas delgadas, largas e muito largas. Esse polimorfismo foi correlacionado ao curso clínico da infecção experimental de camundongos por Brener, (1965; 1969). Em 1969, Brener demonstrou que as formas delgadas penetravam mais rapidamente nas células do hospedeiro e estas eram mais susceptíveis aos mecanismos imunes, enquanto, as formas largas persistiam por um tempo maior no sangue periférico, sendo, portanto, mais resistentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro. Dessa maneira, as formas delgadas parecem mais adaptadas a penetrarem nas células que as formas largas e muito largas, que tendem a acumular-se no sangue (BRENER, 1969). Corroborando com essa hipótese, as taxas de mortalidade foram maiores nos animais infectados com as cepas constituídas predominantemente por formas delgadas quando comparadas às cepas constituídas por formas largas ou muito largas, onde muitos dos animais sobreviveram até a fase crônica (BRENER, 1965), indicando que o curso da infecção poderia depender da predominância relativa de uma forma sobre a outra. Estudos posteriores realizados por Guedes e colaboradores (2007) revelaram que a cepa Y possuía 91% de formas delgadas, enquanto a cepa Berenice-78 (Be-78) era constituída predominantemente por formas largas (90%). Essas características foram correlacionadas à infectividade dessas cepas em células de VERO, sendo confirmada a maior taxa de infectividade para a cepa com predomínio de formas delgadas, a cepa Y, em relação a cepa Be-78. Além disso, essas características das cepas Y e Berenice-78 são associadas a diferenças em relação à parasitemia. Estudos utilizando o cão como modelo experimental mostram que a cepa Be-78 apresenta período pré-patente e pico de parasitemia tardios em relação a cepa Y, e ainda, os animais infectados com a cepa Y são capazes de controlar a parasitemia mais rapidamente que os animais infectados com a cepa Be-78 (VELOSO *et al.*, 2008; CAMARGOS *et al.*, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2007). Em relação ao

histotropismo dessas cepas, achados histológicos em modelo murino indicam outra diferença entre essas duas cepas, sendo a cepa Y caracterizada por um tropismo preferencial para macrófagos e a cepa Be-78, por parasitismo predominante em células musculares, o que as classifica como reticulotrópicas ou miotrópicas, respectivamente (MELO & BRENER, 1978).

Estas diferenças morfológicas e biológicas somadas às características genéticas, bioquímicas e moleculares do parasito e ao advento de técnicas cada vez mais sensíveis determinaram o surgimento de diferentes classificações para as subpopulações do *T. cruzi*. Atualmente, uma classificação geral em *Discrete Typing Units* (DTU) identifica as cepas do *T. cruzi* em grupos geneticamente mais relacionados baseada em características genéticas e biológicas: *TcI*, *TcII*, *TcIII*, *TcIV*, *TcV* e *TcVI* (ZINGALES *et al.*, 2009).

Além das características inerentes à cepa, fatores relacionados ao hospedeiro também parecem ser importantes para o estabelecimento das diferentes formas clínicas da DC. Estudos realizados por Andrade e colaboradores (1999) envolvendo duas diferentes populações do *T. cruzi*, JG e Col1.7G2, originalmente isoladas de pacientes com formas clínicas distintas da DC, mostraram alteração no padrão de histotropismo. A cepa JG, isolada de um paciente com megaesôfago, causou parasitismo cardíaco em camundongos infectados por ela isoladamente ou em associação com a cepa Col1.7G2. Para os autores, na infecção mista pode ter havido uma interação entre as duas cepas que foi capaz de alterar a colonização tecidual, no entanto, a inversão de histotropismo observada na infecção apenas com a cepa JG confirma o envolvimento de características do hospedeiro. Mais evidências sobre a participação de aspectos genéticos do hospedeiro sobre aspectos patogênicos das distintas formas clínicas da DC foram obtidas em estudos posteriores, analisando as respostas de diferentes linhagens de camundongos, C57BL/6 e *Swiss versus* BALB/c e DBA-2, à infecção com uma mistura das cepas JG e Col1.7G2 (Andrade *et al.*, 2002). Para os camundongos BALB/c e DBA-2, o mesmo padrão de distribuição tecidual foi observado, com predominância da cepa JG no coração e Col1.7G2 no reto e demais tecidos. No entanto, camundongos C57BL/6 e *Swiss* apresentaram maior parasitismo cardíaco em relação à cepa Col1.7G2, enquanto que, a cepa JG parasitou preferencialmente o reto e demais tecidos. Dessa forma, a distinta distribuição tecidual observada para BALB/c e DBA-2 *versus* C57BL/6 e *Swiss* foi associada às diferenças entre os perfis genéticos destes animais (ANDRADE *et al.*, 2002).

Assim como observado em modelos experimentais, a influência dos perfis genotípicos das linhagens do *T. cruzi* e as diferenças imunológicas/genéticas observadas entre as populações humanas parecem estar relacionadas à ocorrência variável das três mais importantes formas clínicas da DC na América Latina. A forma digestiva é principalmente atribuída ao *TcII* (VIRREIRA *et al.*, 2006; ZINGALES *et al.*, 1998; MILES *et al.*, 1981). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a distribuição das diferentes linhagens do *T. cruzi* varia geograficamente, sendo *TcI* prevalente na América Central e na região norte da América do Sul, enquanto as outras linhagens (*TcII-VI*) são encontradas predominantemente ao sul da América do Sul. Na região central da América do Sul (Brasil e Bolívia) parece ocorrer uma sobreposição entre as linhagens do *T. cruzi* (HIGO *et al.*, 2004). Na Bolívia, as subpopulações pertencentes ao *TcIId* (atual *TcV* em ZINGALES *et al.*, 2009) são as mais comumente encontradas, seguidas pela linhagem *TcI*, e não parecem estar associadas a nenhuma forma clínica específica, cujo desenvolvimento deve relacionar-se mais a fatores relacionados ao hospedeiro (DEL PUERTO *et al.*, 2010). Variações com importância epidemiológica nos padrões de distribuição geográfica das linhagens do parasito têm sido observadas atualmente, por exemplo, na Colômbia, onde a cardiomiopatia, associada ao *TcI*, parece não ser mais a única forma clínica da DC e estudos de caso mostram a ocorrência da forma digestiva associada ao *TcI* (FLORÉZ *et al.*, 2010; MANTILLA *et al.*, 2010) e também a ocorrência de forma cardíaca associada ao *TcII* (ZAFRA *et al.*, 2008). Esses achados sugerem que a relação entre as formas clínicas da DC e as linhagens do *T. cruzi* ainda não são claras (FLORÉZ *et al.*, 2010). Segundo Medeiros e colaboradores (2010), cepas de ambas as linhagens *TcI* (DM28c) e *TcII* (Y ou CL-Brener) foram capazes de causar alterações da motilidade no cólon de camundongos *Swiss* confirmando a dificuldade de se estabelecer essa relação, o que sugere a necessidade de mais estudos abordando as lesões chagásicas órgão-específicas e sua relação com a presença de linhagens particulares do parasito.

1.3 Trato Gastrointestinal e o Sistema Nervoso Entérico

Responsável pelas funções de digestão e absorção de moléculas nutrientes, o trato gastrointestinal (TGI) é constituído pela cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso, reto e ânus, além de órgãos

glandulares associados como fígado, vesícula biliar, pâncreas e glândulas salivares. Com exceção dos órgãos glandulares, o trato digestório é histologicamente constituído por 4 túnicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Na túnica mucosa pode-se observar uma camada de epitélio (variável ao longo do TGI) que mantém contato direto com o lúmen do órgão; uma camada de tecido conjuntivo frouxo, colágeno e elastina, rica em vasos e glândulas, formando a lâmina própria; e uma camada delgada de musculatura lisa, denominada muscular da mucosa. A túnica submucosa pode apresentar glândulas e é constituída por tecido conjuntivo frouxo com fibrilas de colágeno e de elastina e vasos de grande calibre. Duas camadas de musculatura lisa (com exceção do terço superior do esôfago que apresenta musculatura estriada) com fibras dispostas em distintas orientações (camada muscular interna circular e camada muscular externa longitudinal) formam a túnica muscular. E por fim, a túnica serosa ou adventícia, que forma uma cápsula conjuntiva coberta por camadas mesoteliais escamosas ao redor do tubo digestório.

O funcionamento do TGI inclui fenômenos de motilidade, com propulsão (peristaltismo) e mistura do bolo alimentar ao longo de todo o trato; secreção de substâncias (enzimas, água); digestão química; e absorção das moléculas menores digeridas. Estas funções são reguladas por hormônios, produzidos localmente ou em órgãos glandulares associados (ex.: pâncreas) e agem sobre células secretoras ou musculares (ex.: esfíncteres gastrointestinais) ou por circuitos neurais. O controle neural do TGI é exercido pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA) através da inervação simpática ou parassimpática e ainda de uma divisão independente do SNA distribuída ao longo de todo o trato digestório, denominada Sistema Nervoso Entérico (SNE). De forma geral, estes sistemas trabalham integrados e neurônios do SNE são atingidos por axônios de neurônios sensoriais extrínsecos originados no sistema nervoso simpático (SNS) ou parassimpático (SNP) (FURNESS *et al.*, 2000). Porém, o SNE é caracterizado por apresentar certa autonomia na regulação das funções gastrintestinais, como secreção, motilidade, fluxo sanguíneo e controle imunológico (HANSEN *et al.*, 2003).

Além de vários plexos aganglionados, três plexos neurais ganglionados são descritos e estão distribuídos ao longo do TGI, desde o esôfago até o ânus: o plexo mucoso, o plexo submucoso ou de Meissner localizado na borda submucosa da túnica muscular; e o plexo Mientérico ou de Auerbach, observado no plano intermuscular da túnica muscular (COSTA *et al.*, 2000; FURNES, 2000). Neurônios encontrados nos plexos submucosos regulam a secreção e absorção enquanto aqueles do plexo mientérico

normalmente são responsáveis por controlar a atividade peristáltica (FURNESS & COSTA, 1987). Histologicamente estes plexos são constituídos por neurônios de várias classes e funções, células gliais e fibras do SNS e SNP.

As células gliais entéricas (EGC) são morfológica e molecularmente semelhantes aos astrócitos do Sistema Nervoso Central (SNC) e contêm o filamento intermediário ou proteína do citoesqueleto chamado proteína ácida fibrilar da glia (GFAP), vimentina e a proteína ligadora de cálcio S-100. Essas células apresentam funções citoprotetoras e tróficas, sendo importantes na barreira do TGI, uma vez que formam uma extensiva rede na mucosa intestinal próxima aos vasos sanguíneos submucosos (SAVIDGE *et al.*, 2007).

As fibras nervosas presentes nos plexos são originadas tanto em neurônios entéricos quanto em neurônios extrínsecos aferentes e eferentes. Estudos abordando a inervação intrínseca do TGI revelaram a existência de distintas categorias de neurônios que podem ser classificados de acordo com suas propriedades morfológicas, neuroquímicas e funcionais. Em relação aos critérios morfológicos, os neurônios são classificados em Dogiel tipo I ao tipo VII e neurônios gigantes (revisado por HANSEN, 2002; revisado por FURNESS, 2000). Esses critérios incluem arquitetura dos dendritos, tamanhos dos corpos celulares e sua localização dentro do gânglio e posição do núcleo (revisado por BREHMER *et al.*, 1999). Funcionalmente estas células são classificadas em: *neurônios sensoriais (neurônios intrínsecos aferentes primários-IPANs)*, capazes de transduzir estímulos físicos (ex.: distensão) em atividade elétrica; *neurônios motores excitatórios ou inibitórios*, responsáveis pela contração ou relaxamento muscular, respectivamente; *neurônios secretomotores*, que controlam a secreção do epitélio gastrointestinal; *neurônios vasomotores* associados ao controle do fluxo sanguíneo; *neurônios motores que inervam as células enteroendócrinas*, que respondem a estímulos intermediados por células enteroendócrinas e originados dentro do lúmen; e *interneurônios* que projetam-se para fora da parede gastrointestinal em direções oral (ascendente) ou aboral (descendente) alcançando gânglios simpáticos pré-vertebrais e estão envolvidos nos reflexos gastrointestinais independentes de conexões com o Sistema Nervoso Central (SNC) (FURNESS, 2000; KUNZE & FURNES, 1999). Métodos imuno-histoquímicos permitem a identificação da população total de neurônios pela expressão de HucHud, enolase e outros marcadores e de suas subpopulações, por exemplo NOS, TH e Somastatina. A proteína do gene produzida 9.5 (PGP 9.5) é uma hidrolase C-terminal, expressa no citoplasma de neurônios, utilizada como marcador pan-neuronal (THOMPSON *et al.*, 1983). Embora

algumas classes de neurônios estejam localizadas preferencialmente em um dos plexos, de um modo geral todos os tipos são encontrados distribuídos de forma aleatória entre os gânglios, não havendo nenhuma relação função/localização.

Além do controle intrínseco, o SNE é influenciado diretamente por neurônios sensoriais aferentes e fibras simpáticas e parassimpáticas, caracterizando a inervação extrínseca do TGI. Neurônios aferentes sensoriais possuem terminações nervosas dentro dos gânglios entéricos e são responsáveis pelo controle central da atividade neuronal entérica, ativando vias que causam todas as sensações gastrointestinais e dirigem reflexos mediados centralmente. Os componentes parassimpáticos que alcançam o intestino concentram-se principalmente nas regiões proximal e distal do TGI e originam-se nos nervos vagais ou pélvicos, respectivamente. Essas fibras formam varicosidades (locais de liberação de neurotransmissores) que podem fazer contato com a maioria dos neurônios entéricos e geralmente são excitatórias, agindo através do neurotransmissor acetilcolina (POWLEY, 2000) e são capazes de potencializar as respostas locais reflexas e desencadear padrões motores envolvidos no vômito e defecação. As fibras do SNS, predominantes entre o estômago e o reto, originam-se em neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH^+) localizados principalmente em gânglios pré-vertebrais (celíaco, mesentérico superior, mesentérico inferior e intermesentérico) e diferentes fenótipos inervam os gânglios mientéricos (TH^+), os vasos sanguíneos (TH^+ e Neuropeptídeo Y/ NPY^+) e os gânglios submucosos (TH^+ e Somastatina⁺), sugerindo que os processos de motilidade, secreção e fluxo sanguíneo podem ser independentemente controlados pelo SNS. Esse controle é exercido pela liberação do neurotransmissor noradrenalina e tem função de inibição pré-sináptica suprimindo as atividades espontâneas do SNE e a inervação extrínseca do SNP (HOLZER *et al.*, 2002; KUNZE & FURNES, 1999).

É sabido que a ritmicidade elétrica do TGI é razoavelmente constante e caracterizada por ondas lentas (HANSEN, 2003) e que as células musculares são incapazes de gerar ou propagar movimentos coordenados. Dessa forma o aparato motor do TGI é constituído por neurônios entéricos, células musculares esqueléticas e células intersticiais de Cajal (ICC). Estas últimas foram descritas em 1893, por Ramon Y Cajal e estão localizadas em regiões especializadas ao longo do TGI consideradas “regiões precursoras/marcapasso” onde as ondas lentas se originam. As ICCs são observadas circundando o plexo de Auerbach e irradiando para o interior das camadas musculares dispendo-se no mesmo sentido das fibras adjacentes e permanecem interconectadas e em

contato direto com neurônios entéricos e células musculares esqueléticas. Estas células funcionam como intermediárias entre as fibras nervosas do SNE e as fibras musculares lisas propagando o estímulo nervoso e determinando os fenômenos de contração ou relaxamento (FAUSSONE-PELEGRINI *et al.*, 1999; 1985; BEREZIN, 1988; THUNEBERG, 1982). O comportamento contrátil do músculo liso é dependente de eventos de despolarização e abertura de canais de cálcio (Ca^+) e a oscilação do potencial de membrana dessas células, em resposta às ondas lentas, produzem períodos alternados de maior e menor abertura de canais de Ca^+ . Essas regiões são caracterizadas por padrões de motilidade naturalmente periódicos como peristaltismo e segmentação. A força de contração pode ser controlada por neurônios entéricos excitatórios a partir do aumento da amplitude das ondas lentas com consequente aumento do influxo de Ca^+ . Em contrapartida, neurônios entéricos inibitórios podem reduzir a amplitude das ondas lentas e a força contrátil, via canais de potássio (K^+) (SANDERS *et al.*, 2006). Atualmente, as ICCs são classificadas de acordo com a localização e podem ser observadas por técnicas imunohistoquímicas a partir da marcação do receptor de superfície tirosina cinase cKit/CD117 (WARD *et al.*, 1994).

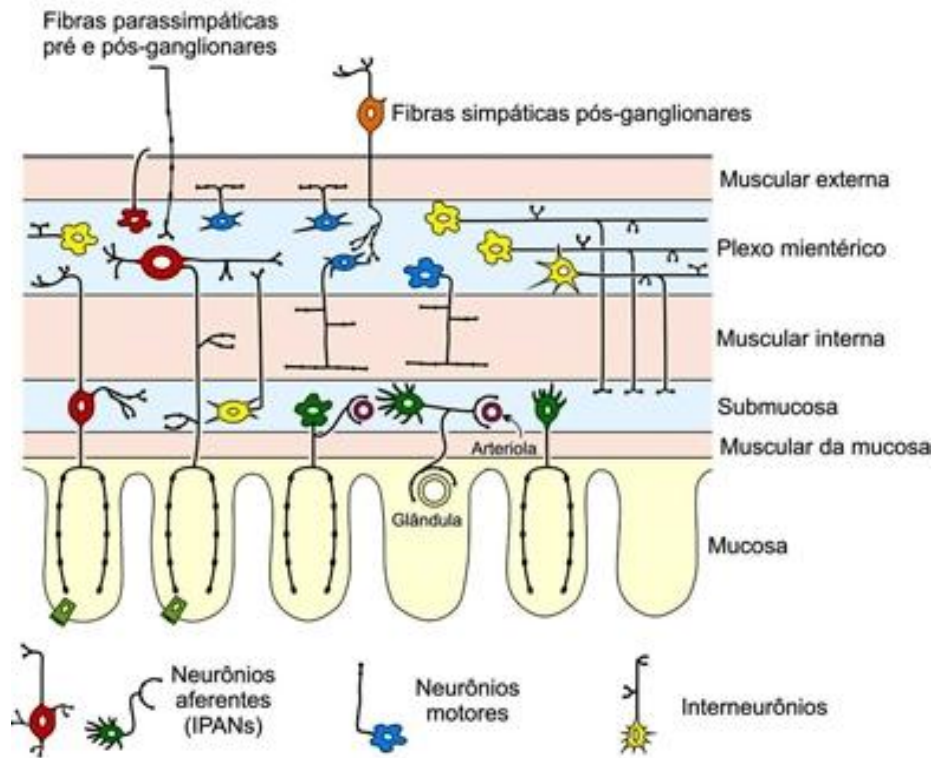


Figura 1: Representação esquemática da organização do sistema nervoso entérico. Os plexos nervosos intramurais são constituídos por regiões ganglionadas e não ganglionadas. O plexo de Meissner ou Submucoso encontra-se localizada na região de transição entre a submucosa e a muscular circular interna, enquanto o plexo de Auerbach ou Mientérico, localiza-se na região intermuscular entre as miofibras circulares e longitudinais. Ambos os plexos são caracterizados por certa autonomia no controle da motilidade do trato digestório, no entanto recebem inervação de corpos neuronais localizados fora da parede do TGI que constituem a inervação extrínseca.

Fonte: www.fiocruz.br

1.4 Envolvimento do Trato Gastrointestinal na Doença de Chagas

As mais frequentes manifestações da forma digestiva da DC são o megaesôfago e o megacólon e sua ocorrência parece ter fatores relacionados à distribuição geográfica das linhagens do *T. cruzi*, uma vez que é incomum em algumas regiões como América Central, Panamá e Venezuela. No Brasil, o comprometimento do trato digestório ocorre com frequência variável de acordo com a região do país com incidência entre 3,1% a 13% dependendo da área endêmica (BOCANEGRA, 2008; CASTRO *et al.*, 1987; DIAS *et al.*, 1983) de forma isolada ou em associação com a forma cardíaca (ANDRADE *et al.*, 1999).

A lesão chagásica do TGI é caracterizada anatomicamente por dilatação em graus variáveis, aumento do lúmen, ausência de obstrução mecânica e espessamento da parede especialmente relacionada à hipertrofia muscular. As áreas dilatadas intercalam-se aleatoriamente com regiões com aspecto normal. Microscopicamente é observado infiltrado inflamatório constituído predominantemente por células mononucleares na muscular da mucosa, submucosa e na muscular própria; ganglionite e periganglionite, especialmente circundando o plexo de Auerbach; ulceração da mucosa e fibrose intermuscular intersticial (ADAD *et al.*, 1991; TAFURI, 1971). Lesões inflamatórias regressivas do sistema nervoso intramural afetam neurônios, células gliais e fibras nervosas e são consideradas elementos essenciais na patogênese da desordem gastrointestinal (DA SILVEIRA *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010; DA SILVEIRA *et al.*, 2009; 2008; 2007a; 2005; ADAD *et al.*, 2001; LAGES-SILVA *et al.*, 2001; ADAD *et al.*, 1991; HAGGER, 2000; KÖBERLE, 1974; TAFURI *et al.*, 1971; TAFURI, 1971; 1970; TAFURI & BRENER, 1967; ANDRADE & ANDRADE, 1966; TAFURI & RASO, 1962; KÖBERLE, 1957; KÖBERLE & ALCÂNTARA, 1960).

O mecanismo patogênico das lesões no SNA ainda não é completamente compreendido, porém, durante a fase aguda, o parasitismo de células do SMF em regiões próximas aos gânglios do plexo de Auerbach pode estar associado ao dano neuronal. Para Lisboa (1960), a ruptura dessas células e liberação do parasito nessas regiões são eventos seguidos por inflamação ganglionar e periganglionar e posterior neurólise. Tem sido mostrada uma íntima relação entre a ruptura de ninhos com consequente liberação de parasitos e seus antígenos e o desenvolvimento de um processo inflamatório (TEIXEIRA *et al.*, 1970; ANDRADE & ANDRADE, 1966) capaz de causar lise celular, seja essa relação intermediada por um agente neurotóxico (KÖBERLE & ALCÂNTARA, 1960),

por uma ligação de antígenos do parasito a células adjacentes não-infectadas do hospedeiro (RIBEIRO & HUDSON, 1981; 1980) ou pela indução de autoimunidade (CUNHA-NETO & KALLIL, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1970). Ribeiro dos Santos e Hudson mostraram, tanto *in vitro* (1980) quanto *in vivo* (1981), que antígenos do *T. cruzi* podem ser adsorvidos em células de hospedeiros mamíferos tornando-as potenciais alvos para a resposta imune contra o parasito. No estudo *in vivo* camundongos C57Bl/6 foram infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e apresentaram perda de neurônios cardíacos coincidente com o pico de parasitemia e antígenos do parasito foram observados por imunofluorescência indireta sobre miofibras e neurônios adjacentes. Eles também observaram que a destruição neuronal, além de ter precedido o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por linfócitos T anti-neurônio, foi correlacionada com a resposta anti-parasito mediada por anticorpos e células T. Neste contexto, os autores sugerem que quando um ninho de parasitos é rompido, antígenos são liberados e podem associar-se à membrana de células adjacentes não-infectadas e estas “células parasito-modificadas” poderiam ser lisadas por elementos da resposta imune anti-*T. cruzi*, liberando antígenos-próprios, potencialmente imunogênicos, que poderiam induzir o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos auto-reativos (RIBEIRO DOS SANTOS & HUDSON 1981; 1980). Dessa forma, a lesão neuronal primária seria causada pelo efeito direto ou indireto do parasitismo tecidual enquanto as lesões subsequentes poderiam estar associadas à eventos de autoimunidade.

De acordo com Tafuri (1971), nas lesões chagásicas do TGI, as alterações agudas do SNE estão relacionadas à disfunção motora do órgão que resultam em acúmulo do conteúdo alimentar ou fecal na luz do trato digestório que pode comprimir a mucosa e induzir dilatação e eventos isquêmicos. A interrupção do aporte sanguíneo causa lesões regressivas da mucosa e nesta camada inicia-se um processo inflamatório, que alcança a submucosa, levando a lesões do plexo submucoso, e consecutivamente as camadas musculares, atingindo os gânglios do plexo mientérico já lesionados pela infecção aguda. O acúmulo de células inflamatórias e a manutenção destas ao longo da doença crônica estão associados à destruição tecidual e à evolução do quadro para fibrose que constitui um dos fatores responsáveis pela modificação dos componentes do interstício intermuscular e das alterações das células musculares propriamente ditas (hipertrofia e/ou alterações regressivas) como conseqüência de um maior esforço de contração devido ao aumento da resistência causada pela fibrose. Estas alterações potencializam as lesões do plexo

mientérico que estão em contato com as células musculares que tendem a ser agravadas de acordo com o tempo e intensidade da dilatação.

O comprometimento do SNE ao longo da infecção pelo *T. cruzi* tem sido comprovado por muitos autores a partir de técnicas imuno-histoquímicas, e achados histopatológicos revelam que o comprometimento não está restrito ao dano neuronal, uma vez que alterações em número e fenótipo de células gliais também são observadas (DA SILVEIRA *et al.*, 2010; 2009a; 2008; 2007a; IANTORNO, *et al.*, 2007). Iantorno e colaboradores (2007), utilizando enolase como marcador pan-neuronal e S-100 como marcador pan-glial, descreveram perda significativa de neurônios e células gliais em pacientes com megacólon chagásico. Desnervação, avaliada pela marcação de áreas PGP9.5, também foi observada em pacientes com megacólon chagásico em estudo realizado por Da Silveira e colaboradores (2007a). Estes autores também descreveram perda de células gliais entéricas S100⁺, em pacientes com megacólon chagásico ou em pacientes assintomáticos soropositivos para *T. cruzi*, porém estes últimos apresentaram aumento nas células gliais GFAP⁺ em relação aos pacientes com megacólon chagásico. Estudos em cultura celular confirmaram a presença de dois tipos de EGC, as EGC GFAP⁺ e as EGC GFAP⁻, e o aumento da expressão de GFAP nessas células, interpretado como resposta a algum trauma, foi associado ao contato com citocinas pro-inflamatórias como TNF α e IL-1 β (VON BOYEN *et al.*, 2004). Considerando que essa proteína é constituinte dos filamentos intermediários, possivelmente sua expressão está relacionada ao aumento da coesão entre as células gliais (BUNIATIAN *et al.*, 2002). Na DC, enquanto a diminuição de células gliais S100⁺ (pacientes com megacólon) pode induzir perda da homeostase e contribuir para o desenvolvimento do megacólon, o aumento de células gliais GFAP⁺ (pacientes não portadores do megacólon) parece criar uma barreira de proteção para os corpos celulares dos neurônios representando uma tentativa de proteção contra o processo inflamatório ou infecção pelo parasito (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a).

Em contraste, pacientes com DC sem envolvimento do TGI apresentaram, além do aumento da expressão de GFAP⁺, aumento de células gliais S100⁺ no esôfago. Nesse mesmo estudo também foi observado que quanto maior era a expressão de S100 e GFAP, menor era a presença de células inflamatórias e pacientes que apresentavam essa relação não apresentavam destruição neuronal, dilatação do órgão e nenhuma manifestação patofisiológica do megaesôfago (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Estes resultados foram explicados pela potencial capacidade das EGC de funcionarem como células

apresentadoras de antígenos. Essa capacidade foi demonstrada em EGC de pacientes com megacólon chagásico, onde foi observada a expressão de HLA-DR classe II e CD80/CD86 (DA SILVEIRA *et al.*, 2010). Nesse sentido, a expansão de EGC S100⁺, embora não impeça a invasão do parasito (DA SILVEIRA *et al.*, 2005), pode estar relacionada ao controle do processo inflamatório prevenindo as lesões associadas a desnervação, dilatação e perda funcional do órgão (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Além das alterações nos componentes enterogliais, o envolvimento do TGI na DC crônica tem sido associado à deficiência de ICCs (LIMA *et al.*, 2008; IANTORNO *et al.*, 2007; HAGGER *et al.*, 2000), aumento de fibrose e de mastócitos (ADAD *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003). Estudos realizados independentemente mostraram diminuição na densidade de ICCs em pacientes com megaesôfago (LIMA *et al.*, 2008) e megacólon (HAGGER *et al.*, 2000) associados à DC. As ICCs são classificadas de acordo com sua localização: ICC IM, distribuídas no plano intermuscular; ICC MY: circundando o plexo mientérico; e ICC SM: circundando o plexo submucoso. Pacientes com megacólon chagásico apresentam diminuição na densidade de ICCs MY, porém um aumento de ICCs IM, localizadas mais distante do processo inflamatório, foi observado o que foi associado à um mecanismo emergencial para compensar a atividade motora comprometida (IANTORNO *et al.*, 2007).

Estudos em modelos experimentais também têm demonstrado a presença de alterações do SNE induzidas pela infecção com o *T. cruzi* (ARANTES *et al.*, 2004). Cães podem desenvolver a fase aguda (LANA *et al.*, 1992; ANDRADE, 1984) e as formas cardíaca (LANA *et al.*, 1992; 1988) e indeterminada (MACHADO *et al.*, 2001a; 2001b; LOPES *et al.*, 1980) da fase crônica da DC, apresentando aspectos clínicos, morfológicos e eletrocardiográficos similares aos observados em humanos, porém pouco é conhecido sobre o envolvimento do TGI na DC experimental neste modelo. Este fato pode estar relacionado à dificuldade em reproduzir os megas chagásicos em cães (ADAD *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2001b). Köeberle (1957) relatou ter observado megaesôfago, megacólon e megabexiga em cães naturalmente infectados pelo *T. cruzi* e sugeriu a associação destas manifestações à DC. Okumura e Corrêa-Neto (1961) em estudo utilizando cães experimentalmente infectados com diferentes inóculos da cepa Y do *T. cruzi*, observaram aumento do calibre e adelgaçamento da mucosa do esôfago e cólon. As alterações do cólon foram observadas apenas nos animais que receberam inóculo maior (20×10^6 tripomastigostas sanguíneas) indicando o envolvimento precoce do esôfago em

relação ao cólon ao longo da infecção (OKUMURA & CORRÊA-NETO, 1961). As células nervosas dos plexos submucosos e mientéricos do esôfago de cães foram avaliadas durante a fase aguda da DC e nenhum processo de desnervação foi observado (CALIARI *et al.*, 1996). Na fase crônica, Machado e colaboradores (2001b) avaliaram o esôfago de cães infectados ou consecutivamente re-infectados com as cepas SC-1 ou 147 do *T. cruzi* e não observaram parasitismo tecidual nem alterações como miosite ou ganglionite. Esses resultados concordam com resultados da literatura onde a presença do *T. cruzi* ou seus antígenos está relacionada ao processo inflamatório e às alterações do SNE (DA SILVEIRA *et al.*, 2005; LAGES-SILVA *et al.*, 2001). Vale a pena ressaltar que nenhum desses autores utilizou técnicas mais sensíveis para avaliação neuroquímica dos componentes do SNE no modelo cão. Dessa maneira, suscita a necessidade de estudos mais profundos buscando compreender o envolvimento do TGI no modelo cão ao longo da DC experimental, bem como a participação de fenômenos inflamatórios e degenerativos do SNE que podem ocorrer mesmo em indivíduos portadores da forma indeterminada sendo de grande importância para a interpretação da influência do parasitismo tecidual e do processo inflamatório sobre as lesões ganglionares, dilatação e disfunção motora do órgão.

Tendo em vista todos esses aspectos, incluindo a variabilidade intraespecífica do *T. cruzi*, o histotropismo preferencial de determinadas cepas e a influência do *background* genético do hospedeiro, esse projeto propõe investigar o envolvimento do TGI de cães *Beagle* durante as fases aguda ou crônica da DC experimental.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Avaliar alterações no esôfago e cólon durante as fases aguda e crônica da infecção de cães da raça *Beagle* com formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y ou Be-78 do *T. cruzi*, com ênfase no plexo mientérico.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar qualitativamente o parasitismo tecidual e quantificar o processo inflamatório na parede do esôfago e cólon;

Avaliar o processo de neoformação de colágeno na parede do esôfago e cólon;

Avaliar a os processos degenerativos dos neurônios e a desnervação do plexo mientérico PGP 9.5-IR;

Avaliar as alterações das células gliais entéricas GFAP-IR do plexo mientérico.

Correlacionar as alterações do trato digestório à parasitemia e ao parasitismo cardíaco.

3. Material e Métodos

3.1 Atividades Previamente Realizadas

Este trabalho utilizou amostras biológicas coletadas durante a execução do projeto “Correlação entre a gênese de lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*”, decorrente de uma colaboração entre a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), coordenado pelos professores Maria Terezinha Bahia e Egler Chiari, respectivamente. As atividades realizadas previamente, que incluem a manutenção destes animais no Canil da UFOP, a infecção, eutanásia e coleta das amostras foram executadas no período de 2004 a 2006 pelos doutores Paulo Marcos da Matta Guedes (GUEDES, 2006) e Vanja Maria Veloso (VELOSO, 2007) durante o desenvolvimento de suas teses de doutorado e todos os procedimentos das etapas de execução experimental do projeto foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este estudo contou com o importante auxílio de vários alunos de iniciação científica, em especial os alunos Ivo Santana Caldas, Geovan Crepalde e Lívia Figueiredo. As amostras biológicas coletadas durante a necropsia atualmente pertencem ao arquivo de tecidos do Laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP).

3.1.1 Animais

Vinte e quatro cães da raça *Beagle* foram obtidos e mantidos no canil da UFOP. Esses animais receberam tratamento prévio com anti-helmínticos e imunização com a vacina Vanguard[®] HTLP 5/CV-L Laboratório Pfizer LTDA, contra Parvovirose, Cinomose, Leptospirose canina, Coronavírus, Adenovírus Tipo 2 e Parainfluenza.

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais com n igual a oito: grupo não-infectado (Não-infectado-NI); grupo infectado com a cepa Y (Y) e grupo infectado com a cepa Berenice-78 (Be-78), sendo que quatro animais de cada grupo foram necropsiados na fase aguda e quatro na fase crônica (Figura 2).

3.1.2 Cepas do *Trypanosoma cruzi*

As cepas do *T. cruzi* utilizadas nesse estudo estão atualmente classificadas dentro do DTU TcII, porém apresentam características morfológicas distintas, sendo a cepa Y predominantemente constituída por formas delgadas e a cepa Be-78, formada principalmente por formas largas. A cepa Y foi isolada de um indivíduo na fase aguda por Pereira de Freitas em 1950, Marília SP (FREITAS *et al.*, 1953), e posteriormente estudada e descrita por Silva e Nussenzweig (1953) e a cepa Berenice-78, isolada em 1978 por xenodiagnóstico da paciente Berenice, considerado o primeiro caso humano descrito no Brasil (LANA e CHIARI, 1986). Nesse estudo foi avaliado o impacto da infecção com as diferentes cepas Y e Be-78, inoculadas isoladamente, sobre as alterações teciduais ocorridas no esôfago e cólon de cães *Beagle* ao longo da infecção experimental.

3.1.3 Infecção dos Cães e Parasitemia

Aos 120 dias de idade, os cães foram inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y ou Be-78 por Kg de massa corporal pela via intraperitoneal. As formas sanguíneas foram obtidas de camundongos *Swiss* infectados com as diferentes cepas e mantidos no Centro de Ciência Animal da UFOP.

A parasitemia dos animais foi verificada do 10^o ao 30^o dia após a inoculação. Para isso, 5µl de sangue da veia marginal da orelha foram coletados diariamente e examinados ao microscópio (aumento de 400X) para pesquisa de tripomastigotas. A infecção foi confirmada em todos os cães avaliados.

3.1.4 Necropsia, Coleta, Fixação e Processamento do Material para Microscopia Óptica

Os animais foram eutanasiados no 30^o (n=12) ou 730^o/2 anos (n=12) dia após a infecção (DAI) com 0,5 mL/Kg de massa corporal de tiopental sódico (0,03g/ml de solução salina 0,8%), por via endovenosa, representando as fases aguda e crônica da DC, respectivamente. Durante a necropsia foram coletados segmentos do esôfago e cólon. As

amostras foram fixadas em formol a 3,7% tamponado (pH 7.2) ou armazenadas em freezer -80°C.

3.1.5 Avaliações Parasitológicas e Histopatológicas

Amostras de sangue e tecido cardíaco também foram coletadas durante a necropsia (30 DAI ou 730 DAI) dos animais e submetidas à avaliação do parasitismo tecidual pela técnica de PCR convencional (VELOSO *et al.*, 2008). As amostras de coração foram ainda submetidas a análises histopatológicas do processo inflamatório, pela coloração Hematoxilina-Eosina, e da fibrose, pela técnica de Tricrômico de Masson (GUEDES *et al.*, 2006), como pode ser observado na Figura 2.

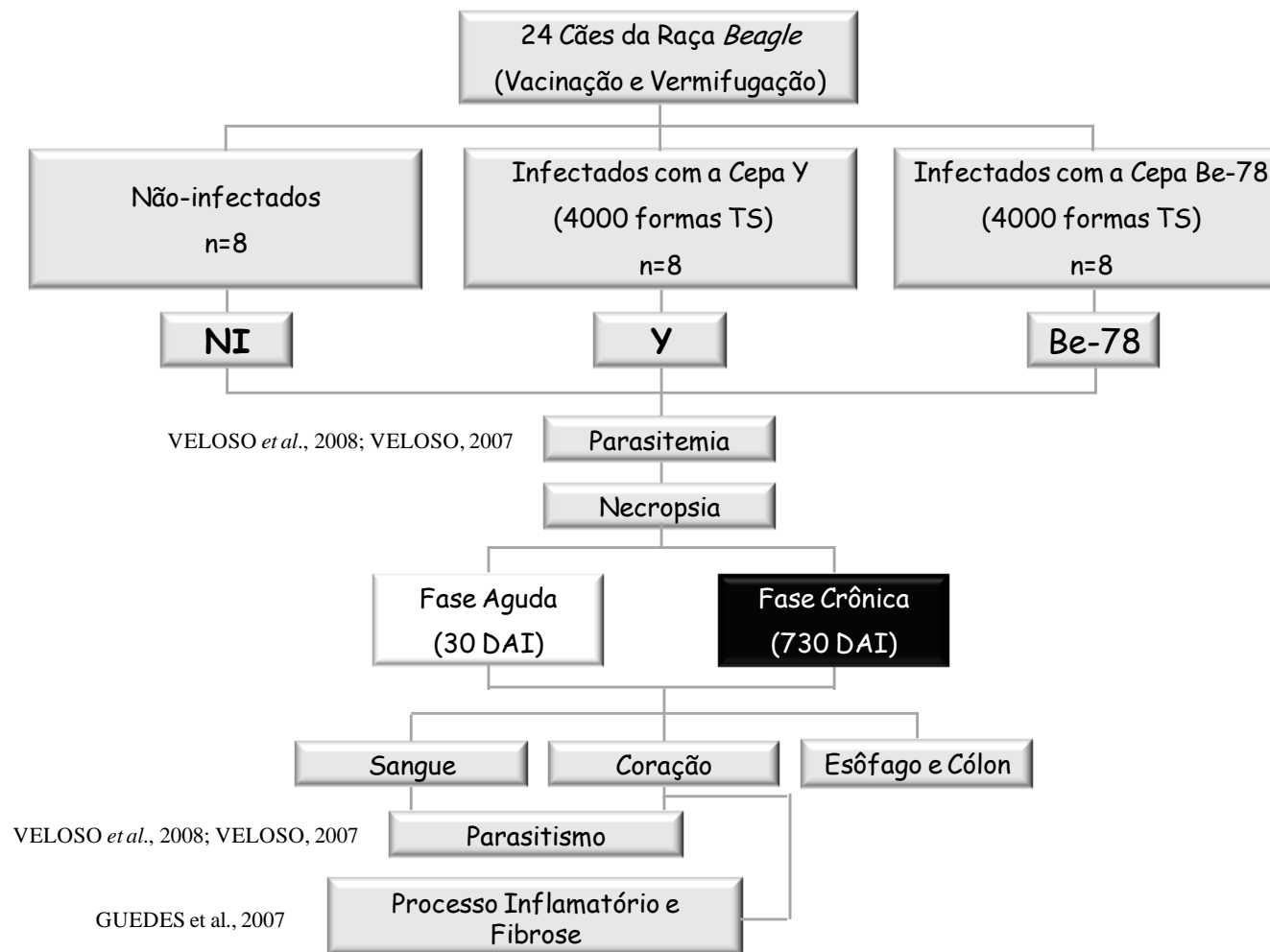


Figura 2: Delineamento experimental, ilustrando as atividades previamente realizadas. TS: tripomastigotas sanguíneas; DAI: dias após a infecção.

3.2 Atividades Realizadas neste Estudo

Neste estudo foi avaliado o envolvimento da TGI de cães *Beagle* ao longo da infecção experimental (fase aguda-30 DAI e fase crônica-730 DAI) com duas cepas biológica e morfológicamente distintas do *T. cruzi* (cepa Y ou Be-78). As análises estão relacionadas ao parasitismo tecidual, processo inflamatório, neoformação de colágeno além de avaliações dos componentes do sistema nervoso entérico, com ênfase no plexo de Auerbach (Figura 3).

3.2.1 Parasitismo Tecidual

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

a) Extração de DNA

O processo de extração de DNA foi realizado utilizando-se o Kit Wizard (Promega). Os fragmentos armazenados em freezer -80°C foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5mL e macerados com auxílio de pistilos devidamente higienizados e esterilizados. Ao tecido macerado foi adicionado 600µL da Solução de Lise Nuclear (*Nuclear Lise Solution*). Após homogeneização, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 56°C durante 30 minutos. A seguir, 200µL da Solução de Precipitação Protéica (*Protein Precipitations Solution*) foram adicionados e as amostras foram então, homogeneizadas vigorosamente em vortex durante 20 segundos e centrifugadas a 14.000 rpm (temperatura ambiente, 3 minutos) com formação de um *pellet*. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo contendo 600µL de isopropanol e misturado delicadamente por inversão por 5 minutos. Novamente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, à temperatura ambiente, porém, durante 6 minutos, sendo observada a formação de um *pellet* claro. O sobrenadante foi descartado e após a adição de 600µL de etanol 70% (ETOH), as amostras foram misturadas por inversão durante 5 minutos. O etanol foi então vertido e as quantidades remanescentes evaporadas. Por fim, 100µL da Solução de Re-hidratação de DNA (*DNA Rehydration Solution*) foram adicionadas às amostras que permaneceram à temperatura ambiente durante 18 horas.

b) Amplificação Específica do DNA do *T. cruzi*

PCR Convencional

Após a extração, o DNA foi amplificado pela PCR utilizando-se os iniciadores específicos para *T. cruzi* (S35 = 5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA 3' e S36 = 5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT 3') que são capazes de amplificar um fragmento de 330 pares de bases (pb) da região variável do minicírculo. Em síntese: 2µL da solução de DNA de cada amostra foram adicionados a solução contendo 10 mM de Tris-HCL (pH 9,0); 75 mM de KCL; 1,5 mM de MgCL₂; 0,1% de Triton X100; 0,25 mM de cada dNTP (Sigma Company Ltda, USA); 10pmol de cada iniciador (S35 e S36); 0,5U de taq DNA polimerase (Platinum, Invitrogen, SP; Brasil) e água suficiente para completar 11µL. Esta mistura foi coberta com 30 µL de óleo mineral e submetida ao seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos contendo um passo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, um de anelamento a 64°C por um minuto e um passo de extensão a 72°C por 1 minuto. Para finalizar, um passo de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizados após coloração pela prata (SANTOS *et al.*, 1993).

3.2.2 Processo Inflamatório

A análise rotineira das alterações histopatológicas, incluindo a quantificação do processo inflamatório foi realizada em cortes de esôfago e cólon submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e então lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina, por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (100 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e novamente lavados em água corrente para evitar acidificação excessiva. Posteriormente, foram corados pela Eosina, por 30 segundos. Após a última lavagem em água corrente, foram

desidratados, em 2 banhos de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e montados com lamínula e Entellan.

Para avaliação do processo inflamatório os núcleos celulares foram quantificados separadamente na submucosa e muscular, sendo 10 imagens (campos) aleatórias em cada uma das camadas, totalizando uma área percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e todas as imagens foram analisadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. O processo inflamatório foi determinado pela diferença significativa ($p < 0,05$) entre o número de núcleos celulares presentes nos animais infectados pelo *T. cruzi* e aquele observado nos animais não-infectados \pm desvio padrão (MALTOS *et al.*, 2004; CALIARI, 1997)

3.2.3 Neoformação de Colágeno

A neoformação de colágeno foi determinada pela quantificação de colágeno total solúvel em amostras de esôfago e cólon, congeladas em freezer -80°C, através de dosagem bioquímica baseada na precipitação de colágeno pelo reagente Sirius Red (MENDES *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2008; PHILLIPS *et al.*, 2004) e pela avaliação qualitativa de cortes histológicos submetidos à coloração com Picrosírius Red (MOURA *et al.*, 2009). Para a dosagem bioquímica, as amostras foram maceradas em 1ml de Salina-Triton X100 e 50 μ l desse homogenato foram adicionados a 50 μ l de reagente Sirius Red. As amostras foram misturadas por inversão delicada do *ependorf*. Após incubação por 30 minutos, o complexo colágeno-corante foi precipitado por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 μ l de etanol (99% puro e livre de metanol). Um ml de solução de NaOH 0,5M foi adicionado ao *pellet* de colágeno-corante remanescente. Após solubilização em vórtex, as amostras foram transferidas em duplicata para uma placa de 96 poços sendo medida a absorbância em comprimento de onda de 540nm. A curva de calibração foi estabelecida com base em um padrão de gelatina (1mg/mL) e os resultados foram expressos como microgramas de colágeno por miligrama de peso úmido. A avaliação qualitativa foi realizada em cortes histológicos

desparafinizados e hidratados que foram mantidos em solução de Picrosíríus Red por 60 minutos e contracorados com Hematoxilina de Harris por três minutos. As fibras colágenas foram visualizadas em microscopia óptica associada a um sistema de polarização de imagens onde os tons vermelho e amarelo representavam o colágeno tipo I, enquanto o tom verde, representava o colágeno tipo III.

3.2.4 Plexo de Auerbach

Os componentes do plexo mientérico foram avaliados em cortes histológicos de esôfago e cólon submetidos à reação imuno-histoquímica em cortes em parafina. O anticorpo primário anti-PGP9.5 foi utilizado para imuno-marcação de neurônios e fibras nervosas enquanto o anticorpo anti-GFAP foi utilizado como marcador de células gliais.

Os cortes desparafinizados e hidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato durante 20 minutos a 96°C. Após resfriamento e bloqueio duplo da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos em duas etapas, sendo a primeira constituída por uma banho com leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, Brasil) seguida pela incubação com soro normal de cabra (1:50) em câmara úmida e à temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos primários produzidos em coelho anti-humano PGP 9.5 (1:100; Z5116-Dako Cytomation, Carpinteria, USA) ou GFAP (1:50; Z03334-Dako Cytomation, Carpinteria, USA) foram adicionados aos cortes. Após incubação a 4°C durante 18 horas, o Kit Streptavidina-Biotina (K0675-Dako Cytomation, Carpinteria, USA), foi aplicado e os cortes mantidos em câmara úmida à 37°C durante uma hora (para cada reagente do Kit) e a atividade enzimática foi revelada com diaminobenzidina (D-5637; Sigma, St. Luis, MO, USA) em Tampão Salina Fosfato (Phosphat Buffer Saline-PBS), pH 7.2 – 7.4. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e cobertos com entellan (1.07961.0100-Merck, Darmstadt, Alemanha) e lamínula. Como controle negativo de cada reação, foram utilizados cortes nos quais os anticorpos primários foram substituídos por diluente de anticorpo (S3022- Dako Cytomation, Carpinteria, USA).

a) Neurônios e Fibras Nervosas

Neste estudo foram realizadas análises morfométricas do corpo neuronal e das áreas PGP9.5 imunorreativas (PGP 9.5-IR) restritas às regiões ganglionares do plexo de Auerbach e quantificação do número de neurônios. O corpo neuronal foi avaliado pelas medidas da área e perímetro do corpo celular, núcleo e citoplasma de todos os neurônios nítidos observados nos cortes de esôfago e cólon e as razões entre área nuclear e área do corpo celular também foram obtidas (BARBOSA *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2009). Além dessas medidas morfométricas, o número de neurônios íntegros foi quantificado e avaliado em relação à área ganglionar (TAFURI & TAFURI, 1957). A inervação do plexo gástrico foi analisada pela medida da área PGP9.5 imunorreativa (PGP 9.5-IR) restrita e relativa à área ganglionar. Todas essas avaliações foram realizadas em 10 imagens aleatórias/animal visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e analisadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

b) Componentes Enterogliais

A análise morfométrica dos componentes enterogliais foi realizada pela avaliação da área GFAP imunorreativa (GFAP-IR) relativa à área ganglionar em 10 imagens aleatórias/animal. Todas essas análises foram realizadas em imagens visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e analisadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.2.5 Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 4.03 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Para avaliação estatística do processo inflamatório, neoformação de colágeno e área imuno-marcada para as diferentes reações imuno-histoquímicas foi realizada análise de

variância (ANOVA one-way). Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias. A diferença entre as fases aguda e crônica para os três grupos experimentais (NI, Y e Be-78) foi determinada com o Test T de Student. As análises de correlação foram executadas através do teste de Spearman com intervalo de confiança de 95%. Diferenças entre médias com valores de p menores que 0,05 foram consideradas significativas.

Análises de associação foram realizadas entre os resultados de parasitismo e processo inflamatório, neoformação de colágeno, área PGP9.5-IR, área GFAP-IR através do Teste do Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95%. Análises de correlação foram realizadas entre os resultados de processo inflamatório, neoformação de colágeno, área PGP9.5-IR e área GFAP-IR através do Teste de Spearman com intervalo de confiança de 95%.

A parasitemia e parasitismo cardíaco avaliados por PCR, nos dias 30 e 730 após a infecção, obtidos durante o desenvolvimento da tese de doutorado da Dra. Vanja Maria Veloso, foram associados aos resultados obtidos para o trato digestório neste estudo.

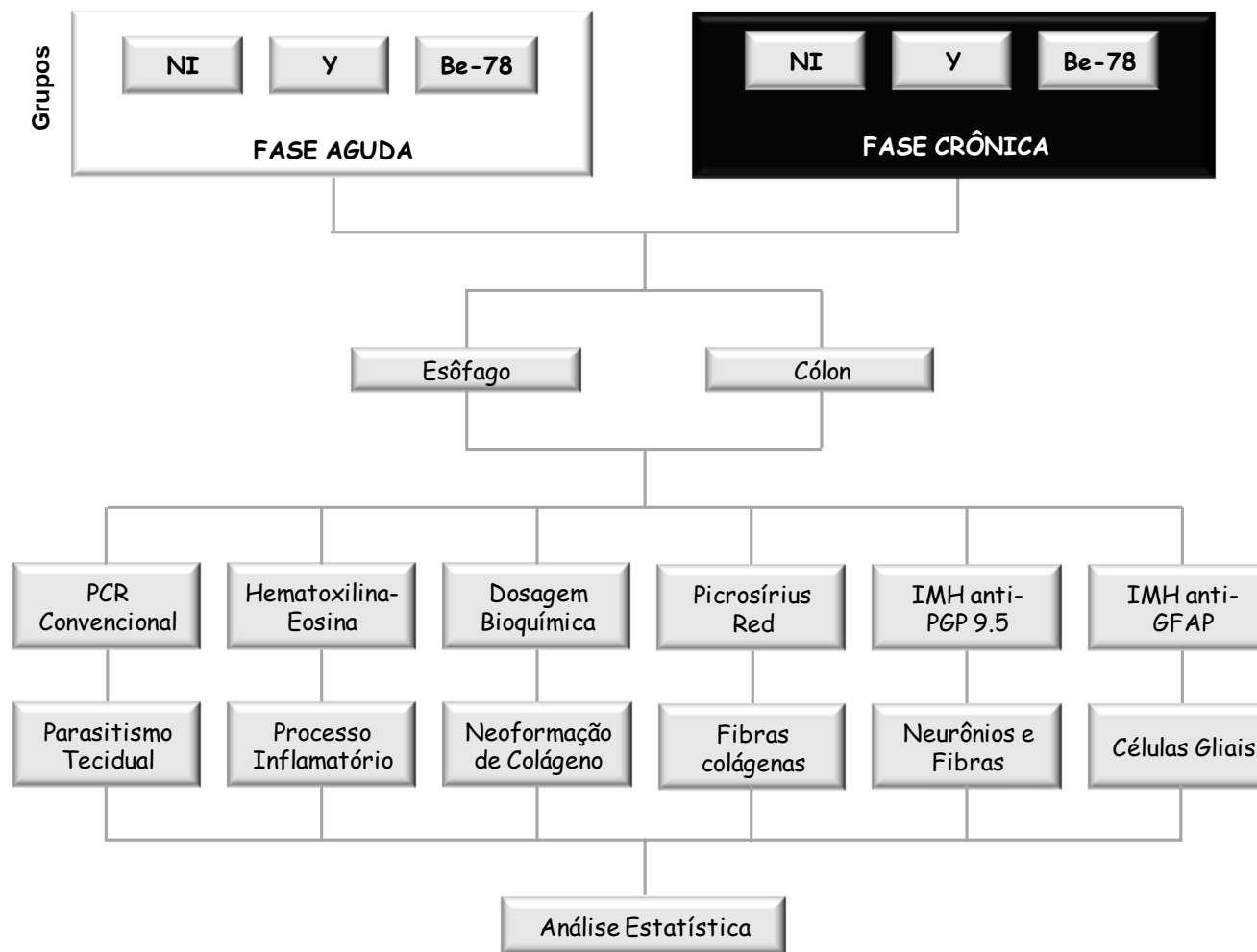


Figura 3: Delineamento experimental, ilustrando as atividades realizadas neste estudo. NI: Grupo de cães *Beagle* Não-infectado; Y: Grupo cães *Beagle* infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*; Be-78: Grupo cães *Beagle* infectado com a cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*.

4. Resultados

4.1 Parasitismo Tecidual

O parasitismo tecidual foi avaliado qualitativamente pela técnica de PCR convencional. Durante a fase aguda, fragmentos de kDNA do *T. cruzi* foram detectados no esôfago e cólon em 100% dos animais do grupo Be-78, enquanto no grupo Y foi observada positividade no esôfago e no cólon de 75% e 50% dos animais, respectivamente. Na fase crônica foi observado parasitismo tecidual apenas no esôfago de 25% dos animais do grupo Be-78 (Figuras 4 e 5).

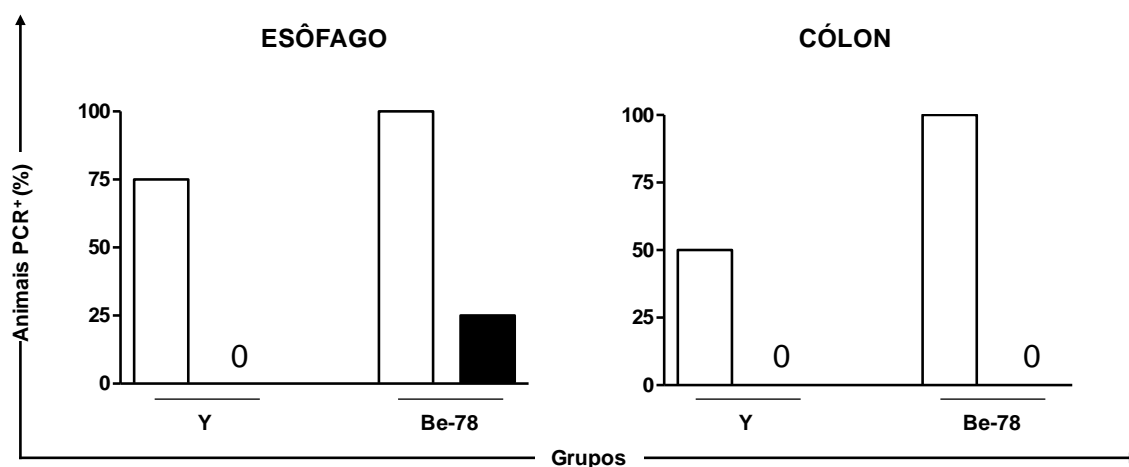


Figura 4: Parasitismo tecidual no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados estão representados em percentual de animais PCR+, cada grupo com $n=4$.

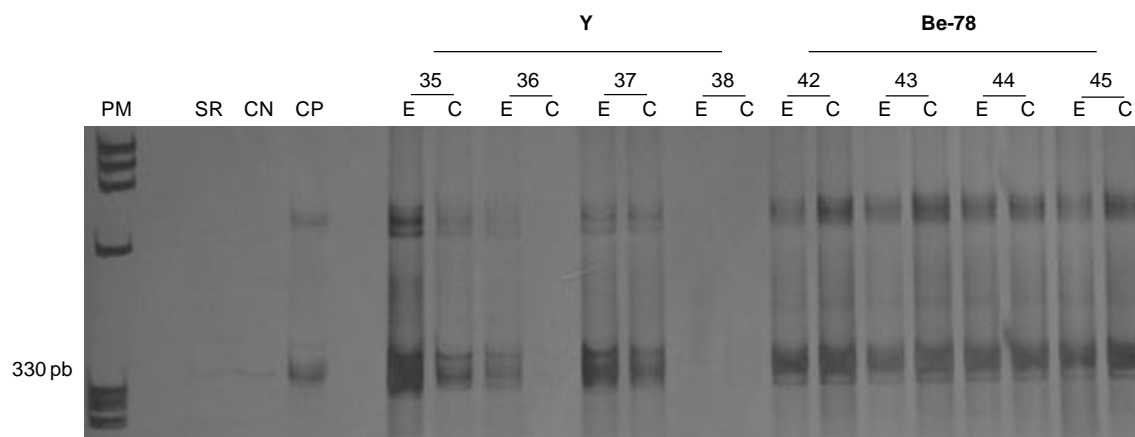


Figura 5: Gel de poliacrilamida representativo da amplificação, pela PCR, do kDNA do *Trypanosoma cruzi* obtido em amostras de esôfago (E) e cólon (C) de cães *Beagle* necropsiados na fase aguda da infecção experimental com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi*. PM: Marcador de Peso Molecular (ϕ X174); SR: Solução de Reidratação; CN: Controle Negativo/Amostra conhecidamente negativa; CP: Controle Positivo/Amostra conhecidamente positiva. Os números representam códigos dos animais infectados com as cepas Y (35-38) ou Be-78 (42-45) necropsiados durante a fase aguda da infecção experimental.

4.2 Processo Inflamatório

O processo inflamatório foi quantificado em cortes histológicos corados pela técnica Hematoxilina-Eosina. Foi observado infiltrado inflamatório significativamente maior nos cortes de esôfago e cólon dos animais infectados com as cepas Y ou Berenice-78 em relação aos animais não-infectados durante a fase aguda. Na fase crônica, apenas os animais infectados com a cepa Be-78 mantiveram uma resposta inflamatória significativa no esôfago quando comparado aos animais não-infectados. O processo inflamatório foi maior tanto no esôfago quanto no cólon dos animais infectados por ambas as cepas necropsiados na fase aguda, quando comparados a fase crônica (Figuras 6, 7 e 8). O infiltrado inflamatório observado na infecção com ambas as cepas foi constituído predominantemente por células mononucleares, no entanto a distribuição destes apresentou-se focal nos animais infectados com a cepa Y e difuso nos animais infectados com a cepa Be-78.

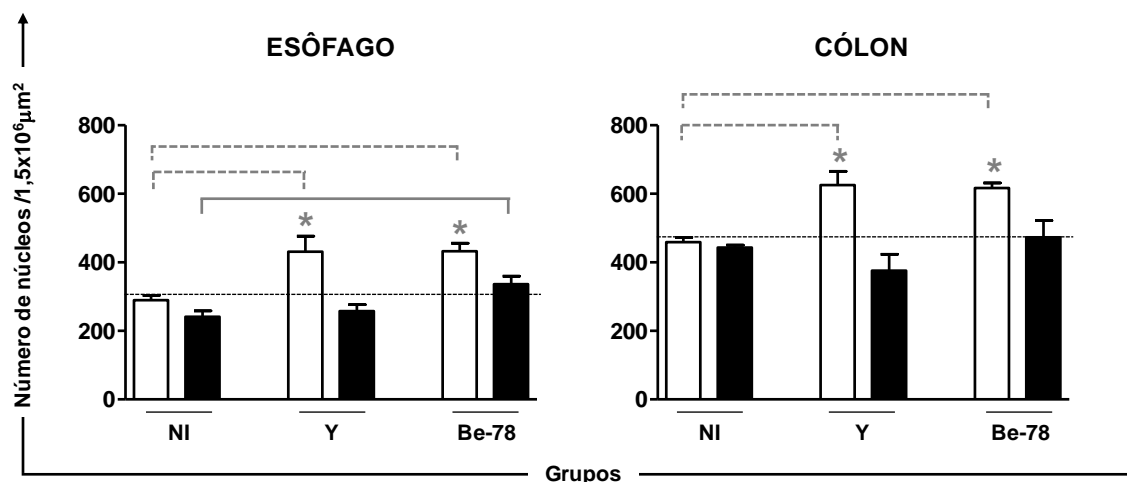


Figura 6: Análise morfométrica do processo inflamatório no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os dados estão representados como Média ± Erro Padrão. Grupos com $n=4$. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados com a cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre a fase aguda e crônica. *Cut off* representado pela linha pontilhada.

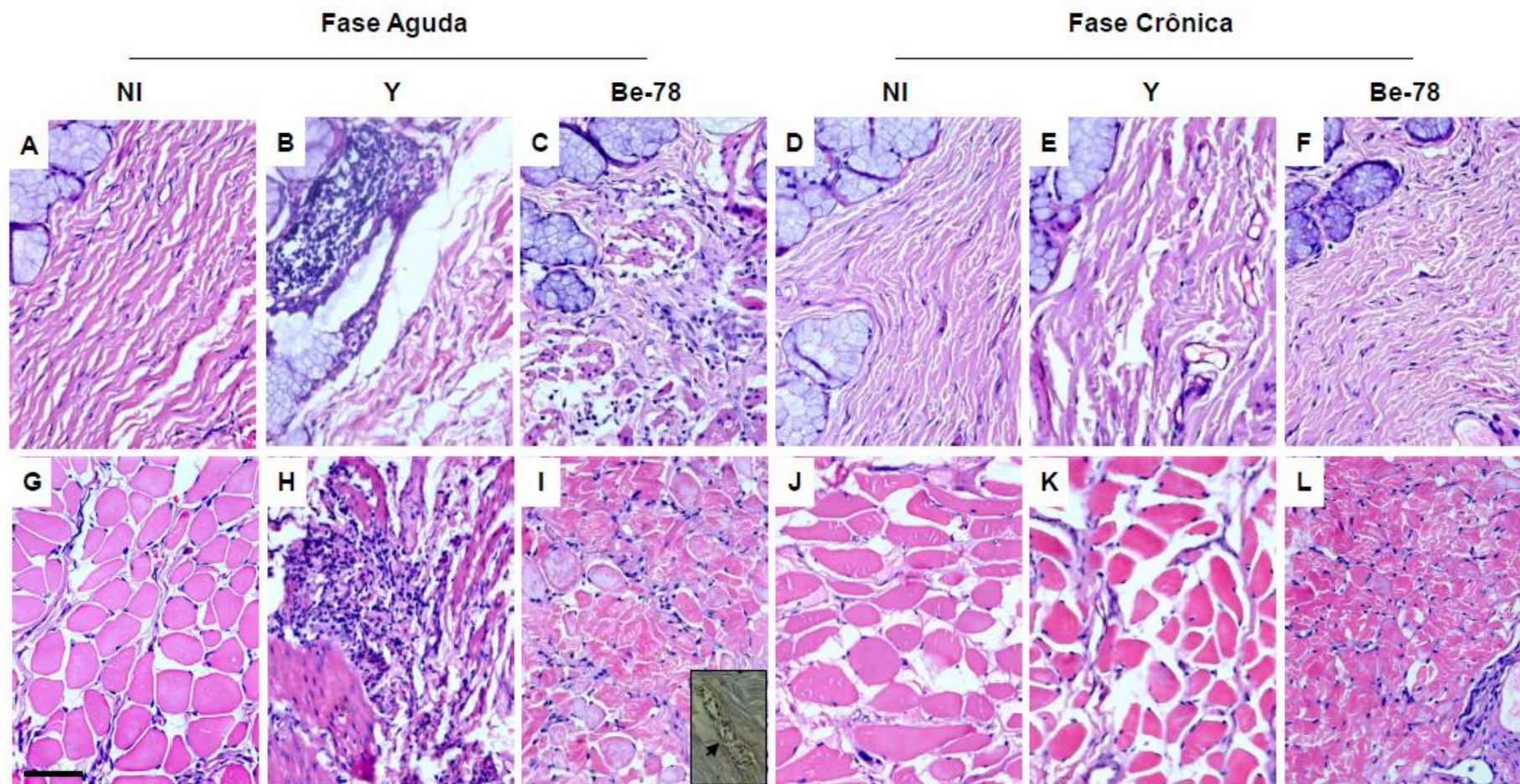


Figura 7: Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados (NI) ou infectados com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Aspecto histológico normal em animais não-infectados necropsiados em época correspondente a fase aguda (A e G) e a fase crônica (D e J); presença de infiltrado inflamatório em animais infectados com as cepas Y (B e H) e Be-78 (C e I), acompanhada por parasitismo tecidual (setas, *insert* em I, Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*) na fase aguda; aspecto histológico normal em animais infectados com a cepa Y na fase crônica (E e K); manutenção do processo inflamatório em animais infectados com a cepa Be-78 (F e L) na fase crônica. Camada Submucosa (A-F); Camada Muscular (G-L). Hematoxilina-Eosina.. Barra= 50µm.

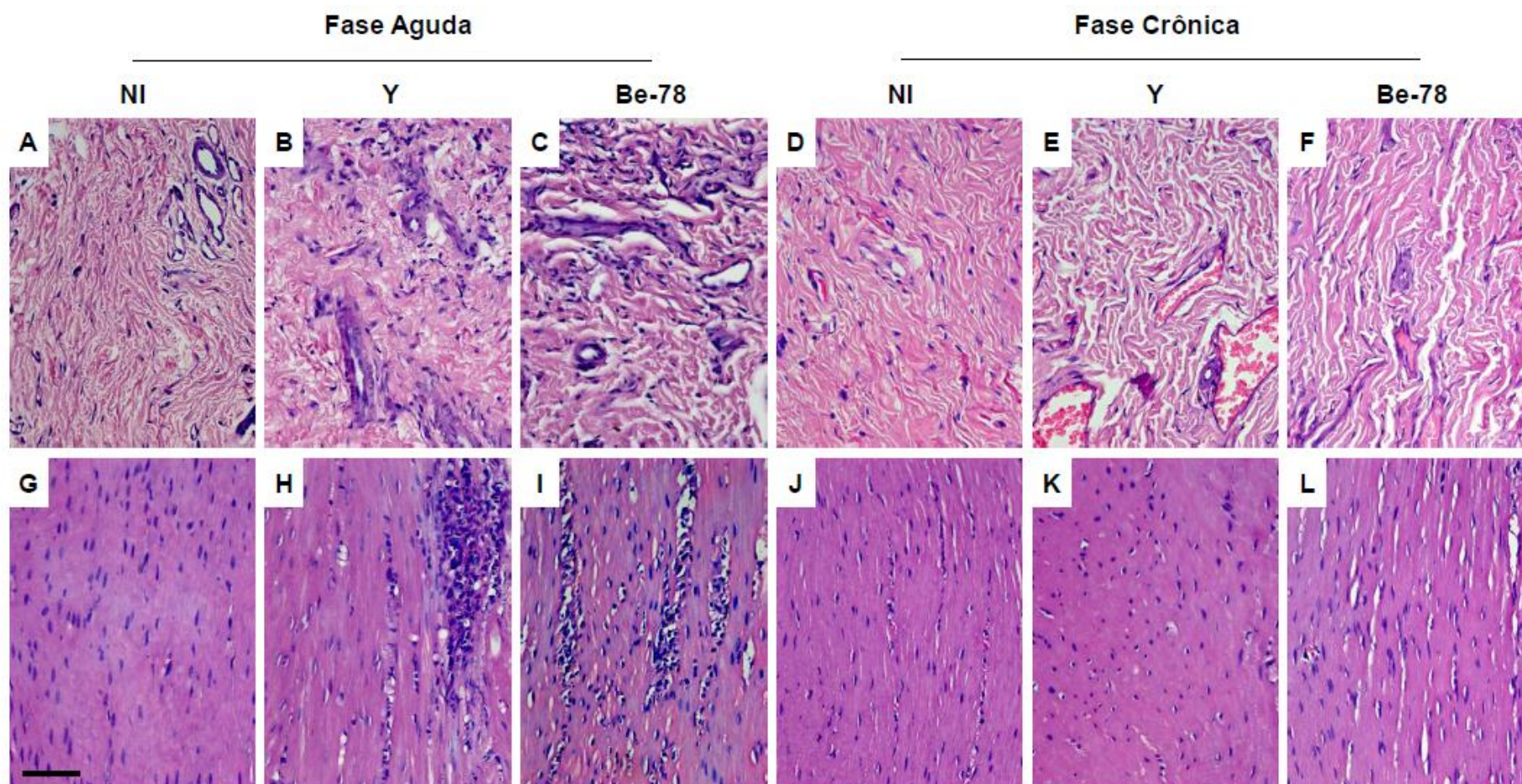


Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon de cães *Beagle* não-infectados (NI) ou infectados com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Aspecto histológico normal em animais não-infectados necropsiados em época correspondente às fases aguda (A e G) ou crônica (D e J); presença de infiltrado inflamatório em animais infectados com as cepas Y (B e H) ou Be-78 (C e I) na fase aguda; aspecto histológico normal em animais infectados com as cepas Y (E e K) ou Be-78 (F e L) na fase crônica. Camada Submucosa (A-F); Camada Muscular (G-L). Hematoxilina-Eosina. Barra= 50µm.

4.3 Neoformação de Colágeno

O processo de neoformação de colágeno foi avaliado através da dosagem bioquímica do colágeno total solúvel em amostras congeladas de esôfago e cólon e o resultado está representado nas Figuras 9 e 10. Foi observado aumento do colágeno total nos animais infectados com a cepa Y em relação aos animais não-infectados e aos animais infectados com a cepa Berenice-78 apenas na fase crônica em ambos os órgãos analisados.

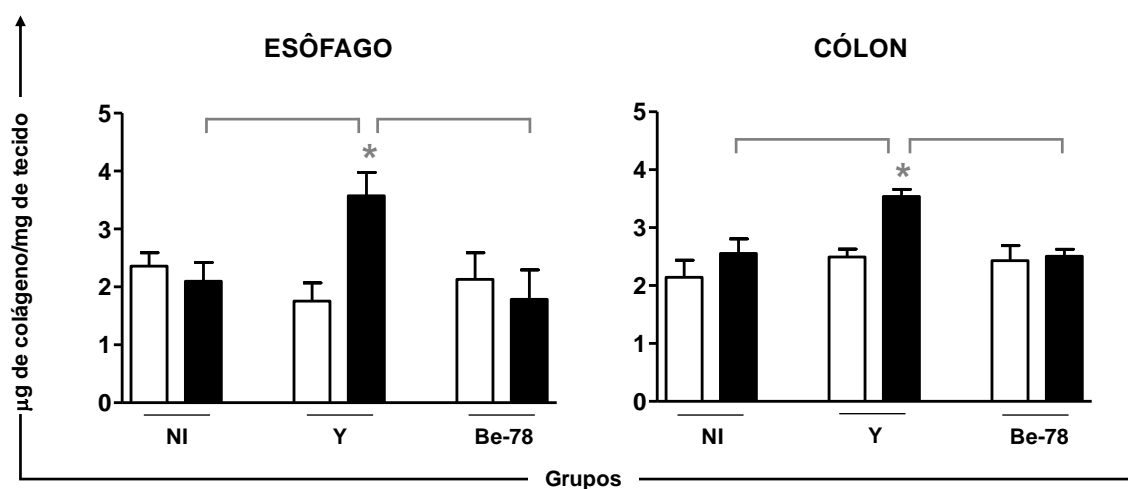


Figura 9: Avaliação quantitativa de colágeno total solúvel no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão, grupos com $n=4$. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados com a cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre a fase aguda e crônica.

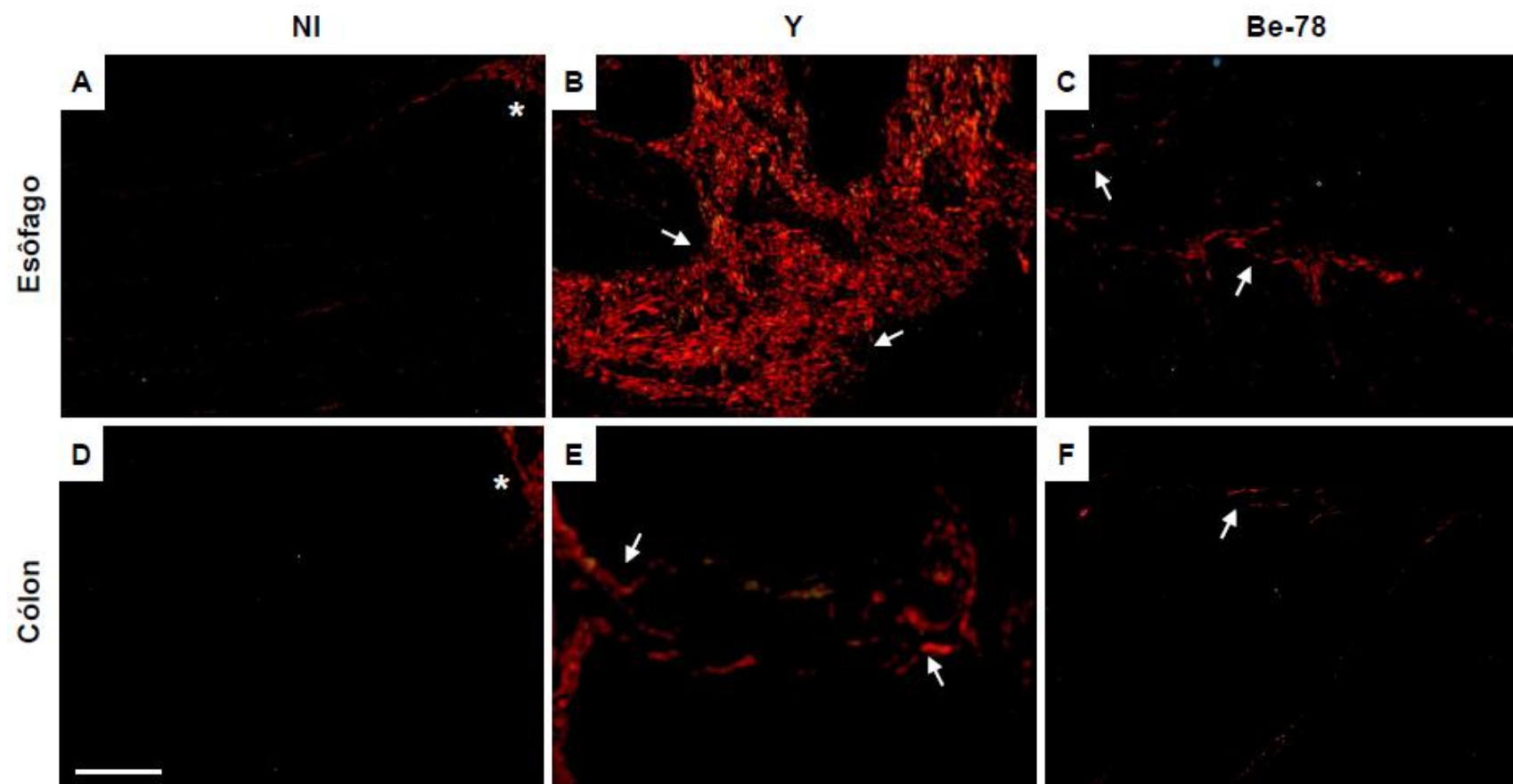


Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago e cólon de cães *Beagle* não-infectados (NI) ou infectados com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases crônica da doença de Chagas. Camada muscular do esôfago com ausência de neoformação de colágeno em animais não-infectados (A) e infectados com a cepa Be-78 (C) e deposição de fibras colágenas tipo I (vermelhas/setas) em animais infectados com a cepa Y na fase crônica (B); camada muscular do cólon com ausência de neoformação de colágeno em animais não-infectados (D) e infectados com a cepa Be-78 (F) e deposição de fibras colágenas tipo I (vermelhas/setas) em animais infectados com a cepa Y na fase crônica (E). Serosa evidente em A e D (asterisco). Picrosírius-Red. Barra= 50µm.

4.4 Plexo de Auerbach

a) Neurônios e Fibras Nervosas

Área PGP 9.5-IR

A inervação mientérica do esôfago e cólon foi avaliada em cortes histológicos pela imunomarcção, por imuno-histoquímica, de áreas PGP 9.5-IR na região intermuscular do plexo de Auerbach. No esôfago, os animais infectados com ambas as cepas apresentaram redução significativa da área PGP 9.5 imunomarcada na fase aguda. Na fase crônica, a desnervação foi mantida apenas nos animais infectados com a cepa Be-78 em relação aos animais não-infectados e aos animais infectados com a cepa Y. Ainda neste órgão, os animais do grupo não-infectado apresentaram uma redução na inervação na fase crônica. No cólon, não foram observadas diferenças para área PGP 9.5-IR entre os diferentes grupos analisados (Figuras 11 e 12).

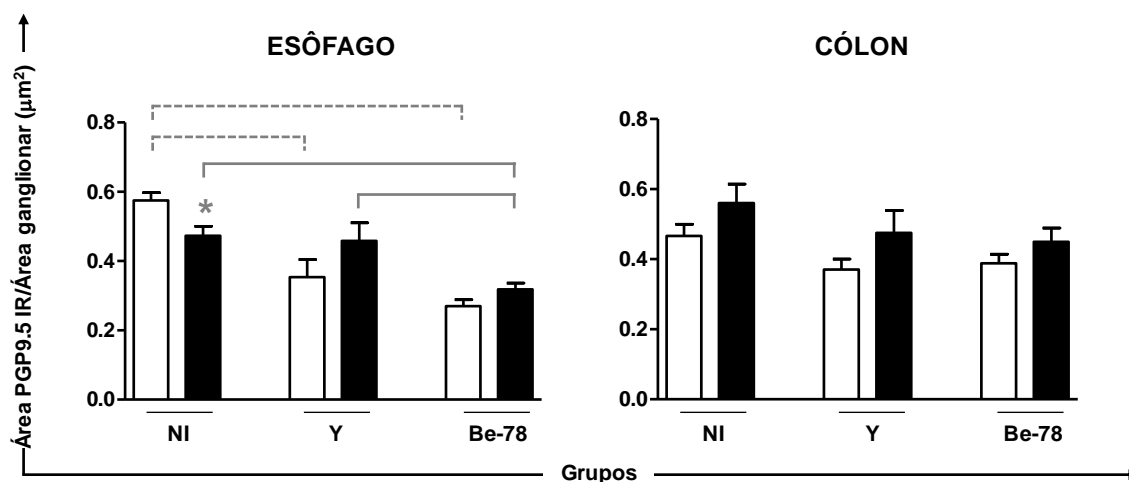


Figura 11: Avaliação morfométrica da área PGP 9.5-IR no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os dados estão representados como Média ± Erro Padrão, grupos com $n=4$. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados com a cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre a fase aguda e crônica.

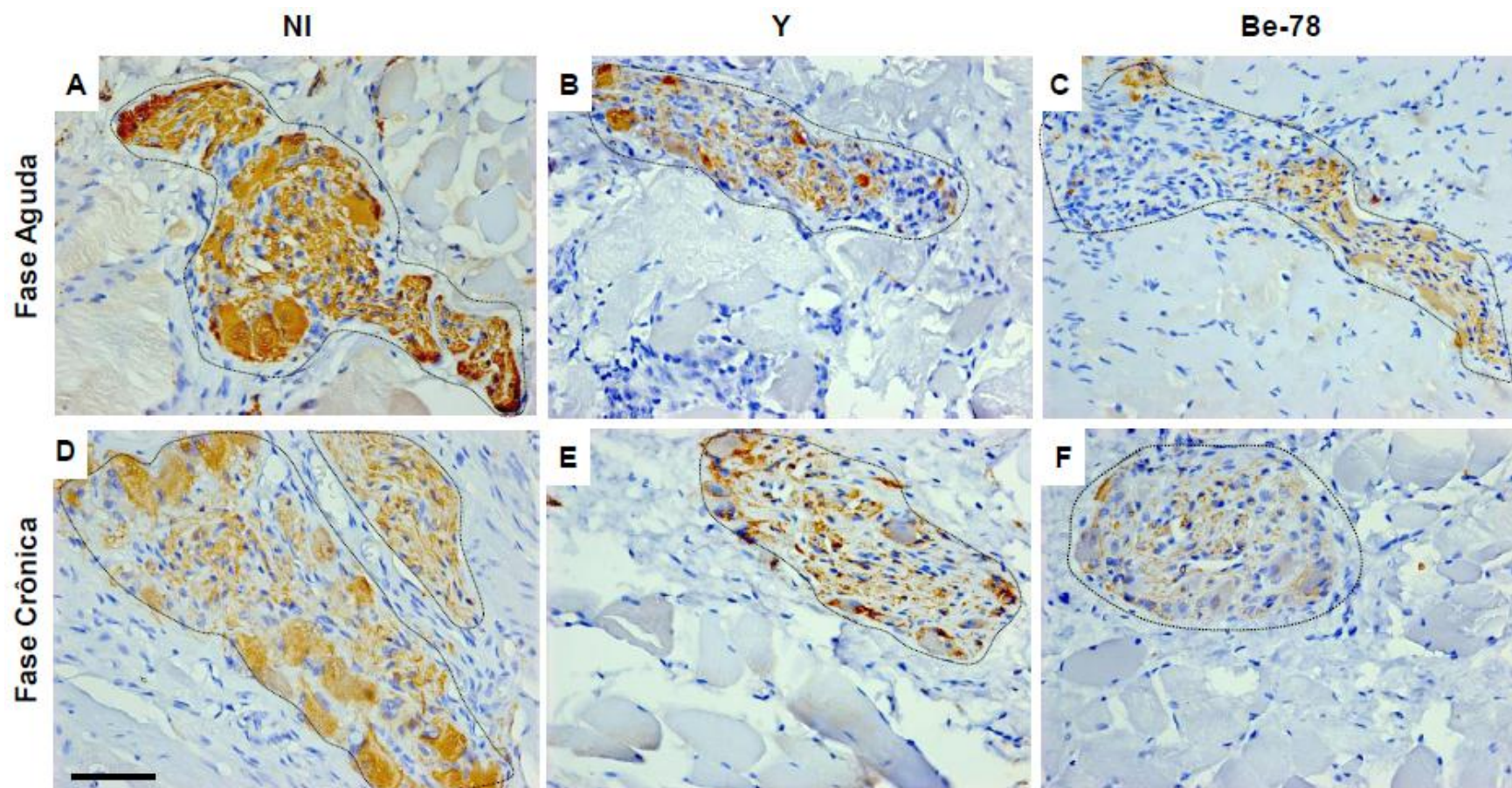


Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados (NI) ou infectados com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Gânglio mientérico PGP 9.5-IR com aspecto normal em animais não-infectados (A) e com moderada redução de área imunomarcada em animais infectados com as cepas Y (B) e Be-78 (C) na fase aguda; gânglio mientérico PGP 9.5-IR com discreta redução da área imunomarcada em animais não-infetados (D) ou infectados com a cepa Y (E) e apresentando intensa redução da área imunomarcada em animais infectados com a cepa Be-78 (F) na fase crônica. Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5. Barra= 50 μ m.

Neurônios

Os neurônios foram visualizados pela imunomarcção com anticorpo anti-PGP 9.5 e quantificados em relação à área ganglionar e os resultados estão apresentados na Figura 13. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos avaliados nos diferentes órgãos.

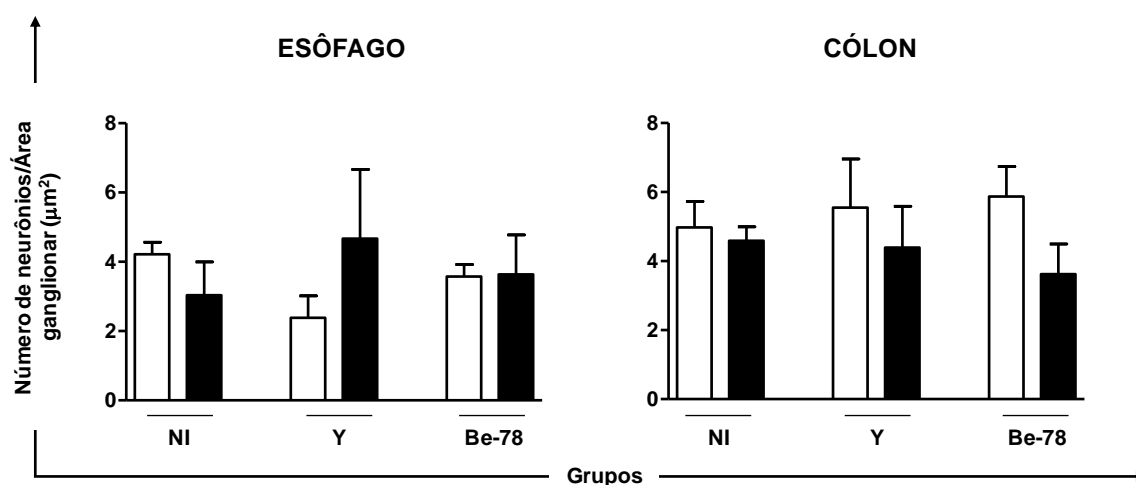


Figura 13: Avaliação quantitativa de neurônios ganglionares do plexo de Auerbach no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os dados estão representados como Média ± Erro Padrão, grupos com $n=4$. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados com a cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre a fase aguda e crônica.

Os neurônios também foram avaliados em relação à área nuclear, citoplasmática e do corpo celular em cortes submetidos à imuno-histoquímica anti-PGP 9.5 e os resultados estão representados nas Figuras 14 e 15. Nenhuma diferença significativa foi observada no esôfago durante a fase aguda em relação à área do corpo celular em nenhum dos grupos analisados. Entretanto, neste mesmo órgão, durante a fase crônica, os animais infectados com a cepa Y apresentaram aumento da área do corpo celular em relação aos animais não-infectados e aos animais infectados com a cepa Be-78. O aumento do corpo celular foi resultado do aumento do citoplasma, uma vez que não houve diferença significativa em relação à área nuclear entre os diferentes grupos analisados e o grupo Y apresentou aumento da área citoplasmática na fase crônica. No cólon nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos avaliados.

Além disso, foi obtida a razão entre a área nuclear e a área do corpo celular para avaliação da atividade nuclear. Não houve diferença significativa em relação à razão núcleo/corpo celular nos dois órgãos analisados.

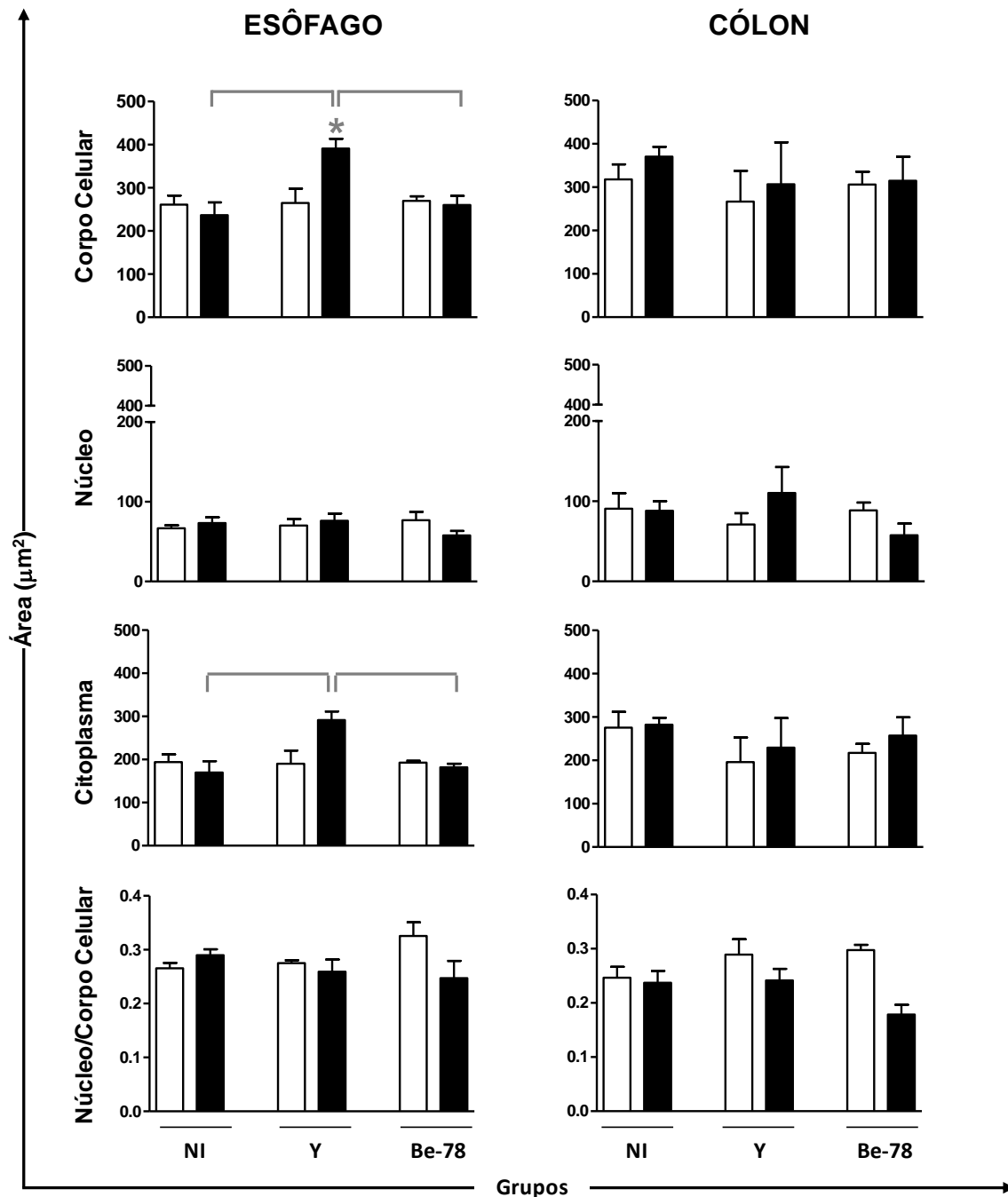


Figura 14: Avaliação morfométrica da área nuclear, citoplasmática e do corpo celular de neurônios ganglionares do plexo de Auerbach no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão, grupos com $n=4$. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados com a cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre a fase aguda e crônica.

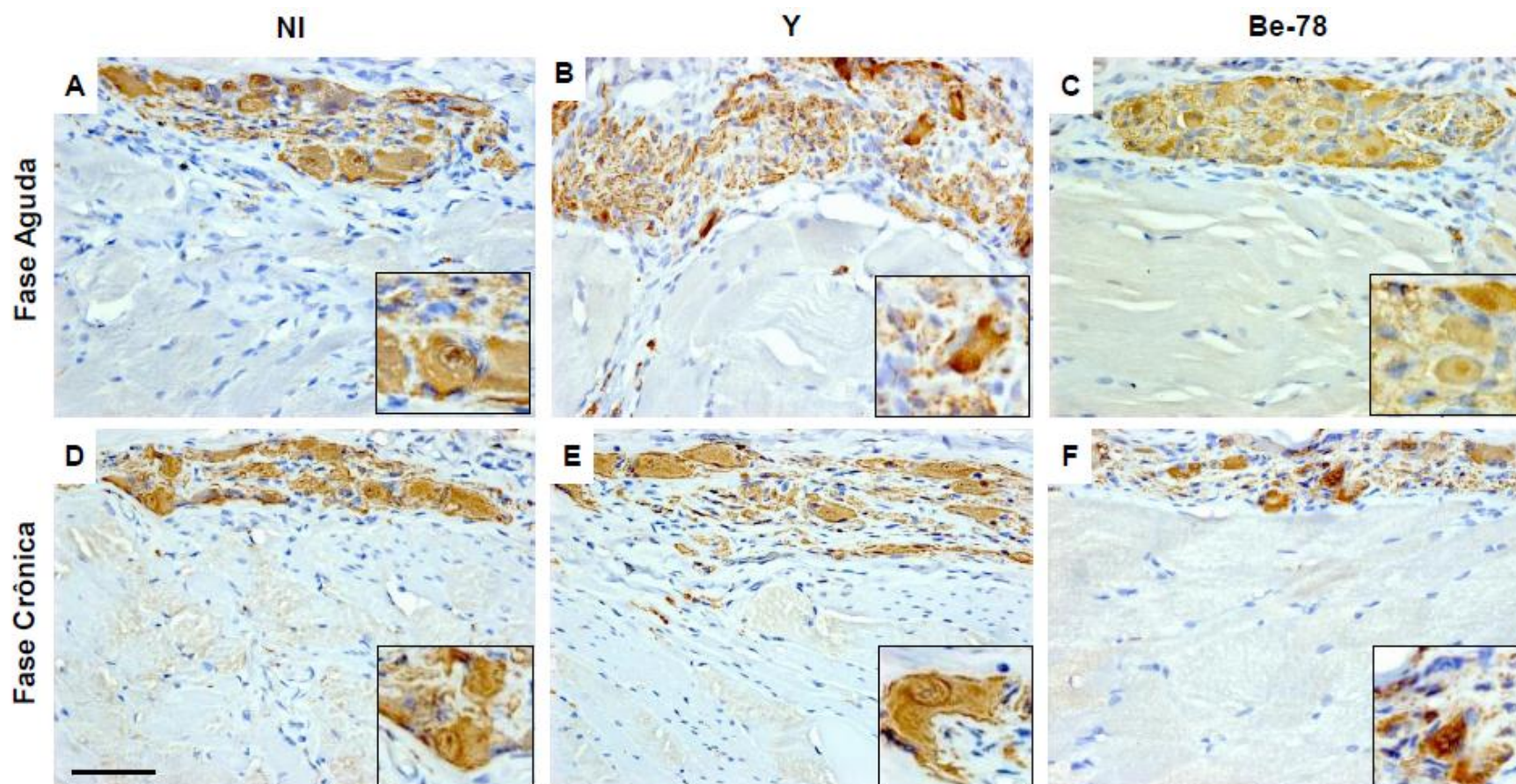


Figura 15: Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados (NI) ou infectados com a cepa Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Neurônios PGP 9.5-IR com aspecto normal em animais não-infectados necropsiados em época correspondente às fases aguda (A) ou crônica (D); neurônios PGP 9.5-IR com aspecto normal em animais infectados com as cepas Y (B); neurônios PGP 9.5-IR apresentando hipertrofia citoplasmática em animais infectados com a cepa Y (E); neurônios PGP 9.5-IR com aspecto normal em animais infectados com a cepa Be-78 nas fases aguda (C) e crônica (F). Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5. Barra= 50µm.

b) Componentes Enterogliais

As células glias entéricas foram avaliadas em cortes submetidos à imunohistoquímica anti-GFAP e os resultados estão representados nas Figuras 16, 17 e 18. No esôfago, os animais do grupo Y apresentaram uma diminuição significativa na área GFAP-IR em comparação ao grupo não-infectado, durante a fase aguda. Durante a fase crônica, essa redução foi observada, neste mesmo órgão, apenas no grupo Be-78 em relação ao grupo não-infectado. A avaliação do cólon revelou redução dos componentes enterogliais apenas durante a fase aguda para o grupo Y em relação aos demais grupos avaliados.

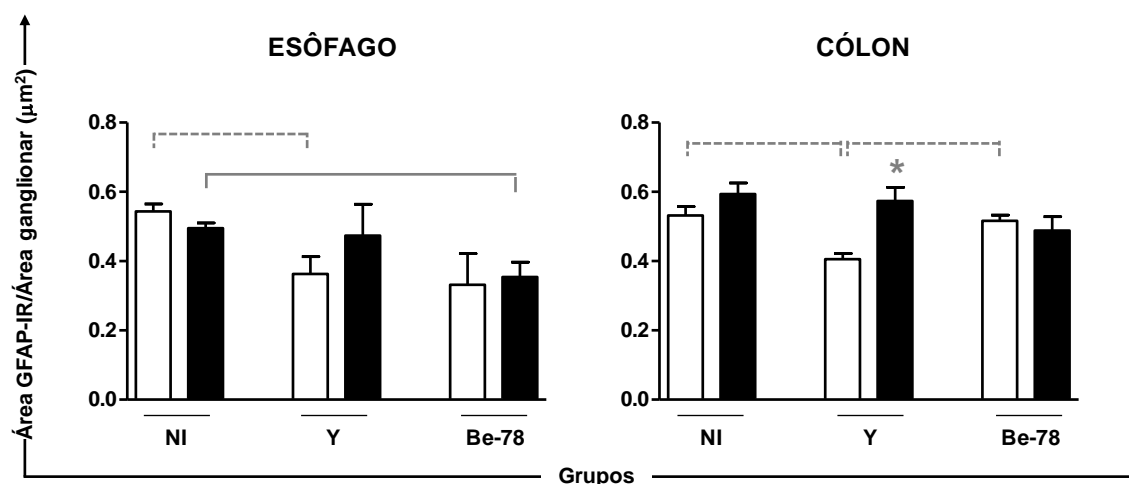


Figura 16: Avaliação morfológica dos componentes enterogliais GFAP-IR nos gânglios do plexo de Auerbach no esôfago e cólon de cães *Beagle* necropsiados nas fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental com as cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os dados estão representados como Média ± Erro Padrão, grupos com $n=4$. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados com a cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre a fase aguda e crônica.

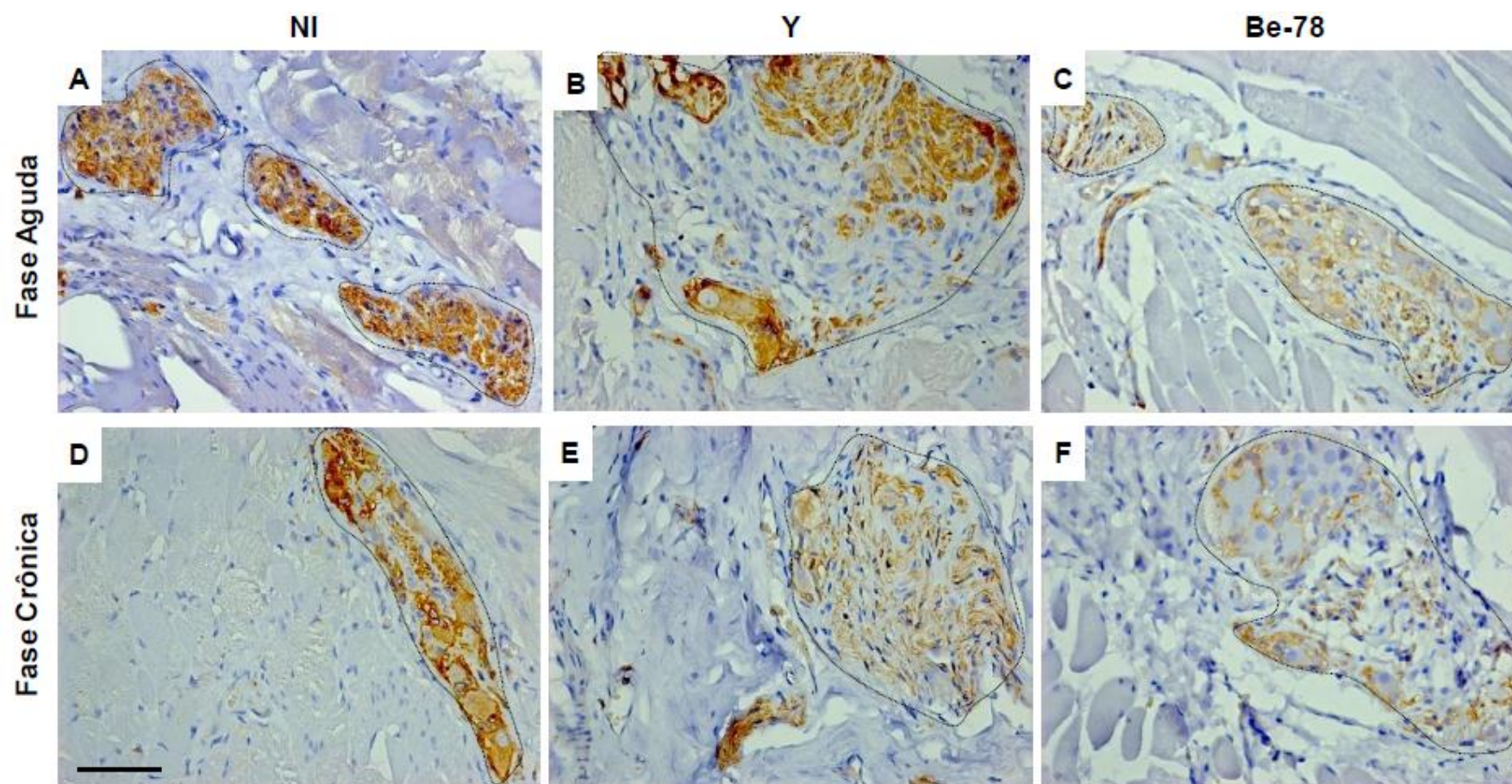


Figura 17: Fotomicrografias de cortes histológicos do esôfago de cães *Beagle* não-infectados (NI) ou infectados com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Gânglio mientérico GFAP-IR com aspecto normal em animais não-infectados (A) e infectados com a cepa Be-78 (C) e com redução da área GFAP imunomarcada em animais infectados com a cepa Y (B) na fase aguda; gânglio mientérico GFAP-IR com aspecto normal em animais não-infectados (D) e infectados com a cepa Y (E) e com redução da área GFAP imunomarcada em animais infectados com a cepa Be-78 (F) na fase crônica. Imuno-histoquímica anti-GFAP. Barra= 50 μ m.

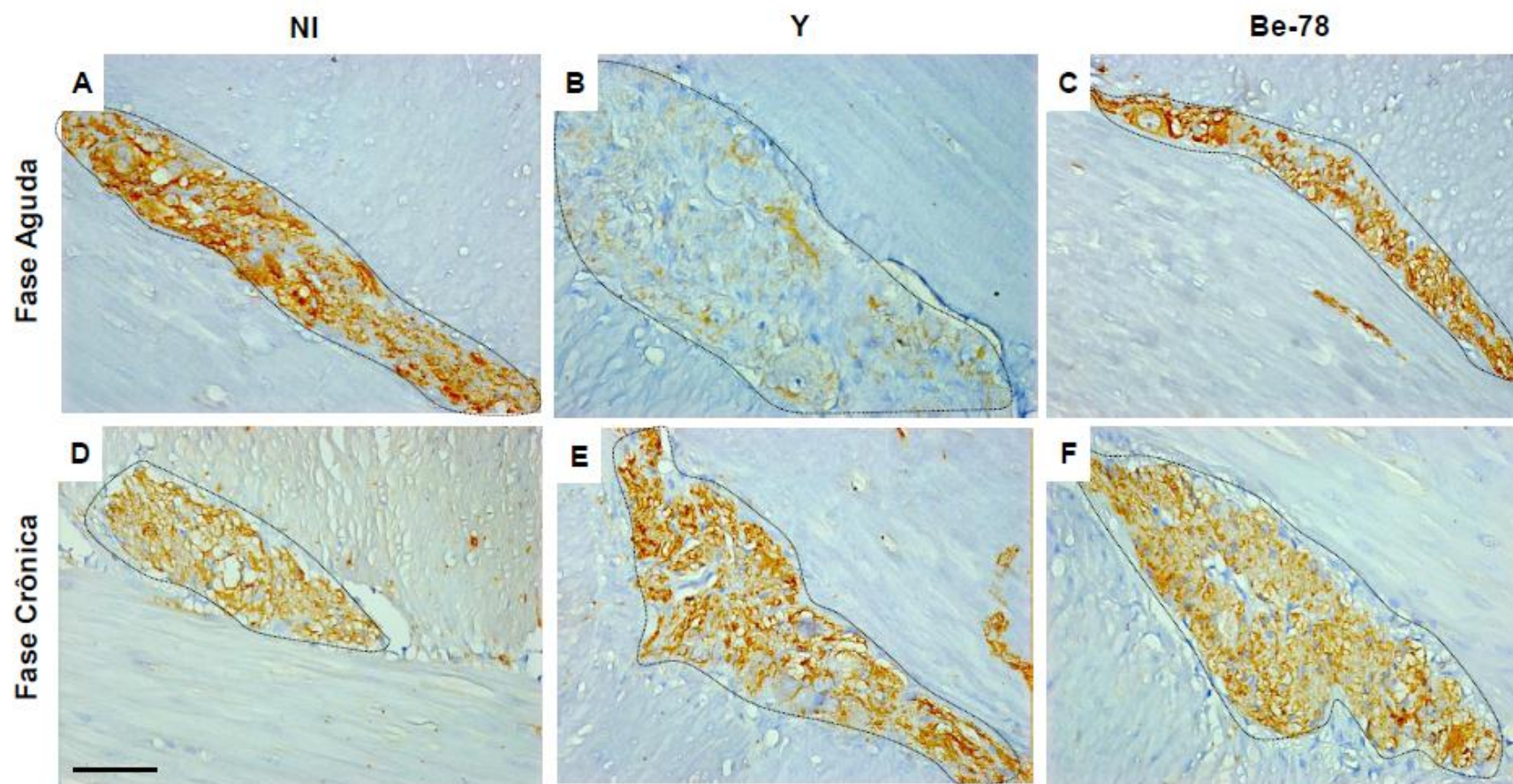


Figura 18: Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon de cães *Beagle* não-infectados (NI) ou infectados com as cepas Y (Y) ou Berenice-78 (Be-78) do *Trypanosoma cruzi* necropsiados nas fases aguda ou crônica da doença de Chagas. Gânglio mientérico GFAP-IR com aspecto normal em animais não-infectados (A) e infectados com a cepa Be-78 (C) e com redução da área GFAP imunomarcada em animais infectados com a cepa Y (B) na fase aguda; gânglio mientérico GFAP-IR com aspecto normal em animais não-infectados (D), infectados com a cepa Y (E) ou infectados com a cepa Be-78 (F) na fase crônica. Imuno-histoquímica anti-GFAP. Barra= 50 μ m.

4.5 Análises de Correlação e Associação

Foi observada associação apenas entre a parasitemia e o parasitismo do esôfago e do cólon ($p < 0,0001$) aos 30 dias após a infecção para os animais infectados com a cepa Be-78.

5. Discussão

Duas fases são clinicamente reconhecidas na DC humana durante sua evolução natural. Após a infecção pelo *T. cruzi* inicia-se a fase aguda, caracterizada por elevada parasitemia, parasitismo tecidual e processo inflamatório intensos. Nesta fase iniciam-se as lesões do SNA que geralmente estão relacionadas a um infiltrado inflamatório adjacente, associado ou não a ninhos do parasito (TAFURI, 1971; ANDRADE & ANDRADE, 1966; LISBOA, 1960). A fase crônica inicia-se quando o sistema imune do hospedeiro controla a multiplicação do parasito, ocorrendo simultaneamente a redução do parasitismo tecidual e sanguíneo. Conseqüentemente, o processo inflamatório tende a reduzir, porém a manutenção de uma resposta inflamatória ativa e progressiva está associada às alterações graves da DC e ao desenvolvimento da fase crônica determinada ou aparente, na qual as manifestações clínicas mais comuns envolvem o coração e o trato digestório, caracterizando as formas cardíaca ou digestiva (megacólon ou megaesôfago), respectivamente, que podem ocorrer isoladas ou em associação (TAFURI, 1971). Indivíduos com infecção crônica também podem desenvolver a forma indeterminada ou inaparente da DC. A forma indeterminada é a mais freqüente de todas as formas anatomoclínicas da DC (ANDRADE, 2005). O critério para o diagnóstico da forma indeterminada, adotado pela Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, prevê indivíduos assintomáticos, com evidências sorológicas e/ou parasitológicas da infecção pelo *T. cruzi*, com eletrocardiograma e estudo radiológico contrastado do esôfago e cólon dentro dos limites normais (ANDRADE, 2005). Os indivíduos infectados com o *T. cruzi* podem permanecer assintomáticos pelo resto de suas vidas, no entanto, aproximadamente 30% deles, após vários anos de infecção, podem apresentar alterações morfofuncionais no coração e/ou trato digestório e assim evoluírem para a forma determinada da DC (ANDRADE *et al.*, 1997). Dessa maneira, a forma inaparente ou indeterminada parece ter um complexo significado anatomoclínico e epidemiológico e tem sido considerada por muitos autores apenas como uma fase ou forma latente da DC e a despeito da normalidade nos exames radiológicos e eletrocardiográficos do tórax, lesões histológicas podem estar presentes nestes indivíduos e serem indicativas da evolução para a forma aparente mesmo que em níveis leves (PRATA, 2001; MACEDO, 1999; ANDRADE *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 1994; COURA *et al.*, 1985; MACEDO, 1980). Um estudo longitudinal realizado na cidade de Mambai/Goiás entre os anos de 1975/76 a 1986/91 revelou que 120 dos 190 pacientes com DC pesquisados apresentavam a forma indeterminada no ano inicial da pesquisa, no entanto, 39 desses pacientes indeterminados tiveram evolução progressiva em

1986/91 (CASTRO *et al.*, 2001). Destes 39 indivíduos, 33 evoluíram da forma indeterminada para a forma digestiva sendo que 23 pacientes desenvolveram megaesôfago, enquanto 10 pacientes manifestaram sintomas do megacólon (CASTRO *et al.*, 2001). Neste contexto, o substrato anatômico da forma inaparente é representado por lesões inflamatórias microscópicas focais, associadas ou não a presença de parasitos que são raramente demonstrados pelos métodos histológicos comuns (ANDRADE, 1991), mas têm sido revelados por técnicas mais sensíveis (VAGO *et al.*, 2003; 2000; HIGUCHI *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1993).

A infecção pelo *T. cruzi* tem sido reproduzida em vários modelos experimentais e o cão, em especial, apresenta uma alta representatividade das manifestações da DC sendo capaz de reproduzir a infecção aguda seguida por um longo período clinicamente assintomático e em alguns casos, anos depois, a fase crônica cardíaca fibrosante podendo apresentar insuficiência cardíaca congestiva (CALIARI *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 1997; LANA *et al.*, 1992; TAFURI, *et al.*, 1988; LANA *et al.*, 1988; ANDRADE & ANDRADE, 1980). Em relação à forma digestiva, apesar de alguns autores notificarem a observação de dilatação neste modelo (OKUMURA & CORRÊA-NETO, 1961; KÖBERLE, 1957), a desnervação e as lesões neuronais regressivas do plexo mientérico parecem não ter um padrão característico, podendo (CALIARI *et al.*, 1996; TAFURI, 1971) ou não (MACHADO *et al.*, 2001b) serem observadas.

O envolvimento do TGI na DC humana é caracterizado por distúrbios da motilidade principalmente relacionados à lesão no SNE. As lesões podem ser constituídas por degenerações neuronais, desnervação e alterações nos componentes enterogliais e nas células intersticiais de Cajal. Neste estudo, o envolvimento do TGI foi analisado, ao longo da DC experimental, em cães *Beagle* infectados com duas cepas do *T. cruzi* (Y ou Be-78) com características morfológicas e biológicas distintas. Foi observado que ambas as cepas foram capazes de parasitar o esôfago e o cólon dos cães durante a fase aguda e esse parasitismo induziu uma resposta inflamatória moderada, porém significativa em relação aos animais não-infectados, nos dois órgãos avaliados. Santos (1998) também observou parasitismo tecidual e processo inflamatório durante a fase aguda no esôfago de cães infectados com a cepa Be-78 do *T. cruzi*. Na fase crônica apenas o esôfago de um animal infectado com a cepa Be-78 apresentou positividade na PCR para *T. cruzi*, confirmando que o predomínio de formas largas coincide com uma multiplicação lenta e progressiva do

parasito (ANDRADE, 1985). Ainda nesse grupo processo inflamatório foi observado na fase crônica.

O parasitismo tecidual e o processo inflamatório observado no presente estudo corroboram com os dados obtidos por Andrade e Andrade (1980) no modelo cão durante a fase aguda. Estes autores avaliaram cortes histológicos, submetidos à coloração por HE, do esôfago de cães infectados com as cepas 12SF ou Colombiana do *T. cruzi* e necropsiados aos 30 dias de infecção, e observaram a presença frequente de infiltrado linfocitário ao longo do plexo de Auerbach e parasitismo tecidual raro sem correlação direta com o processo inflamatório. Os animais que sobreviveram à fase aguda foram necropsiados até o 36^o mês de infecção e apenas leve infiltrado linfocitário focal foi mantido no esôfago e esses cães foram considerados como portadores da forma indeterminada da DC (ANDRADE & ANDRADE, 1980). A manutenção da resposta inflamatória durante a fase crônica observada nos animais infectados com a cepa Be-78, neste estudo, provavelmente está relacionada a cepa e ao modelo experimental.

Tendo em vista que as duas cepas utilizadas neste trabalho foram capazes de parasitar o TGI e que a resposta inflamatória induzida por elas foi diferente, o próximo passo foi avaliar se a inflamação teria sido capaz de causar destruição tecidual suficiente para que houvesse um processo de cicatrização com neoformação de colágeno. A dosagem bioquímica do colágeno total solúvel mostrou que o processo inflamatório limitado à fase aguda observado nos animais infectados com a cepa Y foi capaz de causar necrose e neoformação de colágeno durante a fase crônica. É importante ressaltar que esses resultados foram confirmados pela avaliação qualitativa de cortes histológicos submetidos à coloração pelo Picrosírius Red e a partir dessa análise pôde-se observar um aumento deposição de fibras colágenas tipo I, associadas ao processo de fibrose, nos animais infectados com a cepa Y na fase crônica. A ausência de neoformação de colágeno no grupo Be-78 aos dois anos de infecção reflete a manutenção de processo inflamatório ainda ativo, que por sua vez pode estar relacionado à presença do parasito na fase crônica. Esses dados sugerem que os animais infectados com a cepa Y podem controlar a resposta inflamatória e induzir um processo de cicatrização das áreas teciduais destruídas já aos dois anos de infecção, enquanto a resposta imunorreguladora dos animais infectados com a cepa Be-78 parece ocorrer mais tardiamente, o que concorda com os dados já observados por Brener (1969) onde a resposta à infecção com a cepa Y é mais rápida o que resulta no controle precoce da parasitemia e do parasitismo tecidual.

Muitos autores têm relacionado as lesões do SNA à um processo inflamatório adjacente (TAFURI *et al.*, 1971; TAFURI, 1971; 1970; TAFURI & BRENER, 1967; ANDRADE & ANDRADE, 1966) e diante da presença de células inflamatórias margeando os gânglios mientéricos do esôfago e cólon observada neste estudo, foi avaliado se essa resposta inflamatória seria capaz de causar alguma alteração nos componentes ganglionares do plexo de Auerbach no modelo cão. A inervação mientérica foi analisada a partir da técnica de imunomarcção de áreas ganglionares PGP 9.5-IR. A imunomarcção com distintos marcadores pan-neuronais (enolase, PGP 9.5, HuCHuD) têm sido amplamente utilizadas para a avaliação de processos de desnervação do SNE em diferentes doenças inflamatórias gastrointestinais que envolvem distúrbios da motilidade relacionados às lesões do SNE, seja em pacientes ou em modelos experimentais (NASCIMENTO *et al.*, 2010; DA SILVEIRA *et al.*, 2009; 2008; 2007b; IANTORNO *et al.*, 2007; BOYER *et al.*, 2005). A proteína gene produzida 9.5 (PGP 9.5) é uma proteína citoplasmática específica para neurônios, expressa no corpo neuronal e seus processos, que permite a visualização e diferenciação destes dos demais componentes ganglionares (THOMPSON *et al.*, 1983). No esôfago, a inflamação induzida pela infecção com ambas as cepas foi capaz de causar redução da área PGP 9.5-IR durante a fase aguda, no entanto o processo de desnervação foi mantido na fase crônica apenas nos animais infectados com a cepa Be-78, o que pode estar associado à manutenção do processo inflamatório observado nesses animais, e embora o parasitismo tecidual nessa fase tenha sido observado apenas em um animal desse grupo esses resultados parecem concordar com a hipótese de participação do parasito na patogênese das lesões teciduais crônicas, sendo que a associação entre a gravidade da lesão e o parasitismo deva ter relação com o nível do parasitismo podendo este ser o determinante do limite entre as alterações capazes de levar ao surgimento dos “megas” ou àquelas características da forma indeterminada. A desnervação observada neste estudo foi constatada também em outros estudos que avaliaram o TGI ao longo da DC em modelos experimentais (OKUMURA, 1967; KÖBERLE, 1957). Na desnervação do plexo mientérico pode ocorrer perda neuronal ou apenas alterações das fibras nervosas (TAFURI *et al.*, 1979). Durante a fase aguda, Andrade e Andrade (1980) observaram perda neuronal e processos de degeneração com tumefação e vacuolização citoplasmática em alguns dos neurônios remanescentes em cães infectados com a cepa Y, enquanto Santos (1998) observou, em cães infectados com a cepa Be-78, embora não tenham constatado perda neuronal significativa, lesões destrutivas de gânglios mientéricos. No presente

estudo, semelhante ao observado por Santos (1998) não foi visto redução do número de neurônios, no entanto, estes apresentavam-se morfológicamente alterados, com hipertrofia neuronal coincidente com o aumento da área citoplasmática dos mesmos no esôfago dos animais infectados com a cepa Y. A hipertrofia neuronal na DC foi constatada em diferentes órgãos e modelos experimentais (SOUZA *et al.*, 1996; TAFURI, 1971; TAFURI & BRENER, 1967; 1966a; 1966b; ANDRADE & ANDRADE, 1966) e tem sido relacionada à processos degenerativos da célula que podem ocorrer após eventos isquêmicos (TAFURI, 1971). Na fase aguda da DC ocorre dilatação do órgão com consequente isquemia e dessa forma, a hipertrofia neuronal observada pode ser resultado de desequilíbrio hidroeletrolítico resultante da ausência de ATP com alteração do funcionamento da bomba de Na⁺ e K⁺ e o consequente influxo de água. No presente estudo, a ausência de lesões regressivas nos neurônios pode estar relacionada ao fato de que as alterações do cólon foram geralmente menos graves que aquelas observadas no esôfago. Desta maneira, embora ambos os órgãos apresentem alterações neuronais com a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, alguns mecanismos intrínsecos do cólon parecem torná-lo mais resistente às lesões relacionadas às alterações motoras típicas da DC apresentando uma lenta progressão, enquanto o esôfago parece ser primariamente afetado (REZENDE, 1968; REZENDE & RASSI, 1958).

Em concordância com resultados obtidos por diferentes autores ao longo da infecção experimental em modelo murino utilizando as mesmas cepas deste trabalho (TAFURI & BRENER, 1966a; TAFURI & RASO, 1962) ou cepas distintas (TAFURI & BRENER, 1967), as alterações do plexo mientérico observadas nos cães *Beagle* foram distribuídas de forma irregular, com gânglios lesados situados ao lado daqueles morfológicamente normais, tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Adicionalmente, a agressão precoce causada pela cepa Y neste trabalho também foi constatada nos estudos independentes acima citados.

Estudos avaliando o cólon de cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* revelaram diferentes resultados em relação às lesões do SNE. Machado e colaboradores (2001b) utilizando as cepas 147 ou SC-1 do *T. cruzi* estudaram o efeito da infecção e de reinfecções sobre o sistema nervoso intramural do esôfago de cães e, diferente dos resultados obtidos neste estudo, não observaram nenhuma destas alterações: miosite, ganglionite, periganglionite, desnervação e lesões neuronais degenerativas. Estes autores sugeriram que a ausência de lesões no SNE poderia estar associada ao tropismo das cepas

utilizadas. Além disso, em estudo prévio, Machado e colaboradores (2001a) avaliaram o coração e o cólon desses animais e concluíram que os cães estudados desenvolveram a forma indeterminada da DC não sendo constatadas lesões significativas em nenhum dos órgãos. Caliari e colaboradores (1996) avaliaram, durante a fase aguda, o esôfago de cães experimentalmente infectados com a cepa Be-78 e de forma semelhante aos dados deste trabalho, observaram miosite, periganglionite, ganglionite e lesões neuronais degenerativas no plexo mientérico, além de raros ninhos de amastigotas localizados no tecido muscular. Em nenhum dos estudos foi possível reproduzir o megaesôfago, porém, segundo Caliari e colaboradores (1996) os fenômenos inflamatórios e as lesões observadas talvez possam ser semelhantes às lesões básicas iniciais de esôfagos humanos na fase aguda da infecção. Essas observações concordam com a idéia de que a forma indeterminada possa apenas refletir um período de latência, onde o verdadeiro significado das lesões histopatológicas ainda não foram esclarecidos, permanecendo a dúvida se estas são auto-limitadas ou progressivas (ANDRADE *et al.*, 1997).

Comparando o perfil patogênico das duas cepas utilizadas nesse estudo, pôde-se observar que a infecção com a cepa Y, de uma forma geral, induz o desenvolvimento precoce de alterações o que pode ser refletido em uma resposta inflamatória limitada à fase aguda com um processo de cicatrização com neorformação de colágeno já aos dois anos de infecção. Além disso, o processo de desnervação e a redução dos componentes enterogliais GFAP-IR causado por esta cepa são significativos apenas na fase aguda. Estes dados são consistentes com o controle mais rápido da parasitemia (VELOSO *et al.*, 2008) e parasitismo tecidual. As alterações conseqüentes da infecção com a cepa Be-78 foram mantidas ao longo da infecção experimental ou mais tardias. No esôfago destes animais a resposta inflamatória iniciada na fase aguda foi observada também na fase crônica, e este fato pode estar associado ao parasitismo esofageal ainda observado nesta fase. Além disso, a manutenção do processo inflamatório ao longo da infecção experimental com a cepa Be-78 parece estar associada à desnervação mientérica progressiva. Camargos e colaboradores (2000) estudaram o impacto da infecção de ratos com as diferentes cepas do *T. cruzi* e embora tenham avaliado o tecido cardíaco, os autores também observaram que a cepa Y induzia um intenso processo inflamatório durante a fase aguda que era resolvido já ao final desta fase. Entretanto, ao contrário do que foi observado no presente estudo, a resposta inflamatória sustentada durante a fase crônica (animais infectados com a cepa Col 1.7G2) não estava associada à manutenção da desnervação cardíaca, e esta embora ocorresse na

fase aguda, era menor em relação à desnervação induzida pela infecção com as outras cepas estudadas. É importante ressaltar que no estudo de Camargos e colaboradores (2000) os animais infectados com a cepa Col1.7G2 apresentaram inflamação significativamente menor em comparação às outras cepas durante a fase aguda, no entanto mantiveram o parasitismo tecidual e uma resposta inflamatória discreta na fase crônica. A discordância em relação aos resultados do presente trabalho pode ser explicada pela manutenção do processo inflamatório significativo durante a fase crônica. Dessa forma a desnervação parece estar mais relacionada à intensidade da inflamação do que à manutenção desta ao longo da infecção experimental e ainda, embora as cepas Be-78 e Col1.7G2 sejam constituídas por formas largas (ANDRADE *et al.*, 1999; ANDRADE, 1985), diferenças nas características genéticas podem explicar o comportamento distinto delas em relação à patogenicidade. Ainda em relação aos animais infectados com a cepa Be-78, a perda de componentes enterogliais GFAP-IR foi evidente somente na fase crônica, o que pode refletir o desenvolvimento progressivo das lesões histopatológicas nestes animais.

Em comparação à infecção humana, as lesões do esôfago e cólon dos cães *Beagle* experimentalmente infectados com o *T. cruzi* avaliadas neste estudo parecem refletir as alterações histológicas do TGI observadas em pacientes com DC não portadores dos “megas” digestivos. Atualmente a persistência do parasito no tecido tem sido demonstrada e associada ao desenvolvimento das lesões crônicas da DC (AÑES *et al.*, 1999). Vago e colaboradores (2000) observaram a presença de kDNA do *T. cruzi* em amostras de coração e esôfago de pacientes com a formas cardíaca ou digestiva da DC, respectivamente. Os autores ainda caracterizaram geneticamente os parasitos obtidos diretamente desses tecidos e de forma interessante, observaram, em dois pacientes que apresentavam envolvimento tanto cardíaco quanto esofageal, a presença de perfis genéticos distintos do *T. cruzi* para cada órgão indicando a ocorrência de infecção com cepas policlonais e um histotropismo diferencial entre os clones, capaz de influenciar na patogênese e no desenvolvimento de distintas formas clínicas (VAGO *et al.*, 2000). Embora no presente estudo a infecção com as duas cepas tenha sido independente, uma distinta preferência tecidual pode ser sugerida na fase crônica, onde o tecido cardíaco apresentou maior positividade na PCR para a cepa Y (VELOSO *et al.*, 2008), enquanto o esôfago apresentou positividade apenas para a cepa Be-78. Essa observação pode ser reforçada por dados obtidos por Guedes e colaboradores (2007) durante a avaliação do coração destes animais, onde foi demonstrado que 80% dos animais infectados com a cepa Y apresentaram alterações cardíacas como cardiomegalia,

inflamação crônica e fibrose, em contraste, apenas 20% dos cães infectados com a cepa Be-78 apresentaram estas manifestações. Além disso, parasitemia observada aos 30 DAI para a cepa Be-78 (VELOSO, 2007) foi estatisticamente associada ao parasitismo tecidual, avaliado por PCR nos cães necropsiados na fase aguda, tanto no esôfago quanto no cólon.

Lages-Silva e colaboradores (2001) avaliaram amostras de sangue e esôfago de pacientes com megaesôfago chagásico, associados ou não ao megacólon e à cardiopatia, e observaram *T. cruzi* no sangue (hemocultura ou xendiagnóstico) de 75% dos pacientes que apresentavam parasitismo tecidual e de 66,7% daqueles com parasitismo tecidual negativo. A presença do *T. cruzi*, seus antígenos ou fragmentos genômicos foi observada em 98% desses pacientes, considerando todos os métodos utilizados. Em relação à PCR realizada por estes autores foi detectada positividade em 69,2% das amostras de esôfago e 90,4% das amostras de sangue e em relação aos pacientes em que foi observado parasitismo esofageal, 92,5 % também apresentaram PCR⁺ no sangue. Os autores também observaram uma relação entre o parasitismo tecidual, a intensidade do processo inflamatório e o grau clínico do megaesôfago, onde paciente classificados dentro do grau IV pareceram apresentar estas manifestações com maior frequência (LAGES-SILVA *et al.*, 2001). Todos estes resultados sustentam a participação do parasito nas lesões digestivas da fase crônica da DC, no entanto estudos avaliando a presença do *T. cruzi* em pacientes não portadores da forma digestiva geram resultados conflitantes. Vago e colaboradores (1996) observaram positividade para PCR em amostras de esôfago em quatro pacientes com megaesôfago chagásico, sendo que o tecido esofageal de três pacientes portadores apenas de cardiopatia chagásica foram negativos. Adad e colaboradores (2001) avaliaram o parasitismo tecidual através de imuno-histoquímica e também não observaram parasitismo tecidual no esôfago de pacientes com DC sem megaesôfago e a pesquisa de parasitos no tecido esofageal de pacientes com megaesôfago foi positiva em 50% deles. Em contrapartida, Vago e colaboradores (2000) mostraram a presença do parasito, por PCR, no esôfago de um paciente não portador de megaesôfago chagásico, resultado que foi posteriormente comprovado em trabalhos independentes onde 55-60% de amostras de esôfago de pacientes chagásicos sem megaesôfago, foram positivas para PCR (DA SILVEIRA *et al.*, 2005; MANOEL-CAETANO *et al.*, 2008; VAGO *et al.*, 2003). No presente estudo, amostras de esôfago e cólon foram submetidas à PCR para avaliação do parasitismo tecidual e ambas as cepas estudadas, Y e Be-78, foram detectadas no trato digestório no modelo canino. Na fase aguda, a positividade variou entre 75-100% no esôfago e 50-100%

no cólon e na fase crônica foi observado parasitismo apenas no esôfago (25%). Considerando a ausência dos “megas” nestes animais e assim classificando-os como não portadores da forma digestiva, esses dados concordam com os dados anteriores (DA SILVEIRA *et al.*, 2005; MANOEL-CAETANO *et al.* 2008; VAGO *et al.*, 2003; 2000) onde o parasito ou seus antígenos e fragmentos genômicos foram observados em percentuais mais baixos também em pacientes sem nenhum envolvimento do TGI na DC crônica, enquanto pacientes com megesôfago apresentaram até 100% de positividade (DA SILVEIRA *et al.*, 2005), no entanto, discordam dos resultados obtidos por Adad e colaboradores (1991) que não observaram nenhum parasito no tecido esofageal de pacientes sem megesôfago, fato que pode estar associado à baixa sensibilidade da técnica usada por estes autores. A presença de parasitos relacionada à ausência de sintomas clínicos na DC crônica sugere a participação de outros fatores, como as características genéticas e a resposta imune do hospedeiro, além de fenômenos associados à interação parasito-hospedeiro durante a fase aguda, para desenvolvimento da forma determinada da DC.

A presença de infiltrado inflamatório nos cães infectados com a cepa Be-78 durante a fase crônica, concorda com os resultados obtidos por Da Silveira e colaboradores (2007a; 2005) e Adad e colaboradores (2001) que também observaram miosite nos pacientes com DC não portadores da forma digestiva. Além da manutenção da resposta inflamatória, os animais do grupo Be-78 apresentaram uma sustentada desnervação mientérica na fase crônica, relação que também foi observada por Da Silveira e colaboradores (2005), porém esses autores constataram redução do número de neurônios, o que não foi observado neste estudo, onde a desnervação parece estar associada às lesões nas fibras nervosas. Outros estudos avaliaram a área PGP 9.5-IR no TGI de pacientes com DC portadores ou não da forma digestiva e, diferentemente do observado no presente estudo, apenas os pacientes com a forma digestiva apresentaram redução da área PGP 9.5-IR (NASCIMENTO *et al.*, 2010; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a). Esta diferença pode ser explicada pelas distintas metodologias de análise morfométrica utilizadas, sendo que no estudo dos autores acima citados apenas as fibras nervosas imunomarcadas extra-ganglionares foram avaliadas, enquanto no presente estudo, a área PGP 9.5-IR avaliada foi restrita à área ganglionar. Em relação às células gliais, os dados obtidos neste estudo indicam que a cepa Y foi capaz de induzir uma redução dos componentes enterogliais GFAP-IR na fase aguda que foi recuperada na fase crônica, enquanto os animais infectados com a cepa Be-78

apresentaram perda de células gliais entéricas GFAP-IR apenas na fase crônica. O comprometimento dos componentes enterogliais foi observado por outros autores na DC crônica, no entanto as células gliais GFAP-IR parecem estar associadas à proteção dos componentes ganglionares, sendo expressa quando estas células entram em contato com citocinas pró-inflamatórias. Neste sentido, pacientes com DC que não apresentam a forma digestiva têm área GFAP-IR aumentada em relação aos indivíduos não infectados, enquanto pacientes com a forma digestiva apresentam redução dessas áreas (NASCIMENTO *et al.*, 2010; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a). Diante disso, os cães infectados com a cepa Be-78 exibem o perfil de comprometimento das células gliais compatível com os pacientes portadores de megaesôfago ou megacólon. Uma vez que tem sido proposto que as células gliais operam um mecanismo de defesa no SNE contra *T. cruzi*, no qual estariam associadas à prevenção da desnervação do órgão (NASCIMENTO *et al.*, 2010), pode-se sugerir que a diminuição das células gliais GFAP-IR pode estar associada à desnervação, sendo ambas as alterações observadas no esôfago dos cães infectados com a cepa Be-78 durante a fase crônica.

Em relação ao processo de cicatrização na DC humana, a neoformação de colágeno observada nos animais infectados com a cepa Y, durante a fase crônica, em ambos os órgãos analisados concordam com os resultados obtidos por Adad e colaboradores (2001) que também observaram processo de fibrose nos pacientes sem forma digestiva. Da Silveira e colaboradores (2007b) observaram um sutil aumento de tecido fibroso no cólon dos pacientes sem megacólon, porém não houve diferença significativa em comparação ao grupo controle. No entanto os pacientes com a forma digestiva apresentaram fibrose no cólon, com quantificação da área ocupada por tecido fibroso estatisticamente aumentada em relação aos pacientes não chagásicos e aos pacientes com DC não portadores da forma digestiva.

Neste trabalho foi observado que os animais não-infectados apresentaram redução da inervação no tempo correspondente à fase crônica da infecção. Esse fato está associado à senescência e causa alterações da motilidade (MECIANO-FILHO *et al.*, 1995). Em pacientes com DC, achados radiológicos indicam que a motilidade esofageal está mais comprometida em pacientes com idade mais avançada em comparação àqueles mais jovens, e que este fato não está apenas ao tempo de exposição à disfagia e mas também à um processo natural neurodegenerativo conseqüente da senescência (DANTAS & APRILE, 2006). No presente estudo a redução da área PGP 9.5-IR observada no esôfago

dos animais infectados com a cepa Be-78 durante a fase crônica foi significativamente maior àquela causada pela senescência no grupo não-infectado e por essa razão foi aqui considerada como desnervação decorrente da DC.

Tendo em vista estes resultados, a positividade para o *T. cruzi*, observada para o grupo Be-78 durante a fase crônica, associada aos demais achados histopatológicos corroboram a idéia da participação do parasito nas lesões teciduais e ainda leva ao questionamento a respeito do caráter auto-limitado ou progressivo das manifestações da forma indeterminada da DC. Neste sentido, os dados aqui apresentados mostram que, embora os cães avaliados não tenham desenvolvido nenhum sintoma associado à forma digestiva da DC, alterações histológicas podem ser observadas no esôfago e cólon neste modelo experimental e estas parecem ser compatíveis com as lesões observadas em pacientes com a forma indeterminada, no entanto as lesões do SNE sugerem que o perfil indeterminado não é caracterizado por normalidade histológica. Estudos imunopatológicos indicam que a forma indeterminada representa uma situação ideal para ambos parasito e hospedeiro, onde ocorre um balanço entre a resposta imune capaz de manter o parasitismo em níveis baixos e o controle desta capaz de impedir mecanismos citotóxicos (DUTRA *et al.*, 2009). A influência direta de mecanismos imunes nas lesões crônicas suscita a necessidade de estudos abordando os aspectos imunológicos ao longo da DC tanto aparente quanto inaparente e as diferenças relativas ao fenótipo das células inflamatórias e ao microambiente de citocinas que parecem estar associadas às distintas formas clínicas da DC, a ausência de sintomas durante a fase latente da infecção e aos fatores responsáveis pela progressão para a forma crônica determinada.

6. Conclusões

A infecção experimental de cães da raça *Beagle* com as cepas Y ou Be-78 do *T. cruzi* mostrou que ambas são capazes de parasitar o esôfago e o cólon desses animais suscitando resposta inflamatória aguda.

Um padrão distinto de patogenicidade foi verificado:

- a inflamação focal associada a cepa Y, na fase aguda, evoluiu para cicatrização na fase crônica. Neste grupo, as alterações do SNE, como degenerações, desnervação e perda de células gliais GFAP-IR, foram restritas à fase aguda.

- a inflamação difusa associada a cepa Be-78, na fase aguda, persistiu na fase crônica, o que pode ser explicado pela manutenção do parasitismo tecidual. As lesões do SNE foram progressivas, sendo sustentadas na fase crônica.

Dessa forma, os cães avaliados neste estudo foram considerados como não portadores da forma digestiva, no entanto, alterações histológicas do TGI foram observadas a partir da infecção com essas duas cepas. Portanto, conclui-se que a infecção pela cepa Y leva ao controle precoce da lesão, enquanto a infecção com a cepa Be-78 resulta em lesões progressivas do TGI ao longo da doença de Chagas experimental no modelo cão.

7. Referências Bibliográficas

- ABREU-VIEIRA, P. M., FRANCISCO, A. F., SOUZA, S. M., COTTA, L. C., MALAQUIAS, B., REIS, A. B., GIUNCHETTI, R. C., VELOSO, V. M., LANA, M., TAFURI, W. L., CARNEIRO, C. M. ***Trypanosoma cruzi*: Serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in myocardium and spleen of dogs in the acute stage of infection with metacyclic or blood trypomastigotes.** *Experimental Parasitology*, 121:76–82, 2009.
- ADAD, S. J., CANÇADO, C. G., ETCHEBEHERE, R. M., TEIXEIRA, V. P. A., GOMES, U. A., CHAPADEIRO, E., LOPES, E. R. **Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis.** *Virchows Archiv: an International Journal of Pathology*, 438:254–258, 2001.
- ADAD, S. J., ANDRADE, D. C. S., LOPES, E. R., CHAPADEIRO, E. **Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico.** *Revista do Instituto Nacional de Medicina Tropical de São Paulo*, 33:443-450, 1991.
- AKHAVAN, D. **Análise de custo efetivo do programa de controle da doença de chagas no Brasil.** OPAS/OMS. Brasília, 2000.
- ANDERSSON, J., ÖRN, A., SUNNEMARK, D. **Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes.** *Immunology Letters*, 86: 207-212, 2003.
- ANDRADE, L. O., MACHADO, C. R. S., CHIARI, E., PENA, S. D. J., MACEDO, A. M. ***Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations.** *Experimental Parasitology*, 100:269–275, 2002.
- ANDRADE, L. O., MACHADO, C. R. S., CHIARI, E., PENA, S. D. J., MACEDO, A. M. **Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 100:163–172, 1999.
- ANDRADE, S. G. **Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 18:39-46, 1985.
- ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. **Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach. Estudo experimental em camundongos.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8:219-224, 1966.
- ANDRADE, Z. A. **A forma indeterminada da doença de Chagas em tempos de controle do *Triatoma infestans*.** *Revista de Patologia Tropical*, 34:105-111, 2005.
- ANDRADE, Z. A., ANDRADE, S. G., SADIGURSKY, G., WENTHOLD-JR, R. J., HILBERT, S. L., FERRANS, V. J. **The indeterminate phase of Chagas' Disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57:328-336, 1997.
- ANDRADE, Z. A. **A patologia da doença de Chagas no homem.** *Annales de La Societe Belge de Medecine Tropicale*, 65:15-30, 1985.
- ANDRADE, Z.A. **The canine model of Chagas disease.** *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 79: 77-95. 1984.
- ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. **A patologia da doença de Chagas experimental no cão.** *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 75:77-95, 1980.
- AÑES, N., CARRASCO, H., PARADA, H., CRISANTE, G., ROJAS, A., FUENMAYOR, C., GONZALES, N., PERCOCO, G., BORGES, R., GUEVARA, P., RAMIRES, J. L. **Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60:726-732, 1999.

- ARANTES, R. M., MARCHE, H. H., BAHIA, M. T., CUNHA, F. Q., ROSSI, M. A., SILVA, J. S. **Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice.** American Journal of Pathology, 164:1361-1368, 2004.
- BARBOSA, B. J. P., ARAÚJO, E. J. A., SILVA, A. V., SANT'ANA, D. M. G. **Atrofia neuronal mientérico no íleo de ratos infectados cronicamente por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii*.** Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoológicas da Universidade Paranaense, 12:101-108, 2009.
- BARBOSA, P. R. B. **The oral transmission of Chagas disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks.** International Journal of Cardiology, 112:132-133, 2006.
- BEREZIN, I., HUIZINGA, J. D., DANIEL, E. E. **Interstitial cells of Cajal in the canine colon: a special communication network at the inner border of the circular muscle.** The Journal of comparative neurology, 273 42-51, 1988.
- BERN, C., MONTGOMERY, S. P., HERWALDT, B. L., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A., DANTAS, R. O., MAGUIRE, J. H., ACQUATELLA, H., MORILLO, C., KIRCHHOFF, L. V., GILMAN, R. H., REYES, P. A., SALVATELLA, R., MOORE, A. C. **Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: A systematic review.** The Journal of the American Medical Association, 298:2171-2181, 2007.
- BOCANEGRA, J. M. C. **Estudo clínico parasitológico de pacientes com doença de Chagas, de Mambai-
GO, compreendendo um período de 30 anos.** Tese, Universidade de Brasília, 138p., 2008.
- BOYER, L., GHOREISHI, M., TEMPLEMAN, V., VALLANCE, B. A. B., BUCHAN, A. M. C., JEVON, G., JACOBSON, K. **Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis.** Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, 117:41-53, 2005.
- BREHMER, A., SCHRÖDL, F., NEUHUBER, W. **Morphological classifications of enteric neurons - 100 years after Dogiel.** Anatomy and Embryology, 200:125-135, 1999.
- BRENER, Z. **Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas'Disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 82:205-213, 1987.
- BRENER, Z. **The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 63:215-220, 1969.
- BRENER Z. **Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 59:19-26, 1965.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. **Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 19:220-224, 1963.
- BUNIATIAN, G. H., HARTMANN, H. J., TRAUB, P., WIESINGER, H., ALBINUS, M., NAGEL, W., SHOEMAN, R., MECKE, D., WESER, U. **Glial Fibrillary Acidic Protein-Positive Cells of the Kidney Are Capable of Raising a Protective Biochemical Barrier Similar to Astrocytes: Expression of Metallothionein in Podocytes.** The Anatomical Record 267:296-306, 2002.
- CALIARI, M. V., LANA, M., CAJÁ, R. A. F., CARNEIRO, C. M., BAHIA, M. T., SANTOS, C. A. B., MAGALHÃES, G. A., SAMPAIO, I. B. M., TAFURI, W. L. **Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy.** Virchows Archive, 441:69-76, 2002.
- CALIARI, M. V. **Princípios de morfometria digital. KS300 para iniciantes.** Ed. UFMG, 149, 1997.
- CALIARI, E. R., CALIARI, M. V., DE LANA, M., TAFURI, W. L. **Estudo quantitativo e qualitativo dos plexos de Auerbach e Meissner do esôfago de cães inoculados com o *Trypanosoma cruzi*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 29:17-20, 1996.

- CAMARGOS, E. R. S., FRANCO, D. J., GARCIA, C. M. M. G., DUTRA, A. P., TEIXEIRA, A. L., CHIARI, E., MACHADO, C. R. S. **Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: miocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62:604-612, 2000.
- CAMARGO, M. E., SILVA, G. R., CASTILHO, E. A., SILVEIRA, A. C. **Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 26:192-204, 1984.
- CAMPOS, P. P., BAKHLE, Y. S., ANDRADE, S. P. **Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain.** Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society, 16:416-424, 2008.
- CARNEIRO, C. M., MARTINS-FILHO, O. A., REIS, A. B., VELOSO, V. M., ARAÚJO, F. M. G., BAHIA, M. T., LANA, M., MACHADO-COELHO, G. L. L., GAZZINELLI, G., CORRÊA-OLIVEIRA, R., TAFURI, W. L. **Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs.** Acta Tropica, 101:120-129, 2007.
- CASTRO, C., PRATA, A., MACEDO, V. **Estudo clínico durante 13 anos de 190 chagásicos crônicos de Mambai, Goiás, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34:309-318, 2001.
- CASTRO, C., MACEDO, V., RESENDE, J. M., PRATA, A. **Estudo radiológico longitudinal do esôfago, em área endêmica de doença de Chagas, em um período de treze anos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 27: 227-233, 1994.
- CASTRO, C. N., REZENDE, J. M., CAMARGO, M., PRATA, A., MACEDO, V. **Prevalência sorológica da infecção chagásica em Mambai, Goiás-Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 20:13-17, 1987.
- CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1:159-218, 1909.
- COURA, J. R., ABREU, L. L., PEREIRA, J. B., WILLCOX, H. P. **Morbidade da doença de Chagas. IV Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 80:73-80, 1985.
- COSTA, M., BROOKES, S. J., HENNIG, G. **Anatomy and physiology of the enteric nervous system.** Gut, 47:15-19, 2000.
- CUNHA-NETO, E. & KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas' heart disease.** São Paulo Medical Journal, 113:757-766, 1995.
- DANTAS, R. O. & APRILE, L. R. O. **Comparison of esophageal motility impairment caused by Chagas' Disease in two age groups.** Arquivo de Gastroenterologia, 43:196-200, 2006.
- DA SILVEIRA, A. B. M., OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., FUJIWARA, R. T., CORREA-OLIVEIRA, R., BREHMER, A. **Enterogial cells act antigen-presenting cells in chagasic megacolon.** Human Pathology, 2010. *Epub ahead of print*
- DA SILVEIRA, A. B. M., FREITAS, M. A. R., OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., FURNESS, J. B., CORREA-OLIVEIRA, R., D'AVILA REIS, D. **Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enterogial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients.** Human Pathology, 40:244-251, 2009.
- DA SILVEIRA, A. B. M., FREITAS, M. A. R., OLIVEIRA, E. C., NETO, S. G., LUQUETTI, A. O., FURNESS, J. B., CORREA-OLIVEIRA, R., D'AVILA-REIS, D. **Neuronal plasticity of the enteric**

- nervous system is correlated with chagasic megacolon development.** *Parasitology*, 135:1337-1342, 2008.
- DA SILVEIRA, A. B. M., LEMOS, E. M., ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R., FURNESS, J. B., D'AVILA-REIS, D. **Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells.** *Human Pathology*, 38:1256- 1264, 2007a.
- DA SILVEIRA, A. B. M., ADAD, . J., CORRÊA-OLIVEIRA, R., FURNES, J. B., D'ÁVILA REIS, D. **Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon.** *Parasitology*, 134:789-96, 2007b.
- DA SILVEIRA, A. B., ARANTES, R. M., VAGO, A. R., LEMOS, E. M., ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R. AND D'AVILA REIS, D. **Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megasophagus.** *Parasitology*, 131:627-634, 2005.
- DEL PUERTO, R., NISHIZAWA, J. E., KIKUCHI, M., LIHOSHI, N., ROCA, Y., AVILAS, C., GIANELLA, A., LORA, J., VELARDE, F. U. G., RENJEL, L. A., MIURA, S., HIGO, H., KOMIYA, N., MAEMURA, K., HIRAYAMA, K. **Lineages analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms Chagas disease in Bolivia.** *Plos Neglected tropical Diseases*, 4:1-6, 2010.
- DIAS, J. C. P. **Controle da doença de Chagas. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral.** In: JCP Dias, JR Coura (eds), Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, p. 453-468, 1997.
- DIAS, J. C. P. **Natural history of Chagas' disease.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 65: 359–366, 1995.
- DIAS, J. C. P., CAMACHO, L. A. B., SILVA, J. C., MAGALHÃES, J. S., KRIEGER, H. **Esofagopatia chagásica na área endêmica de Bambuí, MG-Brasil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 16:46-57, 1983.
- DUTRA, W. O., MENEZES, C. A. S., VILLANI, F. N. A., COSTA, G. C., DA SILVEIRA, A. B. M., D'ÁVILA-REIS, D., GOLLOB, K. J. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune response in human Chagas disease.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104:208-218, 2009.
- FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S., THUNEBERG, L. **Guide to the identification of interstitial cells of Cajal.** *Microscopic Research and Technique*, 47:248-66, 1999.
- FAUSSONE-PELLEGRINI M. S., CORTESINI, C. **Ultrastructural features and localization of the interstitial cells of Cajal in the smooth muscle coat of human esophagus.** *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17:187-97, 1985.
- FLORÉZ, O., ESPER, J., HIGUERA, S., BARRAZA, M. F., CABRERA, H. B., MANTILLA, J. C., RUGELES, C. I. G. **Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* I in a Colombian patients.** *Parasitology Research*, 107:439-442, 2010
- FREITAS, J. L. P., LION, M. F., TARTARI, J. T. A. **Resultados de uma investigação sobre moléstia de Chagas realizada no município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença.** *Revista do Hospital das Clínicas*, 8:81-92, 1953.
- FURNESS, J. B., CLERC, N., KUNZE, W. A. A. **Memory in the enteric nervous system.** *Gut*, 47:60-62, 2000.
- FURNESS, J. B. **Types of neurons in the enteric nervous system.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81, 87-96, 2000.

- FURNESS, J. B. & COSTA, M. **Types of nerves in the enteric nervous system.** *Neuroscience*, 5:1-20, 1987.
- GASCÓN, J., ALBAJAR, P CAÑAS, E., FLORES, M., PRAT, J. G., HERRERA, R. N., LAFUENTE, C. A., LUCIARDI, H. L., MONCAYO, ÁLVARO., MOLINA, L., MUÑOZ, J., PUENTE, S., SANZ, G., TREVIÑO, B., SERGIO-SALLES, X. **Diagnosis, management, and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic.** *Revista Española de Cardiología*, 60:285-93, 2007.
- GOLGHER, D. & GAZZINELLI, R.T. **Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease.** *Autoimmunity*, 37:399-409, 2004.
- GUEDES, P. M. M. **Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*.** Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, 122p., 2006.
- GUEDES, P. M. M., VELOSO, V. M., CALIARI, M. V., CARNEIRO, C. M., SOUZA, S. M., LANA, M., CHIARI, E., BAHIA, M. T., GALVÃO, L. M. C. ***Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in *Beagle* dogs.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102:149:147, 2007.
- HAGGER, R. FINLAYSON, C., KAHN, F., DE OLIVEIRA, R., CHIMELLI, L., KUMAR, D. **A deficiency of interstitial cells of Cajal in chagasic megacolon.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 80:108-111, 2000.
- HANSEN, M. B. **The enteric nervous system II: gastrointestinal functions.** *Pharmacology & Toxicology*, 92:249–257, 2003.
- HIGO, H., MIURA, S., HORIO, M., MIMORI, T., HAMANO, S., AGATSUMA, T., YANAGI, T., CRUZ-REYES, A., UYEMA, N., ROJAS DE ARIAS, A., MATTA, V., AKAHANE, H., HIRAYAMA, K., TAKEUCHI, T., TADA, I., HIMENO, K. **Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects.** *Parasitology International*, 53:337-344, 2004.
- HIGUCHI, M. L., BRITO, T., REIS, M. M., BARBOSA, A., BELLOTTI, G., PEREIRA-BARRETO, A. C., MEGGI, F. **Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagas'ic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings.** *Cardiovascular Pathology*. 2:101-106, 1993.
- HIRSCHBERG, D. L., YOLES, E., BELKIN, M. AND SCHWARTZ, M. **Inflammation after axonal injury has conflicting consequences for recovery of function: rescue of spared axons is impaired but regeneration is supported.** *Journal of Neuroimmunology*, 50:9–16, 1994.
- HOLZER, P. **Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain.** *Neurogastroenterology & Motility*, 14:459-475, 2002.
- IANTORNO, G., BASSOTTI, G., KOGAN, Z., LUMI, C. M., CABANNE, A. M., FISOGNI, S., VARRICA, L. M., BILDER, C. R., MUNÓZ, J. P., LISERRE, B., MORELLI, A., VILLANACCI, V. **The Enteric Nervous System in Chagasic and Idiopathic Megacolon.** *The American Journal of Surgical Pathology*, 31:460-468, 2007.
- JONES, E. M., COLLEY, D. G., TOSTES, S., LOPES, R., VNENCAK-JONES, C. L., MCCURLEY, T. L. **Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:348-357, 1993.
- KÖBERLE, F. **Pathogenesis of Chagas disease.** *Ciba Foundation Symposium*, 20:137-158, 1974.
- KÖBERLE, F. & ALCANTARA, F. G. **Mecanismo de destruição neuronal do sistema nervoso periférico na molestia de Chagas.** *Hospital*, 57:1057, 1962, 1960.

- KÖEBERLE, F. **Patogenia da moléstia de Chagas. Estudos dos órgãos musculares ocos.** Revista Goiana de Medicina, 3:155-180, 1957.
- KUNZE, W. A. A. & FURNESS, J. B. **The enteric nervous system and regulation of intestinal motility.** Annual Review of Physiology, 61:117-142, 1999.
- LAGES-SILVA, E., CREMA, E., RAMIREZ, L. E., MACEDO, A. M., PENA, S. D., CHIARI, E. **Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 65:435-441, 2001.
- LANA, M., CHIARI, E., TAFURI, W. L. **Experimental Chagas disease in dogs.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 87:59-71, 1992.
- LANA, M., TAFURI, W. L., CALIARI, M. V., BAMBIRRA, E. A., CHIARI, C. A., RIOS LEITE, V. H., BARBOSA, A. J. A., TOLEDO, M. J. O., CHIARI, E. **Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanossomíase cruzi experimental no cão.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 21:113-121, 1988.
- LANA, M. & CHIARI, C. A. **Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 81:247-53, 1986.
- LARANJA, F. S., DIAS, E., NOBREGA, G., MIRANDA, A. **Chagas' disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study.** Circulation: Journal of the American Heart Association, 14:1035-59, 1956.
- LIMA, A. M., CABRINE-SANTOS, M., TAVARES, M. G., GEROLIN, P., LAGES-SILVA, E., RAMIREZ, A. E. **Interstitial cells of Cajal in chagasic megaesophagus.** Annals of Diagnostic Pathology, 12:271-274, 2008.
- LISBOA, A. C. **Sobre a forma congênita da doença de Chagas. Estudo anatomopatológico de 6 casos.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2:319-334, 1960.
- LOPES, E. R., TAFURI, W. L., CHAPADEIRO, E., PIRES, L.L., MACEDO, V., PRATA, A. R., TANUR, R. **Doença de Chagas em cães. Estudo anátomo-patológico de animais naturalmente infectados.** Revista do Instituto de Medicina Tropical, 22:135-143, 1980.
- MACEDO, A. M., MACHADO, C. R., OLIVEIRA, R. P., PENA, S. D. J. ***Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99:1:12, 2004.
- MACEDO, V. **Indeterminate form of Chagas Disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94:311-316, 1999.
- MACEDO, V. **Forma indeterminada da Doença de Chagas.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38:34-40, 1980.
- MACHADO, E. M. M., FERNANDES, A. J., MURTA, S. M., VITOR, R. W. A., CAMILO-JR, D. J., PINHEIRO, S. W., LOPES, E. R., ADAD, S. J., ROMANA, A. J., DIAS, J. C. P. **A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 65:958-965, 2001a.
- MACHADO, E. M. M., CAMILO-JÚNIOR, D. J., PINHEIRO, S. W., LOPES, E. R., FERNANDES, A. J., PINTO-DIAS, J. C., ADAAD, S. J. **Morphometry of Submucous and Myenteric Esophageic Plexus of Dogs Experimentally Reinfected with *Trypanosoma cruzi*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96:545-548, 2001b.
- MALTOS, K. L., MENEZES, G. B., CALIARI, M. V., ROCHA, O. A., SANTOS, J. M., ALVES, D. L., DUARTE, I. D., FRANCISCHI, J. N. **Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp.** Archive of Oral Biology, 49:443-450, 2004.

- MANOEL-CAETANO, F. S., CARARETO, C. M. A., BORIM, A. A., MIYAZAKI, K., SILVA, A. E. **kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and esophageal mucosa from chronic chagasic patients.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102:1102-1107, 2008.
- MANTILLA, J. C., ZAFRA, G., MACEDO, A. M., GONZALES, C. I. **Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient.** Human Pathology, 41:610-613, 2010.
- MECIANO-FILHO, J., CARVALHO, V. C., SOUZA, R. R. **Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation.** Gerontology, 41:18-21, 1995.
- MEDEIROS, M. M., ARAÚJO-JORGE, T. C., BATISTA, W. S., ALVES DA SILVA, T. M. O., SOUZA, A. P. ***Trypanosoma cruzi* infection: do distinct populations cause intestinal motility alteration.** Parasitology Research, 1:239-242, 2010.
- MELO, R. C. & BRENER, Z. **Tissue tropismo of different *Trypanosoma cruzi* strains.** *Journal of Parasitology*, 64:475-482, 1978.
- MENDES, H. M. F., ESCOBAR, A., VASCONCELOS, A. C., ZUCOLOTO, S., ALVES, G. E. S., FALEIROS, R. R. **Alterações morfológicas no plexo mientérico do cólon menor equino distendido experimentalmente.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 29:557-562, 2009.
- MENDES, J. B., ROCHA, M. A., ARAÚJO, F. A., MOURA, S. A. L., FERREIRA, M. A. N. D., ANDRADE, S. P. **Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice.** Microvascular Research, 78:265-271, 2009.
- MENEGHELLI, U. **Chagasic Enteropathy.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37:252-260, 2004.
- MILES, M. A., CEDILLOS, R. A., POVOA, M. M., DE SOUZA, A. A., PRATA, A., MACEDO, V. **Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease?** Lancet, 1:1338-1340, 1981.
- MONCAYO, A. **Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98:577-591, 2003.
- MOURA, S. A. L., NEGRI, G., SALATINO, A., LIMA, L. D. C., DOURADO, L. P. A., MENDES, J. B., ANDRADE, S. P., FERREIRA, M. A. N. D., CARA, D. C. **Aqueous Extract Of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation Of Inflammation And Wound Healing By Using Subcutaneous Implanted Sponges.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 1-9, 2009.
- NASCIMENTO, R. D., LISBOA, A. S., FUJIWARA, R. T., FREITAS, M. A. R., ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R., D'ÁVILA-REIS, D., DA-SILVEIRA, A. B. M. **Characterization of enteroglia cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus.** Human Pathology, 41:528-534, 2010.
- OKUMURA, M. **Contribuição para o estudo das lesões do neurônios do plexo mioentérico do cólon na moléstia de Chagas experimental no camundongo branco (*Mus Musculus*).** Revista do Hospital das Clínicas, 22:192-203, 1967.
- OKUMURA, M., CORRÊA-NETTO, A. **Produção experimental de megas em animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*.** Revista do Hospital das Clínicas, 16:338-341, 1961.
- OLIVEIRA, R. B., TRONCON, L. E. A., DANTAS, R. O., MENEGHELLI, U. G. **Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease.** The American Journal of Gastroenterology, 93:884-889, 1998.

- PARADA, H., CARRASCO, H.A., ANEZ, N., FUENMAYOR, C., INGLESSIS, I. **Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical parasitological and histopathological study.** International Journal of Cardiology, 60:49-54, 1997.
- PINHEIRO, S. W., RUA, A. M., ETCHEBEHERE, R. M., CANCADO, C. G., CHICA, J. E., LOPES, E. R. AND ADAD, S. J. **Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36:461-466, 2003.
- PHILLIPS, R. J., BURDICK, M. D., HONG, K., LUTZ, M. A., MURRAY, L. A., XUE, Y. Y., BELPERIO, J. A., KEANE, M. P., STIRETER, R. M. **Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis.** The Journal of Clinical Investigation, 114: 438-46, 2004.
- POWLEY, T. L. **Vagal input to the enteric nervous system.** Gut, 47:30-32, 2000.
- PRATA A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** The Lancet Infectious Diseases, 1:92-100, 2001.
- REZENDE, J. M. **The digestive tract in Chagas' disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 79:97-106, 1984.
- REZENDE, J. M. Aspectos clínicos da colopatia chagásica. Revista Goiana de Medicina, 14:69-72,1968.
- REZENDE, J. M., RASSI, A. **Comprometimento esofágico na moléstia de Chagas. Megaesôfago e cardiopatia.** O Hospital, 53:115, 1958.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R., HUDSON, L. **Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*.** Clinical and experimental immunology, 44:349-354, 1981.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R., HUDSON, L. ***Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells.** Clinical and experimental immunology, 40:36-41, 1980.
- SALDANHA, J. C., SANTOS, V. M., REIS, M. A., CUNHA, D. F., TEIXEIRA, V. P. A. **Morphologic and morphometric evaluation of pancreatic islets in chronic chagas' disease.** Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, 56:131-138, 2001.
- SÁNCHEZ-GUILLÉN, M. C., LÓPEZ-COLOMBO, A., ORDÓÑEZ-TOQUERO, G., GOMEZ-ALBINOISIDOR, I., RAMOS-JIMENEZ, J., TORRES-RASGADO, E., SALGADO-ROSAS, H., ROMERO-DÍAZ, M. PULIDO-PÉREZ, P., PÉREZ-FUENTES R. **Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 101:733-40, 2006.
- SANDERS, K. M., KOH, S. D., WARD, S. M. **Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract.** Annual Review of Physiology, 68:307-34, 2006.
- SANTOS, C. A. B. **Estudo Morfológico e Morfométrico do Esôfago do Cão Normal e na Fase Aguda da Tripanosomíase Cruzi Experimental, com Referência Especial ao Plexo Mientérico,** Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, 74p., 1998.
- SANTOS, F. R., PENA, S. D. J., EPPLEN, J. T. **Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique.** Human Genetics, 90:655-656, 1993.
- SAVIDGE, T. C., SOFRONIEW, M. V., NEUNLIST, M. **Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain.** Laboratory Investigation, 87:731-736, 2007.
- SCHMUNIS, G. A. **Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102:75-85, 2007.

- SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. **Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco.** Folia Clinica et Biológica, 20:191-203, 1953.
- SOARES, M. B. P., PONTES-DE-CARVALHO, L., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. **The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 73:547:559, 2001.
- SOUZA, M. M., ANDRADE, S. G., BARBOSA-JR, A. A., SANTOS, R. T. M., ALVES, V. A. F., ANDRADE, Z. A. ***Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 91:217-224, 1996.
- TAFURI, W. L., LANA, M., CHIARI, E., CALIARI, M. V., BAMBIRRA, E. A., RIOS-LEITE, V. H., BARBOSA, J. A. **O cão como modelo experimental para o estudo da história natural da doença de Chagas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 21:82-83, 1988.
- TAFURI, W. L., LIMA-PEREIRA, F. E., BOGLIOLO, L., RASO, P. **Lesões do sistema nervoso autônomo e do tecido muscular estriado esquelético na fase crônica da *Tripanosomose cruzi* experimental. Estudos ao microscópio óptico e eletrônico.** Revista Goiana de Medicina, 25:61-67, 1979.
- TAFURI, W. L. **Light and electron microscopy studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis.** Virchows Archiv: an international journal of pathology, 354:36-149, 1971.
- TAFURI, W. L., MARIA, T. A. AND LOPES, E. R. **Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study.** Revista do Instituto de Medicina Tropical, 13:76-91, 1971.
- TAFURI, W. L. **Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease: light and electron microscope studies.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 19:405-417, 1970
- TAFURI, W. L. & BRENER, Z. **Lesões dos plexos de Meissner e de Auerbach do intestino do camundongo albino na fase crônica da *Tripanosomiose cruzi* experimental.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 9:149-154, 1967.
- TAFURI, W. L. & BRENER, Z. **Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na tripanosomiose cruzi experimental, na fase aguda.** Hospital, 69: 371-383. 1966a.
- TAFURI, W. L. & BRENER, Z. **Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na fase crônica da tripanosomiose cruzi experimental.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 8: 177-183. 1966b.
- TAFURI, W. L. & RASO, P. **Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na tripanosomiose.** Hospital, 62:199-216, 1962.
- TAFURI, W. L., TAFURI, C. P. **The submucous plexus in the guinea pig intestine: quantitative study of the ganglia and nerve cells of the ileum caecum and colon.** Revista da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 165:174, 1957.
- TARLETON, R.L E ZHANG, L. **Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?** Parasitological Today, 15:94-99, 1999.
- TEIXEIRA, A. R. L.; ROTERS, F. A.; MOTT, K. E. **Acute Chagas' Disease.** Gazeta Médica da Bahia, 3:176-186, 1970.
- THOMPSON, R. J., DORAN, J. F., JACKSON, P., RODE, J. **PGP 9.5 – a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells.** Brain Research, 278:224-228, 1983.

- THUNEBERG, J. **Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells?** *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 71:1-130, 1982.
- VAGO, A. R., SILVA, D. M., ADAD, S. J., CORREA-OLIVEIRA, R., D'ÁVILA REIS, D. **Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in esophagus without megaesophagus.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97:308-309, 2003.
- VAGO, A. R., ANDRADE, L. O., LEITE, A. A., D'AVILA, R. D., MACEDO, A. M., ADAD, S. J., TOSTES, J. R., MOREIRA, M. C., FILHO, G. B., PENA, S. D. **Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs.** *The American Journal of Pathology*, 156:1805-1809, 2000.
- VAGO, A. R., MACEDO, A. M., ADAD, S. J., REIS, D. A., CORRÊA-OLIVEIRA, R. **PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic Chagas disease.** *Lancet*, 348:891-892, 1996.
- VELOSO V. M., GUEDES, P. M., ANDRADE, I. M., CALDAS, I. S., MARTINS, H. R., CARNEIRO, C. M., MACHADO-COELHO, G. L. L., LANA, M., GALVÃO, L. M. C., BAHIA, M. T., CHIARI, E. ***Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103:528-534, 2008.
- VELOSO, V. M. **Doença de Chagas experimental em cães da raça *Beagle*: avaliação clínica, parasitológica, histopatológica e molecular.** Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, 147p., 2007.
- VIRREIRA, M., SERRANO, G., MALDONADO, L., SVOBODA, M. ***Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from bolivian patients.** *Acta Tropica*, 100: 252-255, 2006.
- VON BOYEN, G. B. T., STEINKAMP, M., REINSHAGEN, M., SCHAFER, K. H., ADLER, G., KIRSCH, J. **Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia.** *Gut*, 53:222-228, 2004.
- WARD, S. M., BURNS, A. J., TORIHASHI, S., SANDERS, K. M. **Mutation of the proto-oncogene *c-kit* blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine.** *The Journal of Physiology*, 480:91-97, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease control and prevention in Europe. Report of a WHO Informal Consultation**, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee. Control of Chagas disease. Brasília, Brasil. WHO technical report series 905**, 2002.
- ZAFRA, G., MANTILLA, J. C., VALADARES, H. M., MACEDO, A. M., GONZALES, C. L. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitology Research*, 103: 731-734, 2008.
- ZELEDÓN, R., RABINOVICH, J. E. **Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors.** *Annual review of entomology*, 26:101-33, 1981.
- ZINGALES, B., ANDRADE, S. G., BRIONES, M. R. S., CAMPBELL, D. A., CHIARI, E., FERNANDES, O., GUHL, F., LAGES-SILVA, E., MACEDO, A. M., MACHADO, C. R., MILES, M. A., ROMANHA, A. J., STURM, N. R., TIBAYRENC, M., SCHIJMAN, A. G. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcIV.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104:1051-1054, 2009.

ZINGALES, B., SOUTO, R. P., MANGIA, R. H., LISBOA, C. V., CAMPBELL, D. A., COURA, J. R., JANSEN, A., FERNANDES, O. **Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences.** International Journal for Parasitology, 28:105-112, 1998.