

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**PESQUISA DO TRYPANOSOMA CRUZI E ANÁLISE DO
INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO ESÔFAGO E CÓLON DE
CHAGÁSICOS CRÔNICOS COM E SEM MEGA**

ELIÂNGELA DE CASTRO CÔBO

UBERABA – MG

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELIÂNGELA DE CASTRO CÔBO

**PESQUISA DO TRYPANOSOMA CRUZI E ANÁLISE DO
INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO ESÔFAGO E CÓLON DE
CHAGÁSICOS CRÔNICOS COM E SEM MEGA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração: Patologia Geral, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sheila Jorge Adad
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Adilha Misson Rua Micheletti

UBERABA - MG

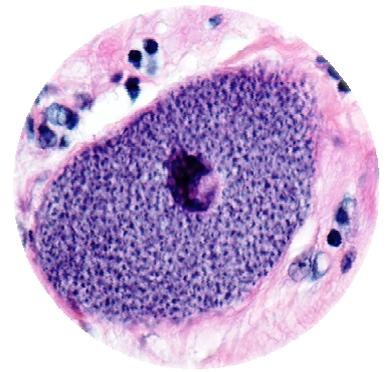
Setembro, 2009

CÔBO, Eliângela C.,

*Pesquisa do Trypanosoma cruzi e análise do infiltrado
inflamatório no esôfago e cólon de chagásicos crônicos com e sem
mega.*

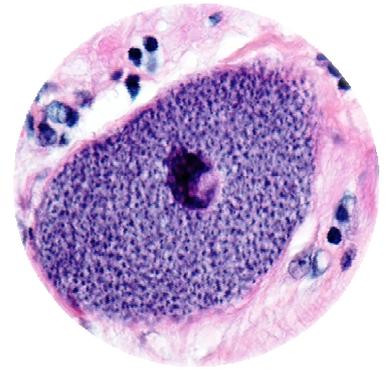
Tese (Mestrado em Patologia Geral) –
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2009.
Orientadora: Profa. Dra. Sheila Jorge Adad.

1. Megacólon. 2. Megaesôfago. 3. Patologia/Doença de
Chagas. 4. Trypanosoma cruzi. 5. Imuno-histoquímica. 6. Miosite
7. Ganglionite I. Título. II. ADAD, SHEILA JORGE.



Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE GRÁFICO, QUADROS,TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
INTRODUÇÃO.....	2
OBJETIVOS.....	33
1. Objetivo Geral.....	33
2. Objetivos Específicos.....	
	33
MATERIAL E MÉTODO.....	35
1. Materiais.....	35
2. Metodologia.....	36
2.1 Coleta e processamento do material.....	36
2.2 Procedimento Imuno-histoquímico.....	37
2.3 Pesquisa do <i>T. cruzi</i> em cortes histológicos corados por imuno-histoquímica....	38
2.4 Análise semi-quantitativa da intensidade da miosite e ganglionite na túnica muscular e no plexo mientérico.....	39
2.5 Caracterização imuno-histoquímica qualitativa do tipo de infiltrado inflamatório.....	39
2.6 Análise estatística.....	39
RESULTADOS.....	41
1. Idade e sexo.....	41
2. Pesquisa do <i>T. cruzi</i> em cortes histológicos corados por imuno-histoquímica.....	42
3. Análise semi-quantitativa da intensidade da miosite e ganglionite.....	45
4. Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório.....	55
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	67
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75



Lista de Figuras

Fig. 1 - Ninho de <i>T. cruzi</i> na túnica muscular em caso de megaesôfago, (HE - 1000x).....	44
Fig. 2 - Mesmo ninho da Fig. 1 corado com imuno-histoquímica para <i>T. cruzi</i> – (400x).....	44
Fig. 3 - Único ninho <i>T. cruzi</i> visto em caso de megacólon. HE - 1000x.....	44
Fig. 4 - Mesmo ninho da Fig. 3 corado por imuno-histoquímica - 1000x.....	44
Fig. 5 - Miosite crônica intensa em caso de megaesôfago (HE - 100x).....	46
Fig. 6 - Detalhes da Fig. anterior evidenciando predomínio de mononucleares e aspecto destrutivo da inflamação (HE - 400x).....	46
Fig. 7 - Ganglionite crônica em megaesôfago, classificada como intensa por haver diversos gânglios com esse mesmo aspecto (HE – 400x).....	46
Fig. 8 - Gânglio em megaesôfago com denervação e fibrose (HE - 400x).....	46
Figs. 9 e 10 - Megacólon e megaesôfago, respectivamente, mostrando eosinófilos permeando o infiltrado inflamatório, (HE – 400x).....	47
Figs. 11 e 12 - Megaesôfago e megacólon, respectivamente, evidenciando focos de miosite com granuloma, (Giemsa e HE 400x).....	47
Fig. 13 - Miosite moderada em esôfago sem mega (HE - 400x).....	57
Figs. 14 a 16 - Mesmo caso da Fig. 13, corado por imuno-histoquímica; notar o intenso predomínio de Linfócitos T (Fig. 14 - CD3 – 400x), ausência de Linfócitos B (Fig. 15 - CD20 – 400x) e esparsos “macrófagos” (CD68 - 400x).....	57
Fig. 17 - Ganglionite moderada em esôfago sem mega (HE - 400x).....	58
Figs. 18 a 20 - Mesmo caso da Fig. 17, corado por imuno-histoquímica; notar o intenso predomínio de Linfócitos T (Fig. 18 - CD3 – 400x), ausência de Linfócitos B (Fig. 19 - CD20 – 400x) e esparsos “macrófagos” (Fig. 20 - CD68 - 400x).....	58
Fig. 21 - Miosite intensa em caso de megacólon (HE - 400x).....	59
Figs. 22 a 24 - Mesmo caso da Fig. 22, corado por imuno-histoquímica; notar o intenso predomínio de Linfócitos T (Fig. 22 - CD3 – 400x), ausência de Linfócitos B (Fig. 23 - CD20 – 400x) e ausência de “macrófagos” (Fig. 24 - CD68 - 400x).....	59
Fig. 25 - Ganglionite intensa em caso de megacólon (HE - 400x).....	60
Figs. 26 a 28 - Mesmo caso da Fig. 25, corado por imuno-histoquímica; notar o intenso predomínio de Linfócitos T (Fig. 26 - CD3 – 400x), ausência de Linfócitos B (Fig. 27 - CD20 – 400x) e esparsos “macrófagos” (Fig. 28 - CD68 - 400x).....	60
Fig. 29 – Muscular de caso com megaesôfago com numerosos mastócitos no perímio e nos focos de miosite (imuno-histoquímica – CD68 – 400x).....	61

Fig. 30 – Comparar a imagem vista por imuno-histoquímica para CD68 que cora não apenas macrófagos, mas também os mastócitos (Giemsa – 400x)..... 61



***Lista de Gráficos,
Quadros e Tabelas***

Gráfico 1 - Percentual de casos positivos para miosite agrupando todos os esôfagos e todos os cólons.....	51
Gráfico 2 - Percentual de casos positivos para miosite na túnica muscular do esôfago e cólon, subdividindo-se em portadores ou não de megas.....	51
Gráfico 3 - Percentual de casos positivos para ganglionite no plexo mientérico agrupando todos os esôfagos e cólons.....	53
Gráfico 4 - Percentual de casos positivos para ganglionite no plexo mientérico do esôfago e cólon, subdividindo-se em portadores ou não de megas.....	53
Quadro 1. Distribuição dos 39 casos de chagásicos crônicos com ou sem mega, em que o esôfago foi avaliado, segundo idade (anos), sexo, intensidade da miosite, da ganglionite e pesquisa do <i>T. cruzi</i>	48
Quadro 2. Distribuição dos 50 casos de chagásicos crônicos com ou sem mega, em que o cólon foi avaliado segundo idade, sexo, intensidade de miosite, da ganglionite e pesquisa de <i>T. cruzi</i>	49
Quadro 3 - Comparação da intensidade da ganglionite, miosite e pesquisa de <i>T. cruzi</i> nos 30 casos em que foi possível estudar o esôfago e cólon do mesmo paciente chagásico crônico, segundo os grupos de estudo.....	55
Tabela 1 – Valores médios da idade dos pacientes segundo os grupos de estudo.....	42
Tabela 2 - Distribuição dos casos, segundo os grupos de estudo e a intensidade da miosite no esôfago e cólon.....	50
Tabela 3 - Distribuição dos casos, segundo os grupos de estudo e a intensidade da ganglionite no esôfago e cólon.....	52



Lista de Abreviaturas

ABC – Complexo Avidina-Biotina

CD – Grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)

DAB – 3,3-Diaminobenzidina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FIG - Figura

HE - Hematoxilina e Eosina

IFN- γ - Interferon Gama

IL – Interleucina

LSAB - Labeled StreptAvidin Biotin

NK - Células Natural Killer

PAP – Peroxidase Anti-Peroxidase

PBS - Tampão Fosfato Salino

PCR - Polymerase chain reaction

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

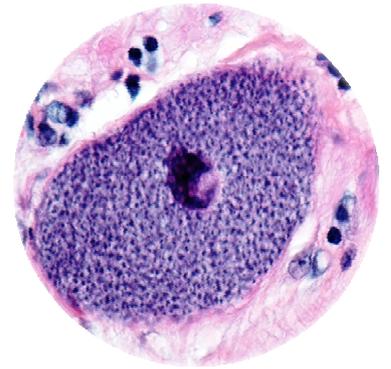
SNE - Sistema Nervoso Entérico

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TGF- β – Fator transformador de crescimento Beta

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

WHO - Organização Mundial de Saúde



Introdução

Doença de Chagas e a patogênese dos megas

A doença de Chagas (tripanosomíase americana), descoberta em 1909 por Carlos Chagas, tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Na década passada, a implantação de medidas de controle vetorial em muitas áreas endêmicas determinou uma redução na transmissão vetorial, pelo *Triatoma infestans*, o que proporcionou decréscimo substancial na incidência da doença de Chagas na América Latina (MONCAYO, 2003; WHO, 2002). Estima-se, no entanto, que ainda existam entre 12 e 14 milhões de infectados na América Latina, com mais de 60 milhões de pessoas sob risco de transmissão, em cerca de 18 países com essa endemia (WHO, 2002). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que exista cerca de 5 milhões de indivíduos infectados (FERREIRA *et al.*, 2002) .

Essa endemia foi dividida em duas fases: aguda e crônica, ambas subdivididas, em assintomática e sintomática (DIAS & COURA, 1997). Após a infecção, os pacientes desenvolvem a fase aguda da doença de Chagas; nessa fase é comum a presença do sinal de Romaña ou chagoma de inoculação, que possuem significado de uma lesão de porta de entrada (KOBBERLE, 1968; DIAS & COURA, 1997).

Aproximadamente 90% dos pacientes sobrevivem à fase aguda, que na maioria dos casos é assintomática; posteriormente os indivíduos passam para uma fase crônica assintomática; na ausência de qualquer das síndromes clínicas predominantes, na qual altos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* são detectados e o parasitismo torna-se escasso. Essa fase, chamada de indeterminada pode persistir por toda a vida; entretanto, depois de 5 a 20 anos, os pacientes podem desenvolver manifestações clínicas cardiológicas e/ou doença digestiva (KOBBERLE, 1968; HUDSON & BRITTEN, 1985; FERNANDEZ *et al.*, 1992; OLIVARES-VILLAGÓMEZ *et al.*, 1998).

Na fase crônica há uma subdivisão de acordo com as manifestações nas seguintes formas anátomo-clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva, nervosa, mista e de exacerbação aguda. Os órgãos predominantemente acometidos na doença são: o coração, o esôfago e o cólon (LOPES *et al.*, 2006).

A forma cardíaca, pela sua complexidade e frequência, é uma das formas mais bem estudadas na doença de Chagas. Essa forma pode levar à insuficiência cardíaca, transtornos do ritmo e da condução, fenômenos tromboembólicos e morte súbita. Pacientes portadores dessa forma clínica apresentam miocardite usualmente intensa e difusa, sendo acompanhada de cardiomegalia, lesões vasculares e fibrose (REZENDE & RASSI, 1983; MARIN NETO *et al.*, 1980; RASSI *et al.*, 2000).

A forma digestiva é representada por alterações da secreção, motilidade, absorção e, nos casos mais graves, pelos megas do tubo digestivo. Os megas são dilatações permanentes e difusas de vísceras ocas ou de canais; não provocadas por obstrução mecânica e cujo substrato anátomo-funcional é uma lesão do sistema nervoso autônomo intramural (TAFURI, 1987; REZENDE, 1979; LOPES *et al.*, 2000). Os megas são encontrados em cerca de 7 a 11% dos pacientes com doença de Chagas crônica (BRENER, 2000). No Brasil, a prevalência de megaesôfago em áreas endêmicas é em torno de 8,8% (REZENDE & MOREIRA, 1988). A região do Triângulo Mineiro é considerada endêmica

para doença de Chagas, com aproximadamente 10% da população chagásica apresentando a forma digestiva (LOPES, 1998).

Dentro da forma digestiva, a expressão mais frequente é o megaesôfago, endêmico no Brasil Central, vindo em seguida o megacólon. No complexo das manifestações da doença de Chagas, apontadas por vários pesquisadores posteriormente, foi Carlos Chagas, em 1916, quem primeiro levantou a hipótese do comprometimento do trato digestório com aparecimento de megaesôfago, que ficou conhecido na época como “mal do engasgo” (CORSI *et al.*, 1992). Outras manifestações digestivas, como o megaduodeno, megajejuno e megaíleo, podem ocorrer com frequência bem menor (DIAS, 1997; LOPES *et al.*, 2000; MENEGHELLI, 2004).

Os primeiros relatos na literatura, analisando clinicamente a etiologia e a associação entre megaesôfago e megacólon afirmavam que os megas endêmicos no Brasil representavam uma manifestação isolada de uma doença sistêmica. Várias teorias etiopatogênicas foram descritas para justificar o aparecimento dos megas: PARANHOS (1913) propôs que o consumo de farinha de mandioca seria a causa dessa afecção; PEREIRA BARRETO (1925) em seus estudos atribuiu o “mal do engasgo” à malária; porém, a confirmação anatomopatológica definitiva de que megaesôfago e megacólon tinham uma mesma causa - a doença de Chagas - só foi demonstrada por KOBERLE em 1956. KOBERLE estudou o esôfago e cólon e estendeu sua pesquisa para outros órgãos demonstrando a denervação autonômica característica da doença de Chagas (REZENDE & MOREIRA, 1988).

REZENDE, em 1956, propôs a denominação de forma digestiva para caracterizar as manifestações decorrentes das "lesões do tubo digestivo com as conseqüentes alterações da motilidade", denominação esta que foi aceita pela comunidade científica. Em 1959, o mesmo autor ampliou o conceito de forma digestiva para abranger, além das desordens motoras, as alterações secretoras e absortivas do aparelho digestivo, já conhecidas ou que

viessem a ser descritas no futuro, independentemente da presença ou não de dilatação do esôfago ou do cólon (REZENDE & MOREIRA, 1988).

Anatomopatologicamente o megaesôfago exhibe um impressionante alargamento luminal e hipertrofia muscular (REZENDE & LAUAR, 1960; KOEBERLE, 1968). É mais comum no sexo masculino e a maioria dos casos é diagnosticada entre 29 e 40 anos (LOPES *et al.*, 2006).

O megacólon chagásico atinge, sobretudo, o sigmóide e o reto. Pode manifestar-se como uma doença isolada, mas freqüentemente é encontrado associado ao megaesôfago ou à cardiopatia chagásica. É mais comum no adulto entre 30 e 60 anos e mais incidente no sexo masculino (DIAS, 1997).

As alterações que ocorrem no trato digestório como resultado da infecção pelo *T. cruzi* são relacionadas à destruição das células nervosas dos plexos intramurais atualmente denominados de SNE. Aparentemente todas as vísceras ocas podem ser afetadas pelo processo de denervação, envolvendo os plexos submucosos e mientérico (KOBERLE, 1956; KOBERLE, 1968a, b; ADAD 1989, 1996; ADAD *et al.* 1991, 1992, 1997a, 1997b, 2001). O plexo mientérico é o mais atingido, em virtude do parasitismo das camadas musculares vizinhas (KOBERLE, 1968a, 1968b; ADAD, 1996; ADAD *et al.*, 1991, 2001; REZENDE & MOREIRA, 2000). Acredita-se que esse processo degenerativo dos gânglios do SNE tenha início na fase aguda, persistindo até a fase crônica (KOBERLE, 1968 a, b; ANDRADE & ANDRADE, 1969; ADAD, 1996; ADAD *et al.*, 1991; ARANTES *et al.*, 2004).

O tubo digestivo é dividido em quatro camadas principais: mucosa, submucosa, muscular própria e adventícia ou serosa. As principais diferenças entre os segmentos estão na mucosa, que apresenta epitélio de revestimento adequado às funções. A submucosa apresenta variações ao longo do trato gastrintestinal, especialmente quanto à presença de glândulas. A muscular externa ou própria é composta por duas camadas: circular (interna)

e longitudinal (externa) (BAILEY, 1973; FURNESS & COSTA, 1980; GABELLA, 1990; STERNBERG, 1997).

O SNE é dividido em dois plexos: mientérico ou de Auerbach e submucoso ou de Meissner. O primeiro situa-se entre as camadas musculares longitudinal e circular do tubo digestivo, controlando principalmente os movimentos gastrointestinais; o último é encontrado na submucosa e controla a secreção gastrointestinal local e o fluxo sanguíneo corporal. A denervação intrínseca repercute na fisiologia dos órgãos atingidos, principalmente do esôfago e do cólon distal, que necessitam de perfeita coordenação motora para propelir o seu conteúdo semi-sólido e ambos possuem um esfíncter distal que deve abrir-se por mecanismo reflexo (GUYTON & HALL, 1998; REZENDE & MOREIRA, 2000).

Nas décadas de 60 e 70, a maioria dos trabalhos sobre a tripanosomíase cruzi experimental em camundongos, referia-se apenas à fase aguda da doença, sendo raras as pesquisas sobre a fase crônica. TAFURI (1967, 1968, 1979) revolucionando os conceitos aceitos até então, abriu um novo campo de pesquisas, tendo realizado estudos, através de microscopia ótica e eletrônica, sobre a patogênese das lesões do SNA do coração, cólon e tecido muscular estriado esquelético, tanto na fase aguda como crônica da infecção experimental e humana por *T. cruzi*. Dentre as várias conclusões obtidas, observou que “as lesões do sistema nervoso intramural do tubo digestivo, eram representadas por periganglionite e ganglionite focais ou difusas, com intensos fenômenos regressivos dos neurônios, chegando à destruição completa desses gânglios com consecutiva fibrose”. Encontrou no mesmo gânglio neurônios alterados, ao lado de outros normais. Fato esse que reafirma a imprevisibilidade das lesões, uma vez que o *T. cruzi* poderia parasitar, ao acaso, qualquer parte do órgão. No tecido muscular estriado esquelético, relatou que havia miosite crônica intensa, ora focal, ora difusa. Segundo TAFURI, “na fase aguda o parasitismo no interior das células de Schwann era bastante frequente, sendo extremamente raro o achado

de parasitas na fase crônica da infecção experimental. A inflamação com a cronificação da doença tornava-se mais difusa e o exsudato era, predominantemente, linfocitário”.

Dando continuidade às comparações dos achados, TAFURI *et al.* (1971) e TAFURI & RASO (1983), utilizaram segmentos de pacientes chagásicos portadores da forma digestiva. Segundo os autores, “as lesões eram mais graves no megaesôfago e megacólon, e a estase constituía um dos fatores importantes no mecanismo de formação dos megas, visto que o conteúdo alimentar ou fecal ao se acumular no lúmen do órgão, determinava compressão da mucosa e atrofia da mesma. A compressão, por sua vez, levaria à isquemia e, secundariamente, à degeneração, necrose e ulceração da mucosa. A mucosa comprimida sofreria alterações e se tornaria propensa à inflamação e essa deixaria seqüelas, como a fibrose intersticial, um dos fatores responsáveis pela modificação dos componentes do interstício intermuscular. Segundo esses autores esse processo inflamatório atinge o plexo mientérico já previamente lesado pelo *T. cruzi*, agravando ainda mais a destruição do SNE. Por sua vez, o plexo submucoso sofre as conseqüências das lesões do plexo mientérico, devido às relações sinápticas entre eles. A inflamação secundária à estase, somada à destruição dos plexos e dos componentes intersticiais, evoluem para a fibrose da submucosa e do conjuntivo intermuscular. Com o tempo ocorrem hipertrofia e alterações regressivas das miocélulas”. Como o plexo mientérico está em íntima relação com as células musculares é fácil compreender como a miosite e suas seqüelas podem lesar ainda mais os gânglios.

Em sua contribuição ao estudo da anatomia patológica e da patogênese do megaesôfago e megacólon chagásicos, ADAD (1989, 1996, 1997, ADAD *et al* 1991) analisou e comparou as alterações morfológicas desses órgãos e verificou que o mínimo para ser considerado megaesôfago seria o órgão permanentemente dilatado, com diâmetro superior a 2,5cm, após fixação. Descreveu que no megaesôfago chagásico, a espessura da parede do órgão poderia estar normal, aumentada ou diminuída, quando a dilatação era

muito intensa. Quanto ao cólon, seus estudos concordam com os de KOBERLE (1968a) e OKUMURA (1983) com relação ao megacólon chagásico caracterizar-se por dilatação permanente do cólon, acompanhada ou não de espessamento da parede e alongamento da alça, na ausência de obstáculo mecânico; porém, propôs que os termos espessamento ou hipertrofia da parede fossem substituídos por aumento da massa muscular. Além disso, com base em seus achados morfométricos, observou que nos chagásicos as lesões mais intensas se localizavam na muscular própria e nos gânglios do plexo mientérico; na camada muscular identificou focos de miosite e fibrose na grande maioria dos casos analisados. No plexo mientérico identificou gânglios infiltrados predominantemente por células mononucleares. Além disso, realizou estudo quantitativo dos neurônios, tanto no cólon quanto no esôfago e demonstrou haver despopulação dos mesmos, afirmando não haver megaesôfago sem denervação acentuada (ADAD, 1989).

A destruição neuronal é considerada a marca característica do mecanismo patogénico do desenvolvimento dos megas chagásicos (KOBERLE, 1956, 1968a; ADAD, 1989; ADAD *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005). Segundo KOBERLE (1968a) o destino do chagásico decidia-se na fase aguda. Entretanto, TAFURI (1971), ADAD (1989, 1996) e ADAD *et al.* (1991) afirmaram que a denervação persistia na fase crônica da doença de Chagas através da ganglionite.

A resposta auto-imune em pacientes com doença de Chagas crônica foi detectada como uma reação cruzada entre os antígenos do *T. cruzi* e tecidos do hospedeiro (BRENER, 1987). VAN VOORHIS *et al.* (1991) sugeriram que os neurônios poderiam ser alvos desses ataques imunes por apresentar epítomos de reação cruzada em sua superfície, como um mimetismo molecular. ARANTES *et al.* (2004) em estudo experimental em camundongos afirmaram que a destruição dos neurônios do plexo mientérico, que ocorre na fase aguda da infecção, seria devido à ativação do óxido nítrico no foco inflamatório ao longo de toda parede intestinal.

MAIFRINO *et al.* (1999) demonstraram que a atividade da acetilcolinesterase estava presente em baixa intensidade no plexo mientérico do cólon de animais infectados com *T. cruzi*, sugerindo assim, que a infecção afetaria algumas categorias de neurônios e em particular o sistema neurotransmissor entérico, reduzindo conseqüentemente, o potencial de ação sobre a função intestinal.

DA SILVEIRA *et al.* (2007b) estudaram mudanças na expressão de marcadores neuropeptídicos e neuroquímicos presentes nos plexos intramurais do cólon de pacientes chagásicos com megacólon e demonstraram que os neurônios motores inibitórios são preferencialmente destruídos pelo *T. cruzi* e/ou pelo processo inflamatório.

IANTORNO *et al.* (2007) compararam os achados do SNE de pacientes argentinos portadores de megacólon com indivíduos portadores de megacólon idiopático e controles normais. Encontraram redução do número de neurônios entéricos, das células gliais entéricas e aumento na quantidade de fibrose no megacólon chagásico. O grupo megacólon idiopático apresentou alterações similares; porém, menos intensas. Destacam que as células gliais fornecem suporte para os demais elementos.

Estudando a forma digestiva da doença de Chagas DA SILVEIRA *et al.* (2008b), afirmaram haver um aumento no processo de regeneração dos neurônios do SNE da porção dilatada do cólon de pacientes chagásicos com megacólon. Acreditam que esse aumento na regeneração possa ser interpretado como uma plasticidade neuronal acentuada, que pode ser a resposta do SNE para evitar a propagação do megacólon ao órgão inteiro, mantendo dessa forma a inervação funcional do restante do cólon. DA SILVEIRA *et al.* (2008a) verificaram que na porção dilatada do cólon de pacientes com megacólon chagásico a concentração de substância P é alta, enquanto o nível do seu receptor NK1 é baixo; na porção não dilatada do cólon dos mesmos pacientes e nos controles normais, o contrário foi observado. Sabe-se que a substância P induz secreção de citocinas pró-inflamatórias. Esses dados sugerem que esses altos níveis de substância P contribuiriam para a

manutenção do processo inflamatório, descrito no megacólon chagásico. Os baixos níveis do receptor NK1 seriam devidos à expressão de citocinas pró-inflamatórias, visto que elas inibem a expressão do mesmo; esse mecanismo utilizado pelo SNE e sistema imune agiria como uma chave para tentar restringir a magnitude da inflamação e prevenir a destruição de estruturas e, dessa forma, evitaria o aparecimento da fibrose e dilatação do órgão.

Em seus estudos sobre doença de Chagas, ADAD (1989) visualizou vasos sanguíneos no interior de gânglios do esôfago; porém, não os identificou nos gânglios do cólon (ADAD, 1996). Entretanto, segundo os dados da literatura (TAFURI, 1979; GABELA, 1979, 1989, 1990) os gânglios do SNE são avasculares. Devido a esses dados controversos a respeito da existência de vasos nos gânglios do sistema nervoso entérico humano, ETCHEBEHERE *et al.*(2001) realizaram um estudo pormenorizado, a fim de verificar se havia ou não vasos no plexo mientérico do esôfago e cólon de indivíduos normais. Confirmaram que os gânglios do esôfago são vascularizados, enquanto os do cólon são avasculares. Acreditam que essa diferença estrutural seja um dos fatores que favoreçam a denervação mais intensa e mais rápida do esôfago, em relação ao cólon, na doença de Chagas. Outro fator poderia ser a maior quantidade usual de mastócitos no esôfago em relação ao cólon normal (PINHEIRO, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2008). Esses dados poderiam explicar porque apesar do grau de denervação para o aparecimento de megacólon ser menor (cerca de 50%) que para o megaesôfago (cerca de 90 ou 95%) (KOBERLE, 1961, 1963, 1968a, b; KOBERLE *et al.*, 1983; ADAD 1989, 1996; ADAD *et al.*, 1991, 1999, 2001, 2002), megaesôfago é mais frequente que megacólon e, quando ocorre no mesmo indivíduo, em geral, precede o megacólon (RESENDE & RASSI, 1983).

PINHEIRO (2000) e PINHEIRO *et al.* (2003) também realizaram estudos morfométricos analisando o grau de fibrose e o número de mastócitos no cólon de pacientes chagásicos crônicos com e sem megacólon. Observaram que os pacientes chagásicos com megacólon apresentavam aumento do número de mastócitos e constataram

ainda que a presença dessas células tinha uma relação direta com a fibrose no megacólon chagásico. DA SILVEIRA *et al.* (2007a) também observaram uma alta concentração de macrófagos, eosinófilos e mastócitos no cólon de indivíduos com megas chagásicos; relataram que essas células são capazes de secretar fatores de crescimento para os neurônios; entretanto, elas também são responsáveis pela destruição do parasita e/ou tecido hospedeiro, pois têm capacidade de produzir citotoxicidade quando ativadas e substâncias como óxido nítrico e radicais livres. Concluíram que o acúmulo dessas células no megacólon é percebido como um esforço em tentar restabelecer a homeostasia intestinal e que a permanência delas é capaz de produzir degenerações e necrose local.

Com o intuito de determinar alguma diferença na natureza da invasão dos neurônios e células gliais entéricas pelos linfócitos, DA SILVEIRA *et al.* (2007c) compararam os tecidos colônicos de indivíduos sorologicamente positivos para doença de Chagas, com e sem mega, com controles soronegativos. Notaram que nos chagásicos com e sem megacólon, houve um claro predomínio de linfócitos T (CD3⁺) tanto na camada muscular quanto no plexo mientérico e linfócitos B (CD20⁺) no plexo submucoso. Além disso, encontraram um aumento significativo das células NK (CD57) e linfócitos T citotóxicos (TIA-1) no plexo dos indivíduos afetados e uma redução de 20% da inervação da túnica muscular dos indivíduos com megacólon. Porém, a redução do número de células gliais ocorreu igualmente nos chagásicos com e sem mega, levando a concluir que o desenvolvimento do megacólon está associado à manutenção da invasão dos gânglios entéricos pelas células T citotóxicas e à perda da inervação do músculo, mas não a mudanças no número de células gliais.

Pacientes chagásicos com mega apresentam denervação frequentemente associada à intensa inflamação, enquanto chagásicos sem mega podem apresentar ou não denervação, e em geral, a inflamação é menos intensa, sugerindo um importante papel para o processo

inflamatório sobre o desenvolvimento desta patologia (ADAD 1989, 1996; CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Embora o *T. cruzi* possa infectar vários tipos de células, existem cepas com grande tropismo para certas células, tecidos e órgãos. Esse fato poderia explicar diferenças regionais em relação à doença de Chagas, por vezes dentro de um mesmo país; no Brasil a forma digestiva é rara na Bahia; entretanto, é freqüente na região Sudeste e Centro-Oeste. Sendo assim, diferentes formas anátomo-clínicas da doença poderão ser determinadas por: 1) tropismo por diferentes órgãos; 2) intensidade do parasitismo; 3) intensidade da resposta inflamatória; 4) formação e evolução da resposta imune (TAFURI, 1999).

Nas décadas de 70 e 80, já se postulava a existência de diferentes cepas de *T. cruzi* (REZENDE *et al.*, 1988). Existem várias cepas de *T. cruzi* que diferem em termos bioquímicos, epidemiológicos, patogênicos e de resposta ao tratamento. O grupo *T. cruzi* I está extremamente difundido dentro do ciclo silvestre e pode representar a forma original do *T. cruzi*. O grupo *T. cruzi* II está associado a roedores e ao *Triatoma infestans*. Esses dois grupos estão associados a lesões cardíacas em infecções humanas; mas, somente o *T. cruzi* II está associado a lesões do trato digestório (SATELLITE MEETING, 1999; PRATA, 2001).

A heterogeneidade sugere que variações genéticas do hospedeiro, parasita ou ambos, são importantes no estabelecimento da forma clínica da doença. Em humanos essa suspeita foi confirmada através de estudos com técnicas de PCR em material de biópsia e/ou necropsia; VAGO *et al.* (1996; 2000) demonstraram variabilidade genética do parasita como sendo um dos fatores determinantes da forma digestiva ou cardíaca da doença de Chagas.

Com objetivo de caracterizar o perfil genético de cepas de *T. cruzi* obtidas de pacientes chagásicos, com e sem sintomas, oriundos de nosso país, FREITAS *et al.* (2005) e, em nossa região LAGES-SILVA *et al.* (2006), confirmaram que o *T. cruzi* II é o agente

causador das lesões da doença de Chagas no Brasil. Entretanto, LAGES-SILVA *et al.* (2006) encontraram um alto grau de variabilidade dentro das cepas de *T. cruzi* II, demonstrado pelo intenso polimorfismo do kDNA, entre todas as formas clínicas e também dentro das mesmas. Segundo MACEDO *et al.* (2004) o intenso polimorfismo poderia ser explicado devido ao fato de muitas populações de *T. cruzi* serem policlonais. E o elevado grau de diversidade do parasita poderia estar associado a sua necessidade de adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros.

É possível que diferenças histológicas entre o esôfago e o cólon, como já referimos, tais como a vascularização dos gânglios do esôfago e maior quantidade de mastócitos na muscular desse órgão possam favorecer a maior frequência e intensidade de miosite e ganglionite no esôfago que no cólon. Todavia, devem existir outros fatores, um deles poderia ser o parasitismo mais frequente no esôfago, seja por maior afinidade pelo tipo de tecido ou por tipos genéticos diferentes de *T. cruzi*.

Pesquisa do *Trypanosoma cruzi* em tecido

Durante a fase aguda da doença de Chagas sabe-se que os parasitas podem ser encontrados em quase todos os órgãos e em vários tipos celulares. No entanto, nas formas crônicas os parasitas tornam-se raros nos tecidos e são encontrados em poucos sítios anatômicos, dentre eles o coração, músculo esquelético, esôfago, intestino ou, mais raramente, o cérebro (BRENER *et al.*, 2000).

Em imunocompetentes a infecção inicial parece ser prontamente controlada através de uma variedade de mecanismos imunes efetores; como resultado, o número de parasitas no sangue e nos tecidos cai drasticamente, próximo a níveis indetectáveis no estágio crônico da doença (ZHANG & TARLETON, 1999).

Admite-se ser extremamente rara a presença do *T. cruzi* nos tecidos da quase totalidade dos portadores de doença de Chagas crônica (LOPES *et al.*, 2006). Por outro lado, alguns estudos demonstraram ser o parasitismo tissular do *T. cruzi* mais frequente do que era admitido antigamente. A utilização de métodos específicos para a demonstração de amastigotas do *T. cruzi* no tecido foi primeiramente empregado por ANDRADE & ANDRADE (1969), na tripanosomíase experimental através de imunofluorescência indireta. CROKER & KUHN (1983) através de imuno-histoquímica, compararam duas técnicas: peroxidase anti-peroxidase (PAP) e complexo avidina biotina (ABC), para identificação de formas tissulares do *T. cruzi* em tecidos de camundongos infectados. Perceberam que a técnica ABC poderia ser usada com diluições maiores do anticorpo primário, quando comparada com a técnica de PAP; além disso, a técnica ABC identificou claramente os organismos nos tecidos, sendo de grande valor sua aplicabilidade nas pesquisas.

Em seguida, vieram os trabalhos em humanos, BARBOSA (1985) e BARBOSA *et al.* (1986) realizaram estudo comparando duas metodologias, HE e imuno-histoquímica (PAP), para identificação de ninhos de *T. cruzi* em corações de indivíduos com cardiopatia

chagásica crônica. Encontraram ninhos de amastigotas em todos os casos analisados. Afirmaram que o número de ninhos de amastigotas foi sempre maior nas preparações coradas pelo PAP do que naquelas coradas pelo HE. LANDMAN *et al.* (1986) realizaram trabalho semelhante em dois casos de doença de Chagas congênita. Através da técnica de PAP encontraram ninhos de *T. cruzi* até em locais que não foram suspeitados durante a análise histológica com HE, como por exemplo, pulmões e testículos.

BARBOSA Jr. & ANDRADE (1984) avaliaram 556 casos de cardiopatia chagásica crônica, tendo encontrado ninhos de *T. cruzi* no coração de 84 (15%) desses casos, em exame rotineiro (HE). Selecionaram 20 desses 84 casos para avaliar o parasitismo em vários órgãos. Através da técnica de HE demonstraram formas tissulares em 50% dos casos nas paredes do tubo digestivo, sendo 20% no esôfago, 20% no intestino delgado, 5% no cólon e 5% no apêndice cecal. Comentaram, no entanto, que 2 (10%) casos eram de pacientes com diagnóstico da fase subaguda da doença de Chagas. Além disso, como os casos escolhidos já apresentavam facilmente amastigotas identificáveis no coração, acreditamos que os autores cometeram um viés ao utilizarem amostras selecionadas e, portanto a frequência real seria bem menor que a referida. De qualquer forma parece válida a conclusão de que o parasitismo na fase crônica é mais frequente no coração que no tubo digestivo.

ADAD (1989) e ADAD *et al.* (1991) estudaram 56 esôfagos de chagásicos crônicos, 17 deles portadores de mega. Selecionaram, com base na intensidade da inflamação, 8 casos com e 8 sem megaesôfago para realizar imuno-histoquímica (PAP) para pesquisa de *T. cruzi*. Identificaram ninhos de amastigotas em 4 (50%) casos de megaesôfago; em nenhum caso sem mega identificou-se *T. cruzi*. ADAD (1996) estudou 60 cólons de chagásicos crônicos. Em 17 casos com mega e 10 casos sem megacólon analisou, de cada caso, 36 cortes histológicos da transição reto-sigmóide (TRS), porção média do sigmóide (SIG) e transição descendente-sigmóide (TDS), através de colorações

como Giemsa e HE. Identificou ninhos de amastigotas em 2 (11,8%) dos 17 casos de megacólon e não encontrou *T. cruzi* em nenhum dos 10 casos sem megacólon.

ANEZ *et al.* (1999) avaliaram fragmentos de biópsias endocárdicas humanas de pacientes chagásicos crônicos, com a finalidade de detectar a persistência do *T. cruzi* em tecidos, através de diferentes técnicas: 1) à imunofluorescência encontraram depósitos antigênicos de *T. cruzi* em 89% dos tecidos cardíacos analisados; 2) à imuno-histoquímica (PAP) demonstraram amastigotas de *T. cruzi* em 85% das biópsias endocárdicas e 3) por meio de PCR detectaram porções do genoma, do *T. cruzi* em 91% dos casos. Com este trabalho esses autores conseguiram demonstrar a presença de depósitos antigênicos de *T. cruzi*, do parasita em si ou fragmentos do seu genoma no miocárdio de 96% de indivíduos chagásicos. Afirmaram que embora o número de parasitas seja baixo na doença de Chagas crônica, seu potencial para destruição cardíaca pode ser comparado ao presente durante a fase aguda.

MONTEÓN-PADILLA *et al.* (2001) afirmaram que os pacientes com cardiopatia chagásica crônica apresentam uma forte resposta imune contra o *T. cruzi* e uma baixa parasitemia e que a presença contínua do parasita pode levar a manutenção do estímulo imune e pode aumentar a patogenia ou a destruição auto-imune dos tecidos nos hospedeiros susceptíveis.

ALTEMANI *et al.* (2000) através das técnicas de HE e imuno-histoquímica, pesquisaram ninhos de amastigotas em placentas humanas com vilosite causada pela infecção com *T. cruzi*; constataram que os parasitas eram muito mais abundantes nas placentas dos natimortos quando comparados com as placentas dos nascidos vivos; também concluíram que o número de ninhos estava diretamente relacionado à intensidade e extensão da reação inflamatória em torno das vilosidades. RODRIGUES *et al.* (2002), através da coloração de HE, identificaram ninhos de amastigotas na muscular da veia

central da glândula adrenal em pacientes com AIDS levando-os a acreditar na reativação dessa infecção em indivíduos imunossuprimidos.

HERRERA *et al.* (2007) citaram os olhos como sendo uma importante porta de entrada do parasita, devido a alta irrigação sanguínea e a proximidade com o cérebro. Analisaram tecidos da córnea e da musculatura ocular de camundongos infectados com *T. cruzi*; identificaram ninhos de amastigotas em 67% destes tecidos e k-DNA em 66% dos mesmos através da técnica de PCR. Com esses resultados concluíram que o globo ocular pode comportar-se como um possível meio apropriado ao parasita e enfatizaram ainda, o risco de transmissão do *T. cruzi* através de fluidos oculares e transplantes de córneas parasitadas.

Foi demonstrado experimentalmente que os antígenos de *T. cruzi* estão presentes em 11% do infiltrado inflamatório dos tecidos de 4 a 5 meses depois da infecção (YONES-CHENNOUFI *et al.*, 1988); entretanto, esses achados em animais experimentais não devem ser generalizados para a doença humana, uma vez que os animais não desenvolvem uma doença cardíaca crônica equivalente (HIGUCHI *et al.*, 1997).

CALIARI *et al.* (2001) pesquisaram a presença de ninhos de *T. cruzi* em corações de cachorros infectados com o parasita, tanto na fase aguda quanto na crônica, através da técnica de imuno-histoquímica (LSAB). Na fase aguda encontraram focos de ninhos de amastigotas em todos os casos; porém, na fase crônica nenhum ninho foi localizado. Todavia, isso pode ter ocorrido como nos estudos experimentais de cães feitos por MACHADO *et al.* (2001a, 2001b), por terem obtido apenas a forma indeterminada da doença ou por terem feito pequeno número de cortes histológicos, sem técnica adicional que facilitasse a visualização do agente.

Vários trabalhos realizados sobre doença de Chagas crônica foram baseados nos achados de microscopia óptica e eletrônica. Esses demonstravam destruição tecidual e infiltrado inflamatório intensos, em contraste com a ausência do parasita, sugerindo assim

um papel controverso para o parasita na patogênese das lesões teciduais na fase crônica. Entretanto, na década de 90 vários estudos introduziram a técnica de PCR como uma ferramenta bastante sensível na área diagnóstica e muitos pesquisadores começaram a demonstrar a presença de estruturas do genoma do *T. cruzi* nesses tecidos. Demonstrando assim, que a presença do parasita parece ser crucial para a manutenção da resposta inflamatória.

Os tripanosomatídeos possuem uma única e grande mitocôndria que se estende por todo o comprimento da célula. Essa difere dos demais eucariontes pela presença de uma rede formada por milhares de moléculas circulares de DNA (kDNA) denominada de cinetoplasto. No *T. cruzi*, o kDNA representa cerca de 20-25% do DNA total da célula (BRENER *et al.*, 2000).

JONES *et al.* (1993) e HIGUCHI *et al.* (1993) demonstraram que o *T. cruzi* ou porções do seu DNA estavam presentes nas lesões inflamatórias encontradas na cardiopatia chagásica. VAGO *et al.* (1996) utilizaram amostras de esôfagos de pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas, nas quais detectaram a presença de fragmentos do genoma do *T. cruzi* em 100% dos pacientes com megaesôfago; concluíram que esses resultados mostram claramente a persistência de kDNA do parasita nas lesões esofágicas na doença de Chagas. Porém, não excluem o envolvimento de mecanismos autoimunes na patogênese do megaesôfago. Posteriormente, VAGO *et al.* (2003) pesquisaram o kDNA do *T. cruzi* no esôfago de pacientes chagásicos sem megaesôfago. Encontraram positividade em 55% dos casos, ao PCR. Por essa razão, deduziram que outros fatores, além da presença do parasita, deveriam ser levados em consideração.

LAGES-SILVA *et al.* (2001) utilizaram amostras de pacientes chagásicos com megaesôfago para identificação do *T. cruzi*, utilizando técnicas parasitológicas para identificação do parasita no sangue, técnicas de HE e imuno-histoquímica (PAP) para identificação no tecido e também a técnica de PCR para identificação do DNA do parasita.

Encontraram uma positividade de 73% através dos métodos parasitológicos, 90% através da técnica de PCR e 77% na identificação do parasita e/ou antígenos de *T. cruzi* nos tecidos. Todavia, não há figuras neste artigo demonstrando o que os autores consideraram como sendo antígenos de *T. cruzi* através de imuno-histoquímica.

Por outro lado, DA SILVEIRA *et al.* (2005) pesquisaram a presença de kDNA de *T. cruzi*, inflamação e denervação no esôfago de pacientes chagásicos crônicos com ou sem megaesôfago. Encontraram kDNA do *T. cruzi* em 100% dos portadores de megaesôfago e em 60% dos chagásicos sem megaesôfago. Além disso, afirmaram que todos os chagásicos que apresentavam processo inflamatório, até mesmo aqueles sem megaesôfago, tiveram positividade para kDNA e diminuição da contagem neuronal em suas amostras. Concluíram que o processo de denervação no esôfago de pacientes chagásicos poderia ser, em menor parte, uma consequência de mecanismos imunes citotóxicos, os quais são dependentes da persistência do parasita no tecido.

Caracterização do infiltrado inflamatório nas lesões chagásicas

No início da infecção, o parasitismo é eventualmente controlado por vários mecanismos imunes: citocinas ativadoras de macrófagos, opsonização através de anticorpos e citotoxicidade medida por células T. A resposta imune controla o parasitismo, mas falha ao tentar eliminar completamente o parasita; por isso, os pacientes permanecem infectados por toda vida (HUDSON & BRITTEN, 1985). Várias evidências apoiam a hipótese de que a persistência do *T. cruzi* nos tecidos seria o estímulo para a resposta inflamatória crônica, que resulta em destruição tecidual (TARLETON & ZHANG, 1999; TARLETON, 2001). O mecanismo de patogênese na doença de Chagas está baseado em duas hipóteses: a primeira seria que a persistência do *T. cruzi* em locais específicos nos hospedeiros infectados resultaria em uma reatividade inflamatória crônica; a segunda hipótese seria que a infecção pelo *T. cruzi* induziria a uma resposta imune na qual os próprios tecidos são alvos, independente da persistência do parasita (TARLETON, 2001).

A inflamação é o processo patológico básico da doença de Chagas. A resposta inflamatória que segue-se à infecção pelo *T. cruzi* é essencial à resistência do hospedeiro, mas também é responsável pela patologia observada na doença de Chagas (TEIXEIRA *et al.*, 2002). A inflamação focal pode ser destrutiva não só para as células parasitadas, mas também para as células não parasitadas. Ela se faz inicialmente às custas de células mononucleares e logo depois com neutrófilos e eosinófilos (BRENER *et al.*, 2000). DA SILVEIRA (2007c) afirmou que dentre os componentes etiológicos do megacólon chagásico, um deles é comprovadamente de natureza imunológica.

A patogênese das lesões chagásicas ainda é motivo de muita controvérsia, pois a escassez de parasitas frente a uma resposta imune intensa, levou muitos pesquisadores a pensar num envolvimento de fatores autoimunes (YOSHIDA *et al.*, 1997 e TARLETON *et al.*, 1999). A intensidade da resposta inflamatória é a grande questão que permanece ainda

sem uma resposta; não se sabe se as células inflamatórias representam a causa ou a consequência do desenvolvimento das lesões teciduais nos chagásicos.

Na década de 80 muitos trabalhos envolvendo a resposta imune contra a infecção pelo *T. cruzi* foram desenvolvidos: RIMOLDI *et al.* (1981) e VILLALTA & KIERSZENBAUM (1983, 1984a e 1984b) afirmaram que as células inflamatórias contribuíam para a remoção dos parasitas dos tecidos infectados. Em contrapartida, MOLINA & KIERSZENBAUM (1987, 1988, 1989) estudaram a atuação das células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos presentes nos sítios das lesões cardíacas infectados com *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Relataram depósitos de eosinófilos e componentes dos grânulos de polimorfonucleares nas células cardíacas e perceberam que essas células tinham sofrido necrose; atribuíram às células inflamatórias uma possível contribuição para a destruição tecidual. D'AVILA REIS *et al.* (2001) relataram que a atividade dos eosinófilos contribui para a disfunção e destruição dos tecidos do hospedeiro através da secreção de mediadores inflamatórios e proteínas catiônicas que são neurotóxicos.

O infiltrado inflamatório mostra um importante papel na patogênese da miocardite chagásica crônica (HIGUCHI *et al.*, 1987) e nas lesões inflamatórias do SNE, associado a uma drástica redução do número de neurônios, reforçando os achados clínicos nos megas chagásicos (KOBBERLE, 1968; TAFURI *et al.*, 1971; ADAD *et al.*, 1991).

O infiltrado inflamatório é constituído predominantemente por linfócitos (TAFURI *et al.*, 1971; MONTUFAR *et al.*, 1977; ROCHA *et al.*, 1981; TAFURI & RASO, 1983; ADAD, 1996; LOPES *et al.*, 2006), em especial por linfócitos T (NOGUEIRA, 1996; ADAD, 1996). Em geral, há número menor de linfócitos B, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e neutrófilos (ROCHA *et al.*, 1981; ADAD, 1996; LOPES *et al.*, 2006).

Em uma minuciosa pesquisa das formas tissulares do *T. cruzi* em portadores de miocardite chagásica crônica BARBOSA & ANDRADE (1984) descreveram que no esôfago aparecia frequentemente infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente linfocitário, discreto e focal, tanto nas camadas musculares como no plexo de Auerbach; sendo que estas alterações estavam também presentes na maioria dos casos, independente de ter parasitas identificados. No restante do intestino as alterações inflamatórias eram muito discretas ou ausentes.

ADAD (1989) e ADAD *et al.* (1991) identificaram nos esôfagos de chagásicos crônicos, com e sem mega, focos de miosite e fibrose na grande maioria dos casos analisados; observaram também que as alterações do plexo gástrico eram mais frequentes nos chagásicos com megacôlon.

ADAD (1996) e ADAD (1997) identificaram focos de miosite no cólon em 100% dos chagásicos com mega, quando analisados cortes seriados de três regiões (transição reto-sigmóide, porção média do sigmóide e transição descendente sigmóide); assim como fibrose, frequentemente moderada ou intensa, na túnica muscular. No grupo sem megacôlon detectaram miosite, assim como fibrose discreta, somente em 20% dos casos. Nos casos de indivíduos não chagásicos, nenhum foco de miosite e/ou fibrose foi encontrado (ADAD, 1996).

Os focos inflamatórios presentes no miocárdio de pacientes chagásicos crônicos são em geral maiores e mais frequentes em relação aos focos do tubo digestivo, mesmo em pacientes com megas. E, com relação ao tubo digestivo, os focos são mais frequentes no esôfago que no cólon, embora do ponto de vista qualitativo a inflamação seja semelhante nos três órgãos (ADAD *et al.*, 2000).

As células T ativadas são os maiores componentes do infiltrado inflamatório e são observadas tanto em pacientes com forma cardíaca quanto digestiva (DUTRA *et al.*, 1994).

Na população de linfócitos T, além da expressão da proteína CD3, são expressas moléculas acessórias, CD4 e CD8. A molécula de CD4 é expressa em aproximadamente 60% das células T maduras CD3⁺, enquanto CD8 é expressa em cerca de 30% das células T (ABBAS *et al.*, 2005). O CD20 é o marcador de linfócitos B mais usado, altamente específico e sensível (ALVES *et al.*, 1999) e representa a maioria ou todos os linfócitos B (ABBAS *et al.*, 2005). O macrófago é uma das principais células na inflamação crônica e integra o sistema fagocitário mononuclear (ABBAS *et al.*, 2005). O CD68 é um dos marcadores de macrófagos mais usado sendo bastante sensível (ALVES *et al.*, 1999); entretanto, o anticorpo anti-CD68 além de marcar os macrófagos, marca também fortemente mastócitos (Especificação do anticorpo anti-CD68/DAKO).

As células T CD4⁺ são extremamente importantes na proteção contra a infecção pelo *T. cruzi*, visto que são necessárias para a produção de anticorpos líticos e produzem citocinas, como IFN- γ , que auxilia na destruição de formas intracelulares do parasita em células infectadas (TARLETON *et al.*, 1996).

Vários trabalhos têm demonstrado o quanto as células T CD8⁺ são cruciais para o controle do *T. cruzi*. Essas células dominam o foco inflamatório nos tecidos parasitados e sua ausência leva a replicação descontrolada do parasita e subsequente morte do hospedeiro infectado. As células T CD8 provavelmente atuam em mecanismos múltiplos, sendo a produção do IFN- γ um dos mais importantes. A redução na produção do mesmo está associada ao aumento da severidade da doença em humanos. O aspecto qualitativo e quantitativo da resposta imune do hospedeiro também mostra um importante papel no processo da doença. O sucesso no controle da infecção pelo *T. cruzi* e da doença de Chagas envolve um balanço na geração da resposta imune, devendo esta ser suficiente para controlar a infecção e regulação da mesma, a fim de prevenir a destruição excessiva de tecidos dos hospedeiros (MARTIN & TARLETON, 2004).

Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas mostram que 30-40% dos indivíduos infectados desenvolvem formas clínicas severas da doença de Chagas, apresentando cardiopatia e/ou disfunção do trato gastrointestinal (WHO, 2002). Neste contexto, o mecanismo específico associado ao estabelecimento/manutenção de uma forma clínica distinta da doença parece ser bastante complexo. Existem muitas dúvidas relacionadas ao fato de que alguns indivíduos infectados desenvolvem uma forma severa da doença de Chagas e outros não; também há dúvidas em relação às manifestações clínicas, que se apresentam de forma heterogênea. Na forma cardiodigestiva, CARDOSO *et al.* (2006) encontraram um perfil de citocinas distinto quando comparado a outras formas clínicas da doença de Chagas; sugeriram que os eosinófilos são as maiores fontes de citocinas nessa entidade clínica. Os pacientes com a forma indeterminada da doença apresentam células T capazes de controlar a atividade citotóxica deletéria através da inibição da ativação do HLADR das células T CD8⁺. Acredita-se que a falta de uma população reguladora nas formas cardíaca ou digestiva acarretaria em prejuízo da resposta imune, que culminaria numa forte atividade citotóxica e destruição dos tecidos (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005).

As citocinas mostram um papel fundamental na infecção pelo *T. cruzi* e suas atividades determinam o início, a duração e a composição da resposta imune. O IFN- γ é a citocina que está mais relacionada com a resistência à infecção, devido a sua capacidade de ativar os macrófagos, que por sua vez, apresentam atividade tripanocida. Macrófagos infectados liberam IL-12, que estimulam as células NK a produzir IFN- γ . O IFN- γ em associação com TNF- α , induzem a expressão da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) através dos macrófagos e, conseqüentemente, a produção de óxido nítrico, que apresenta atividade microbicida sobre o *T. cruzi*. As interleucinas IL-4 e IL-10 e o Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF- β) inibem os efeitos do IFN- γ durante a

infecção, pois desativam a capacidade tripanocida dos macrófagos e inibem a liberação de óxido nítrico (GAZZINELLI *et al.*, 1992).

CREMA *et al.* (2006) avaliaram e quantificaram a produção de citocinas em indivíduos com esofagopatia chagásica crônica durante diferentes fases evolutivas da doença. Observaram níveis significativamente altos de IFN- γ e MIG (Monocina Induzida por Interferon) nos pacientes com megaesôfago avançado. Afirmaram que esse achado apoiaria a hipótese de que um desequilíbrio na resposta imune levaria a destruição dos tecidos. E embora esses indivíduos tenham apresentado menor número de linfócitos T CD4, suas células mononucleares ainda eram capazes de responder à estimulação com antígenos específicos do *T. cruzi*.

RIBEIRO *et al.* (2008) encontraram altos níveis de IL-4 no sangue periférico de pacientes com megaesôfago; esse achado poderia estar implicado no mecanismo de escape do *T. cruzi* e sua persistência no esôfago, pois a IL-4 inibe a capacidade microbicida do macrófago favorecendo a permanência do parasita no tecido.

Usando a técnica de imuno-histoquímica com ampla variedade de marcadores fenotípicos, vários pesquisadores caracterizaram as células inflamatórias em corações, esôfagos, cólons e placentas na fase aguda ou crônica, em modelos experimentais (YONES-CHENNOUFI *et al.*, 1988a; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 1991; SATO *et al.*, 1992; SUN & TARLETON, 1993; SILVA-GONSALVES *et al.*, 1999 e CALIARI *et al.*, 2001) e em humanos (HIGUCHI *et al.*, 1993; D'AVILA REIS *et al.*, 1993; TOSTES, 1993; HIGUCHI *et al.*, 1997; ADAD *et al.*, 2000; ALTEMANI *et al.*, 2000; CORBETT *et al.*, 2001; D'AVILA REIS *et al.*, 2001; CABRAL *et al.*, 2002; FUENMAYOR *et al.*, 2005) infectados pelo *T. cruzi*.

Os trabalhos em que foram feitas caracterizações imuno-histoquímicas das células inflamatórias em tecidos, usando modelos experimentais, apresentaram resultados conflitantes. YONES-CHENNOUFI *et al.* (1988a) e RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*

(1991) afirmaram que na fase aguda da doença de Chagas as células T CD4⁺ são predominantes nos tecidos, enquanto SATO *et al.* (1992), SUN & TARLETON (1993) e SILVA-GONSALVES *et al.* (1999) sugerem que o predomínio se faz pelas células T CD8⁺. No infiltrado inflamatório do coração de cachorros portadores de miocardite chagásica, CALIARI *et al.* (2001) não encontraram parasitas e verificaram que linfócitos T CD8⁺ eram as células predominantes durante a fase aguda e crônica da forma cardíaca da doença de Chagas, apesar de que que nos órgãos linfóides caninos normais o predomínio é de células T CD4. Em estudo desenvolvido em corações de camundongos infectados com *T. cruzi*, MELO & MACHADO (2001) demonstraram que os macrófagos estavam associados às lesões do SNA cardíaco e poderiam contribuir para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica.

FUENMAYOR *et al.* (2005) avaliaram a frequência e intensidade dos antígenos de *T. cruzi* e a presença de células T CD4⁺ e CD8⁺ no infiltrado inflamatório do coração de pacientes com doença de Chagas aguda. Apesar de terem encontrado quantidade aumentada de células CD4 e CD8, essas células apresentaram proporções similares; concluíram também que a intensidade da miocardite estava diretamente relacionada à presença de antígenos do parasita.

Com relação aos estudos que caracterizaram os linfócitos na cardiopatia chagásica crônica humana, HIGUCHI *et al.* (1993), D'AVILA REIS *et al.* (1993), TOSTES (1994) e HIGUCHI *et al.* (1997) afirmaram que as células T desempenham papel crítico na imunopatologia da doença e demonstraram que linfócitos T CD8⁺ ativados são as células predominantes no infiltrado inflamatório das lesões cardíacas humanas.

CABRAL *et al.* (2002) compararam quantitativa e qualitativamente os tipos de células inflamatórias nos corações de chagásicos que tiveram morte precoce em relação aos que tiveram morte mais tardia. Os resultados obtidos mostraram intensa infiltração intracardíaca de linfócitos T CD4⁺ e poucos linfócitos CD8⁺; qualitativamente, esses achados

foram similares nos diferentes grupos de pacientes; mas, quantitativamente o número de linfócitos T e de mastócitos foi maior nos casos de morte precoce. Concluíram que essas células mostravam citoaderência aos miocardiócitos com lesões e, por sua localização e quantidade, também estavam associadas à “cardiopatia maligna”. HIGUCHI *et al.* (1997), na tentativa de esclarecer a influência do *T. cruzi* no desenvolvimento da inflamação miocárdica na doença de Chagas, realizaram quantificação de células T e também a relação dessas células com a presença de antígenos do parasita, em amostras de necrópsias e biópsias. Afirmaram que o ataque contra o *T. cruzi* parece induzir atividade de morte indiscriminadamente, resultando em lise do parasita e das células miocárdicas adjacentes. Afirmaram que o ataque dos linfócitos às miocélulas não-infectadas poderia ser explicado pelo fato dos linfócitos estarem sensibilizados contra estruturas internas dessas células, como por exemplo, a miosina. Concluíram que a célula T CD8⁺ é o principal subtipo de célula T responsável pela ativação imune na miocardite chagásica crônica. E essa célula seria ativada, provavelmente, pela presença de antígenos de *T. cruzi* associados a antígenos miocíticos do hospedeiro. A ausência de um número significativo de células T CD4⁺ na presença de antígenos de *T. cruzi* sugere inibição da ativação dessas, ou uma falta do mecanismo de apresentação do MHC-classe II.

D’AVILA REIS *et al.* (2001) caracterizaram as células inflamatórias na muscular própria de pacientes com megaesôfago chagásico. Analisaram a distribuição dos linfócitos T, B, células NK, macrófagos e ainda as células que expressavam positividade para a proteína TIA-1, que está associada aos linfócitos, às células NK e também está envolvida na fragmentação do DNA da célula-alvo. Encontraram intenso predomínio de células T CD3⁺ (82 à 93%), enquanto macrófagos CD68⁺ e linfócitos B CD20⁺ tiveram porcentagens que variaram de 6 à 19% e 1 à 4%, respectivamente. As células expressando TIA-1⁺ foram encontradas em todos os casos. Além disso, alguns casos de megaesôfago apresentaram focos extensos com eosinófilos. Em contraste, no plexo mientérico predominaram os

macrófagos CD68⁺. Concluíram então que as lesões das células ganglionares e musculares no megacólon chagásico poderiam ser conseqüência de mecanismos citotóxicos múltiplos e ainda interrogaram se essas células representavam a causa ou a conseqüência do desenvolvimento do megacólon. Parte dos casos utilizados nessa pesquisa também foi usado em nosso estudo.

A fim de avaliar o papel das células inflamatórias e dos subtipos de linfócitos e células NK envolvidas nas lesões neuropáticas do cólon, CORBETT *et al.* (2001) realizaram investigação histológica e imuno-histoquímica em amostras de pacientes que apresentavam megacólon chagásico. Observaram alterações degenerativas, necrose das células ganglionares e resposta inflamatória no plexo mientérico de quase todas as amostras. Classificaram o infiltrado inflamatório como moderado sendo a maioria das células linfócitos T CD3⁺. Os linfócitos T CD8⁺ estavam associados às células ganglionares degeneradas e as células NK foram detectadas entre as camadas musculares ou nas proximidades do plexo mientérico. Segundo os autores esses achados foram encontrados também no plexo submucoso. Concluíram que a patogênese do megacólon está baseada num processo contínuo de destruição ganglionar com participação dos linfócitos expressando CD8 e células NK.

A severidade da infecção chagásica congênita é variável podendo causar retardo do crescimento uterino, prematuridade, malformações, abortos, natimortos ou ser assintomática. Baseados neste fato, ALTEMANI *et al.* (2000) caracterizaram as células inflamatórias utilizando placentas de recém-nascidos vivos e natimortos com vilosites causadas pelo *T. cruzi*. Descreveram que nas placentas com vilosite chagásica dos recém-nascidos vivos, o infiltrado inflamatório era focal e havia poucos parasitas. Relataram que as áreas de necrose trofoblástica eram raras ou ausentes. Nos natimortos a vilosite era difusa e severa, com freqüente necrose trofoblástica, numerosas células mononucleares aderidas aos sítios de reação granulomatosa e ainda numerosos ninhos de amastigotas.

Analisaram a porcentagem de células positivas para linfócitos T, linfócitos B, células NK, macrófagos, granulócitos e proteína S-100. Concluíram que em todos os casos de vilosite chagásica, o infiltrado inflamatório era composto principalmente por macrófagos, linfócitos T CD8⁺ e poucas células NK. As células B eram raras ou ausentes. Concluíram ainda que resposta inflamatória era quantitativamente mais difusa e severa nos natimortos, provavelmente devido ao maior número e intensidade do parasitismo nas vilosidades das placentas dos natimortos.

VOLTARELLI (1990) encontrou números absolutos de leucócitos e linfócitos, de células T totais e de células B diminuídos no sangue periférico de pacientes com doença de Chagas crônica. Os neutrófilos quando estimulados por plasma autólogo, mostravam atividade quimiotática reduzida devido, provavelmente, a um defeito celular intrínseco. Estes achados estendem a documentação da imunossupressão na doença de Chagas humana.

Com o intuito de elucidar o envolvimento do sistema imune no desenvolvimento da forma gastrointestinal da doença de Chagas, LEMOS *et al.* (1998) analisaram os fenótipos das células mononucleares no sangue periférico de pacientes portadores dessa forma da doença. Segundo os autores, os dados obtidos demonstraram uma redução significativa do número de linfócitos T CD3⁺, de linfócitos B CD19⁺ e do percentual de células CD4⁺CD28⁺ e, uma inversão na relação CD4/CD8, nos pacientes portadores de megaesôfago avançado. Essa inversão da relação CD4/CD8 não foi observada em pacientes chagásicos cardiopatas não portadores de megas (DUTRA *et al.*, 1994). Analisaram também a ativação das células T, através da determinação da expressão do HLA-DR e perceberam que nesses pacientes com a forma severa da doença, havia uma elevada porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ expressando essa molécula, sugerindo que apesar das células T expressarem esses marcadores, elas poderiam funcionar de modo alterado pela falta da expressão do CD28. Os autores afirmaram que as células CD28⁺ são

importantes na estimulação gênica, no processo do sinal da transdução e conseqüentemente na ativação de células T. Afirmaram ainda que a estimulação de células T, na ausência do CD28 é comprometedora, levando a uma inibição da proliferação celular e, sob algumas circunstâncias, induzindo uma baixa resposta antígeno-específica. Dessa forma concluíram que é provável que a progressão da doença esteja associada a uma diminuição significativa da circulação de linfócitos CD4⁺ CD8⁺ levando a um prejuízo da resposta imune nesses pacientes.

A molécula de CD28 promove sinais para as células T que induzem a expressão de proteínas anti-apoptóticas e estimulam a produção de fatores de crescimento e outras citocinas, promovendo ainda a diferenciação e proliferação dessas células T (ABBAS, 2005).

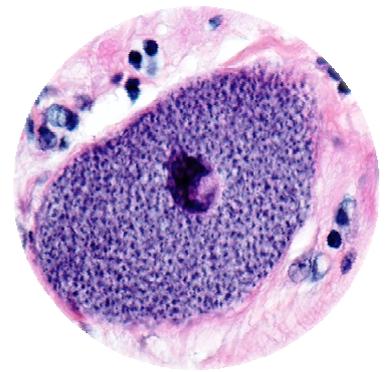
Revisando os dados da literatura nos deparamos com poucos trabalhos focados na pesquisa direta do *Trypanosoma cruzi* em tecidos humanos cronicamente infectados e não encontramos estudos comparando a pesquisa do *T. cruzi* e o infiltrado inflamatório em cortes histológicos do esôfago e cólon de chagásicos crônicos com e sem mega. Talvez essa escassez de trabalhos deva-se à necessidade de uma pesquisa minuciosa, detalhada e exaustiva; além disso, a introdução das técnicas de biologia molecular, como uma ferramenta bastante sensível para demonstração desses parasitas, revolucionou o campo das pesquisas.

Ademais, ainda existem dúvidas quanto à gênese das lesões inflamatórias e celulares na fase crônica da doença de Chagas, em relação ao papel do parasita. Outro ponto importante é o fato de que trabalhos focados no desenvolvimento da forma digestiva são raros.

Esses estudos correlacionariam os níveis das células inflamatórias e a severidade da doença, estabelecendo quais células inflamatórias ou tipo celular específico teriam papel

importante na patogênese da infecção pelo *T. cruzi*, revelando a participação direta ou indireta das células inflamatórias como causa ou consequência.

Com base nesses fatos apresentados nos propusemos a realizar este estudo com o objetivo de pesquisar diretamente o parasita nos tecidos do esôfago e cólon e avaliar se a intensidade do parasitismo e do processo inflamatório é diferente no esôfago em relação ao cólon e entre o órgão não ectásico e mega. Propusemo-nos ainda a realizar estudo qualitativo e semi-quantitativo do infiltrado inflamatório para linfócitos T, B e macrófagos com a finalidade de verificar se há semelhança no padrão inflamatório nos casos com e sem parasitismo evidente no órgão.



Objetivos

Geral

- Avaliar comparativamente o processo inflamatório no esôfago e cólon de chagásicos crônicos, através das técnicas de HE, Giemsa e imuno-histoquímica para linfócitos T, B e macrófagos, com a finalidade de verificar se há semelhança entre o processo no esôfago e no cólon e entre os casos com e sem parasitismo evidente no órgão.

Específicos

- Avaliar a frequência de *T. cruzi*, através de imuno-histoquímica, no esôfago e cólon de chagásicos crônicos com e sem mega, na tentativa de verificar se é mais frequente nos órgãos com mega, em relação aos órgãos sem mega.
- Verificar se, do ponto de vista qualitativo e semi-quantitativo, através de HE, Giemsa e imuno-histoquímica (CD3, CD20 e CD68), o infiltrado inflamatório na muscular e no plexo mientérico é semelhante no esôfago e no cólon com e sem mega.



Material & Método

1. Material

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Anexo A).

Foram estudados 50 segmentos de intestino grosso e 39 segmentos de esôfago de chagásicos crônicos, obtidos por cirurgia (16 cólons e 4 esôfagos) e/ou necropsias realizadas no serviço de Patologia Cirúrgica/Disciplina de Patologia Especial do Hospital de clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG. Em 30 casos oriundos de necropsias, foi possível utilizar o esôfago e o cólon do mesmo indivíduo.

Dos 39 esôfagos estudados, 20 apresentavam mega e 19 tinham diâmetro normal. Dos 50 intestinos avaliados, 25 eram portadores de megacólon e os outros 25 tinham calibre normal.

O diagnóstico de infecção chagásica foi baseado na positividade de pelo menos duas das três reações no sangue e/ou líquido pericárdico: ELISA, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta para *T. cruzi*.

Caracterizou-se megaesôfago quando havia dilatação (diâmetro maior que 2,5cm após fixação em formaldeído), difusa, acompanhada ou não de alongamento do órgão, não provocada por obstrução mecânica.

O diagnóstico de megacólon foi feito a partir de dados clínicos (obstipação intestinal acompanhada frequentemente de complicações como fecaloma e volvo) e radiológicos (enema opaco mostrando dilatação e perda das haustrações acompanhadas ou não de alongamento do cólon e/ou Rx simples de abdômen evidenciando fecaloma e dilatação intestinal). Parte deste material foi estudado anteriormente em teses de esôfago (ADAD, 1989) e cólon (ADAD, 1996).

2. Metodologia

2.1. Coleta e processamento do material

Foi retirado, de cada caso, um anel intestinal com cerca de 0,5cm de “altura”, na transição reto-sigmóide e/ou um anel esofágico a 5cm da cárdia. Os anéis foram fixados em formaldeído a 4%, por tempo variável, não inferior a 24 horas. Para evitar que os anéis maiores fossem subdivididos, em alguns casos, foram abertos a fresco, enrolados sobre si mesmo com um papel de filtro justaposto à mucosa, facilitando a fixação e moldando-os para posterior inclusão. Após a fixação, os anéis foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em parafina, confeccionando-se blocos para microtomia, com até 5x5cm, obtendo-se cortes histológicos com 4µm de espessura, em lâminas silanizadas (ATPS/Silano, A3648, Sigma®). Os cortes histológicos foram corados segundo as técnicas de Hematoxilina e eosina (HE) e imuno-histoquímica (IHQ) (Técnica de Polímeros) para *T. cruzi*, linfócito B (CD20), linfócito T (CD3) e macrófago (CD68).

Os cortes corados pelas técnicas de HE e Giemsa foram utilizados para uma análise geral dos anéis e avaliação qualitativa e semi-quantitativa do processo inflamatório na muscular própria e gânglios do plexo mientérico.

2.2. Procedimento imuno-histoquímico

As lâminas permaneceram na estufa a 56°C por um período de 24 horas, em seguida foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol, permanecendo cerca de 5 minutos

em cada um, e hidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e 1 banho de álcool a 80%, durante 10 segundos em cada um.

Posteriormente as lâminas permaneceram em um banho de solução salina tamponada (PBS pH 7,2), durante 5 minutos para hidratação. Logo depois, o excesso de tampão foi removido e a borda do corte secada cuidadosamente com papel absorvente. As lâminas foram colocadas em uma bandeja, sendo adicionada água oxigenada a 3% sobre cada corte, durante 10 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Novamente foi feita a lavagem em PBS.

A seguir foi realizada a recuperação dos antígenos: foram colocados sobre as lâminas aproximadamente 250µl da enzima Tripsina (Sigma®); essa incubação foi feita por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após essa etapa as lâminas foram novamente lavadas em 3 banhos de 5 minutos no tampão PBS e incubadas com seus respectivos anticorpos primários em torno de 18 horas, em câmara úmida com temperatura de 3 a 4°C. Os anticorpos foram diluídos em soro de albumina bovina (Sigma®) de acordo com as indicações presentes em suas especificações. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD20 (DAKO, diluição 1:600, clone: L26, Carpinteria, CA) e anti-CD68 (DAKO, diluição 1:1000, clone: KP1, Carpinteria, CA) e anticorpos policlonais: anti-CD3 (DAKO, Carpinteria, CA; diluição 1:400) e anti- *T. cruzi* (soro obtido de coelho na Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, diluição 1:600).

Após a incubação por toda a noite, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente, em torno de 15 minutos, lavadas em PBS e secas como anteriormente. O reagente pós-primário (Técnica de polímeros - Novolink - Novocastra®) foi adicionado em cada lâmina por 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida foram feitas 3 lavagens de 5 minutos cada uma em PBS e secaram-se como anteriormente. Logo depois, o reagente Polímero (Técnica de polímeros - Novolink - Novocastra®) foi adicionado por 30 minutos nas mesmas condições acima.

Após 3 lavagens em PBS, por 5 minutos em cada uma, as lâminas foram reveladas, através da adição de uma solução cromógena (Liquid DAB, DAKO®, Carpinteria, CA) por 5 minutos; em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas em Hematoxilina de Harris por 2 segundos.

Finalmente as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool absoluto por cerca de 10 segundos cada um para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e 3 banhos de xilol, por 5 minutos cada um e, a seguir, foram adicionadas lamínulas com entellan.

2.3. Pesquisa de *T. cruzi* em cortes histológicos corados por imuno-histoquímica

A pesquisa de *T. cruzi* foi realizada em 5 cortes escalonados de cada anel, corados segundo a técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-*T. cruzi*. A análise foi realizada em toda a túnica muscular do esôfago e cólon, através de microscopia de luz comum com ocular de 10x e objetiva de 40x.

Os casos em que foram encontrados ninhos de amastigotas foram relatados como positivos para *T. cruzi* e foi anotada a freqüência desses ninhos e se havia relação com o infiltrado inflamatório. Dos trabalhos anteriores da orientadora desta tese (ADAD 1989, 1996) foram aproveitados 9 casos de megaesôfago, 13 esôfagos sem mega, 16 casos de megacólon e 18 sem megacólon, que serviram como piloto no início desta pesquisa.

Alguns casos do nosso trabalho foram submetidos anteriormente à análise, através da técnica de PCR para detecção de DNA de *T. cruzi* em estudos conjuntos com pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais. VAGO *et al.* (1996), VAGO *et al.* (2003) e DA SILVEIRA *et al.* (2005) demonstraram presença do kDNA do *T. cruzi* em 100% dos esôfagos com mega e 33 a 60% dos esôfagos de chagásicos sem mega, na dependência da quantidade de amostras teciduais de cada caso. Somente em alguns casos de esôfago sem mega o PCR resultou negativo.

2.4. Análise semi-quantitativa da intensidade da miosite na túnica muscular e ganglionite no plexo mientérico

Para análise da presença e intensidade da miosite e ganglionite, foram utilizados cortes histológicos corados segundo as técnicas de HE e Giemsa. Miosite foi caracterizada por infiltrado inflamatório associado a fenômenos regressivos (degeneração e/ou necrose) das miocélulas. Com base na intensidade do exsudato, foi classificada em discreta (raros e pequenos focos), moderada (focos esparsos de tamanho médio) e intensa (focos frequentes e extensos). No plexo mientérico, com base na intensidade do infiltrado celular presente, classificou-se a ganglionite de modo semelhante ao feito para a miosite.

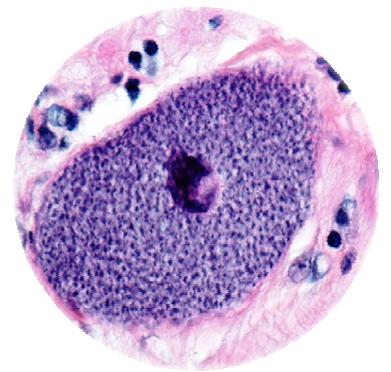
2.5. Caracterização imuno-histoquímica qualitativa do tipo de infiltrado inflamatório

A caracterização qualitativa da inflamação foi realizada em 3 cortes consecutivos, utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica para os anticorpos anti-CD20, anti-CD3 e anti-CD68, com o intuito de caracterizar o tipo celular predominante em cada caso.

Avaliou-se a proporção de células imuno-reativas para CD3, CD20 e CD68 nos focos de miosite e ganglionite. A análise foi realizada em toda a muscular própria do esôfago e cólon, utilizando um microscópio de luz comum, com ocular de 10x e objetiva de 40x (Nikon E 600).

2.6. Análise estatística

Para análise estatística as variáveis foram avaliadas através do programa GRAPHPAD INSTAT versão 3.0. Foi utilizado o teste exato de Fisher para comparação quanto à presença ou ausência de miosite e ganglionite e em relação à intensidade do processo inflamatório. O nível de significância considerado para todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).



Resultados

1. Idade e sexo

A idade dos pacientes que constituem o grupo de amostras de esôfago variou de 34 a 84 anos, com média de 55 ± 12 . No grupo de amostras de cólon a idade variou de 22 a 84 anos, com média de 55 ± 14 . Em relação ao sexo, nas amostras dos esôfagos, 26 (67%) indivíduos eram do sexo masculino e 13 (33%) do sexo feminino; no grupo de amostras dos cólons, 30 (60%) indivíduos eram do sexo masculino e 20 (40%) do sexo feminino.

Tabela 1 – Valores médios da idade dos pacientes segundo os grupos de esôfago e cólon.

	Esôfago n = 39	Cólon n = 50
Mediana	53	54
Valor mínimo	34	22
Valor máximo	84	84
Média	55	55
Desvio-padrão	12	14

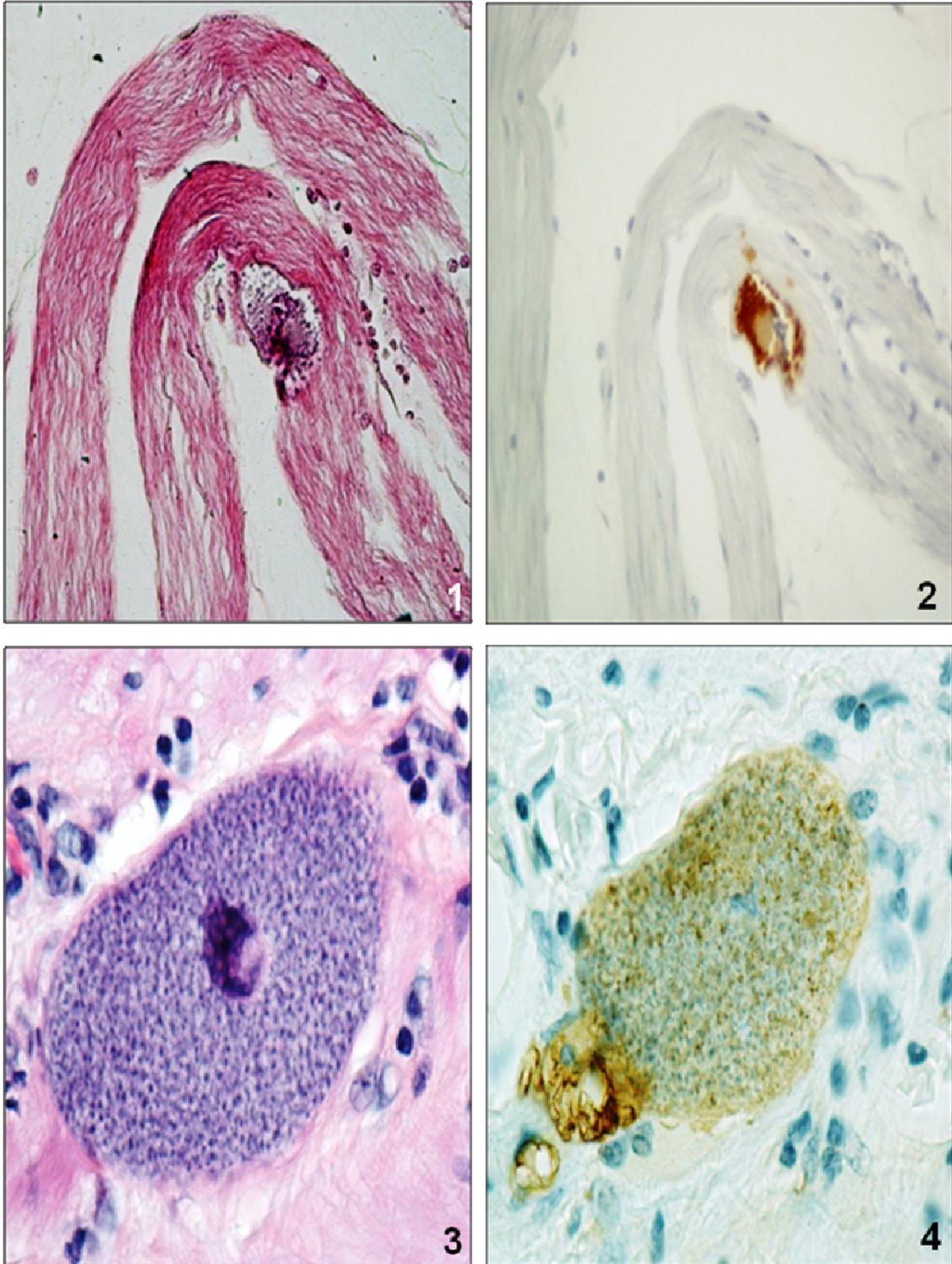
N = número de casos

2. Pesquisa do *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos corados por imuno-histoquímica

À pesquisa do *T. cruzi*, realizada em 5 cortes escalonados de cada caso, corados por imuno-histoquímica evidenciou ninhos de amastigotas em 4 (20%) dos 20 casos de megaesôfago (Figs. 1 e 2), que corresponderiam a 10% do total de 39 esôfagos estudados. Em 2 casos foram identificados 3 ninhos e, em outros 2 casos, um ninho apenas. Alguns desses ninhos também foram reconhecidos em cortes adjacentes corados pela técnica de HE.

Com relação ao cólon, identificou-se ninho de *T. cruzi* em apenas 1 (4%) dos 25 casos de megacólon, correspondendo a 2% do total de 50 cólons de chagásicos crônicos estudados (Figs. 3 e 4).

Em nenhum esôfago ou cólon sem mega foi identificado ninho de *T. cruzi*. Devido ao pequeno número de casos positivos não foi possível realizar análise estatística.



Figs. 1 e 2 - Ninho de *T. cruzi* na túnica muscular em caso de megaesôfago (HE e imuno-histoquímica para *T. cruzi* - 1000x).

Figs. 3 e 4 - Ninho de *T. cruzi* na túnica muscular em caso de megacólon (HE e imuno-histoquímica para *T. cruzi* - 1000x).

3. Análise qualitativa e semi-quantitativa da miosite e ganglionite

Foi feita uma avaliação preliminar global dos cortes corados pelas técnicas de HE e Giemsa para avaliar a existência e classificar a intensidade da miosite na muscular própria e da ganglionite no plexo mientérico dos esôfagos e cólons (Figs. 5 e 6). Em muitos casos de mega observou-se fibrose na muscular e no plexo mientérico com redução do número de neurônios (Figs. 7 e 8). O processo inflamatório era constituído, em geral, predominantemente por células mononucleares, tendo de permeio esparsos eosinófilos, escassos mastócitos e raros plasmócitos, tanto na muscular como no plexo, seja no esôfago ou no cólon, sendo mais evidente e frequente nos megas. Em 6 casos de megacólon e em 1 caso de megaesôfago havia numerosos eosinófilos dispersos, sob a forma de perivasculite e perimiosite difusa; essas células também estavam presentes nos focos de miosite e ganglionite (Figs. 9 e 10). Perivasculite e perimiosite crônicas foram achados frequentes, sendo discretas nos órgãos sem mega. Células mononucleares dispersas de modo isolado foram vistas com frequência no endomísio, especialmente no megacólon. Em 2 casos de megaesôfago e em 1 caso de megacólon foram identificados focos de miosite com formação de granulomas (Fig. 11); em um caso de megaesôfago havia granulomas no plexo mientérico (Fig. 12).

De modo geral a impressão era de ser mais fácil encontrar focos inflamatórios no esôfago que no cólon e os focos eram mais frequentes nos casos de mega em relação aos sem mega. Entretanto, do ponto de vista qualitativo o aspecto era semelhante.

Os quadros 1 e 2 mostram a síntese dos resultados em relação à presença e intensidade do processo inflamatório na muscular e no plexo mientérico, assim como em relação à pesquisa de *T. cruzi*, no esôfago e cólon, respectivamente.

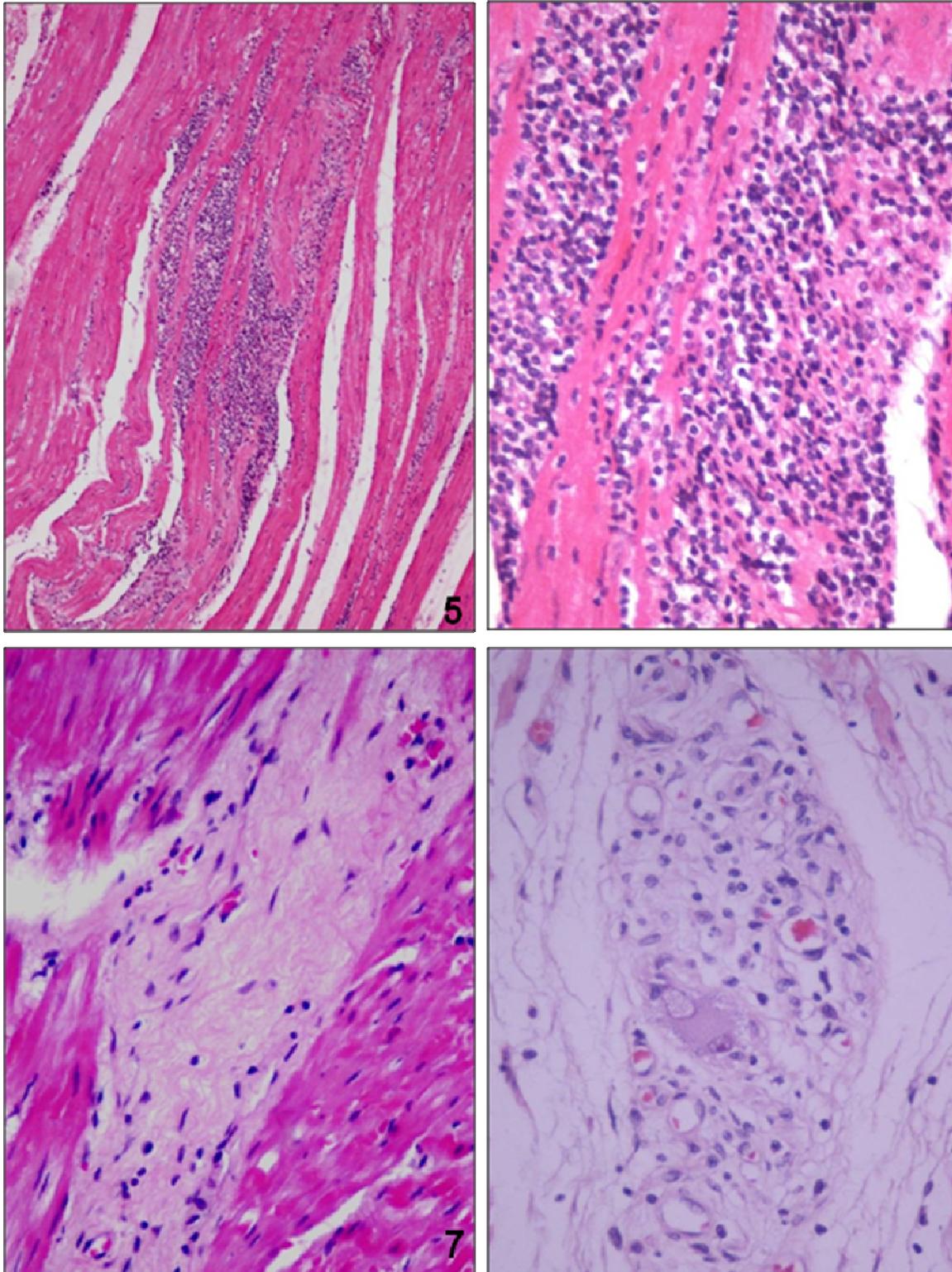
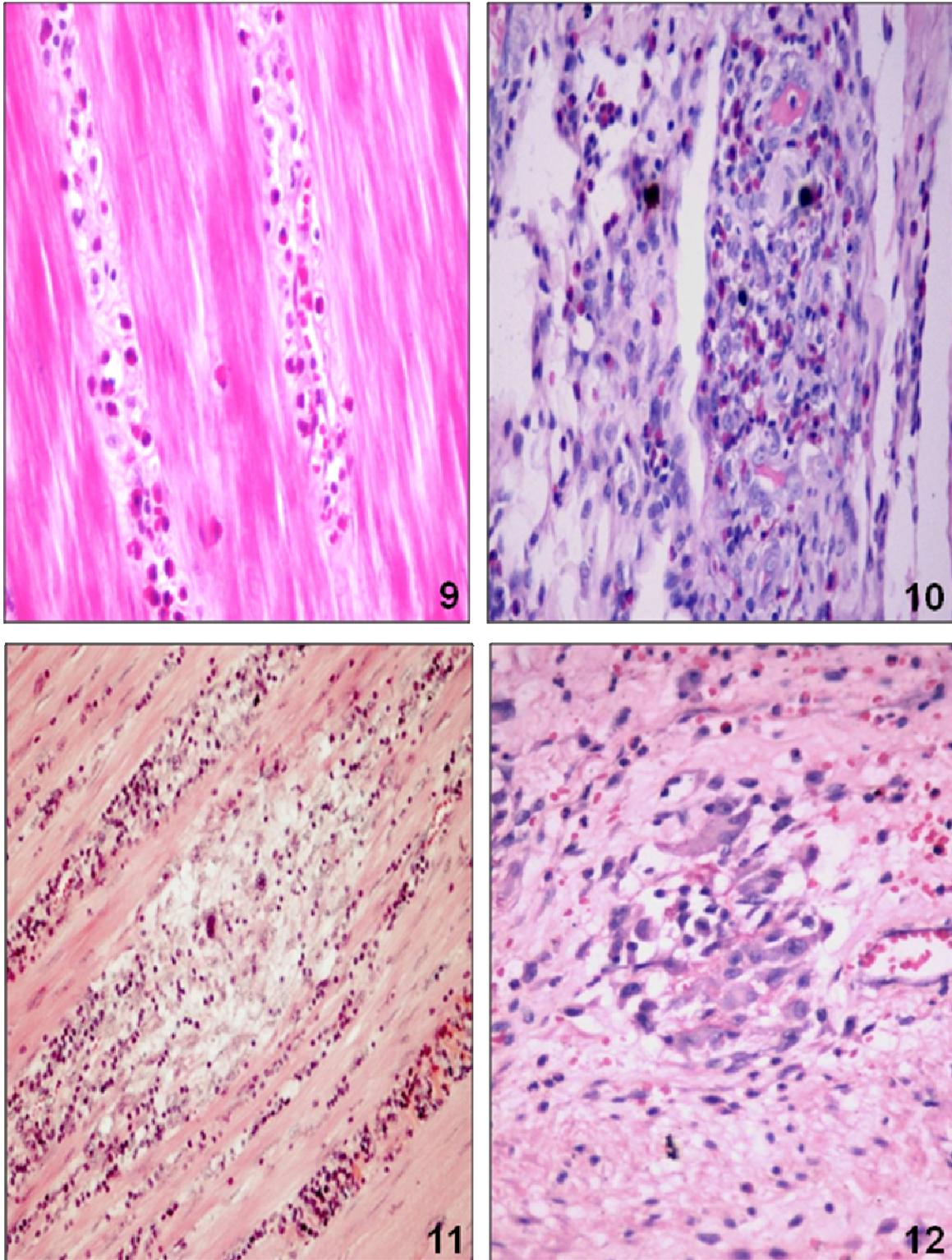


Fig. 5 - Miosite crônica intensa em caso de megaesôfago (HE - 100x).

Fig. 6 - Detalhe da Fig. anterior evidenciando predomínio de mononucleares e aspecto destrutivo da inflamação (HE - 400x).

Fig. 7 - Fibrose na muscular em megaesôfago (HE - 400x).

Fig. 8 - Ganglionite crônica intensa em caso de megaesôfago, classificada como intensa por haver diversos gânglios com esse mesmo aspecto (HE - 400x).



Figs. 9 e 10 – Miosite e ganglionite com frequentes eosinófilos em meio ao infiltrado inflamatório em caso de megacólon e megaesôfago, respectivamente (HE – 400x).

Fig. 11 - Miosite granulomatosa focal em caso de megacólon (Giemsa- 400x).

Fig. 12 – Ganglionite no plexo mientérico com formação de granuloma em caso de megaesôfago (Giemsa 400x).

Quadro 1 - Distribuição dos 39 casos de chagásicos crônicos com ou sem mega, em que o esôfago foi avaliado, segundo idade (anos), sexo, intensidade da miosite, da ganglionite e pesquisa do *T. cruzi*

Nº do esôfago	Nº geral no laboratório	Grupo	Idade (anos)	Sexo	Miosite	Ganglionite	<i>T. cruzi</i>
E3	HE75-93	SME	49	F	+	++	-
E4	HE87-93	SME	61	M	+++	++	-
E7	HE102-93	SME	66	M	-	+	-
E9	HE10-94	SME	47	F	-	+	-
E10	HE23-94	SME	49	F	+	+	-
E13	HE26-94	SME	52	F	-	+	-
E14	HE34-94	SME	70	M	-	+	-
E15	HE37-94	SME	40	M	++	++	-
E16	HE50-94	SME	47	F	++	++	-
E18	HE100-94	SME	42	M	-	-	-
E20	HE30-95	SME	56	M	+	-	-
E22	HE86-95	SME	66	M	-	+	-
E23	HE14-96	SME	38	F	-	+	-
HE78-95	HE78-95	SME	45	M	-	-	-
HE102-98	HE102-98	SME	70	M	++	++	-
HE19-99	HE19-99	SME	58	M	-	+	-
HE26-99	HE26-99	SME	73	M	+	++	-
HE74-00	HE74-00	SME	84	F	-	+	-
HE75-00	HE75-00	SME	68	F	++	++	-
E11	B94-859	ME	38	F	+++	+++	-
E12	HE27-94	ME	57	M	++	++	-
E21	HE83-95	ME	72	F	-	++	-
E24	B96-124	ME	51	M	++	+++	-
E26	B97-1738	ME	54	F	+++	++	-
ML10-86	ML10-86	ME	43	M	+	++	-
ML39-86	ML39-86	ME	54	M	++	++	-
HE20-87	HE20-87	ME	59	M	+	++	1 ninho
HE34-87	HE34-87	ME	71	M	+++	+++	3 ninhos
HE14-89	HE14-89	ME	46	M	++	+++	1 ninho
HE45-93	HE45-93	ME	53	M	++	+++	-
HE55-99	HE55-99	ME	64	M	-	+	-
HE30-00	HE30-00	ME	52	M	+	-	-
HE71-00	HE71-00	ME	67	M	+	+	-
HE46-01	HE46-01	ME	43	F	+	+++	-
HE28-05	HE28-05	ME	50	F	+	++	-
HE36-05	HE36-05	ME	34	M	++	+	-
B00-2365	B00-2365	ME	58	M	++	+++	-
B05-5084	B05-5084	ME	42	M	+++	+	-
N2753	N2753	ME	43	M	+++	+++	3 ninhos

SME = chagásico sem megaesôfago; ME = megaesôfago chagásico; F = Feminino; M = Masculino; - ausente; + discreta; ++ moderada; +++ intensa.

Quadro 2 - Distribuição dos 50 casos de chagásicos crônicos com ou sem mega, em que o cólon foi avaliado segundo idade, sexo, intensidade de miosite, da ganglionite e pesquisa de *T. cruzi*.

Nº do cólon	Nº geral no laboratório	Grupo	Idade (anos)	Sexo	Miosite	Ganglionite	<i>T. cruzi</i>
C8	HE75-93	SMC	49	F	-	-	-
C9	B93-2339	SMC	43	F	-	-	-
C12	HE87-93	SMC	61	M	-	-	-
C18	HE102-93	SMC	66	M	+	+	-
C23	HE10-94	SMC	47	F	-	-	-
C26	HE23-94	SMC	49	F	-	-	-
C29	HE27-94	SMC	57	M	-	-	-
C32	HE26-94	SMC	52	F	-	-	-
C33	HE34-94	SMC	70	M	-	-	-
C34	HE37-94	SMC	40	M	+	+	-
C36	HE50-94	SMC	47	F	+	+	-
C40	HE100-94	SMC	42	M	-	-	-
C41	HE30-95	SMC	56	M	-	-	-
C42	HE78-95	SMC	45	M	-	-	-
C43	HE86-95	SMC	66	M	-	-	-
C45	HE14-96	SMC	38	F	-	-	-
HE96-93	HE96-93	SMC	22	F	-	-	-
HE103-93	HE103-93	SMC	36	M	-	-	-
HE83-95	HE83-95	SMC	72	F	-	-	-
HE102-98	HE102-98	SMC	70	M	-	-	-
HE55-99	HE55-99	SMC	64	M	-	-	-
HE74-00	HE74-00	SMC	84	F	-	-	-
HE75-00	HE75-00	SMC	68	F	+	+	-
HE28-05	HE28-05	SMC	50	F	-	-	-
HE36-05	HE36-05	SMC	34	M	-	-	-
C3	HE31-93	MC	74	M	++	++	-
C4	B93-1217	MC	65	F	+	+	-
C5	B93-1303	MC	64	F	++	++	-
C6	B93-1676	MC	68	M	-	-	-
C10	B93-2492	MC	54	F	+++	++	1 ninho
C11	B93-2703	MC	67	M	+	++	-
C13	B93-2750	MC	44	M	+++	++	-
C14	B93-2979	MC	49	F	++	++	-
C19	B93-3588	MC	70	M	-	-	-
C21	B94-389	MC	55	F	+++	+++	-
C22	B94-547	MC	30	M	++	++	-
C25	B94-612	MC	34	M	-	-	-
C30	B94-1177	MC	63	F	+	-	-
C31	B94-1207	MC	74	M	++	+	-
C38	B94-2249	MC	39	F	-	-	-
C39	B92-2025	MC	78	M	+	+	-
ML10-86	ML10-86	MC	43	M	+	+	-
ML39-86	ML39-86	MC	54	M	+	+	-
HE45-93	HE45-93	MC	53	M	-	-	-
HE51-93	HE51-93	MC	45	M	++	+	-
HE19-99	HE19-99	MC	58	M	++	+++	-
HE26-99	HE26-99	MC	73	M	++	+	-
HE30-00	HE30-00	MC	52	M	+++	++	-
HE71-00	HE71-00	MC	67	M	-	-	-
HE46-01	HE46-01	MC	43	F	+	+++	-

SMC = Sem megacólon; MC = Megacólon; F = Feminino; M = masculino; - ausente; + discreta; ++ moderada, +++ intensa.

Observa-se nos quadros 1 e 2, que o processo inflamatório parece mais frequente nos órgãos com mega em relação aos sem mega.

A tabela 2 e os gráficos 1 e 2 comparam a intensidade da miosite nos esôfagos e cólons (Gráfico 1), com e sem mega (Gráfico 2).

Tabela 2 - Distribuição dos casos, segundo os grupos de estudo e a intensidade da miosite no esôfagos e cólons com ou sem mega.

Miosite	ESÔFAGO				CÓLON			
	Sem mega		Com mega		Sem mega		Com mega	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Presente	9	47	18	90	4	16	19	76
Discreta	4	21	6	30	4	16	7	28
Moderada	4	21	7	35	0	0	8	32
Intensa	1	5	5	25	0	0	4	16
Ausente	10	53	2	10	21	84	6	24
Total	19	100	20	100	25	100	25	100

Teste exato de Fisher para comparação quanto à presença ou ausência de miosite: esôfago x cólon $p = 0,00333$; esôfago sem mega x megaesôfago $p = 0,0057$; cólon sem mega x megacólon $p < 0,0001$; sem megaesôfago x sem megacólon $p = 0,00437$; megaesôfago x megacólon $p = 0,2692$.

No gráfico 1 observa-se o percentual de casos positivos para miosite comparando-se todos esôfagos em conjunto em relação aos cólons e, no gráfico 3, observa-se a mesma comparação subdividindo-se os chagásicos em portadores ou não de mega, segundo o órgão.

Observou-se miosite em 27 (69%) dos 39 esôfagos de chagásicos e em 23 (46%) dos 50 cólons, sendo essa diferença estatisticamente significativa.

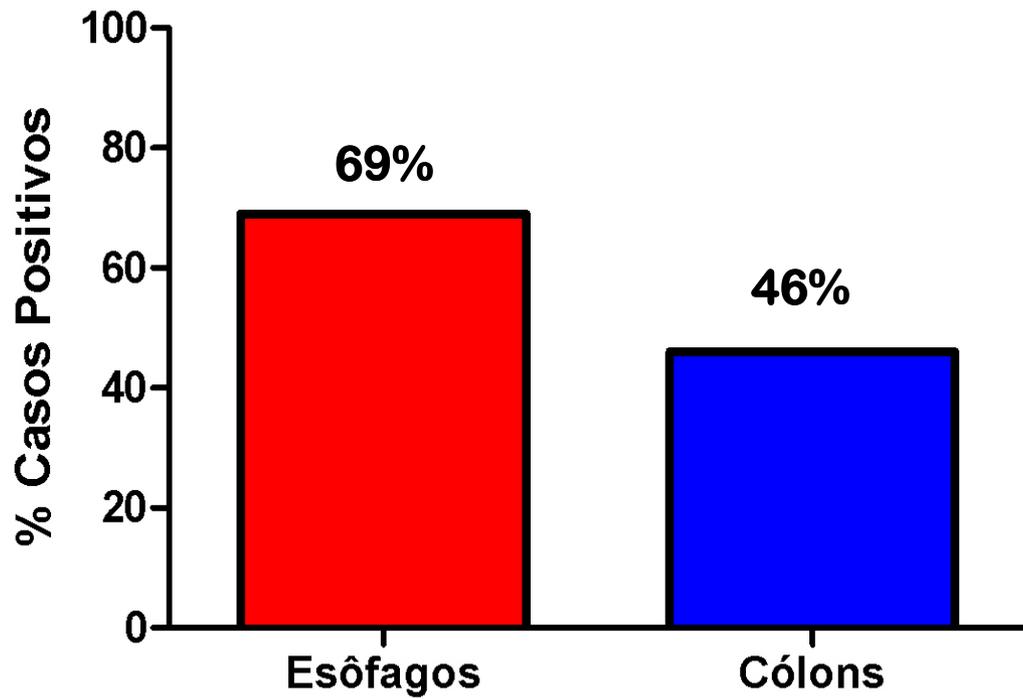


Gráfico 1 - Percentual de casos positivos para miosite agrupando todos os esôfagos e todos os cólons.

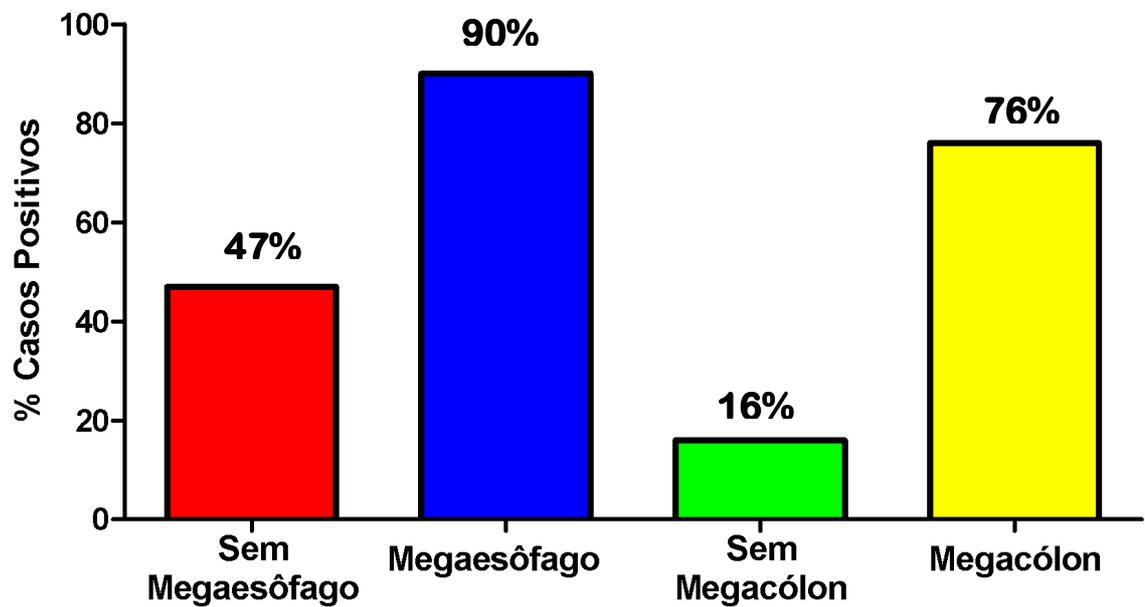


Gráfico 2 - Percentual de casos positivos para miosite na túnica muscular do esôfago e cólon, subdividindo-se em portadores ou não de megas.

Nota-se na tabela 2 e no gráfico 2 que miosite foi muito mais frequente no órgão com mega em relação ao sem mega, tanto no esôfago quanto no cólon, sendo essa diferença estatisticamente significativa. A análise estatística também evidenciou maior frequência de miosite nos esôfagos sem mega em relação aos cólons sem mega. Todavia, embora o percentual de miosite tenha sido um pouco maior no megaesôfago em relação ao megacólon (90% versus 76%), esta diferença não foi estatisticamente significativa.

A tabela 3 e os gráficos 3 e 4 comparam a intensidade da ganglionite nos esôfagos e cólons (Gráfico 3), com e sem mega (Gráfico 4).

Tabela 3- Distribuição dos casos, segundo os grupos de estudo e a intensidade da ganglionite no esôfago e cólon.

Ganglionite	ESÔFAGO				CÓLON			
	Sem mega		Com mega		Sem mega		Com mega	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Presente	16	84	19	95	4	16	18	72
Discreta	9	47	4	20	4	16	7	28
Moderada	7	37	7	35	0	0	8	32
Intensa	0	0	8	40	0	0	3	12
Ausente	3	16	1	5	21	84	7	28
Total	19	100	20	100	25	100	25	100

Teste exato de Fisher para comparação quanto à presença ou ausência de ganglionite: esôfago x cólon $p < 0,0001$; esôfago sem mega x megaesôfago $p = 0,3416$; cólon sem mega x megacólon $p = 0,0001$; sem megaesôfago x sem megacólon $p < 0,0001$; megaesôfago x megacólon $p = 0,0592$.

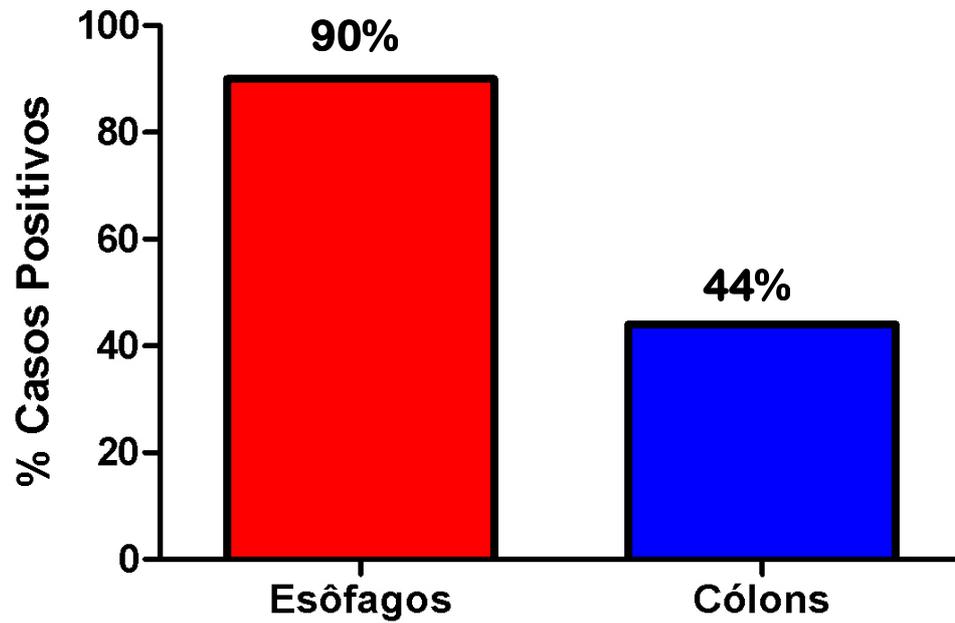


Gráfico 3 - Percentual de casos positivos para ganglionite no plexo mientérico agrupando todos os esôfagos e todos os cólons.

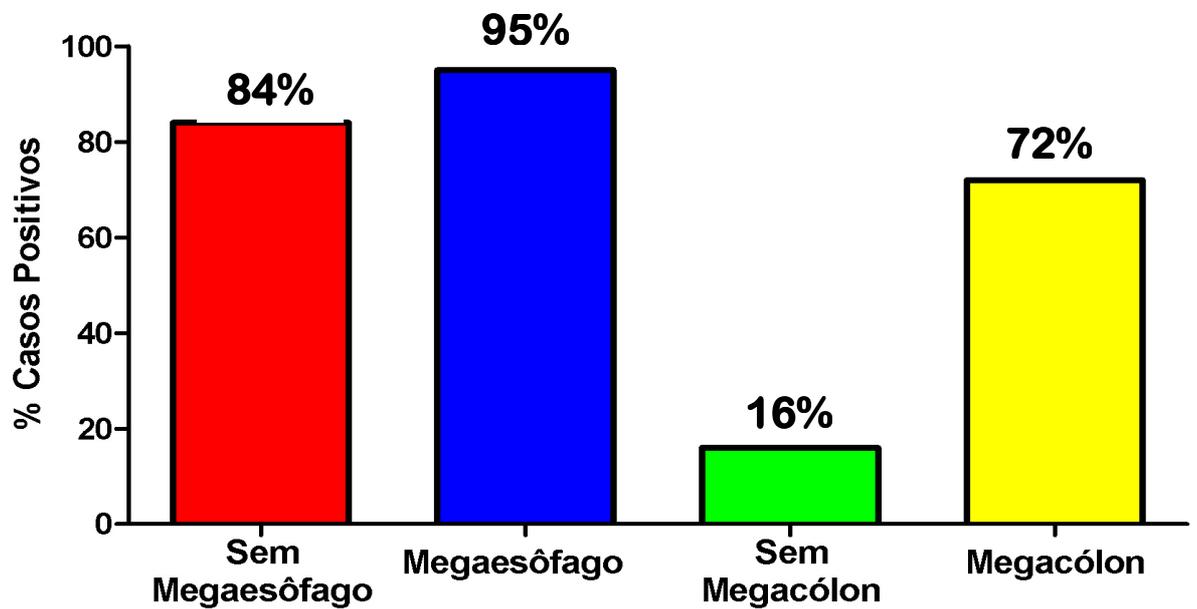


Gráfico 4 - Percentual de casos positivos para ganglioneuromatose no plexo mientérico do esôfago e cólon, subdividindo-se em portadores ou não de megacolon.

Observa-se na tabela 3 e no gráfico 3 que ganglionite foi bem mais freqüente nos esôfagos que nos cólons, sendo a diferença estatisticamente significativa. Nota-se, ainda, que ganglionite foi mais freqüente nos chagásicos com megacólon em relação aos sem megacólon, assim como nos esôfagos sem mega em relação aos cólons sem mega ($p < 0,05$). Por outro lado, embora o percentual de ganglionite no megaesôfago tenha sido um pouco maior que no megacólon (95% *versus* 72%), a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,0592$); no entanto, talvez o valor de “p” tão próximo de 0,05 possa sugerir uma tendência.

Analisando-se o gráfico 4, nota-se que ganglionite foi muito freqüente no esôfago, tanto com mega (95%), quanto sem mega (85%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Todavia, ao exame dos cortes histológicos chamava atenção a maior intensidade do processo no megaesôfago, o que se observa no quadro 1 e na tabela 3. Agrupamos, então, os casos de esôfago com ganglionite moderada ou intensa *versus* os casos com ganglionite discreta, segundo a existência ou não de mega. Havia ganglionite discreta em 26% dos casos sem mega *versus* 11% no grupo com megaesôfago, enquanto ganglionite moderada ou intensa ocorreu em 20% dos esôfagos sem mega *versus* 43% nos casos de mega, observando-se, então, diferença estatisticamente significativa (Teste exato de Fisher, $p = 0,0425$).

No quadro 3 apresentamos em conjunto os dados dos 30 casos de necropsias em que foi possível analisar o esôfago e o cólon do mesmo indivíduo, 13 dos quais tinham algum tipo de mega. Analisando-se o sexo apenas nesses 13 casos de megas, nota-se, intenso predomínio no sexo masculino (9/13; 77%).

Quadro 3 - Comparação da intensidade da ganglionite, miosite e pesquisa de *T. cruzi* nos 30 casos em que foi possível estudar o esôfago e o cólon do mesmo paciente chagásico crônico, segundo os grupos de estudo.

Nº geral no laboratório	Idade	Sexo	Esôfago					Cólon				
			Nº E	G	M	G	T _c	Nº C	G	M	G	T _c
HE75-93	49a	F	E3	SME	+	++	-	C8	SMC	-	-	-
HE102-93	66a	M	E7	SME	-	+	-	C18	SMC	+	+	-
HE10-94	47 a	F	E9	SME	-	+	-	C23	SMC	-	-	-
HE34-94	70 a	M	E14	SME	-	+	-	C33	SMC	-	-	-
HE30-95	56a	M	E20	SME	+	-	-	C41	SMC	-	-	-
HE14-96	38a	F	E23	SME	-	+	-	C45	SMC	-	-	-
HE87-93	61a	M	E4	SME	+++	++	-	C12	SMC	-	-	-
HE23-94	49a	F	E10	SME	+	+	-	C26	SMC	-	-	-
HE26-94	52a	F	E13	SME	-	+	-	C32	SMC	-	+	-
HE37-94	40a	M	E15	SME	++	++	-	C34	SMC	+	+	-
HE50-94	47a	F	E16	SME	++	++	-	C36	SMC	+	+	-
HE100-94	42a	M	E18	SME	-	-	-	C40	SMC	-	-	-
HE78-95	45a	M	HE78-95	SME	-	-	-	C42	SMC	-	-	-
HE86-95	66a	M	E22	SME	-	+	-	C43	SMC	-	-	-
HE102-98	70a	M	HE102-98	SME	++	++	-	HE102-98	SMC	-	-	-
HE74-00	84a	F	HE74-00	SME	-	+	-	HE74-00	SMC	-	-	-
HE75-00	58a	F	HE75-00	SME	++	++	-	HE75-00	SMC	+	+	-
HE27-94	57a	M	E12	MEC	++	+++	-	C29	SMC	-	-	-
HE83-95	72a	F	E21	MEC	-	++	-	HE83-95	SMC	-	-	-
HE55-99	64a	M	HE55-99	MEC	-	+	-	HE55-99	SMC	-	-	-
HE28-05	50a	F	HE28-05	MEC	+	++	-	HE28-05	SMC	-	-	-
HE36-05	34a	M	HE36-05	MEC	++	+	-	HE36-05	SMC	-	-	-
HE19-99	58a	M	HE19-99	SME	-	+	-	HE19-99	MCC	++	+++	-
HE26-99	73a	M	HE26-99	SME	+	++	-	HE26-99	MCC	++	+	-
ML10-86	43a	M	ML10-86	MEC	+	++	-	ML10-86	MCC	+	+	-
ML39-86	54a	M	ML39-86	MEC	++	++	-	ML39-86	MCC	+	+	-
HE45-93	53a	M	HE45-93	MEC	++	+++	-	HE45-93	MCC	-	-	-
HE30-00	52a	M	HE30-00	MEC	+	-	-	HE30-00	MCC	++	++	-
HE71-00	67a	M	HE71-00	MEC	+	++	-	HE71-00	MCC	-	-	-
HE46-01	43a	F	HE46-01	MEC	+	+++	-	HE46-01	MCC	+	+++	-

Nº E = nº do esôfago; G = grupo; Nº C = nº do cólon; M = miosite; G = ganglionite; T_c = *Trypanosoma cruzi*; a = anos; SME = sem megaesôfago, ME = megaesôfago; SMC = sem megacólon; MC = megacólon; F = feminino; M = masculino; - ausente; + discreta; ++ moderada; +++ intensa

Dentre esses 30 casos em que foi possível avaliar o esôfago e cólon do mesmo paciente, 17 (57%) não apresentavam mega, 6 (20%) casos apresentavam associação de megacólon com megaesôfago, 5 (17%) indivíduos apresentavam apenas megaesôfago e 2 (6%) indivíduos apresentavam apenas megacólon. Se nos detivermos na análise apenas dos 13 casos que apresentavam megas, megaesôfago foi mais freqüente e estava presente em 85% (11/13) dos casos e megacólon em 62% (8/13), sendo que em 46% desses casos havia concomitância de megaesôfago e megacólon.

A análise deste quadro confirma os dados já destacados anteriormente: nota-se a tendência de ocorrer mais inflamação nos esôfagos sem mega em relação aos cólons sem mega e dentre os órgãos com mega em relação aos sem mega. Em todos os 30 casos a pesquisa de *T. cruzi* resultou negativa.

Observa-se que a idade dos pacientes portadores de megaesôfago variou de 34 a 72 anos (55 ± 14 anos) e, naqueles com megacólon apenas, variou de 58 a 73 anos (65 ± 11 anos); entretanto o pequeno número de casos dificulta a análise estatística.

4. Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório

Após a avaliação da intensidade de miosite e ganglionite nos cortes corados por HE e Giemsa foram analisados os cortes corados pela técnica de imuno-histoquímica com a finalidade de avaliar a célula inflamatória predominante nos focos.

Dentre as células mononucleares presentes nos focos inflamatórios, houve um intenso predomínio de células CD3⁺ (linfócitos T); em geral, as células CD20⁺ (linfócitos B) e as células CD68⁺ (macrófagos) eram raras. Do ponto de vista qualitativo, o infiltrado inflamatório era semelhante nos casos de esôfago e cólon portadores ou não de megas (Figs. 13 a 28).

Ao analisarmos as células CD68 positivas nos esôfagos, percebemos que várias delas pareciam estar na mesma topografia que usualmente vemos mastócitos neste órgão, que é rico nessas células, normalmente. A comparação do corte corado pela técnica de Giemsa com aquele corado por imuno-histoquímica para CD68, mostrou que várias dessas células eram na verdade mastócitos (Figs. 29 e 30). Esse problema não foi vivenciado no cólon possivelmente porque mastócitos são escassos na muscular do cólon.

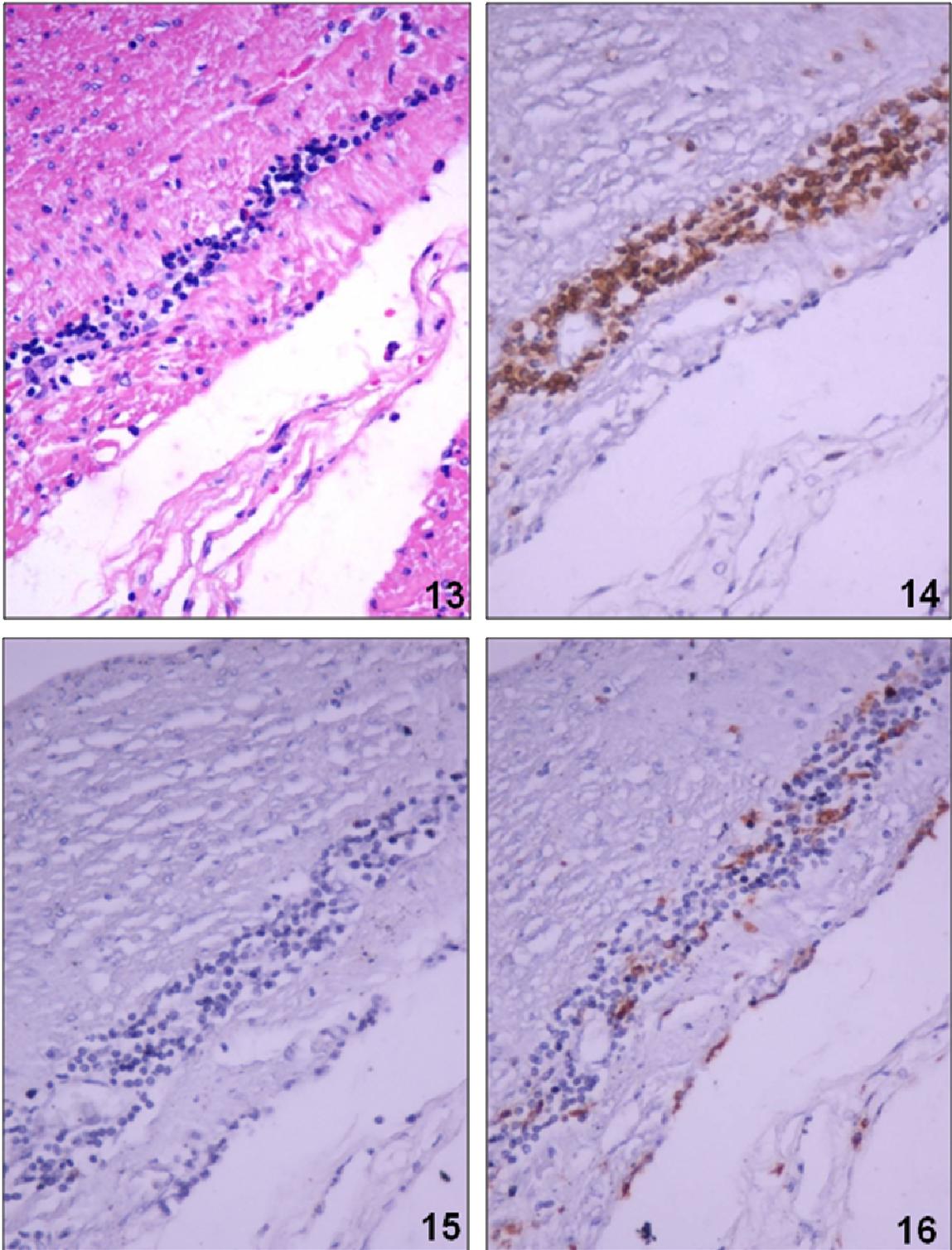


Fig. 13 - Miosite moderada em esôfago sem mega (HE - 400x).

Figs. 14 a 16 - Mesmo caso da Fig. 13, corado por imuno-histoquímica; notar o intenso predomínio de Linfócitos T (**Fig. 14** - CD3 - 400x), ausência de Linfócitos B (**Fig. 15** - CD20 - 400x) e esparsos "macrófagos" (CD68 - 400x).

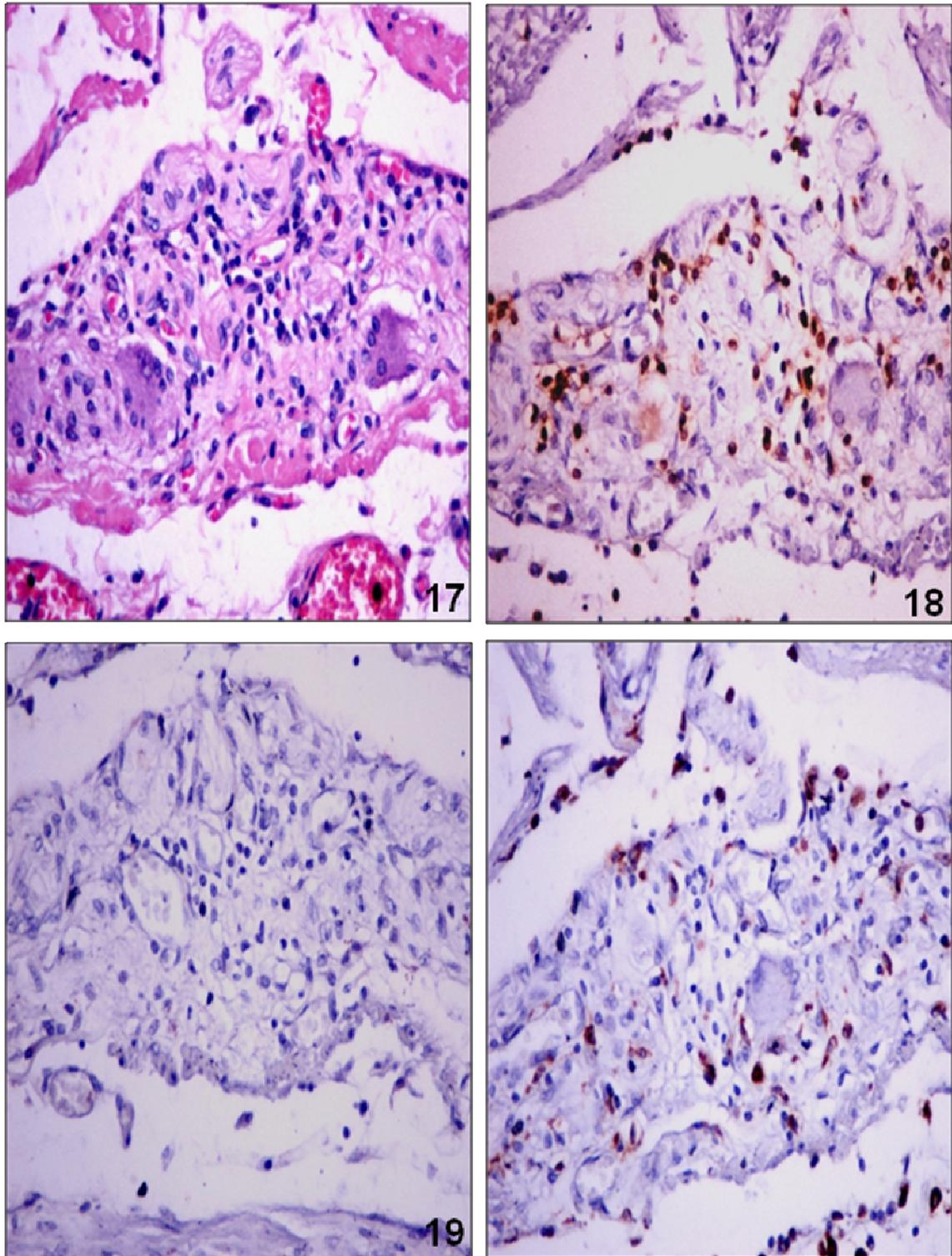


Fig. 17 - Ganglionite moderada em esôfago sem mega (HE - 400x).
Figs. 18 a 20 - Mesmo caso da Fig. 17, corado por imuno-histoquímica; notar o intenso predomínio de Linfócitos T (**Fig. 18** - CD3 - 400x), ausência de Linfócitos B (**Fig. 19** - CD20 - 400x) e esparsos "macrófagos" (**Fig. 20** - CD68 - 400x).

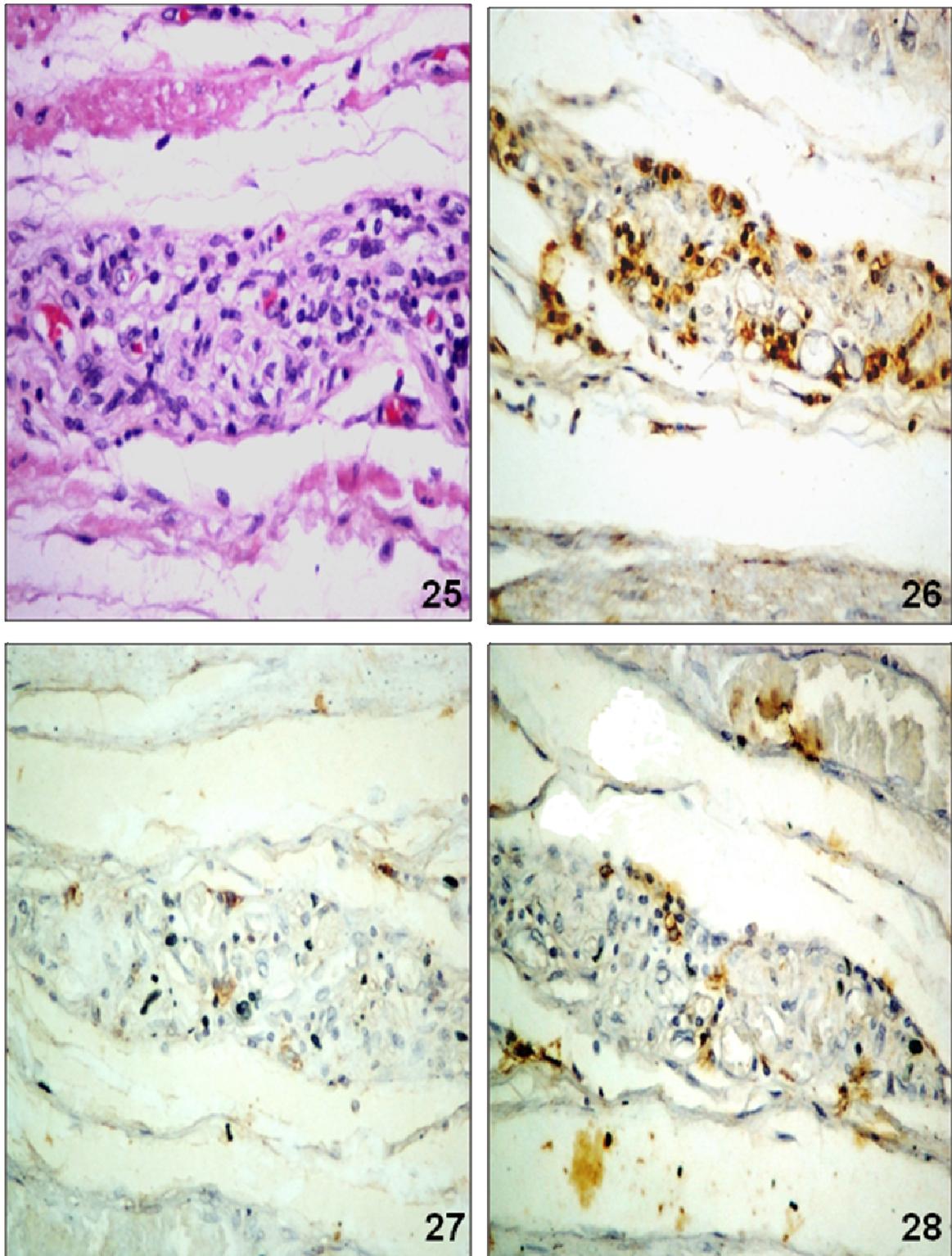


Fig. 25 – Ganglionite intensa em caso de megaesôfago (HE - 400x).

Figs. 26 a 28 - Mesmo caso da Fig. 25, corado por imuno-histoquímica; notar o intenso predomínio de Linfócitos T (**Fig. 26** - CD3 - 400x), escassos Linfócitos B (**Fig. 27** - CD20 - 400x) e esparsos “macrófagos” (**Fig. 28** - CD68 - 400x).

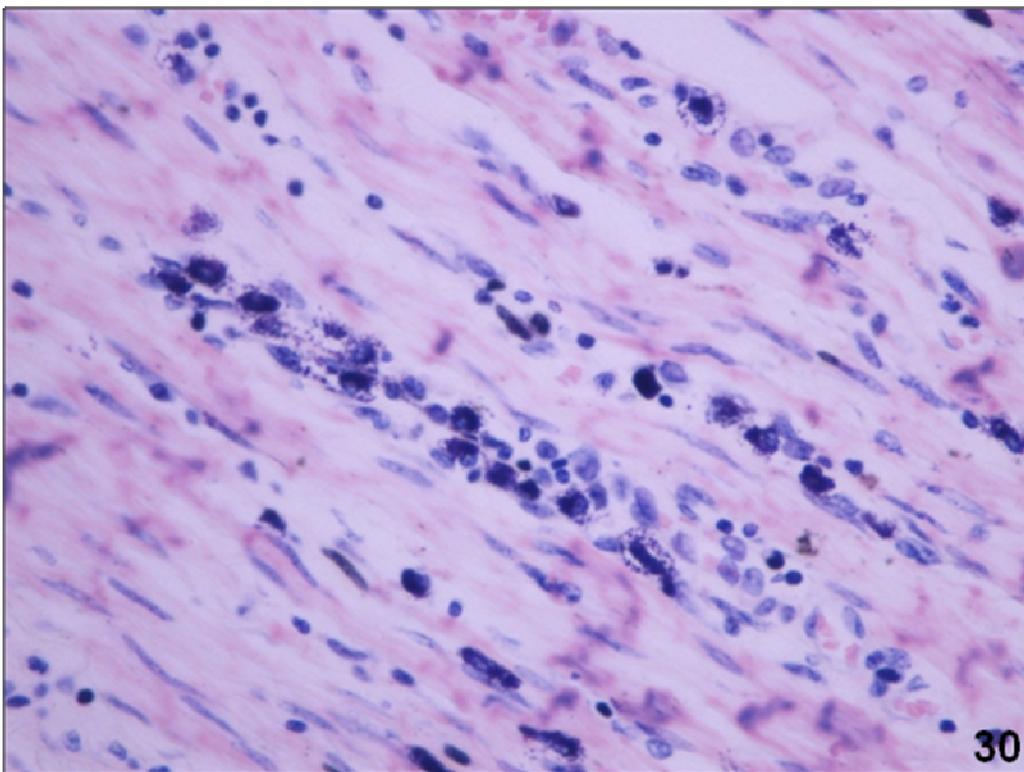
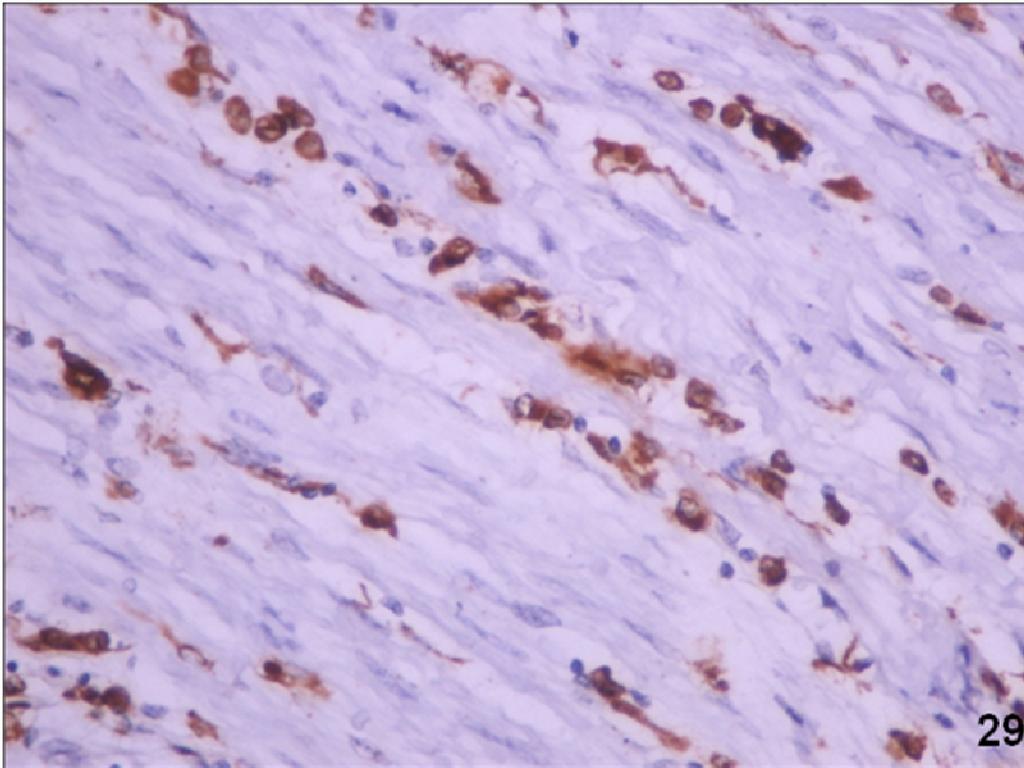
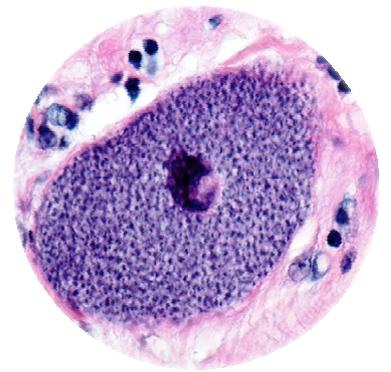


Fig. 29 – Muscular de caso com megaesôfago com numerosos mastócitos no perimísio e nos focos de miosite (imuno-histoquímica – CD68 – 400x).

Fig. 30 – Comparar a imagem vista por imuno-histoquímica para CD68 que cora não apenas macrófagos, mas também os mastócitos (Giemsa – 400x).



Discussão

Nossos dados com relação ao predomínio de megaesôfago e megacólon no sexo masculino, apesar de ser pequena a amostra para esse tipo de análise, estão de acordo com os dados da literatura (COURA, 2000). Esse dado fica ainda mais evidente quando observamos o quadro 3, que compara as alterações nos 30 casos em que pudemos examinar tanto o esôfago quanto o cólon. Apenas 3 (23%) dos 13 casos com visceromegalia eram do sexo feminino.

Nos casos em que pudemos avaliar o esôfago e o cólon do mesmo indivíduo, o megaesôfago foi mais freqüente que o megacólon e observou-se tendência do megaesôfago ter faixa etária menor, o que está de acordo com diversos estudos clínicos (REZENDE & RASSI, 1983; REZENDE & MOREIRA, 1988).

Quanto ao parasitismo na fase crônica da doença de Chagas diversos autores destacaram ser o mesmo escasso (TAFURI & RASO, 1983; RIBEIRO-DOS-SANTOS & SILVA, 1980; ANDRADE, 1996); porém, nas últimas décadas alguns estudos demonstraram que formas amastigotas do *T. cruzi* podem ser detectadas em diversos

órgãos (BARBOSA Jr. & ANDRADE, 1984; ADAD *et al.*, 1991; ADAD, 1996; TEIXEIRA *et al.*, 1993; HIGUCHI *et al.*, 1997). Em nosso material encontramos amastigotas de *T. cruzi* somente em 4 (20%) dos 20 casos de megaesôfago (10% do total de 39 estudados) e em apenas 1 (4%) dos 25 casos de megacólon (2% do total de 50 cólons de chagásicos crônicos estudados). Em nenhum esôfago ou cólon sem mega foi identificado ninho de *T. cruzi*. Esses dados parecem sugerir que o encontro de *T. cruzi* seria menos raro nos órgãos com visceromegalia e, além disso, que no esôfago seria menos incomum que no cólon. Resultado semelhante foi obtido por ADAD (1989, 1996), em estudos isolados em esôfagos e cólons de chagásicos crônicos com e sem mega. É também similar ao resultado de BARBOSA Jr. & ANDRADE (1984), no sentido de terem detectado com maior frequência amastigotas no esôfago (20%) que no cólon (5%). Diferem, entretanto desses últimos autores, não apenas pela maior frequência obtida por eles, mas, especialmente, pelo fato de não termos encontrado amastigotas em órgãos sem megalia. Talvez a diferença no percentual de casos com ninhos de amastigotas em relação aos identificados em nossa pesquisa, decorra do fato de que aqueles autores selecionaram amostras previamente identificadas como positivas para *T. cruzi* em exame de rotina do coração de cardiopatas chagásicos na fase crônica ou “subaguda” (BARBOSA Jr. & ANDRADE, 1984), ou com inflamação intensa na muscular do esôfago (ADAD, 1989) ou do cólon (ADAD, 1996). Em nosso estudo, a pesquisa de *T. cruzi* foi realizada em todos os casos, independente de ter ou não inflamação.

A frequência de positividade para *T. cruzi* em nossos casos de megaesôfago (20%) foi bem menor que a obtida por LAGES-SILVA *et al.* (2001), que identificaram “depósitos de antígenos de *T. cruzi*” em 77% dos megaesôfagos analisados, sem prévia seleção de casos e examinando amostras pequenas de cardiomiectomia. Essa alta positividade chamou nossa atenção. Entretanto, destacamos que em nosso material consideramos positivas apenas as estruturas que tinham morfologia compatível com

amastigotas, tendo em vista serem freqüentes em imuno-histoquímica, artefatos e precipitados de DAB que talvez tenham sido interpretados como “depósitos antigênicos”.

Embora sabendo que o parasitismo tecidual é escasso na fase crônica da doença de Chagas, ele parece ser importante para perpetuar o estímulo sobre o sistema imune. Estudos utilizando técnica de PCR apóiam essa hipótese: JONES *et al.* (1993) e HIGUCHI *et al.* (1993) detectaram, frequentemente, fragmentos do genoma de *T. cruzi* em corações de chagásicos crônicos; VAGO *et al.* (1996; 2003) e DA SILVEIRA *et al.* (2005) identificaram DNA de *T. cruzi* em 100% dos casos de megaesôfago e em 33% a 60% dos esôfagos sem mega, a medida que aumentaram a quantidade de fragmentos teciduais analisados. Estas últimas pesquisas utilizaram parte dos casos que estudamos nesta tese, indicando que apesar de termos identificado formas tissulares do parasita em poucas amostra, por meio da técnica de imuno-histoquímica, utilizando-se PCR demonstra-se persistência do parasita em grande número casos.

Com relação ao infiltrado inflamatório e à presença do *T. cruzi* em cortes histológicos de esôfago e cólon de chagásicos crônicos com e sem mega, não encontramos estudos comparando os dois órgãos simultaneamente. Infelizmente, a escassez de casos positivos para *T. cruzi* em nosso material, não possibilitou análise estatística. Todavia, miosite foi mais freqüente no megaesôfago que no megacólon e, nos órgãos com mega, em relação aos sem mega o que talvez possa ter relação com o parasitismo.

Quanto à extensão e freqüência dos focos inflamatórios presentes nos esôfagos e cólons de pacientes chagásicos crônicos com e sem mega, representados por miosite e ganglionite, nossos resultados demonstram que os fenômenos inflamatórios variaram, sendo mais proeminentes nos esôfagos, especialmente nos casos com mega. Comparação similar não foi vista na literatura. Encontramos na pesquisa de BARBOSA Jr. & ANDRADE (1984), que só avaliaram órgãos sem mega, citação de que os focos inflamatórios eram mais freqüentes no esôfago, enquanto no cólon eram raros ou ausentes.

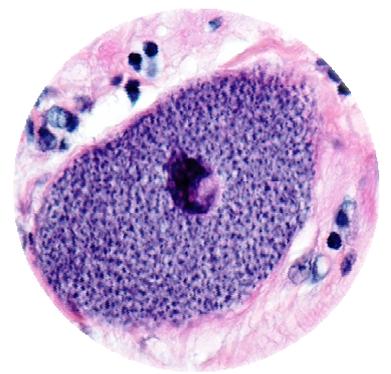
De certa forma poderiam ter alguma relação com a maior frequência de parasitismo no esôfago que no cólon. Por outro lado, poderíamos também lembrar que existem diferenças estruturais entre esôfago e cólon: 1) observa-se usualmente maior quantidade de mastócitos no esôfago que nos cólons, o que poderia favorecer intensificação do processo inflamatório no esôfago (PINHEIRO *et al.*, 2008); 2) a presença de vasos sanguíneos nos gânglios do plexo mientérico do esôfago, o que não é visto no cólon, poderia favorecer inflamação primária nos gânglios esofágicos (ADAD, 1996).

Em relação à caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório nossos resultados demonstram, de modo geral, intenso predomínio de linfócitos T (CD3⁺), escassos macrófagos (CD68⁺) e raros linfócitos B (CD20⁺), independente do órgão, da presença ou não de visceromegalia, da intensidade da inflamação e/ou de ser miosite ou ganglionite. Não encontramos na literatura estudos semelhantes, comparando esôfago e cólon de chagásicos crônicos, como foi feito nesta pesquisa. Comparando aos estudos isolados no esôfago, nossos dados estão de acordo com os de D'ÁVILA REIS *et al.* (2001), em relação à miosite no megaesôfago; diferem, entretanto, desses autores quanto ao infiltrado na região do plexo mientérico, considerando que referem ter predominado células tipo macrófagos-CD68⁺ neste local. Acreditamos que essa diferença decorra do fato de termos analisado o infiltrado apenas no interior dos gânglios, não considerando a região em torno, tendo em vista que no conjuntivo em torno do plexo mientérico e, no perimísio, há freqüentes mastócitos no esôfago normal e essas células coram-se também através do CD68, como se pode ver nas Figs. 29 e 30.

Quanto à comparação dos nossos resultados aos dados isolados do cólon de outros estudos, observamos concordância com CORBETT *et al.* (2001) e DA SILVEIRA *et al.* (2007c) que também notaram predomínio de linfócitos T CD3⁺ em relação aos linfócitos B CD20⁺, na muscular e no plexo mientérico. DA SILVEIRA *et al.* (2005) encontraram resultado diferente no plexo submucoso, no qual predominaram linfócitos B CD20⁺. Em

nosso estudo este plexo não foi analisado por várias razões: 1) na mucosa e submucosa são muito freqüentes alterações secundárias à estase alimentar/bolo fecal (gerando com freqüência a formação de folículos linfóides), ao invés de serem diretamente decorrentes da doença de Chagas, como observa-se predominantemente na muscular própria e no plexo mientérico; 2) as lesões do plexo mientérico são mais importantes para o aparecimento dos megas (ADAD, 1996); 3) não seria possível comparar as alterações do plexo submucoso do cólon às do esôfago, tendo em vista que esse plexo é quase inexistente mesmo em esôfagos normais (ADAD, 1989).

Em síntese poderíamos dizer que o parasitismo tecidual é escasso no esôfago e no cólon na fase crônica da doença de Chagas, sendo menos raro no esôfago com mega. Miosite e ganglionite são mais freqüentes nos órgãos com mega em relação aos sem mega e no esôfago em comparação ao cólon. Entretanto, do ponto de vista qualitativo, o aspecto do infiltrado inflamatório é semelhante, com intenso predomínio de linfócitos T (CD3⁺).



Conclusões

1. O encontro de *T. cruzi* no esôfago e cólon na fase crônica da doença de Chagas é raro, e parece menos raro no megaesôfago. A frequência de *T. cruzi* no megaesôfago foi de 20% e, no megacólon, de 4%. Não foram encontrados amastigotas nos órgãos sem mega. Se considerarmos o total de esôfagos com e sem mega, em conjunto, a frequência de *T. cruzi* seria de 10% e, no cólon, de 2%.

2. Miosite e ganglionite foram mais freqüentes e intensas nos órgãos com mega em relação aos sem mega e, no esôfago, em relação ao cólon.

3. Do ponto de vista qualitativo, o infiltrado inflamatório na muscular no plexo mientérico, nos casos de esôfago e cólon, com e sem mega, foi semelhante e aparentemente independente do encontro de *T. cruzi* no órgão, sendo constituído predominantemente por linfócitos T (CD3+), escassos macrófagos (CD68+) e raros linfócitos B (CD20+). Em alguns casos havia freqüentes eosinófilos e, ocasionalmente, foram vistos granulomas.



Resumo

Com o objetivo de avaliar comparativamente o processo inflamatório no esôfago e cólon de chagásicos crônicos com e sem mega, pesquisou-se o parasitismo tecidual e realizou-se análise qualitativa e quantitativa do processo inflamatório na muscular e no plexo mientérico.

Foram avaliados 39 esôfagos, sendo 19 de chagásicos crônicos sem mega e 20 de portadores de megaesôfago e 50 cólons, sendo 25 de chagásicos crônicos sem mega e 25 de portadores de megacólon. Em 30 casos foi possível examinar o esôfago e o cólon do mesmo paciente. Os anéis foram fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina.

A pesquisa do *T. cruzi* foi realizada em 5 cortes escalonados de cada caso, através da técnica de imuno-histoquímica. A análise foi realizada em toda a túnica muscular dos esôfagos e cólons. Para análise qualitativa e semi-quantitativa intensidade da miosite e ganglionite, foram utilizados cortes histológicos corados segundo às técnicas de HE e Giemsa. Para avaliar o predomínio de linfócitos T, B ou macrófagos no exsudato, foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica para os anticorpos anti-CD3, anti-CD20 e anti-CD68.

Concluimos que:

O encontro de *T. cruzi* no esôfago e no cólon na fase crônica da doença de Chagas é raro, e parece menos raro no megaesôfago. A frequência de *T. cruzi* no megaesôfago foi de 20%, e no megacólon, de 4%. Não foram encontrados amastigotas nos órgãos sem mega. Se considerarmos total de esôfagos com e sem mega, em conjunto, a frequência de *T. cruzi* seria de 10% e, no cólon, de 2%.

Miosite e ganglionite foram mais frequentes e intensas nos órgãos com mega em relação aos sem mega e no esôfago, em relação ao cólon.

Do ponto de vista qualitativo, o infiltrado inflamatório na muscular e no plexo mientérico, nos casos de esôfago e cólon, com e sem mega, foi semelhante e aparentemente independente do encontro de *T. cruzi* no órgão, sendo constituído predominantemente por linfócitos T (CD3+), escassos macrófagos (CD68+) e raros linfócitos B (CD20+). Em alguns casos havia frequentes eosinófilos e, ocasionalmente, foram vistos granulomas.



Abstract

To compare the inflammatory process in the esophagus and colon of chronic chagasics, with and without mega, we research the parasitism in tissue and the quality and quantity of inflammatory process in the muscular and myenteric plexus.

We evaluated 39 esophagus obtained from 19 chagasics patients without megaesophagus and 20 chagasics patients with megaesophagus and, 50 colons from 25 chagasics patients without mega and 25 chagasics with megacolon. In 30 cases it was possible to examine the esophagus and the colon of the same patient. The tissue were fixed in 4% formaldehyde, processed for paraffin embedding and cut at 5 μ m thick microtome sections.

The research for *T. cruzi* were done in 5 sections of each case through immunohistochemical technique in the muscular layer of the esophagus and colons. For qualitative and quantitative analysis of the inflammation in the muscular and myenteric plexus, histologic sections were stained using HE and Giemsa. To evaluate the predominance of lymphocytes T, B or macrophages, we used the technique of immunohistochemical for the antibodies anti-CD3, anti-CD20 and anti-CD68.

We conclude that:

The presence of *T. cruzi* in the esophagus and colon in the chronic phase of Chagas's disease is rare, and seems more common in megaesophagus. The frequency of *T. cruzi* in megaesophagus was 20% and in megacolon 4%. We did not find amastigotas in organs without mega. If we consider all the group of esophagus (with and without mega) the frequency of *T. cruzi* would be 10% and, in colon, 2%.

The inflammation in the muscular and myenteric plexus was more frequent and intense in the organs with mega in relation to those without mega, and in the esophagus, in relation to colon.

The type of inflammatory cells in the muscular and in the plexus myenteric, in cases of esophagus and colon, with and without mega, was similar and independent of the presence of *T. cruzi* being constituted predominantly by lymphocytes T, scarce macrophages and rare lymphocytes B. In some cases frequent eosinophils were observed and occasionally, granulomas.



Referências Bibliográficas

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 109-130.
2. ADAD, S.J. **Contribuição ao estudo da anatomia patológica e da patogênese do megaesôfago chagásico**. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 1989, 93 p.
3. ADAD, S.J. **Contribuição ao estudo da anatomia patológica e da patogênese do megacólon chagásico**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 1996, 212 p.
4. ADAD, S.J.; ANDRADE, D.C.S.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Inst. Med. Trop. São Paulo**, 33: 443-450 1991.
5. ADAD, S. J. Contribuição ao estudo da anatomia patológica e patogênese do megacólon chagásico. Resumo de tese. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, 30 (1): 79-81, 1997.
6. ADAD, S.J.; CANÇADO, C.G.; LOPES, E.R.; GOMES, U.V. Análise quantitativa de neurônios no plexo mientérico no sigmóide de chagásicos crônicos com e sem megacólon . **J. Brasil. Patol.**, 33,Sup. (I) 13, 1997a.
7. ADAD, S.J.; CANÇADO, C.G.; TEIXEIRA, V.P.A.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Análise morfométrica de neurônios do plexo mientérico no sigmóide de chagásicos crônicos com e sem megacólon . **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, 30, Sup., 113-114, 1997b.
8. ADAD, S.J.; SOUZA NETO, A.H.; PINHEIRO, S.W.; ARAÚJO, J.R.; LOPES, E.R. Avaliação quantitativa e qualitativa do processo inflamatório no coração e tubo digestivo de chagásicos crônicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33 Supl. (II): 107, 2000.

9. ADAD SJ, CANÇADO CG, ETCHEBEHERE RM, TEIXEIRA VP, GOMES UA, CHAPADEIRO, A.; LOPES, E.R. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Arch.**, 438 (3): 254-258, 2001.
10. ALTEMANI, A.M.; BITTENCOURT, A L.; LANA, A.M.A. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas disease: A qualitative and quantitative analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 62 (2): 319-324, 2000.
11. ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia - São Paulo, 1999.
12. AMORIM, M.; CORREA NETTO, A. Histopatologia e patologia do megaesôfago e megarreto. **Ann. Fac. Med. Univ. S. Paulo**, 81: 101-127, 1932.
13. ANDRADE, Z.A. & ANDRADE, S.G. Estudo imunocitoquímico da doença de Chagas experimental. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 11 (1): 44-47, 1969.
14. AÑEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALEZ, N.; PERCOCO, G.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 60 (5): 726-732, 1999.
15. ARANTES, R. M. E.; MARCHE, H. H. F.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon- γ induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Am. J. Pathol.**, 164 (4): 1361-1368, 2004.
16. BAILEY, F.R. Aparelho digestivo. In: **Histologia**. São Paulo: Editora Edgar Blucher, 1973. p. 336-407.
17. BARBOSA, A.J.A. Método imunocitoquímico para identificação de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos de retina. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 27 (6): 293-297, 1985.
18. BARBOSA, A.J.A.; GOBBI, H.; LINO, B.T.; LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; TEIXEIRA, V. P. A.; ALMEIDA, H.O. Estudo comparativo entre o método convencional e o método da peroxidase na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 28 (2): 91-96, 1986.
19. BARBOSA Jr., A.A.; ANDRADE, Z.A. Identificação do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. São Paulo**, 17, 123-126, 1984.
20. BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas.**, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 431p.
21. BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82: 205-213, 1987.

22. CABRAL, R.A.; NOVAK, I.T.C.; GLOCKER, T.M.; CASTRO VIEIRA, G.A. Cardiopatía chagásica: Identificación de células infiltrantes, em corações de pacientes que sufrieron muerte cardíaca a distintas edades. **Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Córdoba**, 59 (1): 83-89, 2002.
23. CALIARI, E.R.O.; CALIARI, M.V.; LANA, M.; TAFURI, W.L. Estudo quantitativo e qualitativo dos plexos de Auerbach e Meissner do esôfago de cães inoculados com o *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 29 (1): 17-20, 1996.
24. 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 Arch.**, 441(1): 69-76, 2001.
25. CARDOSO, G.M.; MORATO, M.J.; GOMES, J.A.; ROCHA, M.O.; BONFIM, I.P.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; VANDEBERG, J.L.; REIS, M.R.; MAGALHÃES, E.F.; CORREA-OLIVEIRA, R. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas disease. **Front. Biosci.**, 1; 11: 1158-1163, 2006.
26. CHAPADEIRO, E.; LOPES, E.R.; MESQUITA, P.M.; PEREIRA, F.E.L. Incidência de “megas” associados à cardiopatia chagásica. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 6: 287-291, 1964.
27. CHAUSSABEL, D.; PAJAK, B.; VERCRUYSSSE, V.; BISSEYÉ, C.; GARZÉ, V.; HABIB, M.; GOLDMAN, M.; MOSER, M.; VRAY, B. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Lab. Invest.**, 83 (9): 1373-1382, 2003.
28. CORBETT, C.E.P.; RIBEIRO Jr., U; PRIANTI, M.G.; HABR-GAMA, A.; OKUMURA, M.; GAMA-RODRIGUES, J. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas’ disease. **Dis. Colon Rectum**, 44 (7): 993-998, 2001.
29. CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GOMES, J.A.S.; LEMOS, E.M.; CARDOSO, G.M.; DÁVILA REIS, D.; ADAD, S.J.; CREMA, E.; MARTINS-FILHO, O.A.; COSTA, M.O.R.; GAZZINELLI, G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. **Mem. Inst. Oswal. Cruz**, 94 (1): 253-255, 1999.
30. CORSI, P.R.; CRETILLA, C.M.; GAGLIARDI, D.; VIANA, A.T.; FAVA, J. Incidência de megacólon sintomático em portadores de megaesôfago chagásico. **Rev. Ass. Med. Brasil**, 38 (1): 9-12, 1992.
31. COURA, J.R. A doença de Chagas humana e seus modelos de estudo. In: ARAÚJO-JORGE, T. & CASTRO, S.L. **Doença de Chagas. Manual para experimentação animal**. Edição comemorativa dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas. Rio de janeiro: Fiocruz, 2000, 19-23.
32. CREMA, E.; MONTEIRO, I.O.; GOMES, M.G.Z.; SILVA, A.A.; RODRIGUES JÚNIOR, V. Evaluation of cytokines the different evolutive phases do chagasic esophagopathy. **Clin. Immunol.**, 119, 213-218, 2006.

33. CROKER, B.P.; KUHN, R.E. Immunohistochemical detection of *Trypanosoma cruzi* in tissues of mice with experimental Chagas disease. **Histochemistry**, 77 (2): 195-200, 1983.
34. CUNA, W.R. & CUNA, C.R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 90 (4): 503-506, 1995.
35. DA SILVEIRA, A.B.M.; ARANTES, R.M.E.; VAGO, A.R.; LEMOS, E.M.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, D. D'AVILA. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, 131: 627-634, 2005.
36. DA SILVEIRA, A.B.M.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J.B. REIS, D. D'AVILA. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. **Parasitology**, 9, 1-8, 2007a.
37. DA SILVEIRA, A.B.M.; D'AVILA REIS D., OLIVEIRA, E.C.; NETO, S.G.; LUQUETI, A.O.; POOLE, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J.B. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Dig. Dis. Sci**, 24, 2007b.
38. DA SILVEIRA, A.B.M.; LEMOS, E.M.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J.B.; REIS, D.A. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum. Pathol**, 7: 2007c.
39. DA SILVEIRA, A.B.M.; FREITAS, M. A. R.; OLIVEIRA, E.C; Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon, **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 102 (11):1154-1156, 2008a.
40. DA SILVEIRA, A.B.M.; FREITAS, M.A.R; OLIVEIRA, E.C.; NETO, S.G.; LUQUETTI, A.O.; FURNESS, J.B.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, D.A. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon. **Parasitology**, 135: 1337-1342, 2008b.
41. D'AVILA REIS, D.A.; JONES, E.M. TOSTES JR, S.; LOPES, E.R; GAZZINELLI, G.;COLLEY, D.G.; McCURLEY. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α^+ cells and dominance of Granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 48 (5): 637-644, 1993.
42. D'AVILA REIS, D.A.; LEMOS, E.M.; SILVA, G.C.; CAMARGOS, E.R.S.; ADAD, S.J.; CREMA, E.;CARTER, E.; McCURLEY, T.;CORREA-OLIVEIRA, R.; MACHADO, C.R.S. Chagasic megaesophagus: phenotypic characterization of the infiltrating inflammatory cells. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 95 (2): 177-178, 2001.

43. DIAS, J. C. P.; COURA, J.R. **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.** 1ª ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 486, 1997.
44. DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANÇADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; FREEMAN JÚNIOR, G.L.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G.; PARRA, J.C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **Int. Immunol.**, 6 (4): 499-506, 1994.
45. ETCHEBEHERE, R M; OLIVEIRA, P F; OLIVEIRA, M R P; TOSTES JÚNIOR, S; REIS, M A; ADAD, SJ. Estudo comparativo dos gânglios do plexo mientérico do esôfago e cólon humano em relação à presença de vasos sanguíneos In: XXII Congresso de Patologia, 2001, Salvador. **J. Bras. Patol.**, 37. 30 – 30, 2001.
46. FERREIRA, M. S.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; DIAS, J. C. P.; OSTERMAYER, A. L. Doença de Chagas. In: Veronesi R & Focaccia R (eds). Veronesi: **Tratado de Infectologia.** 2ª ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2002.
47. FERNANDEZ, A.; HONTEBEYRIE, M; SAID, G. Autonomic neuropathy and immunological abnormalities in Chagas disease. **Clin. Auton. Res.**, 2 (6): 409-412, 1992.
48. FREITAS, J.M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int. J. Parasitol.**, 1; 35 (4): 411-417, 2005.
49. FUENMAYOR, C.; HIGUCHI, M.L.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; GUTIERREZ P.; AIELLO V.; PALOMINO, S. Acute Chaga's disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T.cruzi* parasitic antigens. **Acta. Cardiol.**, 60 (1): 33-37, 2005.
50. FURNESS, J.B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric plexus system. **Neurosc.**, 5: 1-20, 1980.
51. GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. **Int. Rec. Cytol.**, 59: 129-193, 1979.
52. GABELLA, G. Fall in the number of myoenteric neurons in aging guinea pigs. **Gastroenterology**, 96: 1487-1493, 1989.
53. GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 30: 559-566, 1990.
54. GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, 22(10): 2501-2506, 1992.
55. GUSMÃO, S. N. S. Redação de tese e dissertação. **Rev. Med. Minas Gerais**, 10 (4): 243-248, 2000.

56. GUYTON, A.C. & HALL, J.E. O trato gastrointestinal: controle nervoso, movimentação do alimento ao longo do trato e fluxo sanguíneo. In: GUYTON, A.C. & HALL, J.E **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 457-468, 1998.
57. HERRERA, L.; MARTINEZ, C.; CARRASCO, H.; JANSEN, A.M.; URDANETA-MORALES, S. Cornea as a tissue of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, 100 (6): 1395-1399, 2007.
58. HIGUCHI ML, DE MORAIS CF, PEREIRA BARRETO AC, LOPES EA, STOLF N, BELLOTTI G, PILEGGI F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clin. Cardiol.**, 10 (11): 665-670, 1987.
59. HIGUCHI, M.L; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, 423: 157-160, 1993.
60. HIGUCHI, M.L; REIS, M.M; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 56 (5): 485-489, 1997.
61. HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi*: the immunological consequences of infection. **J. Cell. Biochem.**, 21 (4): 299-304, 1983.
62. HUDSON, L; BRITTEN, V. Immune response to South American trypanosomiasis and its relationship to Chagas' disease. **Br. Med. Bull.**, 41: 175-180, 1985.
63. IANTORNO, G; BASSOTI, G.; KOGAN, Z.; LLUMI, C.M.; CABANNE, A.M.; FISOGNI, S; VARRICA, L.M.; BILDER, C.R.; MUÑOZ, J.P.; LISERRE, B.L.; MORELLI, A.; VILLANACCI, V. The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. **Am. J. Surg. Pathol.**, 31 (3): 460-468, 2007.
64. JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; McCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 48 (3): 348-357, 1993.
65. KEY, M.; ATWOOD, K.; BISGAARD, K.; BLOOM, K.J.; BOENISCH, T.; CHRISTENSEN, N.K.; FARMILO, A.J.; HARVEY, R.; HUDSON, J.; NADJI, M.; OVERTON, W.R.; PACE, G.E.; RASMUSSEN, O.F.; SCHONAU, A.; WENDELBOE, H.G.; WINTHER, L.; ZEHEB, R. **Immunohistochemical staining methods**, 4 ed., California, USA: Dako Corporate, 2006, 172 p.
66. KOBERLE, F. Patogênese dos megas. **Rev. Goiana Med**, 2: 101-110, 1956.
67. KOBERLE, F. Patologia y anatomia patológica de la enfermedad de Chagas. **Bol. Ofic. Sanit. Panamer.**, 51: 404-428, 1961.

68. KOBERLE, F. Patogenia do megaesôfago brasileiro e europeu. **Rev. Goiana Med.**, 9: 79-116, 1963.
69. KOBERLE, F. Chaga's disease and Chaga's syndromes: The pathology of American Trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.**, 6:63-116, 1968a.
70. KOBERLE, F. Patogenia da moléstia de Chagas. In: CANÇADO, J.R. (ed). Doença de Chagas. Belo Horizonte: **Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais**, 238-260, 1968b.
71. KOBERLE, F.; ALCÂNTARA, F.G.; SANTOS, R.R. Patogenia da forma digestiva. In: RAIÁ, A.A. **Manifestações digestivas da moléstia de Chagas**. São Paulo, Sarvier, 1983. p. 25-34.
72. KUMAR, S.; TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Paras. Immunol.**, 20: 207-216, 1998.
73. 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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65 (5): 435-441, 2001.
74. LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L.E.; PEDROSA, A.L.; CREMA, E.; GALVÃO, L.M.C; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E. Variability of Kinetoplast DNA Gene Signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chaga's' disease in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, 44 (6): 2167–2171, 2006.
75. LANDMAN, G.; CORREA-ALVES, A.; MENDES, N.F.; MENDES, E. Identification of *Trypanosoma cruzi* in human tissues using an immunoperoxidase method: study of acute Chagas disease, congenital form. **Allergol. Immunopathol.**, 14 (6): 509-513, 1986.
76. LAUCELLA, S.A; POSTAN, M.; MARTIN, D.; FRALISH, B.H.; ALBAREDA, M.C.; ALVAREZ, M.G.; LOCOCO, B.; BARBIERI, G.; VIOTTI, R.J.; TARLETON, R.L. Frequency of Interferon- γ - producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **J. Infect. Dis.**, 1;189 (5): 909-918, 2004.
77. LEAVEY, J.K. & TARLETON, R.L. Cutting edge: Dysfunctional CD8 T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, 170 (5): 2264-8, 2003.
78. LEMOS, E.M.; REIS, D.d'À; ADAD, S.J.; SILVA, G.C.; CREMA, E.; CORREA-OLIVEIRA, R. Decreased CD4⁺ circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal Chagas disease. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 88 (2): 150-155, 1998.

79. LOPES, E.R., CHAPADEIRO, E. Anatomia Patológica da doença de Chagas. In: DIAS, J.C.; COURA, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. 67-84.
80. LOPES, E.R. Megaesôfago, megacólon e câncer. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 21, 91–94, 1998.
81. LOPES, E.R.; PRATA, A.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W.L.; ROCHA, A. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Doença de Chagas In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo-Patologia.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 1320-1337.
82. MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99 (1): 1-12, 2004.
83. MACHADO, E.M.; CAMILO JÚNIOR, D.J.; PINHEIRO, S.W.; LOPES, E.R.; FERNANDES, A.J.; DIAS, J.C.; ADAD, S.J. Morphometry of submucous and myenteric esophageic plexus of dogs experimentally reinfected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 96 (4): 545-548, 2001a.
84. MACHADO, E.M.; FERNANDES, A.J.; MURTA, S.M.; VITOR, R.W.; CAMILO JR, D.J.; PINHEIRO, S.W.; LOPES, E.R.; ADAD, S.J.; ROMANHA, A.J.; PINTO DIAS, J.C. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65 (6): 958-965, 2001b.
85. MAIFRINO, L.B.; LIBERTI, E.A; WATANABE, I; DE SOUZA, R.R. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 60 (5): 721-725, 1999.
86. MARTIN, D. & TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Imunol. Rev.**, 201: 304-17, 2004.
87. MARIN-NETO, J.A.; GALLO Jr, L.; MANCO, J.C.; RASSI, A.; AMORIM, D.S. Mechanisms of tachycardia on standing: studies in normal individuals and in chronic Chagas' heart patients. **Cardiovasc. Res.**, 14 (9): 541-50, 1980.
88. MECKERT, P.M.C.; CHAMBÓ, J.G.; LAGUENS, R.P. Presence of cells producing antiheart autoantibodies in the inflammatory infiltrate of chronic chagasic myocarditis. **Clin. Immunol. Immunop.**, 60: 137-144, 1991.
89. MELO, R.C.N.; MACHADO, C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: Peripheral blood monocytes and hearth macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Exp. Parasitol.**, 97, 15-23, 2001.
90. MENEGHELLI, U. G. Enteropatia chagásica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol.37, no.3, p.252-260, 2004.
91. MILEI, J., STORINO, R. A., BEIGELMAN, R., FERNANDEZ ALONSO, G., MATTURRI, L. AND ROSSI, L. Histopathology of specialized and ordinary

- myocardium and nerves in chronic Chagas disease, with a morphometric study of inflammation and fibrosis. **Cardiol.**, 36, 107–115, 1991.
92. MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98(5): 577-591, 2003.
 93. MOLINA, H.A. & KIERSZENBAUM, F. A study of human myocardial tissue in Chaga's disease: Distribution and frequency of inflammatory cell type. **Inter. J. Parasitol.**, 17 (7): 1297-1305, 1987.
 94. MOLINA, H.A. & KIERSZENBAUM, F. Immunohistochemical detection of deposits of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil peroxidase in the myocardium of patients with Chagas' disease. **Immunol.**, 64 (4): 725-731, 1988.
 95. MOLINA, H.A. & KIERSZENBAUM, F. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* *in vitro* causes bystander cardiac cell damage. **Immunol.**, 66: 289-295, 1989.
 96. MONTEÓN-PADILHA, V.; HERNÁNDEZ-BECERRIL, N.; BALLINAS-VERDUGO, M.A.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; REYES, P.A. Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. **Arch. Med. Res.**, 32 (1): 39-49, 2001.
 97. MONTUFAR, O.M.B.; MUSATTI, C.C.; MENDES, E.; MENDES, N.F. Cellular immunity in chronic Chaga's disease. **J. Clin. Micro.**, 5 (4): 401-404, 1977.
 98. NOGUEIRA, A.M.M.F. **Megacólon chagásico: estudo histopatológico e do sistema nervoso entérico com ênfase na inervação colinérgica.** Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996, 176p.
 99. OKUMURA, M. Doença de Chagas experimental. *In*: RAIÁ, A.A. **Manifestações digestivas da doença de Chagas.** São Paulo: Sarvier, 35-59, 1983.
 100. OLIVARES-VILLAGÓMEZ D; McCURLEY, T.L.; VNENCAK-JONES, C.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D.G.; CARTER, C.E.. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 59: 563-570, 1998.
 101. PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, 1 (2), 92-100, 2001.
 102. PINHEIRO, S.W. **Avaliação quantitativa da fibrose e do número de mastócitos na muscular circular do cólon de chagásicos crônicos com e sem megacólon.** Tese (Mestrado). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2000 46p.
 103. PINHEIRO, S.W. **Avaliação comparativa do número de mastócitos na Muscular circular do esôfago e do cólon de Chagásicos crônicos com e sem mega.** Tese (Doutorado). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2006 83p.

104. PINHEIRO, S.W.; RUA, A.M.; ETCHEBEHERE, R.M.; CANÇADO, C.G.; CHICA, J.E.; LOPES, E.R.; 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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36 (4): 461-466, 2003.
105. PINHEIRO, S.W.; RUA, A.M.; CREMA, V.O; de CASTRO COBO, E.; SILVA, A.C. A. L.; ADAD, S.J. The different concentrations of mast cells in the musculature of the esophagus and the colon. **Hum. Pathol.**, 39 (5): 793, 2008.
106. RASSI, A.; AMATO NETO, V.; RASSI, G.G.; FERRIOLLI FILHO, F.; AMATO, V.S. Tentativa de tratamento específico, por meio da ticlopidina, de pacientes com doença de Chagas em fase crônica. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, 33(2): 225-226, 2000.
107. REZENDE, J.M.; LAUAR, K.M. Aspectos clínicos e radiológicos da aperistálsis do esôfago. **Rev. Brasil. Gastroent.**, 12, 247-262, 1960.
108. REZENDE, J.M. Clínica: manifestações digestivas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. **Trypanossoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 312-361, 1979.
109. REZENDE, J.M.; MOREIRA, H. Chagasic megaesophagus and megacólon. Historical review and present concepts. **Arq. Gastroenterol.**, 25: 32-43, 1988.
110. RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; PIRMEZ, A; SAVINO, W. Role of autoreactive immunological mechanism in chagasic carditis. **Res. Immunol.**, 142: 134-136, 1991.
111. REZENDE, J.M.; RASSI, A. Manifestações digestivas na fase aguda da doença de Chagas. In: RAIÁ, A.A. **Manifestações digestivas da moléstia de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 97-107, 1983.
112. REZENDE, J.M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 297-343, 2000.
113. RIBEIRO, B.M.; CREMA E, RODRIGUES V JR. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas disease. **Hum. Immunol.**, 69(8):484-9, 2008.
114. RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; PIRMEZ, C.; SAVINO, W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. **Res. Immunol.**, 142(2):134-137, 1991.
115. RIMOLDI, M.T.; CARDONI, R.L.; OLABUENAGA, S.E.; BRACCO, M.M.E. Trypanosoma cruzi: sequence of phagocytosis and cytotoxicity by human polymorphonuclear leucocytes. **Immunol.**, 42: 521-527, 1981.
116. ROCHA, A.; ESPER, F.E.; SOUZA, A.G.; TAFURI, W.L.; LOPES, E.R. Megacólon chagásico na criança. **Rev. Goiana Med.**, 27, 225-232, 1981.

117. RODRIGUES, D.; REIS, M.; TEIXEIRA, V.; SILVA-VERGARA, M.; FILHO, D.C.; ADAD, S.; LAZO, J. Pathologic findings in the adrenal glands of autopsied patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Pathol. Res. Pract.**, 198 (1): 25-30, 2002.
118. SATELLITE MEETING. Recommendations from a Satellite Meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 94, (I) 429-432, 1999.
119. SATO, M.N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; TANJI, M.M.; KANENO, R.; HIGUCHI, M.L; DUARTE, A.J.S; CD8+ cells, and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infections in rats. **Infect. Immun.**, 60: 1024-1030, 1992.
120. SILVA-GONSALVES, A.J.; MEUSE-BATISTA, M.; PIRMEZ, C. In situ characterization of the myocardial inflammatory infiltrate in different mouse inbred strains infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94: 171, 1999.
121. SOARES, M.B.P.; PONTES, L.C.; RIBEIRO, RS. The pathogenesis of Chagas disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Ciências**, 73 (4), 2001.
122. STERNBERG, S.S. **Histology for Pathologists**, 2 nd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, New York, 613-647, 1997.
123. STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; BORDA, ES. Chagasic IgG binding with cardiac muscarinic cholinergic receptors modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 61 (3): 387-97, 1991.
124. SUN, J.; TARLETON, R.L. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 48(2): 161-169, 1993.
125. TAFURI, W.L. Lesões do sistema nervoso autônomo do coração e do cólon do camundongo na fase aguda da doença de Chagas experimental. Estudos ao microscópio óptico e eletrônico. **Rev. Asso. Med. M. Gerais**, 19: 3-39, 1967.
126. TAFURI, W.L. Patogênese das lesões do sistema nervoso autônomo do intestino na doença de Chagas experimental. Estudos ao microscópio óptico e eletrônico. **Rev. Goiana Med.**, 14: 11-19, 1968.
127. TAFURI, W.L.; MARIA, T.A.; LOPESW, E.R. Lesões do plexo mioentérico do esôfago, do jejuno e do colo de chagásicos crônico. Estudos ao microscópio eletrônico. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 13 (2): 76-91, 1971.
128. TAFURI, W.L.; PEREIRA, F.E.L.; 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. **Rev. Goiana Med**, 26: 61 -67 1979.
129. TAFURI, W.L.; RASO, P. **Anatomia Patológica**. In: RAIÁ, A.A. Manifestações digestivas da moléstia de Chagas. São Paulo: Sarvier, 61-79, 1983.

130. TAFURI, W.L. Pathogenesis of Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 29 (4): 194-199, 1987.
131. TAFURI, W.L. Immunopathology of Chagas disease – A historical overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 Suppl (1): 247-248, 1999.
132. TALVANI, A.; RIBEIRO, C.S.; ALIBERTI, J.C.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P.V; MURTA, S.M.; ROMANHA, A.J.; ALMEIDA I,C; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J.S.; GAZZINELLI, R.T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes. Infect.**, 2 (8): 851-866, 2000.
133. TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, 31: 550-554, 2001.
134. TARLETON, RL. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Parasitol.**, 73 (1): 106-109, 1991.
135. TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.M. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC- deficient mice: further evidence for the role of both Class-I and Class-II restricted T cells in immune resistance and disease. **Int. Immunol.**, 8 (1): 13-22, 1996.
136. TARLETON, R.L. ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol. Today**, 15: 94-99, 1999.
137. TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, 31: 550-554, 2001.
138. TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol.**, 18 (6), 262-265, 2002.
139. TEIXEIRA, V.P.A.; HIAL, V.; GOMES, R.A.S.; CASTRO, E.C.C.; REIS, M.G.; RODRIGUES, M.L.P; GUIMARÃES, J.V.; REIS, M.A. Correlation between adrenal central vein parasitism and heart fibrosis in chronic chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 56: 177-180, 1993.
140. TOSTES Jr., S.; LOPES, E.R.; PEREIRA, F.E.; CHAPADEIRO, E. Miocardiopatia chagásica crônica humana: estudos quantitativos dos linfócitos CD4+ e dos CD8 + nos exsudatos inflamatórios. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, 27: 127-134, 1994.
141. VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; REIS, D.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chaga's disease. **Lancet**, 384 (28): 891-892, 1996.
142. VAGO, A. R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; d'AVILA REIS, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; SIMPSON, A.J.G.; TOSTES, S.; MOREIRA, M. C. V.; FILHO, G.B. & PENA, S.D.J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*

- from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am. J. Pathol.**, 156, 1805-1809, 2000.
143. VAGO, A.R.; SILVA, D.M.; ADAD, S.J; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, D.A. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaesophagus. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 97 (3): 308-309, 2003.
144. VAN VOORHIS, W.C.; SCHLEKEWY, L.; TRONG, H. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. **Proc. Nat. Acad. Sci (USA)**, 88: 5593-5597, 1991.
145. VILLALTA, F. & KIERSZENBAUM F. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanism of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. **J. Immunol.**, 131 (3): 1504-1510, 1983.
146. VILLALTA, F. & KIERSZENBAUM F. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanism of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human eosinophils. **J. Immunol.**, 132 (4): 2053-2058, 1984a.
147. VILLALTA, F. & KIERSZENBAUM F. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. II. Interactions of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*: uptake and mechanism of destruction. **J. Immunol.**, 133 (6): 3338-3343, 1984b.
148. VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R; DIAS, J.C; PASCOAL, V.P.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; LAGE, P.S.; ELÓI-SANTOS, S.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, 62 (3): 297-308, 2005.
149. VOLTARELLI, J. C.; E. A. DONADI; I. F. CARVALHO; R. P. FALCÃO. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in chronic human Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 32 (4): 240-248, 1990.
150. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease**. Geneva: World Health Organization, 2002. (Technical Report Series, 905).
151. YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. American trypanosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 10: 351-356, 1997.
152. YOUNÉS-CHENNOUFI, B.; SAID, G; EISEN, H.; DURAND, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4⁺). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82: 84-89, 1988.
153. ZHANG, L. & TARLETON, L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas disease. **J. Infect. Dis.**, 180: 480-486, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)