

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE SEROTONINA E A PRESENÇA DE MASTÓCITOS  
NO CÓLON DE PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES E NÃO PORTADORES DE  
MEGA

UBERLÂNDIA  
2017

NATALIA BRUNA TISCHLER

RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE SEROTONINA E A PRESENÇA DE  
MASTÓCITOS NO CÓLON DE PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES E  
NÃO PORTADORES DE MEGA

Projeto de pesquisa para Trabalho de Conclusão de Curso  
a ser apresentado ao Curso de bacharel e licenciatura em  
Enfermagem da Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal de Uberlândia,.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas

UBERLÂNDIA  
2017

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>7</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
3.1 Objetivos Gerais.....	7
3.2 Objetivos Específicos.....	8
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>8</b>
4.1 Obtenção das Amostras.....	8
4.2 Processamento dos Tecidos.....	9
4.3 Imunohistoquímica Estreptoavidina / Biotina.....	9
4.4 Imunohistoquímica por imunofluorescência.....	10
4.5 Aquisição de imagem dos gânglios.....	11
4.6 Análises Estatísticas.....	12
4.7 Normas de Biossegurança.....	12
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>17</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1909, na cidade de Lassance em Minas Gerais, um pesquisador chamado Carlos Chagas descobriu um parasita flagelado no intestino de um triatomíneo, também conhecido como barbeiro. Tal parasita era o protozoário *Trypanosoma cruzi*. O ciclo biológico do *T. cruzi*, até então, era restrito a áreas silvestres e incluía apenas mamíferos selvagens, que se infectavam por inoculação feita pelo inseto vetor, ou também, muito comumente, por via oral (ingestão de vetores e/ou outros mamíferos infectados). À medida que o ser humano começou a invadir esses ecótopos, também acabou por ser incluído no ciclo epidemiológico da doença; ademais, as vivendas rurais de péssima qualidade, frutos de perversas relações de produção e de políticas sociais restritivas acabaram por se configurarem em abrigos cômodos para os hemípteros vetores, contribuindo para aumentar o número de casos em humanos (DIAS & BORGES-DIAS, 1979; DIAS & COURA, 1997). A doença causada pelo protozoário apresenta duas fases bem definidas: uma aguda, com duração de dois a três meses aproximadamente, evoluindo para fase crônica. Em torno de 10% das infecções evoluem para formas crônicas com graus variáveis de comprometimento, e estima-se que haja aproximadamente 1,8 a 2,5 milhões de portadores de doença clínica, com cardiopatia e/ou manifestações digestivas (megaesôfago ou megacólon) (SILVEIRA, 2000).

A doença de Chagas, em sua complexa patologia, produz desnervação do sistema nervoso entérico, que decorre da perda de axônio motor ou de motoneurônio como um todo, e é considerada por Köberle e colaboradores (1983) como um fator determinante sobre o surgimento das manifestações gastrintestinais da doença de Chagas, além de ser um dos principais fatores patogênicos da doença. De forma geral, os plexos intramurais são os mais atingidos pelo processo, em virtude de sua localização na parede das vísceras, próximos às camadas musculares parasitadas.

Desse processo de desnervação, decorrem alterações motoras que conduzem a dilatações viscerais, notadamente do esôfago e do cólon, caracterizando o megaesôfago e megacólon chagásicos, respectivamente. A destruição de componentes do sistema nervoso entérico (SNE) leva ao desenvolvimento do megacólon, encontrado em 8-10% dos pacientes crônicos com a forma digestiva da doença em áreas endêmicas do Brasil (DIAS et al, 2002).

Para Tafuri e colaboradores (1971), pode-se admitir uma progressividade das lesões observadas nos plexos, que se agravam proporcionalmente à duração e ao grau do

megacólon; o acúmulo de fezes dilata a luz do órgão, comprimindo a mucosa, de forma a causar uma isquemia e, posteriormente, degeneração, necrose e ulceração da mucosa. Em resposta, tem início um processo inflamatório secundário e independente daquele induzido pela Doença de Chagas, podendo atingir o plexo mioentérico previamente lesado pelo parasito e acelerando o processo de destruição do SNE.

No que tange aos processos inflamatórios primário e secundário desencadeados pela Doença de Chagas, a compreensão do papel desempenhado pelas células encontradas nos focos inflamatórios é de suma importância para o entendimento das respostas observadas nos organismos infectados (MARTINS et al, 2015; MEUSER-BATISTA et al., 2011). Apesar dos numerosos estudos de caracterização celular dos focos inflamatórios em pacientes chagásicos, trabalhos sobre algumas das células encontradas nos infiltrados inflamatórios permanecem escassos.

Em linhas gerais, os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo, com citoplasma dotado de grânulos metacromáticos, comumente encontradas em segmentos próximos à interface com o meio externo, e nas adjacências de ductos glandulares, vasos sanguíneos e nervos, inclusive em associação com nervos periféricos do trato gastrointestinal (BERTON et al., 2000; BIENENSTOCK et al., 1993, SANTOS et al., 2010). Em situações de lesão tecidual, os mastócitos secretam diversos mediadores inflamatórios, além de terem participação em processos fibróticos e imunológicos diversos (BERTON et al., 2000). Dentre as substâncias liberadas, destacam-se histamina, heparina, serotonina, citocinas diversas, entre outras, apresentando um espectro de mediadores que desencadeiam reação de hipersensibilidade imediata após a ativação celular.

Além da baixa quantidade de publicações, a literatura recente acerca da caracterização de focos inflamatórios em pacientes chagásicos envolvendo mastócitos, em sua maioria, apresenta resultados pouco conclusivos, ou até mesmo contraditórios. Ainda assim, é possível encontrar relatos de aumento da quantidade de mastócitos tanto em pacientes portadores de Chagas quanto em experimentos com inoculação dos parasitos em cobaias (PINHEIRO 2000; CALIARI et al., 2002, MEUSER-BATISTA et al., 2008).

Em um trabalho com ratos infectados, Almeida e colaboradores (1989), mostraram uma queda nos níveis de acetilcolina e aumento de histamina e mastócitos na parede do estômago. O aumento de níveis de histamina também foi evidenciado em diversos órgãos no trabalho de Pires e colaboradores (1992), indicando que os

mastócitos podem desempenhar papel importante no processo inflamatório. Estudos *in vitro* realizados por Postan e colaboradores (1994) sugeriram relação direta entre a presença de mastócitos e o desenvolvimento de fibrose em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*.

Com base em informações fornecidas pelo nosso laboratório, porém ainda não divulgadas, há suspeitas que o desenvolvimento do megacólon em pacientes chagásicos tem relação com o processo inflamatório decorrente da ação dos mastócitos. Visto que, esses pacientes apresentam uma grande concentração de mastócitos no trato gastrointestinal. Assim, consideramos de extrema relevância analisar e caracterizar a presença dessas células no colón desses indivíduos.

As alterações do SNE também influenciam o quadro do mega chagásico, por meio de secreção de substâncias com atividade tanto sobre células inflamatórias quanto sobre neurônios, destacando-se, entre elas, a serotonina, em virtude de sua relevância funcional. A serotonina, ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT), é um neurotransmissor da família das aminas biogênicas, caracterizado como sinalizador gastrointestinal. É detectada por diversos receptores, associados a diversas patologias, e tem função de iniciar e propagar reflexos entéricos, além de fazer a sinalização intestino-cérebro. Em torno de 90% da serotonina circulante no organismo é produzida no intestino, tanto por neurônios serotoninérgicos quanto por células neuroendócrinas, por mecanismos dependentes de disponibilidade de triptofano no plasma (COURA & BORGES-PEREIRA, 2012). A serotonina atua sobre diversos receptores em diversas regiões do organismo; no trato gastrintestinal, especificamente, atua nos receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, e pode agir tanto por estimulação colinérgica, levando à contração da musculatura lisa entérica, quanto por ativação de inibidores nitrérgicos, levando ao relaxamento dessa musculatura, o que deixa claro o papel dessa substância na regulação da função gastrintestinal (SIKANDER et al., 2009).

Mediante isso, temos a hipótese de que a expressão de serotonina seja um fator contribuinte para a evolução do quadro clínico desses pacientes, o que notemos a necessidade de estudos analíticos e comparativos sobre a presença de serotoninas e sua relação com a doença, de forma a elucidar sobre os mecanismos referentes à manutenção fisiológica do trato gastrintestinal de pacientes chagásicos.

Com base no contexto apresentado, o presente trabalho buscou realizar um estudo para verificação da relação entre expressão de serotonina e presença de

mastócitos no cólon de pacientes portadores da Doença de Chagas acometidos e não acometidos pelo megacólon.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Estudos sobre o SNE de pacientes chagásicos nos últimos anos nos levaram a sugerir que a dilatação crônica do cólon se dê não só pela destruição de determinados grupos neuronais, mas também pela interação do sistema imunológico com todo o trato digestório. Os dados que temos observado sugerem que as lesões no SNE decorrentes da infecção chagásica levam o indivíduo a apresentar distúrbios de peristaltismo, falta de coordenação motora, retenção de fezes no reto e cólon sigmoide, hipertrofia muscular e a dilatação, levando ao aparecimento do megacólon chagásico. Observamos também que a destruição neuronal encontrada no mega chagásico possui relação direta com a intensidade do processo inflamatório e com a evolução da patologia (COURA & BORGES-PEREIRA, 2012).

A partir destes dados, considerando-se a distribuição desses mastócitos, pode-se inferir que a presença de tais células tenha ligação direta com os processos de modulação da resposta inflamatória que é desencadeada pela infecção chagásica, refletindo em uma melhor regulação da peristalse intestinal e relativa redução da sensibilidade visceral.

Acreditamos que a análise comparativa da expressão de serotonina, mastócitos, sua relação com o processo inflamatório e com a destruição neuronal nestes grupos de amostras poderá sugerir como se dão mecanismos referentes à manutenção da fisiologia do trato gastrointestinal diante do processo inflamatório crônico decorrente de uma infecção parasitária generalizada.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a presença de serotonina e sua relação com a expressão de mastócitos no cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon.

### 3.2 Objetivos Específicos

Nas amostras de tecido de cólon incluídos em parafina:

- Quantificar mastócitos no tecido e analisar sua distribuição no cólon de indivíduos chagásicos portadores e não portadores de mega;
- Avaliar através de imunohistoquímica a expressão e distribuição de serotonina (5-HT) em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacólon e de indivíduos não infectados.
- Estabelecer uma relação entre mastócitos e a expressão de serotonina em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores de megacólon e de indivíduos não infectados.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção das amostras

O projeto utilizou amostras de tecidos de pacientes chagásicos portadores de megacólon, de pacientes chagásicos não portadores de megacólon e de indivíduos controle, coletados por cirurgia ou necropsia no Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro pela Dra. Sheila Jorge Adad. Foram obtidos o consentimento prévio de todos os indivíduos, pais ou responsáveis para a inclusão dos mesmos no trabalho de pesquisa. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ETIC nº 127/03) e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU nº 110/11). O diagnóstico de infecção chagásica foi baseado na positividade de pelo menos duas das três seguintes reações no sangue e/ou líquido pericárdico: fixação do complemento, hemaglutinação e imunofluorescência indireta para *T. cruzi*. Os indivíduos do grupo controle apresentaram as três reações negativas e pacientes chagásicos apresentaram no mínimo duas reações positivas das três realizadas.

**Tabela 1:** Número e média de idade de indivíduos controle e pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon.

Casos estudados	Número	Média de Idade
Indivíduos controle	10	56 ± 22 anos
Pacientes chagásicos não portadores de megacólon	8	53 ± 10 anos



Pacientes chagásicos portadores de megacólon	8	55 ± 11 anos
--	---	--------------

No grupo dos pacientes chagásicos não portadores de megacólon, somente um apresentou queixas intestinais ou sintoma de qualquer comprometimento do sistema digestivo. Dos 8 pacientes analisados neste grupo, 7 faleceram de cardiopatia chagásica crônica e um de neoplasia. Já no grupo dos pacientes chagásicos portadores de megacólon, 5 sofriam de constipação intestinal há vários anos, 3 eram portadores de megaesôfago e 5 faleceram de cardiopatia chagásica.

#### 4.2 Processamento dos tecidos

Os tecidos coletados para os estudos foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo, as amostras de tecido foram destinadas às análises histológicas e imunohistoquímicas. Para isto, os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado com tampão fosfato por 24 horas. Em seguida as amostras foram desidratadas com banhos de álcool de 10 minutos cada, em concentrações crescentes entre 70% a 100%. Após este passo as amostras foram diafanizadas com 3 banhos de 5 minutos de xilol e em seguida incluídas em parafina.

No segundo grupo, as amostras de tecido foram destinadas à técnica de preparação distendida. Para isto, assim que retiradas dos pacientes, as amostras foram imersas em salina tamponada com tampão fosfato (PBS) / nicardipina (pH 7.2; nicardipina, 10<sup>-6</sup> M) à temperatura ambiente durante 20 minutos, e em seguida imersos no fixador de Zamboni, previamente resfriado. Para desidratação, diafanização e re-hidratação, as amostras passaram por três banhos de di-metil-sulfóxido (DMSO) por cerca de 10 minutos cada um, seguido de três banhos de 10 minutos em PBS. Após essa etapa, os tecidos foram armazenados em solução de PBS - 1% azida sódica a 4°C.

#### 4.3 Imunohistoquímica Estreptoavidina / Biotina

As amostras destinadas às análises histológicas e imunohistoquímicas foram fixadas em paraformaldeído tamponado com tampão fosfato e incluídas em parafina. Após a confecção das lâminas provenientes do cólon de indivíduos portadores e não portadores de megacólon e indivíduos controle, as mesmas permaneceram em estufa à 40°C, *overnight*. A desparafinização das lâminas foi realizada com 3 banhos de xilol de 20 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em sucessivos banhos de

álcool (álcool Absoluto 2x, álcool 90%, álcool 70%, álcool 50%), por 2 minutos cada banho. Do álcool, o tecido foi direto para o PBS (salina tampão fosfato) pH 7,2 – 7,4, e passou por 2 banhos de 5 minutos. O bloqueio de ligação inespecífica foi obtido com PBS – BSA (2%) – Triton (1%) por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anti PGP 9.5 (Santa Cruz, EUA) na diluição de 1:1000 µl em PBS–BSA-Triton, usando-se em torno de 150µl de solução já diluída por lâmina. A incubação do anticorpo foi feita aplicando-se 150 µl / lâmina durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS-Tween e incubadas com o conjugado do Kit-DAKO por 45 minutos. Após a incubação com cada componente do Kit-DAKO, as lâminas foram lavadas com PBS-Tween por 3x (5 minutos cada banho) e voltaram para o PBS antes de prosseguir adiante. Foi feito um intervalo de 5 minutos entre cada banho. Em seguida, realizou-se a incubação com a solução de DAB e peróxido de hidrogênio em PBS por 10 minutos (150µl em cada lâmina). Finalmente, as lâminas foram lavadas com PBS-Tween e contra-coradas com hematoxilina. As mesmas passaram pelo processo de desidratação (álcool 50%, álcool 70%, álcool 90%, álcool absoluto 2X, xilol I, xilol II, sendo 2 minutos cada banho e 10 minutos de xilol III) e montadas em meio sintético.

Para a realização da técnica de imunohistoquímica em estruturas do sistema nervoso entérico, foram utilizados como controles positivos e negativos lâminas de cérebro de camundongos. A marcação para cada anticorpo foi realizada em todos os pacientes em apenas uma bateria. Todos os experimentos foram realizados desta forma com intuito de homogeneizar ao máximo o padrão de marcação nas lâminas submetidas a esta técnica.

#### **4.4 Imunohistoquímica por imunofluorescência**

As amostras foram pré-incubadas por 2 h em TBS 0,05 M (pH 7,4) com 1% de albumina sérica bovina (BSA), 0,5% Triton X-100, 0,05% thimerosal e 5% de soro de cabra. Depois de um enxágüe em TBS por 10 min, foram incubadas em uma solução contendo BSA, Triton X-100, thimerosal; Para identificar os mastócitos foi utilizado o anticorpo primário anti-human CD117 (C-19, polyclonal rabbit serum; 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e para avaliar a expressão de serotonina foi utilizado o anticorpo (Anti-serotonina, MERCK MILLIPORE, AB-938, 1:1000) por 72h (4°C). Depois de uma noite, as *wholemounds* foram lavadas em TBS a 4°C e em seguida os anticorpos secundários (Tabela 2) foram adicionados na mesma solução da

mesma forma que os anticorpos primários (4h, temperatura ambiente), seguido por um banho em TBS (*overnight*; 4°C). Para reduzir a autofluorescência induzida por lipofuscina, as wholemounts foram incubadas em tampão de acetato de amônio (pH 5,0) contendo 1 mM CuSO<sub>4</sub> de 60 - 90 min seguido de um curto enxágüe em H<sub>2</sub>O destilada (BREHMER et al., 2004).

**Tabela 2:** Anticorpos secundários.

<b>Anticorpo</b>	<b>Código / Fonte</b>	<b>Diluição</b>
ALEXA Fluor 488, donkey anti-mouse	A-21202; Mobitec, Germany	1:1000
ALEXA Fluor 488, donkey anti-rabbit	A-21206; Mobitec, Germany	1:1000
ALEXA Fluor 555, donkey anti-goat	A-21432; Mobitec, Germany	1:1000
ALEXA Fluor 647, donkey anti-mouse	A-31571; Mobitec, Germany	1:1000
ALEXA Fluor 647, donkey anti-rabbit	A-31573; Mobitec, Germany	1:1000

Posteriormente, as amostras foram montadas em TBS-glicerol (1:1, pH 8,6). Incubações das amostras em soluções sem os anticorpos primários (controles negativos) foram realizadas para o controle da reação.

#### **4.5 Aquisição de imagem dos gânglios**

Para a aquisição das imagens dos gânglios do sistema nervoso entérico, os gânglios nervosos foram selecionados aleatoriamente. Utilizou-se microscopia confocal laser scanning (Bio-Rad MRC 1000 anexado a uma Nikon diaphot 300, equipado com um laser argon-criptônio, American Laser Corporation, Salt Lake City, UT), Séries-Z dos gânglios foram criadas através da aplicação de três comprimentos de onda para a detecção de anticorpos secundários (488, 568, 647nm de excitação; z-steps 0,6µm). A lente objetiva de 20x (abertura numérica 0,75) foi utilizada para a localização dos gânglios, enquanto a lente objetiva de 40x foi utilizada para a aquisição de imagens para

as Séries-Z com o auxílio do programa Confocal Assistant 4.02 software. Imagens dos gânglios foram preparadas usando o Adobe Photoshop CS (8.0.1).

#### 4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico Anova-One way, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos de pacientes. O nível de significância definido foi de  $p < 0.05$  e todas as análises foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prim 3.0 (San Diego, CA). Foram calculadas a distribuição de freqüências de todas as variáveis e as medidas de tendência central utilizando diversos parâmetros: média, mediana, percentis, desvio padrão. As associações entre a variável dependente e as independentes foram testadas através de técnicas de regressão bivariadas e multivariadas (regressão linear simples, múltipla ou regressão logística, segundo seja a característica da variável). Foram aceitos erros aleatórios ao nível de  $p=0.05$  para o de tipo I e  $p=0.2$  para o erro tipo II.

#### 4.7. Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo e colaboradores (2005).

### 5. RESULTADOS

Nos ensaios de imunohistoquímica realizados, foram obtidos os seguintes resultados:

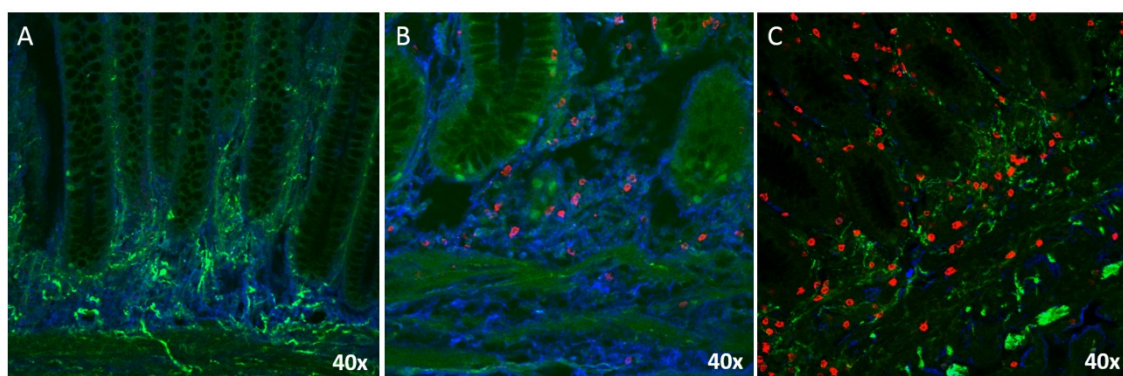
**Tabela 3:** Quantificação de mastócitos e serotonina no cólon de pacientes chagásicos com e sem megacólon, e em indivíduos não infectados

Pacientes	Média de mastócitos	Área média de serotonina ( $\mu\text{m}^2$ )
Não-infectados	$42 \pm 4$	$312 \pm 26$
Chagásicos sem megacólon	$70 \pm 8$	$413 \pm 35$
Chagásicos com megacólon	$264 \pm 11$	$51 \pm 6$

Os pacientes chagásicos sem megacólon apresentavam focos mastocitários delgados e esparsos, enquanto os portadores de megacólon apresentavam focos bem maiores, e em diversos pontos. Indivíduos não-chagásicos apresentaram apenas um leve aumento da quantidade de mastócitos em relação aos pacientes chagásicos sem megacólon. Em todos os grupos analisados, os mastócitos se situavam majoritariamente na camada mucosa.

A concentração de serotonina, por sua vez, apresentou-se com distribuição inversa em relação aos mastócitos; pacientes chagásicos não-portadores de megacólon apresentaram os níveis mais elevados, enquanto os portadores apresentaram menores concentrações, e os indivíduos não-infectados, por sua vez, apresentaram níveis intermediários.

A figura a seguir apresenta uma síntese dos resultados de imunohistoquímica:



**Figura 1:** Imagens da imunohistoquímica para Serotonina (5-HT) e mastócitos (CD117) no cólon de pacientes chagásicos e indivíduos não-infectados. A serotonina (em azul) pode ser vista em grande quantidade em indivíduos não-infectados (A) e pacientes chagásicos sem megacólon (B), apresentando-se reduzida em pacientes chagásicos com megacólon (C). Por outro lado, os mastócitos (em vermelho) estão praticamente ausentes nos indivíduos não-infectados (A) e nos pacientes não portadores de megacólon (B), mas são vistos em abundância nos pacientes portadores do megacólon (C).

## 6. DISCUSSÃO

A doença de chagas pode apresentar morbidade e mortalidade em sua fase crônica, pois, uma parcela considerável dos indivíduos parasitados desenvolvem o megacólon, que acomete o aumento do lúmen e diminuição da camada muscular por lesões inflamatórias e diminuição dos neurônios do sistema nervoso entérico (SNE). Infelizmente, a literatura carece de dados epidemiológicos completos e atuais acerca da incidência e da prevalência de megacólon chagásico. Dados do trabalho de Santos-

Júnior (2002) apontam o mega como sendo considerado, na época, como a doença cirúrgica mais comum do intestino grosso, ocupando o 5º lugar entre doenças operadas do tubo digestivo no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), com 160 pacientes atendidos entre os anos de 1985 e 1994, correspondendo, em média, a 5,8% de todas as operações realizadas por ano na disciplina de Coloproctologia daquela instituição naquele período.

Indivíduos que não possuem o mega, também podem apresentar deservação e inflamação, porém menos intensas quando comparadas com os indivíduos com mega. Manifestações gastrointestinais em pacientes com mastocitose sistêmica são comuns e muitas vezes perigosas. Embora o aumento do número de mastócitos ativados tenha sido observado em segmentos intestinais envolvidos, seus números por si só não dão indicações de capacidade pró-inflamatória substancial. Há evidências experimentais da participação de mastócitos também em doenças cardiovasculares, processos neoplásicos, infecções parasitárias e bacterianas, enfermidades fibrosantes e doenças autoimunes. (SALLUSTO, 1999)

Os mastócitos são células que derivam de células-tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea e migram para os tecidos periféricos como células imaturas e passam por diferenciação *in situ*. São encontrados em tecidos vascularizados, tais como mucosas e epitélios, sendo particularmente abundantes na pele, no trato respiratório e gastrointestinal e principalmente próximos aos vasos sanguíneos. Por esta razão, são umas das primeiras células inflamatórias susceptíveis à injúria (ABBAS, 2008; FRENZEL; HERMINE, 2013; REBER; FROSSARD, 2014).

A ativação dos mastócitos ocorre por uma série de agentes físicos (trauma mecânico, calor, frio e irradiação) e compostos químicos (enzimas, polissacarídeos, lectinas, anafilatoxinas, compostos básicos e Ca<sup>2+</sup>) que induzem a liberação de várias moléculas contidas no citoplasma em um processo conhecido como degranulação. As principais moléculas dos grânulos são histamina, proteases (triptase, quimase, carboxipeptidase), mediadores de lipídios (prostaglandinas), citocinas, quimiocinas, as espécies reativas de oxigênio e a serotonina. Estas moléculas agem em vários sítios, aumentam a permeabilidade do epitélio e endotélio, estimulam a angiogênese, induzem a contração do músculo liso, ativam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos e estimulam os fibroblastos a produzirem colágeno (ABBAS, 2008; ABDELSALAM, 2009; FRENZEL; HERMINE, 2013; GOROSPE et al., 1994).

A Serotonina, 5-HT ou 5-hidroxitriptamina é uma indolamina, produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido triptofano. É produzida nos núcleos da rafe e lançada em todo o cérebro. Ela é um neurotransmissor e, como tal, serve para conduzir a transmissão de uma célula nervosa (neurônio) para outra. A 5HT é secretada por neurônios serotoninérgicos e age em receptores de neurônios pós-sinápticos. As concentrações de 5-HT cerebrais estão relacionadas a alterações de comportamento e humor, ansiedade, agressividade, depressão, sono, fadiga, e ainda na supressão de apetite. A 5-HT tem efeito inibidor da conduta juntamente a um efeito modulador geral da atividade psíquica. Assim, ela influi sobre quase todas as funções cerebrais, inibindo ou estimulando o ácido gama-aminobutírico(GABA). É dessa forma que a 5-HT regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas, a temperatura corporal, a sensibilidade à dor, a atividade motora e as funções cognitivas; no intestino, especificamente, encontram-se mais de 35 anos de pesquisas sugerindo o papel da serotonina na saciedade e na modulação do comportamento alimentar, agindo através de interações com diversos receptores das famílias 5-HT1 e 5-HT2, destacando-se dentre eles o receptor 5-HT2C ( FEIJÓ, 2011).

Em contrapartida, a presença de serotonina demonstra ter correlação com melhorias do controle de motilidade intestinal, além de ocasionar a inibição da atividade linfocitária no intestino, o que poderia ter o efeito de retardar tanto o surgimento quanto a evolução do megacólon (SIKANDER *et al.*, 2009).

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram um considerável aumento da concentração de serotonina e redução na concentração de mastócitos ao longo de todas as camadas do intestino de pacientes chagásicos não portadores do megacólon, quando em comparação com os números observados em pacientes chagásicos portadores de megacólon. Analisando os pacientes sem megacólon, a grande quantidade de serotonina e as modestas quantidades de mastócitos fazem com que o trato gastrintestinal destes pacientes não apresente sintomas clínicos, sendo estes considerados como portadores assintomáticos da doença de Chagas. Já os pacientes com megacólon, que apresentam queda dos níveis de serotonina e elevada quantidade de mastócitos em seu trato gastrintestinal, rapidamente desenvolvem as características clínicas (constipação, perda de motilidade, dilatação reto-sigmoidea). Estes dados sugerem que os mastócitos e a serotonina têm correlação direta com os mecanismos que protegem o intestino contra o desenvolvimento de megacólon. Uma hipótese para tentar explicar tal fato é a presença de receptores histamínicos H1 e H2 expressos na superfície

da membrana de mastócitos, ainda não é possível encontrar na literatura nenhum dado que comprove ou refute a hipótese da presença de receptores de serotonina nesta célula (SILVA *et al.*, 2014); entretanto, alguns autores sugerem que alguns mediadores de liberação de mastócitos (tais como a prostaglandina D2, os leucotrienos B4 e C4 e as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) possam sofrer modulação através de mecanismos que envolvem receptores de serotonina, esta seria uma hipótese para a (CONTI & SHAIK-DASTHAGIRISAHEB, 2015; ACOSTA-ANDRADE *et al.*, 2016).

Desta forma, uma análise mais aprofundada sobre métodos para aumentar a disponibilidade de serotonina no intestino poderia levar ao desenvolvimento de um mecanismo que evitasse o aumento do número de mastócitos no tecido entérico, o que, conseqüentemente, retardaria a instauração do processo inflamatório que resulta na manifestação gastrointestinal da Doença de Chagas.

## **7. CONCLUSÃO**

Pela quantificação dos mastocitos podemos inferir que a presença de tais células tenham ligação direta com os processos de modulação da resposta inflamatória refletindo na peristalse e relativa redução da sensibilidade visceral. Na análise comparativa da expressão de serotonina e mastócitos, sua relação com o processo inflamatório e com a destruição neuronal nestes grupos observou que a Infecção generalizada do trato gastrointestinal interfere na manutenção fisiológica do órgão. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com a hipótese de que o aumento da quantidade de mastócitos nos focos inflamatórios aumenta as chances de desenvolvimento de megacólon em pacientes chagásicos, enquanto que o aumento nos níveis de serotonina teria efeito protetor contra o desenvolvimento do mega.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. *Imunologia Celular e Molecular*. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Org.). *Hipersensibilidade Imediata*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 442-461.

ACOSTA-ANDRADE, C.; LAMBERTOS, A.; URDIALES, J. L.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.; PENAFIEL, R.; FAJARDO, I. A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells. **Amino Acids**, v. 48, p. 2411-2421, 2016

ALMEIDA, A. P.; GOBBI, H.; TOPPA, N. H.; CHIARI, E.; GONZAGA, H. M.; GOMEZ, M. V.; FREIRE-MAIA, L.; CUNHA-MELO, J. R.; Gastric acetylcholine and histamine content of normal and *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Braz J Med Biol Res** v. 22, p. 1229-1236, 1989.

BERTON, A.; LEVI-SCHAFFER, F.; EMONARD, H.; GARBUZENKO, E.; GILLERY, P.; MAQUART, F. –X. Activation of fibroblasts in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 485-492, 2000.

BIENENSTOCK, J.; STEAD, R. H.; MARSHALL, J. S. Mast cells and the nervous system. In: **The mast cell in health and disease**, New York: Dekker, 1993. p. 687- 698.

BREHMER, A.; BLASER, B.; SEITZ, G.; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. **Histochem. Cell Biol**, 121, 13-20, 2004.

CALIARI, M.V.; MACHADO, R.P.; LANA, M.; CAJÁ, R.A.F.; CARNEIRO, C.M.; BAHIA, M.T.; SANTOS, C.A.B.; MAGALHÃES, A.; SAMPAIO, I.B.M.; TAFURI, W.L. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, 2002.

CONTI, P.; DASTHAGIRISAHEB, Y. B. Mast Cell Serotonin Immunoregulatory Effects Impacting on Neuronal Function: Implications for Neurodegenerative and Psychiatric Disorders. **Neurotoxicity Research**, v. 28, p. 147-153, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 3, p. 286 - 296, 2012.

DIAS, J. C. P.; BORGES DIAS, R., 1979. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. *Ciência e Cultura*, 31:105-124. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**. 2000, vol.16, suppl.2, pp. S7-S12. ISSN 1678-4464.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Epidemiologia. In: **Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o Clínico Geral** (JCP Dias e JR Coura, org.), p33-66, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 603-12, 2002.

FEIJO, F. M.; BERTOLUCI, M. C.; REIS, C. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.57, n.1, p.74-77, 2011.

FRENZEL, L.; HERMINE, O. Mast cells and inflammation. *Joint Bone Spine*, v. 80, p. 141-145, 2013.

GILFILAN, A. M.; BEAVEN, M. A. Regulation of mast cell responses in health and disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, p. 475-529, 2011.

KÖBERLE, 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.

MARTINS, P. R.; NASCIMENTO, R. D.; LOPES, J. G.; SANTOS, M. M.; OLIVEIRA, C. A.; OLIVEIRA, E. C.; MARTINELLI, P., M.; REIS, D. A. Mast cells in the colon of *Trypanosoma cruzi*-infected patients: are they involved in the recruitment, survival and/or activation of eosinophils?. **Parasitol. Res.**, 114:1847-1856, 2015.

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation **Nature**, v. 454, p.428-435, 2008.

MEUSER-BATISTA, M.; CORRÊA, J. R.; CARVALHO, V. F.; BRITTO, C. F. P. C.; MOREIRA, O. C.; BATISTA, M. M.; SOARES, M. J.; FARIAS-FILHO, F. A.; SILVA, P. M. R.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, R. C.; HENRIQUES-PONS, A. Mast cell function and death in *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal of Pathology**, v. 179 (4), 2011.

MEUSER-BATISTA, M.; CORRÊA, J. R.; SOARES, M. J.; HENRIQUES-PONS, A. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue & Cell**, v. 40, 2008.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª edição, ed. EDUFU. p. 81-111, 2005.

PINHEIRO, S.W. **Avaliação quantitativa da fibrose e do numero de mastócitos na muscular circular do cólon de chagásicos crônicos com e sem megacólon**. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2000, 66p.

PIRES, J.G.; MILANEZ, M.C.; PEREIRA, F.E. Histamine levels in tissues of *Trypanosoma cruzi* -infected mice. **Agents Actions** . Suppl 36, p. 96-98.1992.

POSTAN, M.; CORREA, R.; FERRANS, V.J.; TARLETON, R. L. In vitro culture of cardiac mast cells from mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int Arch Allergy Immunol**. Nov;105(3):251-7. 1994.

REBER, L. L.; FROSSARD, N. Targeting mast cells in inflammatory diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, p. 416-435, 2014.

SALLUSTO, F. LANZAVECCHIA, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. **J, Exp. Med.**, v. 189, p. 611-6614, 1999.

SANTOS, P. P. A.; FREITAS, V.S.; FREITAS, R. A.; PINTO, L. P.; SOUZA, L. B. Relação entre mastócitos e células T na inflamação. **Odontol. Clín. Cient.**, vol 9 (3), 2010.

SANTOS-JUNIOR, J. C. M. Megacólon – Parte II: Doença de Chagas. **Rev. Bras. Proctologia**, v. 4, p. 266-277, 2002.

SIKANDER, A.; RANA, S. V.; PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. **Clin. Chim. Acta**, v. 403, 2009.

SILVA, E. J.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **The Journal of Histochemistry and Citochemistry**: Official Journal of the Histochemistry and Citochemistry Society, v. 62, p. 698-738, 2014.

SILVEIRA, A. C., 2000. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16(Sup. 2):35-42.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, v. 13, p. 76-91. 1971.