

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO DOS CANAIS DE  $K^+$   
VOLTAGEM DEPENDENTES ( $K_v$ ) NO CÓLON DE  
PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES E NÃO  
PORTADORES DE MEGACÓLON.**

**Orientando:** Claudio Ferreira de Mendonça

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO DOS CANAIS DE  $K^+$   
VOLTAGEM DEPENDENTES ( $K_v$ ) NO CÓLON DE  
PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES E NÃO  
PORTADORES DE MEGACÓLON.**

Dissertação de mestrado apresentada pelo  
aluno Claudio Ferreira de Mendonça como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre do Mestrado Acadêmico do Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da  
Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal de Uberlândia

**Orientando:** Claudio Ferreira de Mendonça

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M539 Mendonça, Claudio Ferreira de, 1972-  
2020 Caracterização dos canais de  $k^+$  voltagem dependentes (kv) no  
cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de  
megacólon. [recurso eletrônico] / Claudio Ferreira de Mendonça. -  
2020.

Orientador: Alexandre Marcelos Morais da Silveira Silveira.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.581>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Silveira, Alexandre Marcelos Morais da  
Silveira, 1978-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.  
Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcs.famed.ufu.br - copme@ufu.br



### ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 020/PSCSA				
Data:	07.08.2020	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:00h
Matrícula do Discente:	11812CSD009				
Nome do Discente:	Cláudio Ferreira de Mendonça				
Título do Trabalho:	CARACTERIZAÇÃO DOS CANAIS DE K+ VOLTAGEM DEPENDENTES (Kv) NO CÓLON DE PACIENTES CHAGÁSICOS PORTADORES E NÃO PORTADORES DE MEGACÓLON				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Relação entre Sistema Nervoso Entérico e sistema imune em patologias do trato digestivo				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Marcos Luiz Ferreira Neto (UFU), Daniel Ventura Dias (UFTM) e Alexandre Barcelos Morais da Silveira (UFU) (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Daniel Ventura Dias, Usuário Externo**, em 07/08/2020, às



16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Luiz Ferreira Neto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 07/08/2020, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barcelos Morais da Silveira, Presidente**, em 07/08/2020, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2181168** e o código CRC **1EE7A543**.

## RESUMO

A doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde especialmente nas Américas. Está presente em 21 países da Américas, com cerca de 30.000 novos casos por ano. A forma digestiva decorrente da doença de Chagas é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na fase crônica da doença. Pacientes portadores da forma digestiva apresentam uma série de sintomas relacionados à obstrução do órgão. No megacólon, os órgãos exibem grande aumento do lúmen e hipertrofia da camada muscular. Análises histológicas dos órgãos afetados têm demonstrado lesões inflamatórias do sistema nervoso entérico (SNE), associadas com uma grande redução no número de neurônios. Embora o mecanismo de lesão neuronal continue obscuro, a frequente observação de ganglionite e periganglionite em pacientes portadores de mega aponta para a participação de células do sistema imune nesse processo. Indivíduos não portadores de dilatação também apresentaram processos de desnervação e inflamação, porém menos intensos em relação aos portadores de megacólon. Esses dados abrem uma nova linha de investigação sobre o estudo da patologia do megacólon chagásico. Os canais de potássio voltagem-dependentes (Kv) participam da ritmicidade elétrica e nas respostas da musculatura lisa em praticamente todos os sistemas corporais, regulando o potencial de membrana em repouso em vários tipos de células em todo o corpo. Como eles são regulados por neurotransmissores excitatórios e inibitórios, canais Kv também participam nas respostas das células intersticiais de Cajal e da musculatura lisa nos estímulos neurais. Assim este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão dos canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes (canais Kv) em pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon. Os resultados deste estudo sugerem que a expressão de canais iônicos, em neste caso, os canais Kv7 são anormalmente expressos na porção dilatada de pacientes chagásicos portadores de megacólon. Da mesma forma a sua expressão nas amostras de pacientes chagásicos não portadores de megacólon poderia significar um fator de proteção contra o desenvolvimento do megacolon, sendo responsável por evita-lo ou ao menos retardá-lo. Acreditamos que a diminuição da expressão de Kv7 pode desempenhar um papel na fisiopatologia desta condição complexa e conseqüentemente no desenvolvimento do megacólon. Da mesma forma, acreditamos que a manutenção da expressão destes canais poderia impedir o quadro de dilatação do órgão.

## ABSTRACT

Chagas disease remains a serious health problem, especially in the Americas. It is present in 21 countries in the Americas, with about 30,000 new cases per year. The digestive form resulting from Chagas disease is one of the main causes of morbidity and mortality in the chronic phase of the disease. Patients with the digestive form have a series of symptoms related to organ obstruction. In the megacolon, the organs exhibit a large increase in the lumen and hypertrophy of the muscle layer. Histological analyzes of Organs affected organs have shown inflammatory lesions of the enteric nervous system (SNE), associated with a large reduction in the number of neurons. Although the mechanism of neuronal injury remains unclear, the frequent observation of ganglionitis and periganglionitis in patients with mega points to the participation of immune cells in this process. Individuals without dilation also presented denervation and inflammation processes, however less intense in relation to megacolon carriers. These data open a new line of investigation on the study of the chagasic megacolon pathology. The voltage-dependent potassium channels (Kv) participate in electrical rhythmicity and smooth muscle responses in virtually all body systems, regulating the resting membrane potential in various types of cells throughout the body. As they are regulated by excitatory and inhibitory neurotransmitters, Kv channels also participate in the responses of Cajal's interstitial cells and smooth muscle in neural stimuli. Thus, this study aimed to characterize the expression of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels (Kv channels) in chagasic patients with and without megacolon. The results of this study suggest that the expression of ion channels, in this case, the Kv7 channels are abnormally expressed in the dilated portion of chagasic patients with megacolon. Likewise, its expression in the samples of chagasic patients without megacolon could mean a protective factor against the development of megacolon, being responsible for preventing it or at least delaying it. We believe that the decrease in Kv7 expression may play a role in the pathophysiology of this complex condition and consequently in the development of the megacolon. Likewise, we believe that maintaining the expression of these channels could prevent the organ from expanding.

## INTRODUÇÃO

A doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde especialmente nas Américas. Está presente em 21 países do continente americano, com cerca de 30.000 novos casos por ano com 1400 mortes e 8000 recém nascidos infectados durante a gestação. No Brasil, em 2018, foram notificados 4685 casos suspeitos de doença de Chagas agudo sendo confirmados 380 casos. É a quarta maior causa de morte por doenças infecciosas no Brasil na forma crônica da doença ( Boletim epidemiológico SVS – MS V.50 / Nov 2019). A fase aguda da doença apresenta sinais e sintomas inespecíficos que dificultam o diagnóstico. Na fase crônica, a maioria dos pacientes permanecem assintomáticos por vários anos ou apresentarão sintomas relacionados ao órgão ou sistema atingido. Os principais representantes da forma digestiva da doença de Chagas são o megaesôfago e o megacólon. Nosso laboratório tem se interessado especialmente no estudo da patogênese do megaesôfago e megacólon chagásicos. Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas do Brasil demonstraram que 8-10% dos pacientes crônicos possuem a forma digestiva da doença (Dias et al., 2002).

Pacientes portadores da forma digestiva apresentam uma série de sintomas relacionados à obstrução do órgão. Tanto no megaesôfago quanto no megacólon, os órgãos exibem grande aumento do lúmen e hipertrofia da camada muscular. Análises histológicas dos órgãos afetados têm demonstrado lesões inflamatórias do sistema nervoso entérico (SNE), associadas com uma grande redução no número de neurônios. Segundo Koberle, para o desenvolvimento do megaesôfago é necessário uma redução de cerca de 85% no número de neurônios no órgão, enquanto a doença no cólon está associada a uma perda neuronal de no mínimo 50% (Koberle, 1961).

Embora o mecanismo de lesão neuronal continue obscuro, a frequente observação de ganglionite e periganglionite em pacientes com megacólon ou megaesôfago aponta para a participação de células do sistema imune nesse processo patológico. Infiltrados inflamatórios são encontrados na muscular da mucosa, submucosa e camadas musculares (Adad et al., 2001).

Em trabalhos anteriores demonstramos a presença de kDNA do parasita ( DNA do cinetoplasto do protozoário ) no esôfago de pacientes portadores de megaesôfago (Vago et al., 1996) e megacólon (dados não publicados), enquanto análises imunohistoquímicas falharam na detecção do antígeno de *Trypanosoma Cruzi* ( *T. cruzi* ) nos órgãos de pacientes chagásicos sem dilatação do órgão ( mega ). Estes dados apontavam para uma associação entre o desenvolvimento do mega e a persistência do parasita na fase crônica, o que já havia sido também considerado para cardiopatia chagásica crônica (Jones et al., 1993). No entanto mais recentemente observamos que o kDNA de *T. cruzi* é detectado



também em amostras de esôfago ou cólon de cerca de 50% dos pacientes chagásicos não portadores de mega (Vago et al., 2003), ao contrário do que tinha sido demonstrado por estudos imunohistoquímicos. Essas observações nos suscitam a rediscutir a patogênese do mega sob um outro aspecto. Para compreender esse processo patológico, devemos analisar, não apenas a presença do *T. cruzi* no órgão, mas também considerar a variabilidade do parasita e outros fatores relacionados ao hospedeiro, como a genética, a resposta imune e o processo de desnervação.

Em estudos prévios de LSSP-PCR (*Low-stringency Single Specific Primer*-PCR) demonstramos similaridade entre as assinaturas de kDNA obtidas de parasitas no esôfago de dois pacientes distintos portadores de megaesôfago severo (Vago et al., 2000). Em trabalhos posteriores observamos uma forte associação entre presença de células com potencial citotóxico, processo de desnervação e desenvolvimento do megaesôfago (d'Avila Reis et al., 2001; da Silveira et al., 2005a). Entretanto, o processo inflamatório crônico e a desnervação são observados não somente em pacientes portadores de mega, mas também em indivíduos chagásicos assintomáticos (Adad et al., 1991; da Silveira et al., 2005a). Alguns pacientes não portadores de dilatação e sem qualquer sintoma digestivo, apresentam uma redução no número de neurônios do SNE próxima do limite estabelecido anteriormente por Koberle.

O SNE contém cerca de 10 a 100 milhões de neurônios, com uma grande variedade de neurotransmissores e/ou neuropeptídeos. Ele controla vários aspectos do intestino como secreção glandular, tônus vascular, peristaltismo e ainda participa das relações neuroimunes regionais. É possível que em pacientes portadores de megaesôfago e megacólon algumas categorias de neurônios e alguns sistemas particulares de neurotransmissores sejam preferencialmente afetados e suas funções deprimidas ou exacerbadas. A realização de estudos comparativos visando esclarecer a natureza do processo inflamatório e a identificação dos sistemas de neuropeptídeos geralmente afetados nessas populações contribuirá para a compreensão da patogênese das alterações provocadas pela doença de Chagas.

Até algum tempo atrás, a investigação de alterações patológicas em neurônios entéricos era dificultada pela escassez de conhecimentos a respeito das classes funcionais destes neurônios em indivíduos normais e pela falta de modelos experimentais que mimetizassem as desordens gastrintestinais que afligem o ser humano. Entretanto, este fato tem se modificado nos últimos anos (Brehmer, 2006; Brehmer et al., 2004a; Brehmer et al., 2005a; Brehmer et al., 2005b; Brehmer et al., 2004b; Furness, 2006; Furness et al., 2006). Devido ao uso de modelos experimentais utilizados em laboratórios, existe atualmente um conhecimento relevante no que diz respeito aos tipos de

neurônios quanto a sua morfologia, neuroquímica, projeções e propriedades fisiológicas (Furness, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que os neuropeptídeos encontrados no sistema nervoso entérico possuem atividade sobre o sistema imune. A substância P possui características pró-inflamatórias, e dentre os seus efeitos podemos citar o aumento na proliferação linfocitária, aumento do tráfego de linfócitos através dos linfonodos, aumento da expressão de citotoxicidade e de produção de Interleucinas (IL-2) por estas células. Além disso, a substância P aumenta a ativação de células Natural Killer (NK) e possui ação quimiotática para mastócitos, macrófagos, e neutrófilos (McKay et al., 1996; McKay & Fairweather, 1997). Já o VIP (peptídeo intestinal vasoativo) possui atividade anti-inflamatória, como a inibição da resposta de linfócitos T e da produção de Interleucinas (IL-2 e IL-4) por estas células. A ativação de células NK também é inibida por este neuropeptídeo. Por outro lado VIP estimula a quimiotaxia de macrófagos e a produção de Interleucinas (IL-5) pelos linfócitos (McKay & Fairweather, 1997).

As alterações sofridas pela integração neuroimune tem sido alvo de pesquisas em diversas patologias que atingem o trato gastrointestinal. Na doença de Chagas, acreditamos que o estudo do sistema nervoso entérico, bem como sua associação com o processo inflamatório poderá fornecer subsídios para compreensão de alterações neuroimunes que possam estar de alguma forma envolvidas no desenvolvimento do mega.

A atividade elétrica existente em todos os órgãos de animais superiores é essencial para os processos fisiológicos dos mamíferos, como a transmissão de excitabilidade nervosa. E essas atividades elétricas são produzidas por sinais elétricos gerados através de canais iônicos. Os íons atravessam os canais distribuídos nas membranas para conduzir sinais elétricos seletiva e rapidamente, o que pode modular as atividades fisiológicas e patológicas das células (Lee et al., 2013). Entre todos estes canais iônicos, os canais de potássio possuem a distribuição mais extensa. Especialmente os canais de potássio, são a maior família de canais iônicos envolvidos na governação de funções neurais, como organização sináptica e sinalização neuronal (Sands et al., 2006).

As concentrações de íons na homeostase do ambiente interno são muito importantes para manter a função do cérebro. A manutenção da homeostase dos íons depende do consumo de ATP. Nos mamíferos, embora o cérebro seja uma pequena parte do corpo, precisará de 20% do consumo basal de  $O_2$ . Um neurônio manterá alta concentração intracelular de  $K^+$ , baixa concentração de  $Na^+$  e concentração de  $Ca^{2+}$  muito baixa ou mesmo indetectável podendo utilizar o ATP produzido a partir de  $O_2$  pelas mitocôndrias. Outro importante fator que contribuiu de forma determinante para esse equilíbrio iônico é o gradiente eletroquímico. Acredita-se que os canais de  $K^+$  voltagem dependentes

(Kv) sejam imprescindíveis para manutenção deste ambiente de homeostase para a função neuronal, e a disfunção dos canais Kv seria prejudicial para o funcionamento de órgãos como cérebro, coração e trato gastrointestinal (O'Donnell et al., 2017; Rivera-Arconada et al., 2017).

Canais K<sup>+</sup> neuronais podem modular a excitabilidade da membrana, por exemplo, estabelecendo o potencial de repouso, e mantendo intervalos breves e temporais em potenciais de ação. Existem quatro tipos de canais de K<sup>+</sup>: canal de potássio retificado interno (KIR), canal de potássio ativado pelo cálcio (KCa), canal de potássio voltagem-dependentes (KV) e canal de potássio do domínio de poros (K2p). O canal de potássio retificado interno (KIR) possui entre suas variadas funções controlar o potencial de repouso da membrana, regular a atividade elétrica cardíaca e neuronal, manter o equilíbrio de eletrólitos e influenciar a secreção de insulina para manter o nível de glicose no sangue. Já o canal de potássio ativado pelo cálcio (KCa) está presente em uma grande variedade de regiões onde são expressos e possuem importantes funções em células endoteliais, na excitabilidade celular, secreção e contração muscular. O canal de potássio do domínio de poros (K2p), não apresenta dependência de voltagem sendo responsável pela manutenção do potencial de repouso em várias células excitáveis (BRUNER et al., 2014). Esses canais podem abrir e fechar com vários estímulos, por exemplo, anestésicos voláteis, mudanças de pH, neurotransmissores, além de terem funções de ajustar o potencial de membrana e regular a excitabilidade celular.

O aumento da atividade dos canais de potássio (KV) voltagem-dependentes da membrana plasmática reduzirá a concentração de K<sup>+</sup> no citoplasma e desencadeará o processo de morte celular. Já foi descrito que alguns bloqueadores dos canais de K<sup>+</sup> ou o aumento da concentração extracelular de K<sup>+</sup> podem inibir o fluxo de K<sup>+</sup>, o que pode impedir totalmente a morte celular (Chen et al., 2016; Davoren et al., 2015).

A família Kv de canais K<sup>+</sup> consiste de 12 subfamílias, Kv1-Kv12, dentro das quais já foram identificados cinco membros da família Kv7. Estes compreendem Kv7.1-Kv7.5, e são codificados pelos genes KCNQ1-5. Até à data, a maioria dos dados publicados sobre a expressão destes canais tem-se centrado na sua localização no coração e no cérebro (Hedegaard et al., 2016; Maljevic et al., 2010; Thomsen, 2013). Os canais Kv exibem sua importância nas atividades neuronais e sinápticas quando as disfunções do mesmo levam a muitos tipos de doenças nervosas. Os canais Kv2 estão ligados à doença de Alzheimer, os canais Kv4 têm uma estreita relação com a doença de Parkinson e os canais Kv7 estão associados à hiper excitabilidade neuronal, e conseqüentemente o desenvolvimento da epilepsia. No entanto os canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes (canais Kv) participam da ritmicidade

elétrica e nas respostas da musculatura lisa em praticamente todos os sistemas corporais, regulando o potencial de membrana em repouso em vários tipos de células em todo o corpo. Como eles são regulados por neurotransmissores excitatórios e inibitórios, canais Kv também participam nas respostas das células intersticiais de Cajal e da musculatura lisa nos estímulos neurais (Brueggemann et al., 2014; Davoren et al., 2015; Shi et al., 2013).

O sistema nervoso entérico é uma complexa rede de neurônios e células enterogliais dispostas dentro das paredes do trato gastrointestinal. É a maior e mais complexa divisão do sistema nervoso periférico, contendo mais neurônios do que a medula espinhal, e tem a característica única de poder realizar suas funções de motilidade completamente independentes do sistema nervoso central (Brown & Passmore, 2009).

O megacólon chagásico é uma patologia caracterizada pela destruição de componentes do sistema nervoso entérico mediada tanto pelo processo inflamatório quanto pela infecção causada diretamente pelo *T. cruzi*. A ressecção cirúrgica dos segmentos do cólon acometido pela forma digestiva da doença de Chagas é um dos poucos tratamentos disponíveis a estes pacientes. Assim, desenvolvemos este estudo para testar a hipótese de que os canais Kv7 estão presentes no cólon humano normal e estão reduzidos na doença de Chagas, o que pode ter influência direta no processo de constipação intestinal e desenvolvimento desta patologia.

## **OBJETIVO GERAL**

Caracterizar a expressão de canais de K<sup>+</sup> voltagem dependentes no SNE de amostras de cólon provenientes de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1 – Avaliar a expressão dos canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes Kv7.3, Kv7.4 e Kv7.5 nos plexos mientérico e submucosa de amostras de cólon provenientes de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon;

2 – Avaliar a correlação entre a expressão dos canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes Kv7.3, Kv7.4 e Kv7.5, células neuronais (através da expressão de anti-HuC/HuD) e células enterogliais (expressão de S-100);

3 – Comparar nos pacientes portadores de megacólon chagásico, a expressão de células neuronais, células enterogliais e de canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes Kv7.3, Kv7.4 e Kv7.5 nas porções dilatadas e não dilatadas.

4 – Estabelecer se existe relação entre a expressão dos canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes Kv7.3, Kv7.4 e Kv7.5 e o desenvolvimento do megacólon chagásico.

## METODOLOGIA

### *Pacientes*

Nesse projeto foram utilizadas 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 da Universidade Federal de Goiás, pelo Dr. Ênio Oliveira. Foi obtido 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 e pelo Comitê de Ética da Universidade de Erlangen-Nuremberg.

Nosso grupo de pesquisa possui uma coleção única de amostras provenientes do trato gastrointestinal de pacientes portadores da doença de Chagas que desenvolveram e que não desenvolveram o megacólon chagásico, também amostras de indivíduos não chagásicos (submetidos à cirurgia devido a patologias intestinais como o câncer). A presença da doença foi confirmada através de exames clínicos e laboratoriais (da Silveira et al., 2005b). A qualidade destas amostras foi avaliada através de técnicas histológicas e de imunohistoquímica, o que demonstrou a preservação da imunoreatividade das mesmas.

**Tabela 01:** Número e média de idade de indivíduos controle e pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon.

<i>Casos estudados</i>	<i>Número</i>	<i>Média de Idade</i>
Indivíduos controle	10	56 ± 22 anos
Pacientes chagásicos não portadores de megacólon	15	53 ± 10 anos
Pacientes chagásicos portadores de megacólon	15	55 ± 11 anos

Os indivíduos do grupo controle e os pacientes chagásicos não portadores de megacólon foram submetidos a processo cirúrgico devido a neoplasias intestinais. No grupo dos pacientes chagásicos não portadores de megacólon somente um apresentou queixas intestinais ou sintoma de qualquer comprometimento do sistema digestivo. Dos 15 pacientes analisados neste grupo, 13 desenvolveram

de cardiopatia chagásica crônica. Já no grupo dos pacientes chagásicos portadores de megacólon, 10 sofriam de constipação intestinal há vários anos e 7 eram portadores de megaesôfago. Neste grupo de pacientes foram coletadas amostras da região dilatada (megacólon) e da região não dilatada à montante da porção acometida. Estes pacientes foram submetidos ao processo cirúrgico devido a complicações causadas pelo megacólon.



Foto de amostras de paciente chagásico portador de megacólon. Na amostra à esquerda observamos porção não dilatada do cólon (coletada à montante da lesão) e à direita a porção dilatada (megacólon) do órgão.

### ***Imunohistoquímica***

Neste trabalho foi realizada tripla marcação em nossas amostras com os anticorpos listados na Tabela 2. As amostras foram pré-incubadas por 2 horas em PBS 0.05M (pH 7.4) contendo albumina de soro bovino a 1% (BSA), Triton X-100 a 0.5%, Timerosal a 0.05% e soro de cabra normal a 5%. Após um banho em PBS por 10 minutos, as amostras foram incubadas em solução contendo BSA, Triton X-100, Timerosal e os anticorpos primários por 72 horas (4°C). Após este período, as amostras foram submetidas a um banho em PBS a 4°C *overnight*. Após este banho os anticorpos secundários foram adicionados na mesma solução utilizada com os anticorpos primários (4 horas em temperatura ambiente) seguidas por um banho em PBS (12 horas a 4°C). Para reduzir a auto-fluorescência induzida por lipofuccina, as amostras foram incubadas com tampão acetato-amônia (pH 5.0) contendo 1 mM

CuSO<sub>4</sub> por 60-90 minutos seguidos de um breve banho em água destilada. Após este processo, as amostras foram montadas em PBS-glicerol (1:1; pH 8.6).

Para aquisição e processamento de imagens foi utilizado um microscópio confocal laser scanning ligado a um Nikon Diaphot 300 e equipado com um Krypton-argon laser (American Laser, Salt Lake City, USA). As imagens foram geradas utilizando três diferentes ondas de excitação utilizando filtros de 488 nm (ALEXA Fluor 488), 594 nm (ALEXA Fluor 594) e 647 nm (ALEXA Fluor 647). As imagens geradas por esse sistema foram preparadas utilizando o programa Confocal Assistant 4.02, Adobe Photoshop 6.0 e Corel Draw 13.

As análises estatísticas foram feitas através do software SPOT (Version 3.5.6 for Windows, Diagnostic Instruments, USA). As diferenças entre os valores médios das áreas de marcação foram analisadas com o ANOVA one-way ( $P < 0.05$ ) para cada paciente.

**Tabela 02:** Anticorpos para imunohistoquímica em tecidos de cólon de indivíduos controle e pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon.

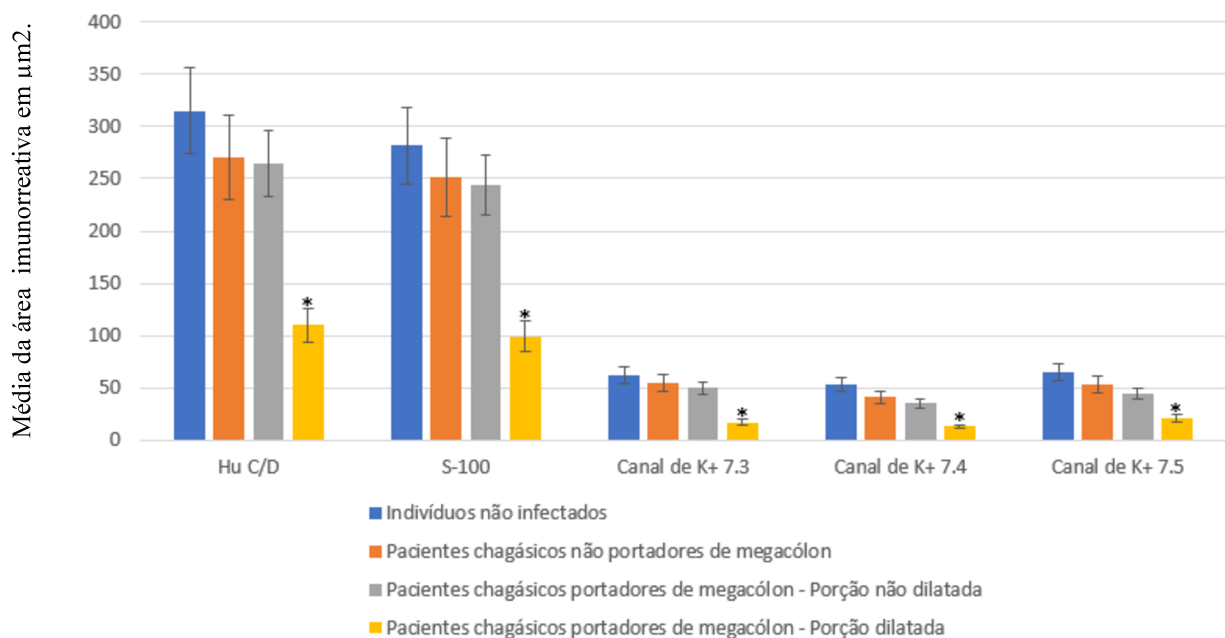
<b>Anticorpo</b>	<b>Origem</b>	<b>Código</b>	<b>Diluição</b>
Rabbit anti-Kv7.3	Abcam, Cambridge, UK	N 4142	1:100
Mouse anti-Kv7.4	Abcam, Cambridge, UK	A-21272	1:100
Rabbit anti-Kv7.5	Abcam, Cambridge, UK	M7245	1:100
Mouse anti-HuC/HuD	Molecular Probes	180091	1:100
Rabbit anti-protein gene product 9.5	Sigma Aldrich, Ireland	AB-N34	1:100
Goat anti-S100	DAKO	Z0311	1:100



## RESULTADOS

Foram analisados a expressão dos canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes Kv7.3, Kv7.4 e Kv7.5 nos plexos mientérico e submucoso em amostras de cólon provenientes de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon. Para isso foi avaliada a co-expressão dos canais de K<sup>+</sup> e de células neuronais (através da expressão de anti-HuC/HuD) e de células enterogliais (expressão de S-100).

Nossos resultados indicaram que pacientes chagásicos portadores de megacólon apresentam uma diminuição estatisticamente relevante dos canais de K<sup>+</sup> em relação aos pacientes não infectados e em relação aos pacientes chagásicos não portadores de megacólon. No entanto, a expressão dos canais de K<sup>+</sup> nos pacientes chagásicos não portadores de megacólon se mostrou semelhante à apresentada pelos indivíduos não infectados. Quando comparamos a expressão dos canais de K<sup>+</sup> na porção dilatada com a porção não dilatada das amostras de pacientes chagásicos portadores de megacólon notamos que a porção não dilatada dessas amostras não apresenta diminuição da expressão dos canais de K<sup>+</sup> de forma tão acentuada quanto à apresentada na porção dilatada, indicando que as alterações sofridas no cólon são limitadas à porção dilatada deste órgão (Gráficos 1, 4, 5 e 6).

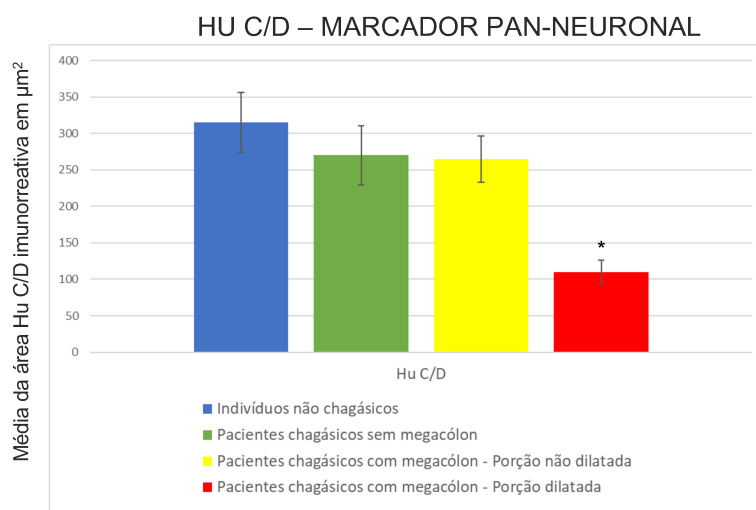


**Gráfico 1:** Relação entre a expressão de Hu C/D, S-100 e canais de K<sup>+</sup> 7.3, 7.4 e 7.5 em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Valores expressos em  $\mu\text{m}^2$

\* Diferença estatisticamente relevante entre este grupo e os outros grupos analisados ( $P < 0.05$ ).

Além disso, observamos que a imunoreatividade do canais de K<sup>+</sup> ocorreram principalmente em neurônios com a morfologia Dogiel II (corpo neuronal grande, redondo ou oval) em todos analisados grupos. Já células enterogliais praticamente não apresentaram expressão dos canais de K<sup>+</sup> analisados, demonstrando que a mesma está restrita aos neurônios (Figura 1).

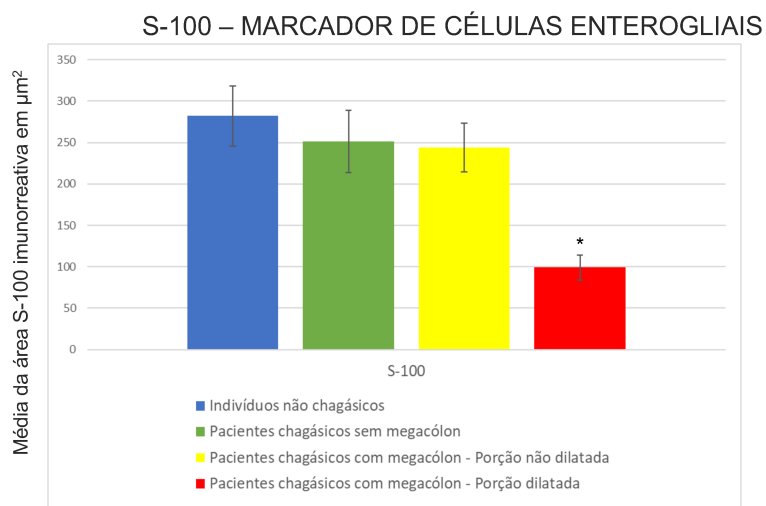
Observamos também que quanto a expressão de neurônios nos plexos nervosos estudados, pacientes chagásicos não portadores de megacólon e pacientes não infectados apresentam quantidade semelhante tanto na expressão de Hu C/D quanto nos canais de K<sup>+</sup>, como observado no gráfico 2 e na figura 1 (linhas A e B). Já pacientes chagásicos portadores de megacólon apresentam uma intensa diminuição na quantidade de neurônios, refletida na baixa expressão de Hu C/D. Além disso, este grupo de pacientes apresenta hipertrofia neuronal, caracterizada pelo aumento dos corpos neuronais remanescentes, tanto na porção não dilatada quanto na dilatada. Já a expressão dos canais de K<sup>+</sup> se apresenta estatisticamente equivalente na porção não dilatada dos pacientes portadores de megacólon, e, grandemente diminuída na porção dilatada destes pacientes. Esses detalhes podem ser observados nas linhas C e D da figura 1 e nos gráficos 4, 5 e 6.



**Gráfico 2:** Relação entre a expressão de Hu C/D, em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Valores expressos em  $\mu\text{m}^2$

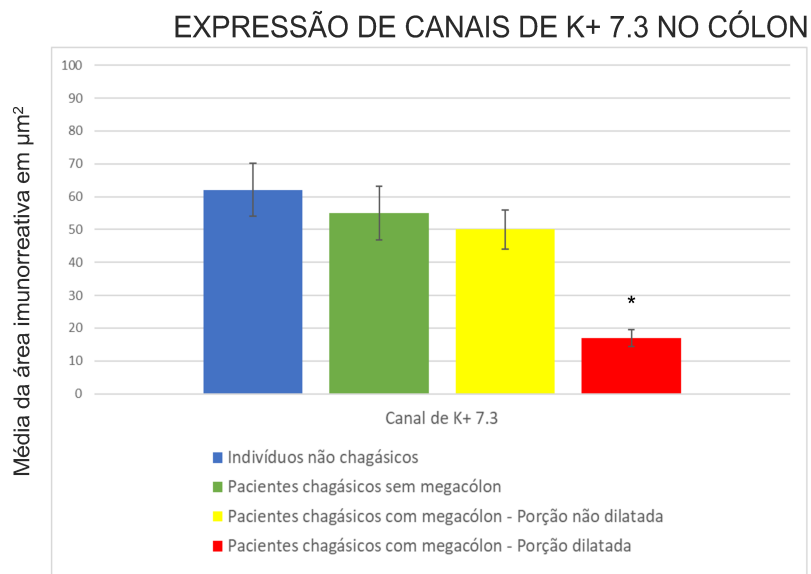
\* Diferença estatisticamente relevante entre este grupo e os outros grupos analisados ( $P < 0.05$ )

Em relação às células enterogliais, observamos que todos os grupos de indivíduos não infectados, pacientes chagásicos não portadores de megacólon e de chagásicos portadores de megacólon (porção não dilatada) apresentam expressão similar da proteína S-100, marcadora de células enterogliais. No entanto a porção dilatada dos pacientes chagásicos portadores de megacólon apresenta uma diminuição da expressão dessas células, como pode ser observado no gráfico 3 e na figura 2.



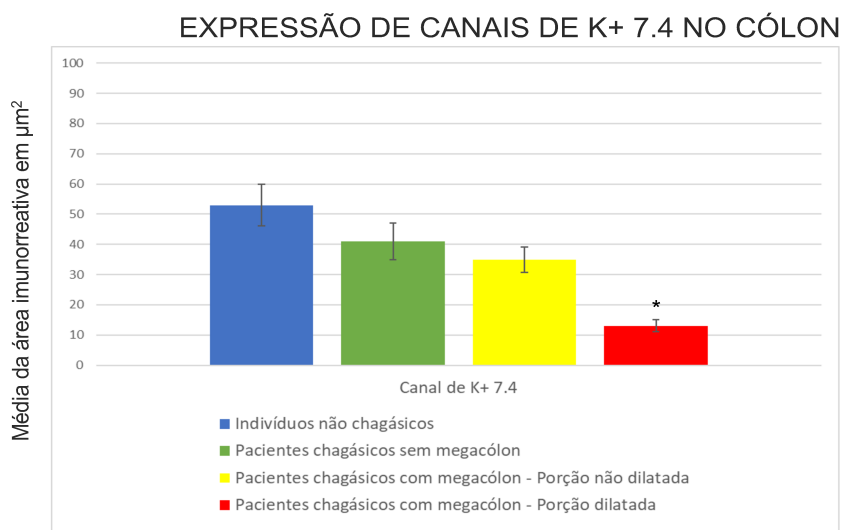
**Gráfico 3:** Relação entre a expressão de S-100, em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Valores expressos em  $\mu\text{m}^2$

\* Diferença estatisticamente relevante entre este grupo e os outros grupos analisados ( $P < 0.05$ )



**Gráfico 4:** Relação entre a expressão de canais K+ 7.3, em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Valores expressos em  $\mu\text{m}^2$

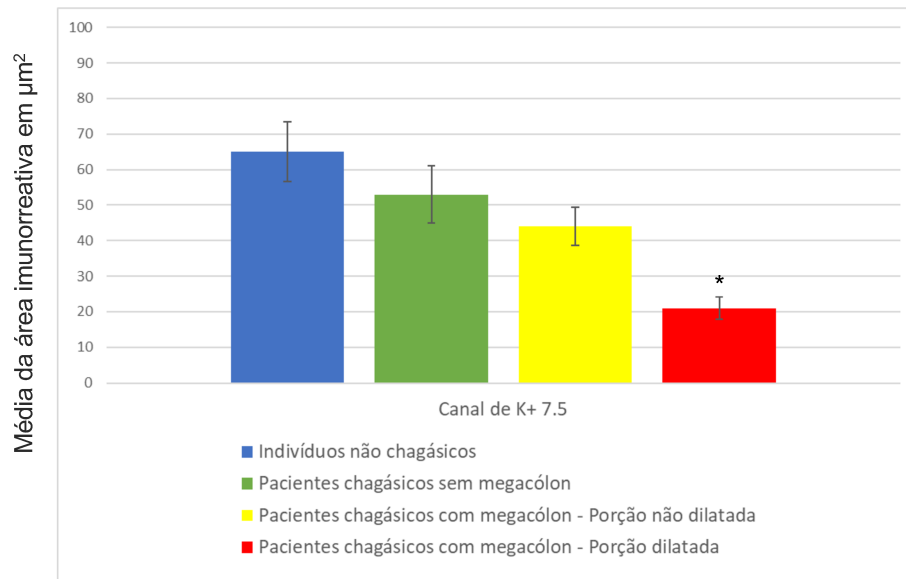
\* Diferença estatisticamente relevante entre este grupo e os outros grupos analisados ( $P < 0.05$ )



**Gráfico 5:** Relação entre a expressão de canais K+ 7.4, em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Valores expressos em  $\mu\text{m}^2$

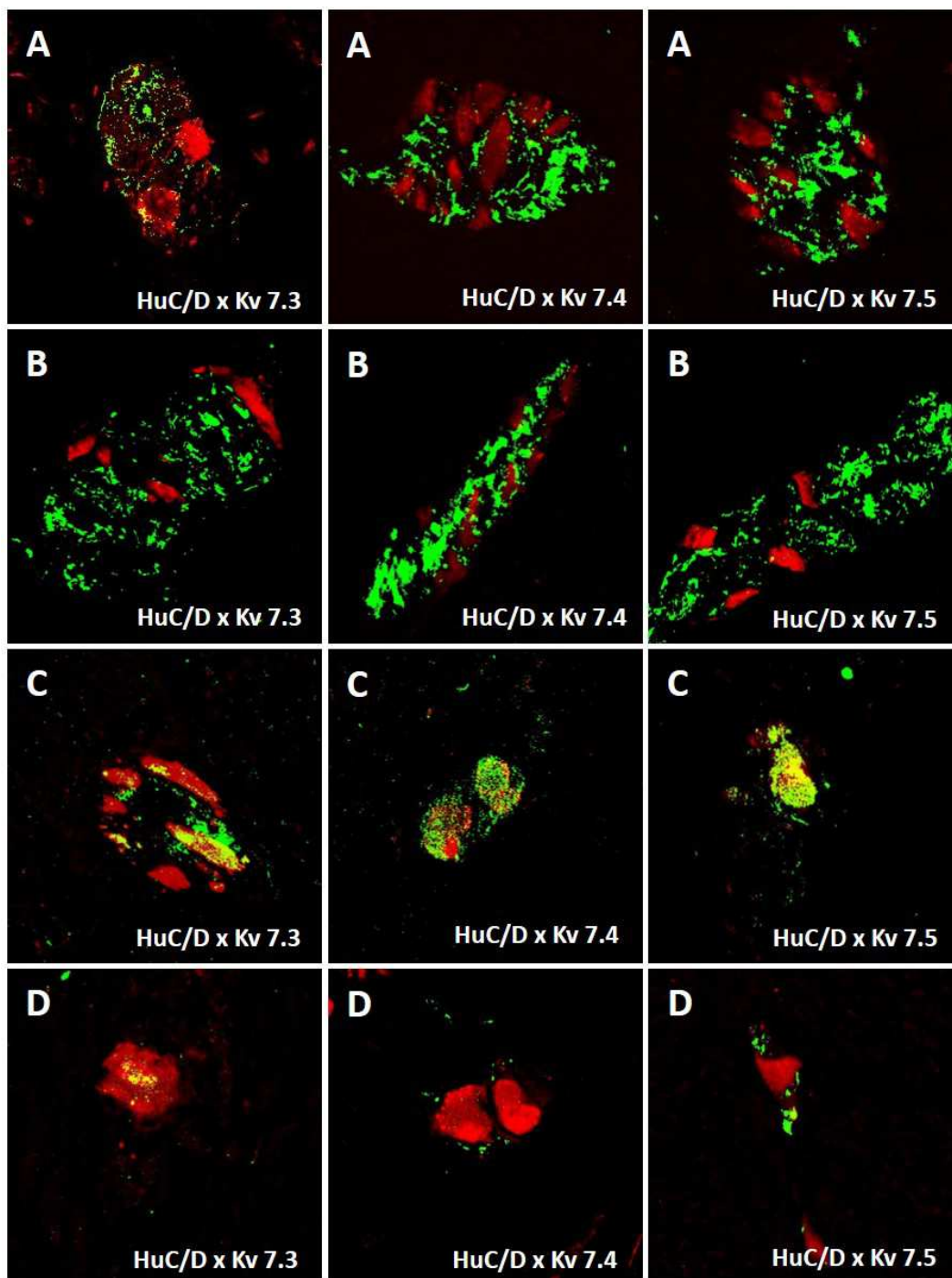
\* Diferença estatisticamente relevante entre este grupo e os outros grupos analisados ( $P < 0.05$ )

## EXPRESSIONE DE CANAIS DE K+ 7.5 NO CÓLON

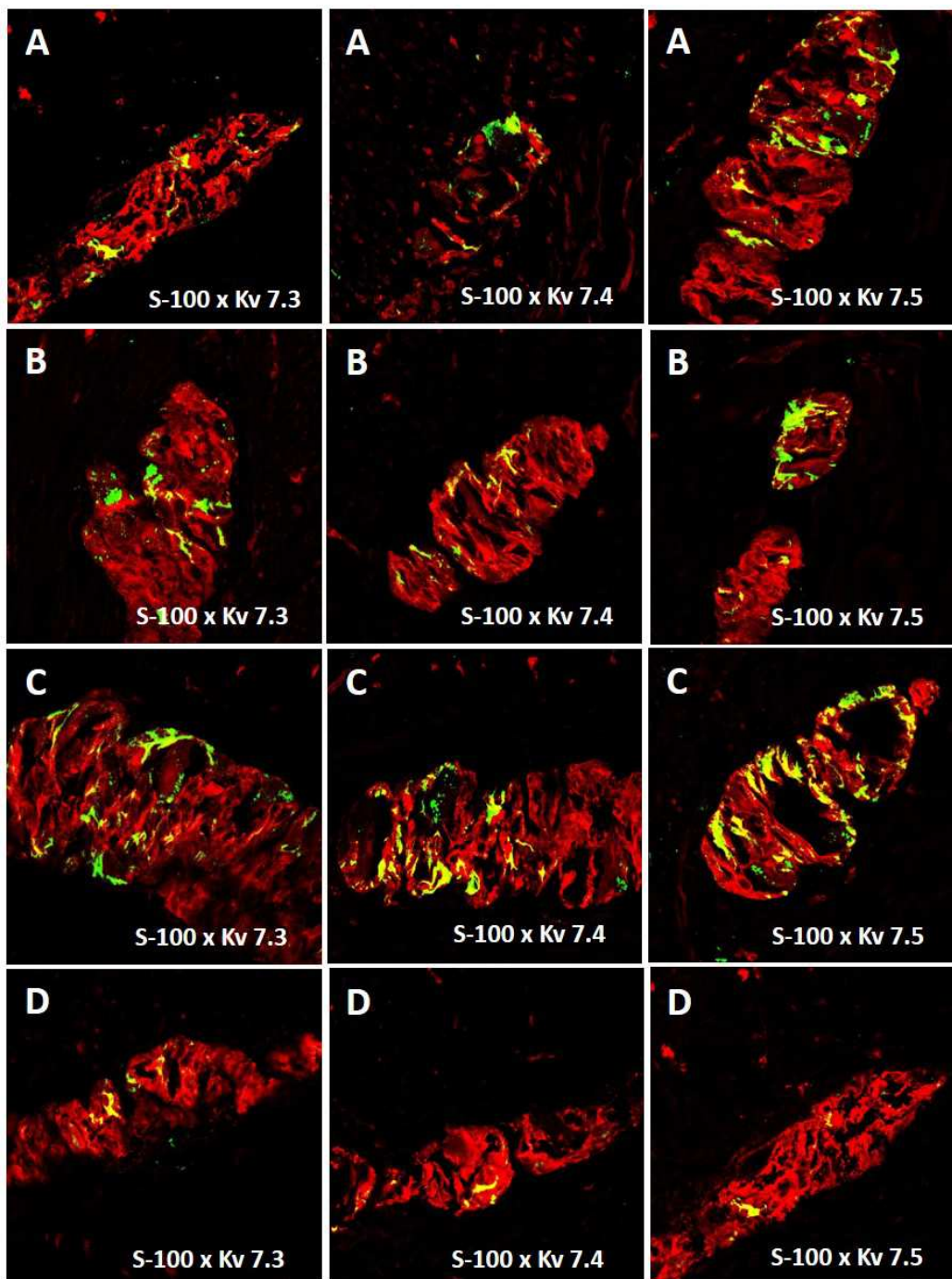


**Gráfico 6:** Relação entre a expressão de canais K+ 7.5, em amostras de cólon de pacientes chagásicos portadores e não portadores de megacólon e de indivíduos não infectados. Valores expressos em  $\mu\text{m}^2$

\* Diferença estatisticamente relevante entre este grupo e os outros grupos analisados ( $P < 0.05$ )



**Figura 1:** Imunohistoquímica de fluorescência no plexo mientérico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados. Em vermelho observamos o marcador de corpos neuronais Hu C/D e em verde os canais de K<sup>+</sup> voltagem dependentes (Kv) 7.3, 7.4 e 7.5. Em (A) indivíduos não infectados, em (B) pacientes chagásicos não portadores de megacólon, em (C) pacientes chagásicos portadores de megacólon (porção não dilatada) e em (D) pacientes chagásicos portadores de megacólon (porção dilatada).



**Figura 2:** Imunohistoquímica de fluorescência no plexo mientérico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados. Em vermelho observamos o marcador de células enterogliais S-100 e em verde os canais de K<sup>+</sup> voltagem dependentes (Kv) 7.3, 7.4 e 7.5. Em (A) indivíduos não infectados, em (B) pacientes chagásicos não portadores de megacólon, em (C) pacientes chagásicos portadores de megacólon (porção não dilatada) e em (D) pacientes chagásicos portadores de megacólon (porção dilatada).



## DISCUSSÃO

Nossos resultados neste estudo revelaram que Kv7.3, Kv7.4 e Kv7.5 foram expressos em neurônios positivos para Hu C/D localizados dentro dos plexos do cólon humano normal. Observamos uma diminuição dos canais Kv nas amostras de cólon da porção dilatada de pacientes chagásicos com megacólon enquanto na porção não dilatada destes pacientes e nos sem megacólon a expressão se mostrou estatisticamente equivalente ao dos indivíduos não infectados; isso pode significar um fator de proteção contra o desenvolvimento do mega, sendo responsável por evita-lo ou ao menos retardá-lo. Acreditamos que a falta ou diminuição da expressão de Kv7 pode desempenhar um papel na fisiopatologia e no desenvolvimento do megacólon. Da mesma forma, acreditamos que a manutenção da expressão deste canais poderia impedir o desenvolvimento do mega.

Há algumas décadas já é consenso que o SNE é uma intrincada rede de neurônios e células enterogliais compreendido entre as paredes do trato gastrointestinal. É a maior e mais complexa divisão do sistema nervoso periférico, contendo mais neurônios do que a medula espinhal, e possui a característica única de realizar suas funções de motilidade completamente independente do sistema nervoso central (Furness, 1998). Sabe-se que a forma digestiva da doença de Chagas ocorre a partir da destruição do SNE e, um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do mega chagásico seria um processo degenerativo, principalmente de gânglios nervosos do trato gastrintestinal, que aparentemente se inicia na fase aguda, persistindo até a fase crônica. No entanto, ainda há muitos aspectos a serem elucidados sobre a sua etiopatogenia (Koberle, 1961).

O megaesôfago e o megacólon são as alterações mais comuns no trato digestório na doença de Chagas. A destruição neuronal na doença de Chagas na fase aguda ocorre pela grande concentração do parasita no tecido, porém, na fase crônica está também relacionada ao processo inflamatório envolvido nesta doença. A inter-relação entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico é muito importante para a compreensão das patologias intestinais, podendo ser definitivo para determinação de manifestações clínicas e para o desenvolvimento de processos inflamatórios no intestino (da Silveira et al., 2007).

Um estudo recente identificou o canal de potássio Kv7.5 como tendo um papel na excitabilidade no cólon do rato (Wang et al., 2016). A partir desse dado, projetamos este estudo para testar a hipótese de que os canais Kv7 presentes normalmente cólon humano, poderiam estar alterados na forma digestiva da doença de Chagas. Os canais de K<sup>+</sup> desempenham papéis importantes em células excitáveis, neurônios e células enterogliais, diretamente envolvidos em vários processos fisiológicos, como disparo de potencial de ação, liberação de neurotransmissores e contratilidade

muscular. O potencial da membrana celular hiperpolariza sempre que os canais de K<sup>+</sup> abrem, assim o K<sup>+</sup> flui para fora da célula devido ao grande gradiente eletroquímico transmembrana levando à diminuição da excitabilidade celular (Lopez-Lopez et al., 2018).

Além disso, os canais K<sup>+</sup> também desempenham um papel na definição do potencial de membrana em repouso, resultando em diferentes níveis de tônus muscular basal que variam dependendo da localização dentro do trato gastrointestinal. Ao longo dos anos, vários grupos de pesquisa investigaram a expressão de canais Kv7 em tecidos do ser humano e em modelos experimentais. Em 2009, Jepps et al. relataram as descobertas de seu estudo da expressão de canais Kv no trato gastrointestinal murino. De todos os canais Kv7 estudados foi demonstrado que tanto os genes Kv7.4 quanto Kv7.5 são os mais abundantemente expressos em células do SNE. Resultados também mostraram que Kv7.4 e Kv7.5, mas não Kv7.1, foram expressos no músculo circular do cólon. Além disso, seus dados mostraram que bloqueadores de canais Kv7 aumentam a atividade contrátil em diferentes regiões do intestino (Jepps et al., 2009).

Ipavec et al. investigou a expressão de canais Kv7 no fundo gástrico de rato. Foi demonstrado que o bloqueador de canal Kv7, XE-991, induziu contrações dependentes de sua concentração. Transcrições codificadas por todos os genes KV7 foram detectados no fundo gástrico de ratos, com Kv7.4 e canais Kv7.5 mostrando os mais altos níveis de expressão, com baixos níveis de Kv7.1–3 também evidentes. Os canais Kv7.4 e Kv7.5 foram visualizados pela imunofluorescência confocal no músculo circular e longitudinal camadas (Ipavec et al., 2011). Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores realizou um análise muito semelhante, em que eles analisaram a expressão de canais Kv7 na *taenia coli* humana, e revelou resultados semelhantes neste tecido como descrito acima. Estes autores sugeriram que os canais Kv7 parecem contribuir para o repouso do tônus muscular e que ativadores de canais Kv7 poderiam apresentar potencial terapêutico como relaxante da musculatura lisa gastrointestinal (Adduci et al., 2013).

Um estudo recente de Jepps et al. discutiu o potencial terapêutico de bloqueadores de canal Kv7 em pacientes com condições de dismotilidade gastrintestinal como a constipação crônica e um estudo de incontinência em modelos animais sugeriram que o ativador do canal Kv7, Retigabina, proporcionou uma melhora no controle esfinteriano em 5% dos indivíduos em comparação com 1,4% que receberam placebo. Este dado sugere que os canais Kv7 encontrados no cólon podem fornecer outro alvo terapêutico para ativadores e bloqueadores do canal Kv7 (Jepps et al., 2013).

Em 2014, um estudo de Wright et al. evidenciou a expressão de canais Kv7 nas células de Cajal, avaliando o potencial destes canais na regulação da excitabilidade dos neurônios do SNE. Esses autores encontraram células de Cajal expressando Kv7.5 através de imunohistoquímica. Foi também relatada

a expressão de canal Kv7.5 em neurônios entéricos dos gânglios mientéricos, bem como a fraca co-localização em células musculares lisas (Wright et al., 2014).

A fisiopatologia do megacólon corrobora com essa hipótese: sabe-se que o primeiro sintoma do megacólon é a obstipação. Tanto o diagnóstico clínico como o anatômico é, em geral, tardio, após o instituir da dilatação. À microscopia ótica de luz observam-se infiltrados inflamatórios crônicos, focais e difusos na muscular da mucosa, na submucosa e nas camadas musculares, lesões do sistema nervoso entérico, especialmente do plexo mientérico, periganglionite e ganglionite focais ou difusas com intensos fenômenos regressivos dos neurônios chegando à destruição completa dos gânglios nervosos do plexo mientérico, com consecutiva fibrose. Também são encontradas ulcerações e inflamação crônica da mucosa, focal ou difusa em casos mais avançados, podendo atingir a submucosa, fibrose intersticial intermuscular, focal ou difusa, em decorrência da miosite, da periganglionite e da ganglionite (Campos & Tafuri, 1973). Alterações ultra-estruturais do plexo mientérico consistem em lesões, em geral focais, de todos os componentes dos gânglios: neurônios, células de Schwann e fibras nervosas. Por isso, é comum, no mesmo gânglio, a existência de neurônios, às vezes, profundamente lesados ao lado de outros morfológicamente íntegros. Em casos mais graves, a lesão pode ser difusa e o gânglio acaba por ser substituído por tecido conjuntivo fibroso denso (Tafuri et al., 1971).

Segundo Tafuri é lícito admitir uma progressividade das lesões dos plexos que se agravam proporcionalmente à duração e ao grau do mega. O acúmulo de fezes no cólon provoca dilatação da luz e compressão da mucosa. A compressão, por sua vez, leva à isquemia, e secundariamente, à degeneração, necrose e ulceração da mucosa. Na mucosa assim ulcerada inicia-se um processo inflamatório secundário e independente da inflamação induzida pela própria doença de Chagas. Esse processo inflamatório atinge o plexo mientérico já previamente lesado pelo *T. cruzi*, agravando ainda mais a destruição do sistema nervoso entérico (SNE). Por sua vez, o plexo submucoso sofre as consequências 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 evolui para a fibrose intersticial da submucosa e do conjuntivo intermuscular. Por sua vez, o aumento da resistência do meio, exige maior esforço das fibras musculares para a contração. Com o tempo ocorre hipertrofia e alterações regressivas das fibras musculares. Essas últimas são consequências dos distúrbios das trocas metabólicas entre as células musculares e o interstício induzido pela própria inflamação (alterações vasculares, edema, infiltrado celular e fibrose) que se interpõe entre eles. Como o plexo submucoso está em íntima relação com as células musculares é fácil compreender como a miosite e suas sequelas podem lesar ainda mais os gânglios (Tafuri, 1971; Tafuri et al., 1971).

Acreditamos que a destruição dos canais Kv iniciada pelo parasita e pelo processo inflamatório levariam inicialmente à dismotilidade muscular e aceleraria todo esse ciclo de destruição descrito acima. Nossos resultados concordaram com estudos anteriores que demonstraram a redução da expressão de canais Kv em outras doenças gastrointestinais, como doença de Crohn e colite ulcerativa. Essa redução acelera a progressão da doença por conduzir a um maior grau de incoordenação motora do cólon. Estudos futuros onde seja avaliada a função de cada canal Kv separadamente poderiam esclarecer melhor a função destes canais no desenvolvimento não só do megacólon chagásico, mas também de outras patologias do trato gastrointestinal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adad, S. J., Andrade, D. C., Lopes, E. R. and Chapadeiro, E. (1991). [Pathological anatomy of chagasic megaesophagus]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **33**, 443-450.
- Adad, S. J., Cancado, C. G., Etchebehere, R. M., Teixeira, V. P., Gomes, U. A., Chapadeiro, E. and Lopes, E. R. (2001). Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch*, **438**, 254-258.
- Adduci, A., Martire, M., Tagliatalata, M., Arena, V., Rizzo, G., Coco, C. and Curro, D. (2013). Expression and motor functional roles of voltage-dependent type 7 K(+) channels in the human taenia coli. *Eur J Pharmacol*, **721**, 12-20. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.09.061.
- Brehmer, A. (2006). Structure of enteric neurons. *Advances in Anatomy*, **186**, 1-95.
- Brehmer, A., Croner, R., Dimmler, A., Papadopoulos, T., Schrödl, F. and Neuhuber, W. (2004a). Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, **112**, 49-59.
- Brehmer, A., Lindig, T. M., Schrod, F., Neuhuber, W., Ditterich, D., Rexer, M. and Rupprecht, H. (2005a). Morphology of enkephalin-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochem Cell Biol*, **123**, 131-138.
- Brehmer, A., Schrödl, F. and Neuhuber, W. (2005b). Morphology of VIP/nNOS-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochemistry and Cell Biology*.
- Brehmer, A., Schrod, F., Neuhuber, W., Tooyama, I. and Kimura, H. (2004b). Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum. *J Chem Neuroanat*, **27**, 33-41.
- Brown, D. A. and Passmore, G. M. (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol*, **156**, 1185-1195. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00111.x.
- Brueggemann, L. I., Haick, J. M., Cribbs, L. L. and Byron, K. L. (2014). Differential activation of vascular smooth muscle Kv7.4, Kv7.5, and Kv7.4/7.5 channels by ML213 and ICA-069673. *Mol Pharmacol*, **86**, 330-341. doi: 10.1124/mol.114.093799.
- Campos, J. V. and Tafuri, W. L. (1973). Chagas enteropathy. *Gut*, **14**, 910-919.
- Chen, X., Li, W., Hiatt, S. C. and Obukhov, A. G. (2016). Novel Roles for Kv7 Channels in Shaping Histamine-Induced Contractions and Bradykinin-Dependent Relaxations in Pig Coronary Arteries. *PLoS One*, **11**, e0148569. doi: 10.1371/journal.pone.0148569.
- d'Avila Reis, D., Lemos, E. M., Silva, G. C., Adad, S. J., McCurley, T., Correa-Oliveira, R. and Machado, C. R. (2001). Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **95**, 177-178.
- da Silveira, A. B., Arantes, R. M., Vago, A. R., Lemos, E. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R. and D'Avila Reis, D. (2005a). Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology*, **131**, 627-634. doi: 10.1017/S0031182005008061.
- da Silveira, A. B., Lemos, E. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R., Furness, J. B. and D'Avila Reis, D. (2007). Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol*, **38**, 1256-1264. doi: 10.1016/j.humphath.2007.01.020.
- da Silveira, A. B. M., Arantes, R. M. E., Vago, A. R., Lemos, E. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R. and D'Avila Reis, D. (2005b). Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology*, **131**, 627-634.
- Davoren, J. E., Claffey, M. M., Snow, S. L., Reese, M. R., Arora, G., Butler, C. R., Boscoe, B. P., Chenard, L., DeNinno, S. L., Drozda, S. E., Duplantier, A. J., Moine, L., Rogers, B. N., Rong, S., Schuyten, K., Wright, A. S., Zhang, L., Serpa, K. A., Weber, M. L., Stolyar, P., Whisman, T. L., Baker, K., Tse, K., Clark, A. J., Rong, H., Mather, R. J. and Lowe, J. A., 3rd (2015). Discovery of a novel Kv7 channel opener as a treatment for epilepsy. *Bioorg Med Chem Lett*, **25**, 4941-4944. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.04.074.
- Dias, J. C., Silveira, A. C. and Schofield, C. J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **97**, 603-612.

- Furness, J. B.** (1998). *Gastroenterology. IDrugs*, **1**, 623-624.
- Furness, J. B.** (2006). *The Enteric Nervous System*, Blackwell, Oxford.
- Furness, J. B., Nguyen, T. V., Nurgali, K. and Shimizu, Y.** (2006). The enteric nervous system and its extrinsic connections. In *Textbook of Gastroenterology* (ed. Yamada, T.).
- Hedegaard, E. R., Johnsen, J., Povlsen, J. A., Jespersen, N. R., Shanmuganathan, J. A., Laursen, M. R., Kristiansen, S. B., Simonsen, U. and Botker, H. E.** (2016). Inhibition of KV7 Channels Protects the Rat Heart against Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *J Pharmacol Exp Ther*, **357**, 94-102. doi: 10.1124/jpet.115.230409.
- Ipavec, V., Martire, M., Barrese, V., Tagliatela, M. and Curro, D.** (2011). KV7 channels regulate muscle tone and nonadrenergic noncholinergic relaxation of the rat gastric fundus. *Pharmacol Res*, **64**, 397-409. doi: 10.1016/j.phrs.2011.06.016.
- Jepps, T. A., Greenwood, I. A., Moffatt, J. D., Sanders, K. M. and Ohya, S.** (2009). Molecular and functional characterization of Kv7 K<sup>+</sup> channel in murine gastrointestinal smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **297**, G107-115. doi: 10.1152/ajpgi.00057.2009.
- Jepps, T. A., Olesen, S. P. and Greenwood, I. A.** (2013). One man's side effect is another man's therapeutic opportunity: targeting Kv7 channels in smooth muscle disorders. *Br J Pharmacol*, **168**, 19-27. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02133.x.
- Jones, E. M., Colley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L. and McCurley, T. L.** (1993). Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*, **48**, 348-357.
- Kalia, J. and Swartz, K. J.** (2013). Common principles of voltage-dependent gating for Hv and Kv channels. *Neuron*, **77**, 214-216. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.001.
- Koberle, F.** (1961). [Pathology and pathological anatomy of Chagas' disease.]. *Bol Oficina Sanit Panam*, **51**, 404-428.
- Labro, A. J. and Snyders, D. J.** (2012). Being flexible: the voltage-controllable activation gate of kv channels. *Front Pharmacol*, **3**, 168. doi: 10.3389/fphar.2012.00168.
- Lee, S., Zheng, H., Shi, L. and Jiang, Q. X.** (2013). Reconstitution of a Kv channel into lipid membranes for structural and functional studies. *J Vis Exp*, e50436. doi: 10.3791/50436.
- Lopez-Lopez, J. R., Ciudad, P. and Perez-Garcia, M. T.** (2018). Kv channels and vascular smooth muscle cell proliferation. *Microcirculation*, **25**. doi: 10.1111/micc.12427.
- Maljevic, S., Wuttke, T. V., Seebohm, G. and Lerche, H.** (2010). KV7 channelopathies. *Pflugers Arch*, **460**, 277-288. doi: 10.1007/s00424-010-0831-3.
- McKay, D. M., Berin, M. C., Fondacaro, J. D. and Perdue, M. H.** (1996). Effects of neuropeptide Y and substance P on antigen-induced ion secretion in rat jejunum. *Am J Physiol*, **271**, G987-992.
- McKay, D. M. and Fairweather, I.** (1997). A role for the enteric nervous system in the response to helminth infections. *Parasitol Today*, **13**, 63-69.
- O'Donnell, A. M., Coyle, D. and Puri, P.** (2017). Decreased expression of Kv7 channels in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.12.028.
- Rivera-Arconada, I., Vicente-Baz, J. and Lopez-Garcia, J. A.** (2017). Targeting Kv7 channels in pain pathways. *Oncotarget*, **8**, 12554-12555. doi: 10.18632/oncotarget.15261.
- Sands, Z. A., Grottesi, A. and Sansom, M. S.** (2006). The intrinsic flexibility of the Kv voltage sensor and its implications for channel gating. *Biophys J*, **90**, 1598-1606. doi: 10.1529/biophysj.105.072199.
- Shi, L., Bian, X., Qu, Z., Ma, Z., Zhou, Y., Wang, K., Jiang, H. and Xie, J.** (2013). Peptide hormone ghrelin enhances neuronal excitability by inhibition of Kv7/KCNQ channels. *Nat Commun*, **4**, 1435. doi: 10.1038/ncomms2439.
- Tafari, W. L.** (1971). Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*, **354**, 136-149.
- Tafari, W. L., Maria, T. A. and Lopes, E. R.** (1971). [Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **13**, 76-91.
- Thomsen, M. B.** (2013). Kv7.1 isoform gradients in the heart: new potential approach to alter repolarization reserve. *Heart Rhythm*, **10**, 1229-1230. doi: 10.1016/j.hrthm.2013.06.017.

- Vago, A. R., Andrade, L. O., Leite, A. A., d'Avila Reis, D., Macedo, A. M., Adad, S. J., Tostes, S., Jr., Moreira, M. C., Filho, G. B. and Pena, S. D.** (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*, **156**, 1805-1809.
- Vago, A. R., Macedo, A. M., Adad, S. J., Reis, D. D. and Correa-Oliveira, R.** (1996). PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, **348**, 891-892.
- Vago, A. R., Silva, D. M., Adad, S. J., Correa-Oliveira, R. and d'Avila Reis, D.** (2003). Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **97**, 308-309.
- Wang, J., Zeng, L., Tan, B., Li, G., Huang, B., Xiong, X., Li, F., Kong, X., Liu, G. and Yin, Y.** (2016). Developmental changes in intercellular junctions and Kv channels in the intestine of piglets during the suckling and post-weaning periods. *J Anim Sci Biotechnol*, **7**, 4. doi: 10.1186/s40104-016-0063-2.
- Wright, G. W., Parsons, S. P., Loera-Valencia, R., Wang, X. Y., Barajas-Lopez, C. and Huizinga, J. D.** (2014). Cholinergic signalling-regulated KV7.5 currents are expressed in colonic ICC-IM but not ICC-MP. *Pflugers Arch*, **466**, 1805-1818. doi: 10.1007/s00424-013-1425-7.