

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

IRACEMA SALDANHA JUNQUEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA DENERVAÇÃO NO SISTEMA
NERVOSO ENTÉRICO NO MEGAESÔFAGO CHAGÁSICO *VERSUS*
IDIOPÁTICO NA CÁRDIA E NOS TERÇOS ESOFÁGICOS, EM
RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE NEURÔNIOS E À PROPORÇÃO
DE NEURÔNIOS SP+ (EXCITATÓRIOS) E NOS+ (INIBITÓRIOS).**

UBERABA
2017

IRACEMA SALDANHA JUNQUEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA DENERVAÇÃO NO SISTEMA
NERVOSO ENTÉRICO NO MEGAESÔFAGO CHAGÁSICO *VERSUS*
IDIOPÁTICO NA CÁRDIA E NOS TERÇOS ESOFÁGICOS, EM
RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE NEURÔNIOS E À PROPORÇÃO
DE NEURÔNIOS SP+ (EXCITATÓRIOS) E NOS+ (INIBITÓRIOS).**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sheila Jorge Adad

CO-ORIENTADORES: Profa. Dra. Lucinda Calheiros Guimarães e Prof. Dr. Sebastião Tostes Júnior.

UBERABA
2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

J94a Junqueira, Iracema Saldanha
Análise comparativa da denervação no sistema nervoso entérico no megae-
sôfago chagásico *versus* idiopático na cárdia e nos terços esofágicos, em rela-
ção ao número total de neurônios e à proporção de neurônios sp+ (excitatórios)
e nos + (inibitórios)/ Iracema Saldanha Junqueira. -- 2017.
119 f. : il., fig., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientadora: Profa. Dra. Sheila Jorge Adad
Coorientadores: Lucinda Calheiros Guimarães e Sebastião Tostes Júnior

1. Doenças do esôfago. 2. Acalasia esofágica. 3. Doença de Chagas. I. Adad,
Sheila Jorge. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.329

IRACEMA SALDANHA JUNQUEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA DENERVAÇÃO NO SISTEMA
NERVOSO ENTÉRICO NO MEGAESÔFAGO CHAGÁSICO *VERSUS*
IDIOPÁTICO NA CÁRDIA E NOS TERÇOS ESOFÁGICOS, EM
RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE NEURÔNIOS E À PROPORÇÃO
DE NEURÔNIOS SP+ (EXCITATÓRIOS) E NOS+ (INIBITÓRIOS).**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

01 de setembro de 2017.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Sheila Jorge Adad – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^a. Dr^a. Débora D’Ávila Reis
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Roberto Oliveira Dantas
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Adilha Misson Rua Micheletti
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^a. Dr^a. Adriana Cartafina Perez-Bóscollo
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedicatória

Aos meus pais, Alceu e Luzia (*in memoriam*), pelos ensinamentos que nortearam minha vida.

Ao meu marido, Cesário e minhas filhas, Lygia e Beatriz, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis, que não foram raros, sempre acreditando nas minhas conquistas, que não são apenas minhas e que só aconteceram graças ao amor, dedicação e apoio que vocês me deram. Sou grata por tudo, sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

Agradecimentos.

A Deus porque é a luz, fortaleza, proteção e sabedoria que dá sentido à minha vida.

À Dra Sheila, minha gratidão por ter me dado um projeto ambicioso e impactante, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela infinita disponibilidade, pela impecável condução deste meu trabalho, pelas constantes demonstrações de sabedoria e que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade.

À minha co-orientadora, Dra Lucinda, pela colaboração inestimável.

Ao meu co-orientador, Dr. Sebastião Tostes Júnior, pela disponibilidade, auxílio e revisões nos meus textos.

À toda a equipe da Patologia, em especial, Luzia e Fernanda, com as quais tive o prazer de conviver e poder contar com o auxílio na realização da parte técnica deste trabalho.

Ao Prof. Benito André Silveira Miranzi, pela orientação na análise estatística e aos colegas Agrimaldo e Milena pelo auxílio nos gráficos.

À Dra Renata Etchebehere, pela amizade, incentivo, pelo convívio sempre prazeroso durante esse percurso.

Aos pacientes e familiares que autorizaram o estudo dos casos desta pesquisa.

A todas as pessoas dos mais diversos locais de trabalho, UFTM, Santa Casa, Gastrocentro, consultórios, pela convivência e paciência.

A todos os meus pacientes, responsáveis pelo desejo constante de buscar conhecimentos e ampliar conquistas.

Aos colegas médicos do serviço de Endoscopia Digestiva, pelos laços de amizade e pela contribuição diária ao meu aprimoramento profissional.

Aos residentes do serviço de endoscopia pelo desafio, pelas inquietações, pelo impacto positivo em ensinar e aprender.

Ao meu irmão Patricio, minhas irmãs, Eliana, Magda e Maria Eustáquia, meus sobrinhos, afilhados e enteados pelo apoio incondicional.

Apoio Financeiro: Fundação de amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG): financiamento de projeto nº APQ-01326-12 e Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

A verdadeira viagem não está em sair à procura de novas paisagens,
mas em possuir novos olhos.

Proust

Resumo

Introdução/objetivo: Estudos clínicos sugerem que, no megaesôfago idiopático (MEI), prevaleceria lesão da inervação inibitória, enquanto no megaesôfago chagásico (MEC), haveria comprometimento tanto da inervação inibitória quanto excitatória. O objetivo deste estudo foi analisar comparativamente a denervação intramural, quanto ao número total de neurônios e à proporção de neurônios excitatórios e inibitórios, na cárdia (Cd) e nos terços esofágicos, entre os grupos MEC, MEI e chagásico sem megaesôfago (CSME), em relação ao controle não chagásico (NC).

Casuística e Metodologia: Na primeira etapa, para a **avaliação geral da denervação**, foi feita contagem dos neurônios no plexo mientérico de **87 esôfagos**, sendo 62 de necrópsias e 25 esofagectomias (NC = 19; MEI = 18; MEC = 22 e CSME = 28 casos), em 5 cortes escalonados corados por HE em um anel do terço inferior (**TI**), médio (**TM**) e do superior (**TS**), e em 5 cortes longitudinais de cada lado da **Cd**. Na segunda etapa, foram analisados **28 casos** (NC = 6; MEI = 7; MEC = 7 e CSME = 8) para avaliação da proporção de neurônios **inibitórios** (NOS+) *versus* **excitatórios** (SP+), através de imuno-histoquímica.

Resultados: Não houve diferença estatisticamente significativa entre a denervação no MEC x MEI em nenhuma região, observando-se frequente aganglionose. Estes grupos mostraram denervação significativa em relação ao NC em todas as regiões. O grupo MEC mostrou denervação significativa em relação ao CSME em todas as regiões; porém, o MEI diferiu do CSME apenas na Cd e TI. Alguns casos de MEI ainda apresentavam frequentes neurônios, predominantemente no TM e TS. No grupo CSME a denervação foi muito variável, sendo significativa em relação ao NC no TI, TM e TS, mas não na Cd. Esses dados sugerem que a denervação na Cd pode ser mais importante para desencadear megaesôfago, assim como disfagia, que estava presente em dois casos de CSME com denervação maior que 95% apenas na Cd. Um caso de MEC discreto e recente também tinha denervação intensa apenas na Cd. Não foi evidenciada denervação seletiva em relação a neurônios NOS ou SP em nenhum grupo; porém, em um caso de MEI com denervação menos intensa e em um CSME com disfagia, houve maior perda de neurônios NOS que SP.

Discussão/Conclusão: Nos megas a destruição neuronal foi total (aganglionose), ou quase total, dos dois tipos de neurônios. A denervação intensa na parte distal parece ser o principal fator para a patogênese do megaesôfago; entretanto, é possível que o desequilíbrio entre a proporção de neurônios inibitórios *versus* excitatórios possa contribuir para a disfunção motora em alguns casos, sobretudo na cárdia, como parece ter ocorrido em um caso de MEI com denervação menos intensa que a usual e em um CSME com disfagia.

Palavras-chave: Megaesôfago chagásico. Acalásia idiopática. Plexo mientérico. Imuno-histoquímica neurônio inibitório - neurônio excitatório. Sistema nervoso entérico.

Abstract

Comparative analysis of denervation on the enteric nervous system in the chagasic versus idiopathic megaesophagus in cardia and thirds esophageal, in relation to the total number of neurons and the proportion of neurons SP+ (excitatory) and NOS+ (inhibitory).

Introduction/objective: Clinical studies suggest that inhibitory innervation injury would prevail in the idiopathic megaesophagus (IME), while in the chagasic megaesophagus (CME) there would be impairment of both inhibitory and excitatory innervation. The aim of this study was to analyze intramural denervation in relation to the total number of neurons and to the proportion of excitatory and inhibitory neurons, in the cardia (Cd) and in the esophageal thirds, between CME, IME and chagasic with no megaesophagus (CNME) groups, in relation to the non-chagasic control (NC).

Material and methods: In the first step, for the **general assessment of denervation**, the neurons were counted in the myenteric plexus of **87 esophagus**, 62 of necropsies and 25 esophagectomies (NC = 19; IME = 18; CME = 22 e CNME = 28 cases) in 5 HE-staggered cuts in a ring of the lower third (**LT**), medium third (**MT**) and upper third (**UT**), and in 5 longitudinal cuts on each side of the **Cd**. In the second step, **28 cases** (NC = 6, IME = 7, CME = 7 and CNME = 8) were analyzed by immunohistochemistry to assess the proportion of **inhibitory** neurons (NOS +) versus **excitatory** (SP +).

Results: There was no statistically significant difference between the denervation in the CME x IME in any region, with frequent aganglionosis. These groups showed significant denervation in relation to NC in all regions. The CME group showed significant denervation in relation to CNME in all regions; however, IME differed from CNME only in Cd and LT. Some cases of IME still had frequent neurons, predominantly in MT and UT. In the CNME group the denervation was very variable, being significant in relation to the NC in the LT, MT and UT, but not in the Cd. These data suggest that denervation in Cd may be more important for triggering megaesophagus, as well as dysphagia, that was present in two cases of CNME with denervation greater than 95% only in Cd. A case of discrete and recent CME also had intense denervation only in Cd. There was no evidence of selective denervation in relation to NOS or SP neurons in any group; however, in a case of IME with less intense denervation and in a CNME with dysphagia, there was a greater loss of NOS neurons than SP ones.

Discussion/Conclusion: In megas the neuronal destruction was total (aganglionose), or almost total, of the two types of neurons. The intense denervation in the distal part seems to be the main factor for the pathogenesis of the megaesophagus; however, it is possible that the imbalance between inhibitory and excitatory neurons may contribute to motor dysfunction in

some cases, especially in the cardia, as seems to have occurred in a case of IME with less intense denervation than usual and in a CNME with dysphagia.

Key words: Chagasic megaesophagus. Idiopathic achalasia. Myenteric plexus. Immunohistochemistry inhibitory neuron - excitatory neuron. Enteric nervous system.

Siglas

Cd - cárdia

CSME - chagásico (s) sem megaesôfago

EEI - esfíncter esofágico inferior

EES - esfíncter esofágico superior

HE - hematoxilina e eosina

MEC - megaesôfago chagásico

MEI - megaesôfago idiopático ou acalasia idiopática

NANC - não adrenérgico, não colinérgico

NC - não chagásico, controle não chagásico

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PCR - reação da polimerase em cadeia

SNE - sistema nervoso entérico

SP - substância P

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TGI - trato gastrointestinal

TI - terço inferior

TM - terço médio

TS - terço superior

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

VIP - peptídeo intestinal vasoativo

Sumário

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 20 |
| 1. O esôfago normal – anatomia, inervação e fisiologia | 22 |
| 2. Esofagopatia por denervação/megaesôfago | 29 |
| 2.1. Acalásia idiopática - megaesôfago idiopático | 31 |
| 2.2. Esofagopatia chagásica - megaesôfago chagásico | 42 |
| 2.3. A Importância de estudos comparativos entre megas | 47 |
| 2.4. Lacunas no conhecimento do MEC e MEI | 48 |
| HIPÓTESE | 50 |
| OBJETIVOS | 52 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 54 |
| 1. Material | 55 |
| 2. Metodologia | 55 |
| 2.1. Análise geral da denervação – contagem neuronal em cortes corados por HE | 56 |
| 2.2. Avaliação através de imuno-histoquímica da proporção de neurônios NOS positivos (inibitórios) <i>versus</i> SP positivos (excitatórios) | 56 |
| 2.3. Análise estatística | 58 |
| RESULTADOS | 59 |
| 1. Dados Gerais | 60 |
| 2. Análise geral da denervação – contagem neuronal em cortes corados por HE | 63 |
| 3. Avaliação através de imuno-histoquímica da proporção de neurônios NOS positivos (inibitórios) <i>versus</i> SP positivos (excitatórios) | 77 |
| DISCUSSÃO | 81 |
| 1. Dados Gerais | 82 |
| 2. Análise geral da denervação – contagem neuronal em cortes corados por HE | 84 |
| 3. Avaliação através de imuno-histoquímica da proporção de neurônios NOS positivos (inibitórios) <i>versus</i> SP positivos (excitatórios) | 86 |
| 4. Considerações gerais sobre a etiopatogênese do MEC x MEI e sobre a gênese da denervação nos megas | 87 |
| CONCLUSÕES | 92 |
| REFERÊNCIAS | 95 |
| ANEXOS | A |
| 1. Parecer substanciado (CEP) protocolo 2109 de 2011 | B |
| 2. Parecer substanciado (CEP) protocolo 2.060.268 de 2017 | I |

Introdução

Megaesôfago é uma dilatação esofágica permanente, que não decorre de obstrução mecânica, cujo substrato anátomo-funcional é uma lesão do sistema nervoso autônomo intramural (KÖBERLE, 1956; REZENDE, 1979, 1993; TAFURI, 1987; ADAD et al., 1991). Ocorre uma desordem motora no esôfago, havendo falha no relaxamento do esfíncter esofágico inferior (EEI) em resposta à deglutição (CASSELLA et al., 1964; GOLDBLUM et al., 1994).

O megaesôfago chagásico (MEC) é uma doença frequente na região central do Brasil, representando uma manifestação da forma digestiva da fase crônica da doença de Chagas (DIAS & COURA, 1997). Também tem prevalência significativa em outras regiões brasileiras, assim como em países vizinhos como Argentina, Chile e Uruguai (ANDRADE, 2000). Devido à intensificação de movimentos populacionais nas últimas décadas, a doença de Chagas tornou-se um desafio mundial; nos Estados Unidos, estima-se que atualmente de 300.000 a pouco mais 1 milhão de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* e que aproximadamente 72 mil pessoas infectadas por *T. cruzi* estejam vivendo na Europa. (COURA & VIÑAS, 2010, ECDC, 2014; DIAS et al., 2016).

O megaesôfago idiopático (MEI) ou acalásia idiopática, apesar de ser relativamente raro, é a principal forma de megaesôfago na Europa e América do Norte (SWAIN & ST PETER, 2003). Embora tenha sido descrito pela primeira vez em 1672 por Willis, até hoje sua etiologia não foi esclarecida (BIRGISSON *et al.*, 1997; DANTAS, 2003; KRAICHELY & FARRUGIA, 2006), tendo como hipótese mais provável infecção viral (HIRANO, 1999).

Os sinais e sintomas do MEC e do MEI são indistinguíveis: disfagia, regurgitação, pirose e emagrecimento, e ambos aumentam o risco de câncer de esôfago (DIAS & COURA, 1997; SWAIN & ST PETER, 2003).

Há alguns anos temos observado redução do número de casos de MEC na UFTM e um aumento, pelo menos relativo, do número de casos com sorologia e dados epidemiológicos negativos para a doença de Chagas (cerca de 5 a 10% dos casos de megaesôfago), que podem representar casos de MEI, o que nos levou a estudar comparativamente essas duas doenças. Por outro lado, considerando que o megaesôfago representa um estágio final desta morbidade, acreditamos ser interessante avaliar casos de chagásicos sem megaesôfago (CSME), como um possível grupo intermediário, que poderia contribuir para o conhecimento da patogênese dos

megas. Para entender melhor esses distúrbios, nos pareceu importante rever a anatomia e a fisiologia do esôfago normal e a patologia do MEC e do MEI.

1. O Esôfago Normal – Anatomia, Inervação e Fisiologia.

O esôfago é um tubo muscular oco, que conduz o alimento da orofaringe até o estômago, sendo anatomicamente dividido em três partes: cervical, torácica e abdominal. Começa em forma de fenda na abertura do esfíncter esofágico superior (EES), entre 15 e 18cm da arcada dentária superior, no nível da cartilagem cricoide e quinta ou sexta vértebra cervical. O corpo do esôfago atravessa o mediastino e o diafragma, atrás da traqueia e do brônquio principal esquerdo, e gira para a esquerda, passando atrás do coração e na frente da aorta. Termina na junção esofagogástrica, que está localizada 2 a 3 cm abaixo do músculo diafragmático, na altura da 11ª vértebra torácica, a cerca de 40 cm da arcada dentária superior (TENÓRIO et al., 2011; FERRARI Jr et al., 2009).

Segundo Gartner et al. (1997), o diâmetro interno do esôfago tem, aproximadamente, 25mm, porém sofre influência direta de estruturas contíguas, como aorta, brônquio fonte e átrio esquerdos, através da compressão. O lúmen do esôfago é revestido por epitélio pavimentoso estratificado não-ceratinizado com 0,5 mm de espessura, de coloração branco-acinzentada ou cinza-rosada, liso e brilhante. Os vasos submucosos são vistos como delicadas linhas irregulares de coloração avermelhada com orientação longitudinal, sendo mais evidentes no terço distal do órgão. A margem distal do EEI, em indivíduos normais, é demarcada pela junção escamocolunar, também denominada linha denteada, orla serrada ou linha Z (zeta). A porção abdominal do esôfago curva-se levemente para esquerda.

Com relação à distribuição de músculo liso e estriado na túnica muscular do esôfago, que é bastante variável de um indivíduo para outro, Meyer et al. (1986) verificaram, ao estudar 11 casos de autópsias, que somente o centímetro mais proximal era composto exclusivamente por músculo estriado. O comprimento médio do esôfago foi de 23cm e, em geral, nos 14cm mais distais havia apenas músculo liso; descreveram, ainda, que a região com proporção igual dos dois tipos de músculo ocorria em média a 18cm da extremidade distal. Esses dados são importantes, tendo em vista que existem diferenças entre a inervação da musculatura lisa e da estriada.

O EES é do tipo muscular estriado, sendo composto, principalmente, pelo músculo cricofaríngeo, embora fibras adjacentes do músculo constritor inferior da faringe e da camada muscular circular do esôfago proximal também participem da sua composição. A inserção

muscular bilateral do músculo cricofaríngeo à borda ínfero-lateral da cartilagem cricoide faz com que este esfíncter acompanhe os movimentos da laringe (LANG & SHAKER, 1997).

Por outro lado, a existência de um verdadeiro EEI anatômico, tem sido motivo de especulação ao longo dos anos, muito embora haja um consenso geral sobre a existência de uma barreira de pressão na junção esofagogástrica. Alguns autores referem um espessamento da camada circular do esôfago da porção mais distal (KAHRILAS, 1997), que, segundo Liebermann-Meffert et al. (1979), seria demarcado por um anel incompleto de espessamento muscular assimétrico, abaixo do diafragma e acima do ângulo de His, angulado obliquamente para cima, da pequena para a grande curvatura, estendendo-se por cerca de 3,1cm.

A regulação neural das funções gastrointestinais está a cargo de um controle nervoso extrínseco, exercido pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, e por um controle nervoso intrínseco, representado pelo sistema nervoso entérico (SNE), que é constituído pelos plexos mientérico e submucoso na parede do trato gastrointestinal (TGI) (FURNESS & COSTA, 1980; GUYTON & HALL, 2007). Os eventos motores, secretores e absorptivos do TGI devem ser integrados para permitir que os nutrientes contidos no alimento ingerido possam ser digeridos, com redução para partículas mais simples e, assim, serem absorvidos (SWENSON & REECE, 1996).

A **inervação extrínseca do esôfago** é formada predominantemente pelo nervo vago (X par craniano). Fibras que se originam no núcleo motor dorsal do vago inervam, indiretamente, a musculatura lisa do corpo do esôfago e do EEI, mediante sinapse com o plexo mientérico, antes de atingir a junção neuromuscular. Na parte estriada do esôfago e do EES ocorre inervação direta das placas neurais através de fibras do nervo vago que se originam no núcleo ambíguo (DIAMANT, 1989).

A **inervação intrínseca do esôfago** é constituída principalmente pelo plexo mientérico (Auerbach), pois o plexo submucoso é escasso no esôfago. O plexo mientérico, localizado entre as camadas musculares circular e longitudinal, é mais denso e desenvolvido na porção muscular lisa do esôfago. Destacam-se, neste plexo, dois tipos de neurônios efetores: os associados à excitação colinérgica, tanto para a camada muscular circular quanto para a longitudinal, e os neurônios associados à inibição não-adrenérgica não-colinérgica (NANC), primariamente para a muscular circular (CHRISTENSEN & ROBISON, 1982).

O **centro da deglutição**, localizado no tronco cerebral, controla o funcionamento motor do esôfago e da orofaringe. É constituído por **três componentes**: o sistema aferente, o de coordenação e o eferente. O **sistema aferente**, que recebe informação sensorial da periferia trazida pelos nervos cranianos V, VII, IX e X, tem como função iniciar a deglutição e a

sequência de eventos associados a ela, alterar a atividade motora vigente e atuar em reflexos gerados no corpo do esôfago e nos esfíncteres, não relacionados à deglutição. O **sistema de coordenação** é responsável pela iniciação da deglutição e pela organização da sequência de eventos a ela associada, assim como pela integração com outros centros medulares, como o centro da respiração. O **sistema eferente** leva a resposta motora do centro da deglutição à orofaringe e ao esôfago, através dos nervos cranianos V, VII, IX, X e XI (CAMACHO-LOBATO & CASTELL, 2001).

Com relação à fisiologia do esôfago, Camacho-Lobato & Castell (2001), em excelente estudo de revisão, referem que a função motora do esôfago, de modo simplificado e didático, pode ser dividida em duas situações: de repouso e durante a deglutição.

Durante a **situação de repouso** é necessário que o EES e EEI mantenham um fechamento tônico para evitar a intrusão de ar e o refluxo gastroesofágico, pois na inspiração existe uma pressão negativa em relação ao estômago e à faringe, em decorrência da localização torácica do esôfago (CAMACHO-LOBATO & CASTELL, 2001).

O EES apresenta pressão de repouso em torno de 100 mmHg no sentido ântero-posterior e 50 mmHg no sentido látero-lateral, sendo mantida por contínua estimulação nervosa (GERHARDT & CASTELL, 1983).

O tônus basal do EEI é de aproximadamente 10 a 45 mmHg em relação à pressão intragástrica. Embora exista controvérsia, há evidências de que o tônus basal deste esfíncter seja mantido por propriedades intrínsecas inerentes ao músculo circular liso desta região, ou seja, predominantemente pelo tônus miogênico (GOYAL & RATTAN, 1976). Todavia, também existe participação de tônus colinérgico, como pode ser evidenciado por redução da pressão do EEI durante a administração de atropina (DODDS et al., 1981) e injeção de toxina botulínica (PASRICHA et al., 1996). Acredita-se, atualmente, que o sistema nervoso autônomo simpático não exerça atividade importante sobre o EEI. **Aparentemente, tanto a inervação excitatória quanto a inibitória extrínseca do EEI estariam associadas ao nervo vago** (GOYAL & CHAUDHURY, 2008). Segundo Diamant (1989), a pressão de repouso do EEI é bastante dinâmica e com frequência se altera em virtude da sensibilidade do músculo liso local a fatores como hormônios, alimentos, agentes neurais e outros. Embora o relaxamento dependa principalmente da liberação de óxido nítrico (NO), também reduzem a pressão do EEI, a nicotina, agonistas B-adrenérgicos, dopamina, colecistoquinina, secretina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), adenosina, prostaglandina E, e inibidores da 5-fosfodiesterase. Por outro lado, receptores agonistas muscarínicos M2 e M3, agonistas alfa-

adrenérgicos, gastrina, substância P (SP) e prostaglandina F2 alfa, causam aumento da pressão do EEI (GOYAL & CHAUDHURY, 2008).

O corpo do esôfago não apresenta atividade motora de rotina durante a situação de repouso. Entretanto, atividade pode ser desencadeada por distensão do lúmen do órgão, não relacionada à deglutição (peristalse secundária), como por exemplo, no refluxo gastroesofágico (DIAMANT, 1989).

Durante a **situação de deglutição**, a atividade motora clássica do esôfago é iniciada, e compreende três fases distintas e coordenadas: oral, faríngea e esofágica. A fase oral é a única voluntária durante a deglutição, na qual são importantes os aferentes sensoriais. A fase faríngea é involuntária, dura menos de 1 segundo, depende da integridade dos nervos cranianos V, VII, IX e X, sendo acionada pelos estímulos aferentes provenientes da orofaringe para o centro da deglutição, que acionam o relaxamento do EES, dentre outros eventos. A fase esofágica completa o transporte do alimento até o estômago e depende da capacidade do corpo do esôfago em gerar ondas peristálticas com amplitude superior a 30mmHg (KAHRILAS et al., 1988) e do relaxamento completo do EEI (DIAMANT, 1997).

Camacho-Lobato & Castell (2001) comentam, também, em sua revisão da fisiologia, que três padrões de motilidade podem ocorrer no corpo do esôfago: peristalse primária, peristalse secundária e contrações terciárias. A **peristalse primária** é iniciada pelo centro de deglutição durante o ato de deglutição voluntária, propelindo o bolo alimentar por toda a extensão do esôfago, e dura entre 8 e 10 segundos. A **peristalse secundária** é a contração progressiva gerada no corpo do esôfago, em resposta à distensão do lúmen, não-relacionada à deglutição, iniciando no sítio do estímulo e progredindo distalmente para eliminar material refluído ou ingerido que não tenha sido eliminado pela peristalse primária. Peristaltismo primário requer integridade da inervação vagal; peristaltismo secundário pode ocorrer sem o vago intacto, porém requer integridade do SNE. **Contrações terciárias** são contrações não-peristálticas, cuja função fisiológica é desconhecida, e que podem ser observadas durante estudos radiológicos do esôfago.

A peristalse normal geralmente é determinada pelo aumento progressivo do período de latência entre a deglutição e a contração no sentido aboral. No músculo estriado, a progressão da onda peristáltica é coordenada pelo centro da deglutição através da excitação sequencial das fibras vagais. No músculo liso, esse mecanismo é bem mais complexo; uma onda inibitória iniciada pela deglutição, provavelmente resultante de estimulação NANC, precederia a contração peristáltica (SIFRIM, JANSSENS & VANTRAPPEN, 1992; CHAN & DIAMANT, 1976).

Estudos experimentais sugerem que a contração da camada muscular longitudinal determinaria apenas o encurtamento do esôfago, enquanto a contração da muscular circular desencadearia a onda peristáltica. A contração da camada longitudinal é mais prolongada e precede a contração da circular, sugerindo que a primeira fornece a base estrutural para a contração da segunda (CAMACHO-LOBATO & CASTELL, 2001).

O relaxamento do EEI é de origem neural e pode ser reproduzido por estimulação vagal ou por tetratoxina (GOYAL & RATTAN, 1976). Já foi demonstrado que o neurotransmissor envolvido não é nem colinérgico nem adrenérgico, visto que o bloqueio farmacológico dos receptores para esses neurotransmissores não influencia o relaxamento do EEI. Estudos indicam que esse neurotransmissor NANC seria o NO (SANDERS & WARD, 1992).

Com relação aos neurotransmissores, Goyal & Chaudhury (2008), em artigo de revisão, destacam que fibras pré-gangliônicas inervam o EEI (que tem natureza tônica miogênica) via neurônios mientéricos pós-gangliônicos. As fibras vagais pré-gangliônicas para os neurônios mientéricos excitatórios e inibitórios são colinérgicas. Elas exercem seus efeitos sobre os neurônios inibitórios através de receptores tanto nicotínicos quanto muscarínicos. Os neurônios excitatórios pós-gangliônicos podem excitar o EEI através de liberação de acetilcolina e SP, e o neurotransmissor inibitório é o NO. Com relação ao músculo liso do corpo do esôfago (que tem natureza fásica), fibras de neurônios pré-gangliônicos do núcleo dorsal do vago enviam estímulos aos neurônios inibitórios intramurais, que liberam NO, e aos excitatórios, que liberam acetilcolina.

Neurotransmissores são moléculas sinalizadoras liberadas ao nível das membranas pré-sinápticas e que ativam receptores nas membranas pós-sinápticas. Existem cerca de 100 neurotransmissores conhecidos, representados por três grupos: pequenas moléculas transmissoras, neuropeptídios e gases (MATSUDA, LEMOS & FEITOSA Jr., 2008). Podem participar do controle da motilidade gastrointestinal por agir diretamente sobre o músculo liso do TGI, causando contração ou relaxamento, ou, indiretamente, modulando a liberação do mediador inibitório ou excitatório (FURNESS & COSTA, 1987). A inibição da musculatura lisa do TGI pode ser encontrada em vários reflexos, como relaxamento descendente do esôfago, relaxamento do EEI durante a deglutição, relaxamento receptivo no fundo do estômago, relaxamento do piloro e duodeno, relaxamento durante o reflexo peristáltico, relaxamento da válvula ileocecal e relaxamento do esfíncter anal interno (FURNESS & COSTA, 1987).

No sistema nervoso entérico (SNE) de mamíferos já foram identificados vários mediadores e/ou candidatos a mediador inibitório NANC. Os que são liberados por ativação dos neurônios do sistema nervoso entérico e que podem causar, simultaneamente, resposta elétrica de hiperpolarização, potencial de junção inibitório, resposta mecânica de inibição e relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal são: NO, ATP, VIP, peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária, monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio e substâncias que ativam os receptores ativados por proteases, como a tripsina e a trombina (BURNSTOCK, 1970; GOYAL, RATTAN & SAID, 1980; BULT et al., 1990; SCHWÖRER et al., 1992; RATTAN e CHAKDER, 1993; COCKS et al., 1999; LOWICKA & BELTOWSKI, 2007).

O **VIP** é um neuropeptídeo que pode atuar como potente inibidor diretamente na musculatura do EEI em gambás e outras espécies. Tem sido localizado nos neurônios intramurais do plexo mientérico, pode ser liberado após estimulação elétrica do nervo vago (GOYAL & CHAUDHURY, 2008), modulando o relaxamento não apenas do esfíncter, mas também da parede do esôfago distal, e apresentar propriedade anti-inflamatória (SREEDHARAN et al., 1995; POZO & DELGADO, 2004; GONZALEZ-REY et al., 2006; PARKMAN, PAGANO & RYAN, 1997).

O **NO** é um gás com o menor peso molecular de qualquer produto de secreção celular de mamíferos, sua meia vida é curta e a especificidade de suas reações é mínima (NATHAN, 1992). É citotóxico e vasodilatador, e modula reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo (ADAMS, 1996). A atividade do NO foi relatada em endotélio, cerebelo, nervos não adrenérgicos não colinérgicos, macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrintestinal e miocárdio (KIECHELE & MALINSKY, 1993; BARRACHINA, PANES & ESPLUGUES, 2001; SHAPIRA, KADAR & WEISSMAN, 1994).

O NO é considerado um mediador inibitório dos neurônios entéricos, conhecidos como neurônios nitrérgicos (BULT et al., 1990). No TGI, o NO pode mediar o relaxamento NANC da musculatura longitudinal e circular do esfíncter esofágico, estômago, duodeno, intestino delgado e esfíncter anal interno (ADAMS et al., 1996).

A NOS (óxido nítrico sintase) é a enzima responsável pela formação do NO. Três isoformas de NOS são descritas, sendo uma NOS induzida e duas constitutivas, a endotelial e a neuronal (KIECHELE e MALINSKY, 1993; WONG & MARSDEN, 1996). Algumas isoformas da NOS possuem um co-fator adicional, a calmodulina. Na presença de elevada concentração de cálcio, a calmodulina liga-se a certas NOS, ativando-as. A isoforma I ou

NOS neuronal (nNOS), é cálcio-calmodulina dependente, está presente em neurônios do sistema nervoso central e periférico, mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético, células β pancreáticas e outros. Regula a transmissão sináptica no sistema nervoso central; atua na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos (FÖRSTERMANN et al., 1994).

A **SP** pertence à família das Taquicininas, assim como as neurocininas e GRP/bombesina. Foi descrita em 1931 como um fator presente no cérebro e intestinos, que estimulava o músculo liso e reduzia a pressão arterial. Em 1951, a SP foi detectada em elevadas concentrações nas raízes nervosas dorsais da medula espinhal, sugerindo estar envolvida na percepção da dor (MARTINS, 1991). A SP é secretada por células enterocromafins presentes em todo o TGI, principalmente no fundo gástrico, e por neurônios nos plexos nervosos entéricos, atuando de modo parácrino e neurócrino, respectivamente (SMITH et al., 1988). Ela estimula a musculatura lisa intestinal, por meio de neurônios motores, inibe a secreção ácida do estômago e estimula a secreção de pepsina pelas células principais das glândulas gástricas, por meio de neurônios secretores (GANONG, 1998). Sua ação também implica em vasodilatação, estimulação da secreção salivar, inibição da secreção de insulina pelo pâncreas (POLAK et al., 1993; REID, 1998) e estimulação secreção intestinal, particularmente no jejuno (COUPAR & DI IULIO, 2003).

Várias pesquisas sobre fisiologia, eletrofisiologia e inervação da muscular têm sido feitas no esôfago; entretanto, estudos relacionados à morfologia dos neurônios intramurais do esôfago são escassos. Não é bem conhecida nem mesmo a proporção de neurônios inibitórios e excitatórios ao longo do esôfago humano normal. Encontramos apenas o trabalho de Singaram et al. (1994) que avaliaram de modo sistematizado a proporção de neurônios inibitórios e excitatórios na parte normal do esôfago de 8 pacientes com carcinoma, em amostras que distavam entre 5 e 15cm da junção escamocolunar. Esse sofisticado estudo foi feito através de cortes por congelamento (criomicrotomia), com o objetivo de avaliar a inervação nitriérgica e peptidérgica do esôfago normal, utilizando diversas técnicas: imunofluorescência, imuno-histoquímica e histoquímica. Verificaram que mais da metade dos neurônios mientéricos do esôfago eram nitriérgicos (continham NOS). Neurônios não-nitriérgicos podem incluir neurônios peptidérgicos e colinérgicos. Os neurônios nitriérgicos foram mais frequentes que os neurônios peptidérgicos: cinco vezes mais abundantes que os VIP neurônios e seis vezes mais que os neurônios CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina). Do total de neurônios, cerca de **55% foram positivos para NOS**, 15% para VIP, 19% para Galanina, 12% para CGRP e **8% para SP**.

Considerando todos os neurônios nitrérgicos (NOS+), houve marcação concomitante de VIP em 14%, de Galanina em 10% e não houve marcação concomitante para SP. Além disso, verificaram que os neurônios nitrérgicos recebiam, frequentemente, terminações contendo vários peptídeos: VIP (96%), CGRP (80%) e Galanina (59%); porém, raramente, de SP (0,9%). A abundância de terminações de VIP e CGRP em neurônios nitrérgicos sugere um sistema regulatório no qual VIP e CGRP poderiam agir controlando a liberação de NO dos neurônios nitrérgicos. Por outro lado, o número de fibras nitrérgicas que inervam a muscular circular do esôfago foi similar ao número de fibras nervosas positivas para VIP e CGRP. Segundo esses autores, esses dados sugerem a possibilidade de uma ação simultânea, de peptídeos e NO como co-transmissores.

Com base neste estudo, acreditamos que avaliar neurônios NOS+ e SP+, principais marcadores imuno-histoquímicos dos neurônios mientéricos inibitórios e excitatórios do esôfago, respectivamente, podem trazer informações para a patogenia do megaesôfago.

Embora seja um estudo basicamente de patologia do cólon, o trabalho de Larsson et al. (1995) nos chamou a atenção em relação à fisiologia e patogenia, porque, de certa forma, o MEC, que apresenta afilamento na parte distal, lembra o segmento agangliônico da doença de Hirschsprung. Esses autores avaliaram o plexo mientérico e a túnica muscular nos segmentos gangliônico e agangliônico em 9 pacientes com esta doença. Observaram, no **segmento gangliônico** (proximal), mais de 50% de neurônios mientéricos positivos para NOS e frequentes fibras nervosas na muscular, positivas para NOS e VIP. Verificaram, no **segmento agangliônico** (distal), ausência de neurônios no plexo e, também, ausência de fibras nervosas NOS+ na muscular; entretanto, havia persistência das fibras nervosas VIP+. Explicam que, provavelmente, as fibras nervosas NOS+ faltam na muscular e no plexo mientérico do segmento agangliônico porque seriam quase todas intrínsecas do SNE, ou seja, teriam origem nos neurônios intramurais; entretanto, como as VIP+ são, provavelmente, de origem extrínseca, ainda são vistas neste segmento. Embora exista concomitância de VIP e NOS em fibras nervosas no intestino normal, que atuam de modo sinérgico no relaxamento NANC da muscular, provavelmente, o VIP, sozinho, não conseguiria efetuar o relaxamento.

2. Esofagopatia por denervação/megaesôfago.

As alterações da inervação do esôfago desencadeiam distúrbios motores caracterizados por anomalias no peristaltismo do corpo do esôfago, associadas a alterações no

funcionamento do EEI. Dentre os distúrbios motores esofagianos decorrentes de denervação, destacam-se o MEC e o MEI (REZENDE-FILHO, 2001).

Dantas (2003), em um artigo com ampla revisão sobre MEC e MEI, destaca que o termo acalásia refere-se à doença motora do esôfago, e o termo megaesôfago, à sua consequência. Embora existam várias semelhanças entre MEC e MEI, algumas diferenças têm sido observadas. Estudos anatomopatológicos mostram denervação similar, sendo em geral intensa tanto no MEC (KÖBERLE, 1963a, b e 1968; ADAD, 1989; ADAD et al., 1991), quanto no MEI (KÖBERLE, 1963b; GOLDBLUM et al., 1994). Ganglionite é comum a ambas as doenças, porém é mais intensa no MEC que no MEI; por outro lado, miosite é usual e em geral intensa no MEC, sendo raramente vista no MEI (SILVEIRA, 2012). Os estudos de fisiopatologia descrevem que, no MEI, ocorre mais intensamente lesão dos neurônios inibitórios do plexo mientérico, enquanto os neurônios excitatórios teriam lesão em diferentes graus de intensidade (HIRANO, 1999), ocasionando variações na apresentação desta doença (HIRANO, 2001). MEC é a expressão mais avançada da forma digestiva da doença de Chagas no esôfago. Entretanto, a intensidade da denervação do plexo mientérico determina grande variação na apresentação da esofagopatia chagásica (KÖBERLE, 1963a, 1968; DANTAS, 1998, 1999; DE OLIVEIRA et al., 1995). Por outro lado, é possível que também exista um espectro de variação de esofagopatia idiopática e que o MEI represente a forma mais grave desta afecção. Para Castell (1979), a acalásia e o espasmo difuso representariam os extremos dos distúrbios motores idiopáticos do esôfago e, no meio, estariam o esôfago em quebra-nozes e os distúrbios inespecíficos da motilidade esofágica. As alterações manométricas vistas nessas condições sugerem problemas da inervação esofágica, lembrando que alterações dos neurônios mientéricos podem prejudicar reflexos inibitórios envolvidos no controle da motilidade esofágica (TRONCON & DANTAS, 2001).

Os estudos de fisiopatologia e manometria sugerem que, no MEI, prevaleceria a lesão da inervação inibitória e, no MEC, haveria comprometimento tanto da inervação inibitória quanto da excitatória. Segundo Hirano (1999), se esta hipótese for verdadeira, a pressão do EEI deveria ser alta no MEI, e normal ou baixa no MEC. Vários estudos confirmam que a pressão do EEI está aumentada no MEI (COHEN, LIPSHUTZ & HUGHES, 1971; DANTAS et al., 1990; FELDMAN, 1988; HOLLOWAY et al., 1986; LEMME et al., 2001). Todavia, no MEC/doença de Chagas, a pressão é variável. Há trabalhos que descrevem pressão diminuída no EEI (DANTAS et al., 1990; PADOVAN et al., 1980), outros, pressão normal (CSENDES, STRAUSZER & URIBE, 1975; DANTAS, DEGHAIDE & DONADI, 2001; HEITTMAN &

ESPINOZA, 1969; LEMME et al., 2001) e, alguns, pressão aumentada no EEI (MORAES FILHO, KAHATSU & BATARELLO, 1986; PAULA-COSTA & REZENDE, 1978).

Dantas (2003) destaca, em sua revisão, as evidências da integridade ou de comprometimento apenas parcial da inervação excitatória no MEI: existe hipersensibilidade do EEI à gastrina (COHEN, LIPSHUTZ e HUGHES, 1971; HOLLOWAY et al., 1986), diminuição da pressão do EEI com a injeção de toxina botulínica no esfíncter (PASRICHA et al., 1996), manutenção das respostas ao edrofônio (HOLLOWAY et al., 1986) e à atropina (HOLLOWAY et al., 1986), e predomínio da inervação alfa-adrenérgica em detrimento da inervação beta-adrenérgica (BRUCH et al., 1978). Existe também redução do número de fibras VIP+ (AGGESTRUP et al., 1983; SIGALA et al., 1995), perda funcional dos receptores inibitórios da dopamina-D1 e manutenção dos receptores excitatórios-D2 (SIGALA et al., 1995). Na doença de Chagas ocorre hipossensibilidade do EEI à gastrina (PADOVAN et al., 1980), predomínio da inervação alfa-adrenérgica em relação à inervação beta-adrenérgica (DA FONSECA, 1999), resposta parcial à atropina (DANTAS, 1988; DANTAS et al., 1987) e à toxina botulínica (BRANT et al., 2003). Nas duas doenças já foi demonstrada perda da inervação NANC inibitória do esôfago (MEARIN et al., 1993; DANTAS, 2003).

O componente mais importante para o controle da pressão do EEI é a ação própria da musculatura; além da inervação colinérgica (HIRANO, 1999), do efeito de outros neurotransmissores e, provavelmente, da ação de hormônios (SIGALA et al., 1995). No MEI, haveria hipersensibilidade do EEI à gastrina, que, atuando na inervação colinérgica excitatória, sem o antagonismo da inervação inibitória, desencadearia resposta aumentada (COHEN, LIPSHUTZ e HUGHES, 1971). No caso do MEC, observou-se hipossensibilidade à gastrina (PADOVAN et al., 1980), reforçando a ideia de comprometimento da inervação excitatória, embora os níveis de gastrina circulantes estejam aumentados (TRONCON et al., 1984; TRONCON et al., 1985), o que não ocorre no MEI (COHEN, LIPSHUTZ e HUGHES, 1971). A colecistocinina, que no esôfago normal provoca diminuição da pressão por agir na inervação inibitória, induz grande aumento da pressão no MEI, devido à ação direta na musculatura do EEI (DODDS et al., 1981).

2.1. Acalásia idiopática - megaesôfago idiopático

Embora a descrição clínica pioneira do distúrbio motor esofágico primário tenha sido feita em 1672 por Willis e, em 1881, Miculilzk tenha utilizado o termo cardioespaço, foi

Hurst, em 1914, quem empregou a denominação de acalásia, sugerindo que o problema não decorria de espasmo, mas, sim, da falta de relaxamento da cárdia (REZENDE-FILHO, 2001).

O diagnóstico definitivo de acalásia é manométrico (RICHTER, 1995). A ausência de peristaltismo em resposta à deglutição, é condição necessária e absoluta para que se estabeleça o diagnóstico manométrico de acalásia (KAHRILAS, CLOUSE & HOGAN, 1994). Esse método é ainda mais relevante quando existem dúvidas no exame radiológico contrastado do esôfago e, nos casos iniciais, quando não há dilatação esofagiana evidente (RICHTER, 1995; CASTELL, GIDEON & CASTELL, 1993; REZENDE-FILHO, 2001). Isso reforça a observação de Dantas (2003), que o termo acalásia refere-se à doença motora do esôfago e, megaesôfago, à sua consequência.

A endoscopia tem importante papel de afastar doenças malignas como causa de acalásia. O tratamento é estritamente paliativo. Opções terapêuticas clínicas e cirúrgicas (dilatação pneumática, miotomia cirúrgica, agentes farmacológicos) visam reduzir a pressão no EEI, facilitando o esvaziamento do esôfago (FARROKHI & VAEZI, 2007).

É uma doença rara com incidência de aproximadamente 1:100.000 e prevalência de 1:10.000. A incidência aumenta com a idade, com um pico maior na sétima década, embora seja observado um pico menor entre 20-40 anos (KRAICHELY & FARRUGIA, 2006).

As causas da destruição dos neurônios intramurais ainda não são totalmente conhecidas, porém esta destruição parece restrita ao plexo do esôfago (PRESSMAN & BEHAR, 2017). Possivelmente existem etiologias diversas, tais como causas auto-imunes, infecciosas e degenerativas, além da participação de fatores genéticos. Alguns casos poderiam ter associação com infecções por vírus, como herpes-zoster (ROBERTSON, MARTIN & ATKINSON, 1993) e sarampo (JONES et al., 1983). Fatores genéticos também poderiam explicar casos em gêmeos idênticos (STEIN & KNAUER, 1982) e na síndrome de Allgrove (STUCKEY et al., 1987). A presença de anticorpos antineurônios sugere agressão auto-imune (VERNE, SALLUSTIO e EAKER, 1997). No entanto, Moses et al. (2003), após analisarem soro de 45 pacientes com MEI e 16 com doença do refluxo gastroesofágico comparados a 22 controles normais, questionaram essa relação, pois os dados obtidos sugeriam que os anticorpos antineurônios eram gerados em resposta à lesão tecidual no MEI e no refluxo. Concluíram que os anticorpos antineurônios no MEI representam um epifenômeno e não um fator causal (MOSES et al., 2003). Outros autores acreditam que o MEI, embora seja mediado por mecanismos autoimunes, seria desencadeado por resposta retardada a infecções virais em indivíduos geneticamente susceptíveis (BOECKXSTAENS, 2008; GHOSHAL, DASCHAKRABORTY & SINGH, 2012; PRESSMAN & BEHAR, 2017), ou seja,

predispostos a desenvolverem uma resposta auto-inflamatória crônica (FURUZAWA-CARBALLEDA et al., 2016).

Quanto aos estudos anatomopatológicos, destaca-se o trabalho de Cassella et al. (1964) pela multiplicidade de técnicas realizadas há mais de 50 anos. Segundo esses autores, após a descrição pioneira de Rake, de 1926, de ausência ou degeneração de neurônios mientéricos, alguns pesquisadores descreveram neurônios em número e aspecto normal no MEI. Esses dados conflitantes geravam uma pergunta: seria a denervação, nesta doença, primária ou secundária?

Com o intuito de responder a essa questão, Cassella et al. (1964) analisaram 34 casos de MEI (9 necrópsias e 25 fragmentos de biópsias de cardiomiectomia) comparando-os a 59 esôfagos normais de necrópsias. Nos casos de necrópsias, realizaram contagem neuronal no plexo mientérico em cortes transversais de todo o esôfago a cada 2cm. Observaram “contagem neuronal numerosa” nos esôfagos normais, não influenciada pela idade, e infiltrado mononuclear no plexo mientérico. Nos 9 casos de necrópsias de MEI encontraram redução de aproximadamente 50% do número de neurônios mientéricos na parte distal (estreitada); em 7 desses 9 casos, notaram denervação ainda mais intensa no corpo esofágico (segmento dilatado); entretanto, nos outros 2 casos não encontraram denervação na parte dilatada. Descrevem que um desses pacientes manifestou sintomas de MEI apenas 1 ano antes do óbito e, o outro, embora tivesse sintomas há 15 anos, não apresentava dilatação esofágica e tinha diagnóstico clínico de cardiospasma. Esses autores descrevem impressões gerais, sem explicitar exatamente as metodologias empregadas para as contagens neuronais. Todavia, apresentam dados interessantes com relação às biópsias de cardiomiectomia, apesar deste tipo de amostra ter um tamanho limitado em relação à esofagectomia. Encontraram neurônios em 7 dos 19 casos de MEI nos quais haviam sido feitos estudos da motilidade esofágica, sendo que encontraram neurônios em 50% dos pacientes que tinham sintomas há menos de 10 anos e constataram a ausência dessas células (aganglionose) em todos os casos com mais de 10 anos de sintomas. Verificaram que as alterações na motilidade esofágica correlacionaram melhor com as alterações dos neurônios e com a duração dos sintomas do que com o grau de dilatação esofágica. Neste amplo estudo, avaliaram, ainda, o músculo esofágico e o nervo vago por microscopia comum de luz e microscopia eletrônica e descreveram que as alterações lembravam degeneração walleriana. Estudaram também o núcleo motor dorsal do vago; porém, esta análise foi feita somente em 2 casos de MEI e em um único caso controle; apesar disso, enfatizaram a intensa redução neuronal no núcleo dorsal do vago (em torno de 60%). Estranhamente, apesar de todos os achados citados nas análises neuronais do esôfago em que

avaliaram maior número de casos e encontraram maior intensidade de denervação, valorizaram mais os dados encontrados na análise dos poucos casos do núcleo dorsal do vago. Concluíram sugerindo a hipótese que as lesões extra-esofágicas no MEI, quer sejam do nervo vago e/ou do seu núcleo motor dorsal, poderiam ser o sítio primário de alterações, e que as lesões esofágicas poderiam ser secundárias.

Por outro lado, Smith (1970), descreve não ter encontrado lesão no nervo vago. Essa autora examinou 6 casos de cardiomiectomia e 1 caso de necrópsia de MEI e não encontrou neurônios em nenhum caso. Embora não deixe clara a metodologia empregada no caso de necrópsia, refere ter analisado toda a extensão do esôfago e descreve denervação completa, uniforme e ausência de inflamação.

Misiewicz et al. (1969) realizaram um excelente estudo associando clínica, histopatologia e resposta farmacológica *in vitro* em faixas do músculo do EEI de 16 casos de MEI submetidos à cardiomiectomia, comparados a 13 controles. O estudo farmacológico indicou que, nos controles, a inervação intrínseca da muscular circular continha neurônios inibitórios adrenérgicos que atuavam através de receptores beta-adrenérgicos. A muscular longitudinal parecia diferente, pois, além da atividade relaxante beta-adrenérgica, também possuía atividade contrátil colinérgica. No MEI parecia haver perda da atividade relaxante beta-adrenérgica em ambas as musculares do esfíncter. Nos 14 casos de MEI em que foi possível a avaliação histopatológica (HE), constataram aganglionose em 9 (65%) casos, hipoganglionose intensa em 3 (21%) casos, alterações degenerativas nos neurônios, inflamação e fibrose no plexo gástrico. Em 2 (14%) casos, o número de neurônios por gânglio era aparentemente normal: um desses pacientes tinha sintomas há apenas 1 ano, apresentava ausência de atividade peristáltica, porém sem dilatação esofágica; o outro tinha sintomas há 9 anos e dilatação moderada do esôfago. Referem que houve melhor correlação da intensidade da denervação com o grau de dilatação que com o tempo de história da doença. Seus dados do estudo farmacológico, de modo geral, concordavam com os de Troncone et al. (1957) e Adams et al. (1961), porém não confirmavam os dados histopatológicos desses autores. Por outro lado, seus resultados histopatológicos confirmavam os de Hurst & Rake (1930) e de Cross (1952), com relação à denervação. Concluíram que seus resultados farmacológicos e histológicos indicavam que o esfíncter cárdico estaria denervado no MEI.

Adams, Brain & Troncone (1976) descreveram denervação intensa na quase totalidade dos casos de MEI examinados, embora sem detalhar a avaliação quantitativa. Examinaram, também, casos de espasmo esofágico e sugerem que essa alteração poderia representar um estágio inicial ou uma expressão incompleta de MEI.

Aggestrup et al. (1983) descreveram intensa redução de fibras nervosas imunorreativas para VIP na muscular de casos de MEI e argumentam que essa redução poderia causar ou contribuir para o relaxamento incompleto e aumentar a pressão de repouso do EEI. Entretanto, esses autores, como vários outros, não avaliaram a inervação excitatória.

Posteriormente, Aggestrup et al. (1985) avaliaram também SP, além de VIP em casos de cardiomiectomia de MEI e doença do refluxo gastroesofágico. Encontraram redução de VIP nos extratos teciduais e, também, de fibras nervosas na muscular de casos de MEI e o inverso nos casos de refluxo. Observaram a mesma tendência com relação à SP, porém a diferença não foi estatisticamente significativa.

Csends et al. (1985; 1992) também encontraram denervação intensa na parte distal do esôfago ao examinaram fragmentos de cardiomiectomia de casos de MEI e um caso de MEC. No primeiro estudo (17 casos) não detalham a metodologia de avaliação neuronal (CSEENDS et al., 1985). No segundo, aumentaram o número de casos de MEI (33 casos) e continuaram com um caso de MEC; a metodologia empregada neste estudo de fragmentos foi a de contagem de neurônios por gânglio. Referem aganglionose em 91% dos 34 casos; redução em 6% e número normal em 3% dos casos (CSEENDS et al., 1992).

Goldblum et al (1994) estudaram 42 casos de esofagectomias de MEI (dolicoesôfagos ou reaparecimento de sintomas de acalásia após cardiomiectomia) e 7 esôfagos normais obtidos de necrópsias. Seccionaram o esôfago longitudinalmente, em fragmentos com 2 a 3cm de extensão, metodologia esta diferente da empregada nos estudos anatomopatológicos de MEC (KÖBERLE, 1963a, b, 1968; ADAD et al., 1991). Descreveram afunilamento do MEI na transição cardioesofágica, hipertrofia da camada muscular e ausência ou diminuição significativa de neurônios no plexo mientérico. Entretanto, não encontraram relação estatística entre a intensidade da denervação e o grau de dilatação esofágica no exame radiológico. Encontraram, também, inflamação no plexo mientérico com predomínio de linfócitos e eosinófilos nos casos de MEI, e infiltrado de linfócitos menos intenso e homogêneo nos controles. Linfócitos no citoplasma de neurônios, que denominaram de ganglionite, não foi encontrada, por isso referem que a destruição neuronal não parecia estar em atividade. Não houve relação entre a intensidade da inflamação no plexo mientérico e a presença ou não de neurônios. Descreveram focos de fibrose na camada muscular em 29 casos; atribuíram essa fibrose à isquemia decorrente da maior demanda de fluxo sanguíneo pelo músculo hipertrofiado.

Goldblum, Rice e Richter (1996) realizaram outro estudo em MEI, no qual foram utilizados fragmentos de 11 cardiomiectomias e compararam com 8 esôfagos normais obtidos

de necrópsias. Dois casos de MEI apresentaram denervação completa, 6 tinham denervação intensa (raros neurônios) e, em 3 casos, as contagens neuronais foram normais. O resultado da contagem neuronal foi expresso em número de neurônios por campo de grande aumento, porém não especificaram quantos campos foram contados de cada caso. Encontraram inflamação no plexo mientérico em todos os 11 casos de MEI, sendo moderada ou intensa em 6 e, no grupo controle, descreveram que alguns casos apresentavam discreto infiltrado de linfócitos.

Wattchow & Costa (1996) analisaram 12 casos de MEI submetidos à cardiomiectomia, através de imuno-histoquímica (enolase neurônio específica, VIP, SP, neuropeptídeo Y e encefalina) para avaliar fibras nervosas. Referem que nos controles havia frequentes fibras positivas para VIP e neuropeptídeo Y, porém havia raras fibras positivas para SP e encefalina. Nos casos de MEI, observaram redução intensa de fibras nervosas reativas para VIP e neuropeptídeo Y, sugerindo lesão de neurônios inibitórios motores para inervação da muscular. No entanto, também observaram redução global das fibras enolase positivas, indicando que havia lesão de outra população de fibras como, por exemplo, dos neurônios motores colinérgicos excitatórios. Encontraram neurônios no plexo em apenas 2/12 casos. Na parte gástrica a inervação era normal. Concluem que no MEI existe lesão de todos os neurônios intramurais; entretanto, as fibras nervosas extrínsecas parecem intactas.

Lui et al. (1997) analisaram a distribuição de NOS no sistema nervoso entérico de 13 crianças com MEI. Verificaram a quase inexistência de fibras NOS positivas na muscular e no plexo mientérico no esôfago e na cárdia e quantidade normal no piloro. Porém, não estudaram inervação excitatória.

De Giorgio et al. (1999) avaliaram qualitativa e quantitativamente neurônios nitrérgicos nos componentes esofágico e gástrico do EEI em 6 casos de MEI submetidos à cardiomiopatia, comparados a 8 controles com câncer de esôfago. Analisaram, em cada caso, seis faixas da muscular contendo plexo mientérico, cada uma com extensão de 2cm, retiradas nos bordos de miotomia na pequena curvatura, sendo duas no esôfago distal e outras duas da parte adjacente do estômago, representando a região do EEI, além de outras duas amostras do fundo gástrico. Utilizaram criomicrotomia e histoquímica para NADPH-diaforase. Descreveram, na avaliação qualitativa de neurônios ao HE, diminuição ou ausência no MEI e ausência de inflamação. Observaram, também, redução de fibras nervosas no MEI. Na análise quantitativa de neurônios nitrérgicos (contagem neuronal) constataram ausência de neurônios (aganglionose), ou denervação intensa, em média, de 99% no lado esofágico do EEI (0,2

neurônios/corte histológico no grupo MEI *versus* 15 neurônios no grupo controle) e, de 83%, no lado gástrico. No fundo gástrico a denervação média foi de 70%.

Raymond, Lach e Shamji (1999) realizaram estudo anatomopatológico de 16 biópsias e uma esofagectomia de MEI, com o objetivo de estudar a etiopatogênese do MEI. Utilizaram cortes imunocorados para neurofilamentos NF70 e NF200, proteína S100 e enolase neurônio específica, CD20, CD43, CD68 e CD45RO. Infiltrado inflamatório de intensidade variável estava presente ao longo dos fascículos nervosos e em torno de neurônios em 90% dos casos, predominando linfócitos T. Referem que, nos fragmentos das biópsias de MEI, não detectaram perda convincente de neurônios, porém, no caso de esofagectomia, constataram ausência total de neurônios e significativa perda de fibras nervosas. O grupo controle mostrou plexos normais, sem nenhuma inflamação. Concluíram que a degeneração e a significativa perda de fibras nervosas associadas ao infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos T em torno do plexo mientérico apoiavam o conceito de inflamação, provavelmente autoimune, na etiologia da lesão do sistema nervoso autônomo no MEI.

Khelif et al. (2003) também avaliaram fragmentos obtidos por cardiomiectomia de 10 crianças com MEI, portadoras de síndrome de Allgrove. Observaram ausência ou diminuição de NOS em todos os casos, mas também não utilizaram marcadores para neurônios excitatórios.

Dados discordantes em relação à interpretação da denervação foram aventados por Gockel et al. (2006). Esses autores analisaram o plexo mientérico de 17 casos de MEI, sendo 8 casos de esofagectomia e 9 de cardiomiectomia. Utilizaram coloração por HE, Elástica Van Gieson e PAS; imuno-histoquímica para linfócitos B e T, neurofilamentos, SP, PGP 9.5, S-100, miosina, desmina e actina de músculo liso. Referem denervação significativa em 76% dos 17 casos, intensa fibrose no músculo liso em 59% e miopatia das células musculares lisas em 29%. Observaram inflamação na mucosa e muscular e, em 3 casos, acentuada permeação de eosinófilos na muscular própria. Reações inflamatórias intensas predominaram nos pacientes com longa história de acalásia (>10 anos), assim como fibrose endomisial intensa. Concluíram que a histopatologia desses casos sugeria que a redução das células ganglionares intramurais poderia ser secundária à inflamação por mecanismos autoimunes ou processos degenerativos crônicos da inervação central ou periférica e, estranhamente, levantaram ainda a hipótese de que a lesão primária poderia também ser uma miopatia.

Gockel et al. (2008) avaliaram também a redução de células intersticiais de Cajal e a imununorreatividade para NOS em pacientes com MEI. Embora tenham avaliado 42 casos de cardiomiectomia e 11 de esofagectomia por MEI, a correlação entre NOS e Células de Cajal

foi feita em 40 casos apenas do grupo de cardiomiectomia, comparados a 6 controles. A avaliação foi semi-quantitativa com proposta de separação em 4 graus (I – aspecto normal ou redução mínima; II – redução evidente com distribuição irregular das estruturas; III – redução intensa com raras estruturas positivas; IV – sem reação). No entanto, para a análise estatística, sem explicar a razão, juntaram I + II e III + IV, de modo que usaram, na realidade, apenas dois graus, aumentando a imprecisão. Referem redução intensa ou total de NOS em 72,5% dos casos e de Células de Cajal em 59,5%; relatam que houve correlação entre essas variáveis e que a redução de ambas poderia explicar a falta de relaxamento do EEI. Afirmaram, ainda, que houve correlação entre a redução dessas células e a duração dos sintomas.

Kilic et al. (2007) avaliaram semi-quantitativamente fibras nervosas na muscular e células inflamatórias no plexo através de imuno-histoquímica em 12 casos de cardiomiectomia por MEI. Referem que o subgrupo com tempo mais curto de doença tinha menos inflamação e mais perda de fibras nervosas, podendo representar uma forma mais agressiva da doença.

Clark et al. (2000) avaliaram o infiltrado inflamatório no plexo gástrico de 9 casos na fase precoce (cardiomiectomia) e 13 casos na fase final de MEI (esofagectomia), através de imuno-histoquímica. Observaram predomínio de linfócitos CD3 e CD8 que expressavam, frequentemente, TIA-1 (marca células citotóxicas ativadas e em repouso); descreveram que, aparentemente, havia redução da expressão de CD8 com a progressão da doença. Concluem que o MEI é uma doença imuno-mediada, embora o antígeno desencadeador ainda seja um enigma.

Villanacci et al. (2010) realizaram estudo imuno-histoquímico do plexo gástrico comparando amostras de 12 casos de MEI submetidos à cardiomiectomia e 7 controles com ressecção por câncer. Realizaram avaliação semi-quantitativa em 4 graus, conforme proposta por Gockel et al. (2008) para células de Cajal, enolase neurônio específica (neurônios totais) e VIP. Observaram diminuição intensa de neurônios entéricos (grau III) em 17% dos casos e ausência (grau IV - aganglionose) em 83%. Notaram redução de células de Cajal em 92% dos casos, porém discreta (grau II) e, em 8%, não houve redução (grau I). Redução de imunoreatividade por VIP foi vista em todos os casos, sendo grau III em 67% deles e grau IV (ausência) em 33% dos casos. Descreveram ainda hipertrofia de fibras nervosas (S-100 positivas) em 92% dos casos. Observaram, também, inflamação no plexo gástrico em 42% dos casos (linfócitos CD3 positivos) e ausência no grupo controle. Não detectaram imunoreatividade para Herpes simples vírus e Papilomavírus em nenhum caso. Concluíram que o SNE está lesado na região do EEI no MEI e que, em muitos desses pacientes, também existem

alterações das células de Cajal; porém, os fatores que desencadeiam essas alterações ainda são desconhecidos.

Hoshino et al. (2013) avaliaram, através de imuno-histoquímica, a muscular externa de 62 casos de MEI submetidos à cardiomiectomia, comparados a 10 controles submetidos a esofagectomia por câncer. O estudo foi semi-quantitativo, utilizando os critérios propostos por Gockel et al. (2008) e Vilanacci et al. (2010). Verificaram redução significativa de células positivas para S-100, NOS, VIP e ubictina no MEI em relação ao controle. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao CD43 e ao C-kit. Concluíram que a produção diminuída de NOS e VIP no MEI pode afetar tanto as células de Cajal quanto as células musculares, desempenhando um papel na fisiopatologia do MEI.

Sodikoff et al. (2016) realizaram, recentemente, um interessante estudo com o objetivo de determinar se os padrões histopatológicos correlacionavam com os subtipos manométricos de acalásia, segundo a classificação de Chicago (BREDENOORD et al., 2012; KAHNILAS et al., 2015). Foram estudados 46 pacientes (26 mulheres e 21 homens) com idade média de 42 anos (15-84), comparados a 5 controles submetidos a esofagectomia distal por tumores gástricos. O estudo manométrico pré-operatório classificou-os em:

- acalásia tipo I = 20 casos (acalásia clássica: contratilidade mínima no corpo esofágico)
- acalásia tipo II = 20 casos (períodos intermitentes de pressurização pan-esofágica)
- acalásia tipo III = 3 casos (contrações prematuras - espásticas no esôfago distal)
- obstrução de junção esofagogástrica = 3 casos (pressão integrada de relaxamento do EEI elevada, na ausência de critérios para acalásia).

Esses autores (SODIKOFF et al., 2016) avaliaram denervação, inflamação, fibrose e alterações musculares. A contagem neuronal foi expressa “através da média do número de neurônios por feixe de nervo”. Talvez, o termo que utilizaram seja o que, em geral, se designa como gânglio; todavia, também não especificaram quantos cortes foram utilizados e qual a coloração. Verificaram aganglionose em 34 (74%) dos 46 casos, inflamação em 17%, fibrose em 11% e atrofia muscular em 2%. O teste exato de Fisher mostrou maior proporção de casos com aganglionose na acalásia tipo I que no Tipo II (19/20 *versus* 13/20; $p=0,04$). O teste de Wilcoxon, comparando o número de neurônios por gânglio, mostrou maior grau de denervação na acalásia tipo I em relação ao tipo II. A média do número de neurônios por gânglio foi de 0,86 nos controles, de 0,45 na acalásia tipo II e de 0,03 na acalásia tipo I. Três pacientes apresentavam aspecto normal, sendo um do grupo com acalásia tipo II, um do tipo III e um do grupo com obstrução de junção esofagogástrica. Concluíram que o padrão de alteração era similar nos grupos I e II de acalásia e que a perda maior de neurônios no grupo I sugeria que

esta representaria a progressão do tipo II. Ademais, acrescentaram que o espectro de achados histopatológicos – de perda neuronal completa e inflamação linfocítica para o padrão normal – enfatizava que a acalásia representava um grupo heterogêneo de pacientes, que tinham em comum a obstrução da junção esofagogástrica.

Embora diversas pesquisas com técnicas sofisticadas e modernas tenham sido citadas, a nosso ver, o estudo anatomopatológico feito por Köberle (1963b), há mais de 50 anos, comparando MEI (que denominou de “megaesôfago europeu”) e MEC (que denominou de “megaesôfago brasileiro”), continua sendo um dos mais interessantes, não apenas por ter idealizado uma metodologia sistematizada de contagem neuronal, como também pelo seu amplo conhecimento de fisiopatologia em megas. Talvez seja pouco conhecido, por ter sido publicado em português em revista brasileira sem circulação internacional, diferentemente de várias de suas publicações em doença de Chagas feitas em revistas internacionais de língua inglesa. Referiu preferir o termo megaesôfago por ser uma designação descritiva, morfológica, independente da etiopatogenia, cujas características eram: dilatação do esôfago torácico, hipertrofia da muscular na parte dilatada, aspecto macroscópico normal na parte terminal do esôfago e ausência de obstáculo mecânico. Todos os casos de MEI que estudou foram obtidos em institutos europeus de Patologia. Avaliou 15 casos de MEI (14 de necrópsias e 1 de cirurgia), 33 esôfagos normais obtidos de necrópsias em Viena, 30 esôfagos sem alterações macroscópicas de chagásicos submetidos à necrópsia e 30 casos de MEC (10 de necrópsias e 20 de esofagectomias). Verificou, nos dois grupos de megaesôfago, intenso espessamento da muscular circular. Utilizou, para contagem neuronal, a metodologia que desenvolvera para estudar o plexo mientérico nos chagásicos (KÖBERLE, 1958, 1961). Contou todos os neurônios do plexo mientérico em 20 cortes subseriados com espessura de $7\mu\text{m}$ (escalonados de 7 em 7) de um anel esofágico do terço inferior do esôfago, 5cm acima da cárdia. Referia que os neurônios tinham em média $45\mu\text{m}$ de diâmetro, com o escalonamento de 7 em 7 cortes evitaria a contagem repetida do mesmo neurônio. Através dessa metodologia, conseguia avaliar o número de neurônios em um anel de aproximadamente 1mm de altura ($7 \times 7 \times 20 = 980\mu\text{m}$). Destacava a necessidade de avaliar toda a circunferência do anel esofágico para corrigir a dispersão dos neurônios devido à dilatação no megaesôfago, cuja circunferência frequentemente era diversas vezes maior que a do órgão normal. Por outro lado, examinando material de cardiomiectomia em fitas longitudinais, tal dispersão neuronal não ocorreria. Inferia que, por isso, alguns trabalhos como o de Trounce et al. (1957), descreveram casos de MEI com número normal de neurônios na parte distal e, ao contrário, Ellis et al. (1960), desse mesmo grupo de pesquisadores, mostraram maior

denervação no esôfago torácico. Köberle (1963b) verificou, nos controles, denervação esofágica fisiológica com a idade: a média do número de neurônios foi de 1223 no subgrupo mais jovem (15 a 30 anos) e de 636 neurônios no subgrupo mais idoso (76 a 90 anos); ou seja, uma redução de quase 50% aos 80 anos de idade. No grupo dos 30 chagásicos sem lesões macroscópicas no esôfago, a média foi de 407 neurônios (mínimo de 137 e máximo de 777), nos 30 casos de MEC foi de 5,7 (0 a 30 neurônios) e, nos 15 casos de MEI, a média foi de 7,9 (0 a 25 neurônios). Além do anel do terço inferior, esse autor examinou anéis de toda a extensão do esôfago de 3 casos controles e verificou que o número de neurônios aumentava até a parte média do órgão e, depois, mantinha-se mais ou menos constante até a cárdia. Realizou ainda, contagem neuronal em 7 anéis da parte final da “ampola esofágica e do esôfago terminal”, em 10 casos de MEC e 2 casos de MEI, contando de 0 a 30 neurônios por anel nos casos de MEC e de 1 a 34 no MEI. Concluiu que existia uma denervação uniforme em toda a extensão do esôfago, tanto no MEC quanto no MEI, que ultrapassava 90%, sendo a denervação intensa o substrato anatômico desses megas.

Além deste estudo morfológico comparativo entre MEC e MEI, pioneiro e único de Köberle, iniciamos há alguns anos, uma análise comparativa através de uma tese de mestrado com casos do nosso Serviço (SILVEIRA, 2012). Foram analisados 10 casos de MEC comparados a 10 de MEI e 10 controles não chagásicos (NC), avaliando ganglionite, miosite e fibrose na muscular, além de denervação. Foi observada denervação em todos os casos de megaesôfago, sendo mais acentuada e difusa no MEC (aganglionose total). No MEI, a denervação foi mais intensa na parte distal em relação à proximal. Entretanto, neste estudo enfatizaram-se mais os achados relacionados ao processo inflamatório e não foram analisados esôfagos de chagásicos sem megaesôfago. Ganglionite foi comum nos megas e até mesmo no grupo não chagásico (NC); porém, foi mais intensa no MEC em relação ao MEI. Esse processo inflamatório crônico, persistente e frequentemente intenso no plexo mientérico no MEC poderia explicar a maior extensão e intensidade da aganglionose nesse grupo. Miosite crônica ocorreu em todos os casos de MEC, e em apenas 1 (10%) caso de MEI, no qual era discreta; por isso, concluiu-se que miosite crônica em megaesôfago gera suspeita de etiologia chagásica. Parte da fibrose nos megas parece decorrer da isquemia secundária ao aumento da demanda de fluxo sanguíneo na muscular hipertrofiada e até mesmo por úlceras profundas; no entanto, é muito mais freqüente e intensa no MEC porque deve decorrer também da miosite crônica destrutiva, persistente mesmo na fase crônica desta doença.

2.2. Esofagopatia chagásica - megaesôfago chagásico

Com a implementação, há algumas décadas, de medidas de controle vetorial do *Triatoma infestans* em áreas endêmicas de doença de Chagas, houve redução substancial na incidência da doença de Chagas na América Latina (MONCAYO, 2003; WHO, 2002). Todavia, estima-se que ainda existam entre 12 e 14 milhões de infectados na América Latina (WHO, 2002). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que existam cerca de 5 milhões de indivíduos infectados (FERREIRA et al., 2005).

A doença de Chagas é dividida em duas fases: aguda e crônica, ambas subdivididas em assintomática e sintomática (DIAS & COURA, 1997). Após a infecção, os pacientes podem desenvolver fase aguda sintomática; entretanto, na maioria dos casos esta fase é assintomática. Mais de 90% dos pacientes sobrevivem à infecção inicial, passando para a fase crônica assintomática, na qual anticorpos anti-*T. cruzi* são detectados, mas o parasitismo torna-se escasso. Essa fase, sem sinais ou sintomas da doença, é chamada de indeterminada e pode persistir por toda a vida em cerca de 60 a 70% dos chagásicos (RASSI & MARINETO, 2010). Todavia, depois de 5 a 20 anos, alguns pacientes podem desenvolver manifestações clínicas cardiológicas e/ou digestivas (PRATA, 1968; KÖBERLE, 1968b; CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

A fase crônica subdivide-se nas seguintes formas anatomoclínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva, nervosa, mista e de exacerbação aguda. Os órgãos predominantemente acometidos são: coração, esôfago e cólon (TAFURI et al., 2011). Estima-se que, a cada ano, 0,33% dos chagásicos da forma indeterminada progridam para a esofagopatia chagásica (PRATA, 2001).

A forma digestiva da fase crônica pode se manifestar por alterações da motilidade e, nos casos mais graves, pelos megas, que ocorrem em cerca de 7 a 11% dos pacientes com doença de Chagas (BRENER et al., 2000). A região do Triângulo Mineiro é considerada endêmica para doença de Chagas, com aproximadamente 10% dos chagásicos apresentando a forma digestiva (LOPES, 1988). A expressão clínica mais frequente da forma digestiva é o megaesôfago, seguido pelo megacólon e raramente por outros megas (LOPES, 1988). É mais comum no sexo masculino e a maioria dos casos de megaesôfago é diagnosticada entre 29 e 40 anos (TAFURI et al., 2011).

Carlos Chagas, em 1916, foi o primeiro pesquisador a levantar a hipótese do megaesôfago (conhecido então como “mal do engasgo”) ser parte do espectro da

“tripanosomíase brasileira” (CORSI et al., 1992). Entretanto, transcorreram algumas décadas para que essa etiologia fosse aceita.

Amorim & Correa Netto (1932) descreveram alterações degenerativas e inflamatórias do plexo mientérico em um caso de necrópsia com megaesôfago e megacólon, no qual os sintomas de “mal de engasgo” surgiram após uma afecção febril. Ressaltaram que as alterações vistas eram idênticas às descritas por Rake, mas não atribuíram as lesões à doença de Chagas.

Etzel (1934) também estudou o plexo mientérico no megaesôfago e megacólon, encontrando lesões degenerativas e denervação; porém, atribuiu as lesões à carência crônica e incompleta de Vitamina B1.

Brasil (1954, 1955, 1959) defendeu a etiologia chagásica do megaesôfago, propôs o termo aperistalse do esôfago, dividindo-a em anectásica e ectásica e, ainda, afirmou que as lesões essenciais estavam localizadas no plexo mientérico.

No entanto, foi através dos trabalhos de Köberle & Nador (1955) e Köberle (1956, 1957, 1958, 1960, 1961, 1963a, 1968), que teve início uma nova etapa no conhecimento da doença de Chagas.

Köberle & Nador (1955) encontraram um ninho de *T. cruzi* na muscular do esôfago de um CSME, no qual havia focos de miosite. Embora tenham descrito as lesões na muscular, para Köberle apenas a destruição neuronal representava o fator patogênico na doença de Chagas.

O processo patológico básico da doença de Chagas é inflamação. A resposta inflamatória que surge após a infecção pelo *T. cruzi* é essencial para estabelecer a resistência do hospedeiro; no entanto, também é responsável pelas lesões observadas nessa doença (TEIXEIRA, GAZZINELLI & SILVA, 2002; DUTRA et al., 2009). A inflamação pode destruir não apenas as células parasitadas, mas também as células não parasitadas adjacentes. Inicialmente se faz às custas de células mononucleares e, logo depois, também observam-se neutrófilos e eosinófilos (BRENER et al., 2000). Granulomas também podem ocorrer (KÖBERLE, 1961; ADAD et al., 1991). Outras células podem atuar no processo inflamatório. Nascimento et al. (2010) levantaram a hipótese de que as células enterogliais, que parecem estar em número aumentado nos CSME, poderiam contribuir para a defesa do SNE no esôfago.

Neuropeptídeos encontrados no SNE também atuam sobre o sistema imune. A SP tem ação anti-inflamatória e o VIP pode atuar de modo inverso. Por isso, o achado de aumento da

frequência de neurônios SP+ em casos de megacólon chagásico pode sugerir sua participação na manutenção da inflamação na fase crônica da doença de Chagas (DA SILVEIRA, 2005).

O infiltrado inflamatório tem um importante papel na patogênese das lesões do SNE, podendo ocorrer uma drástica redução do número de neurônios, favorecendo a ocorrência dos megas chagásicos (KÖBERLE, 1968; TAFURI, MARIA & LOPES, 1971; ADAD et al., 1991; D'ÁVILA REIS et al., 2001). As alterações na motilidade do tubo digestivo decorrem da denervação intramural, sobretudo do plexo mientérico (KÖBERLE, 1958, 1963a, 1963b, 1968; ADAD, 1989, 1996; ADAD et al., 1991, 2001). Considera-se que uma intensa denervação seja fundamental para o início da disperistalse na esofagopatia chagásica (KÖBERLE, 1957; KÖBERLE, 1963b; ADAD, 1989; ADAD et al., 1991, 2001, 2012).

Penha & Köberle (1959) e Köberle, Penha & Köberle (1961) realizaram estudos quantitativos dos neurônios do plexo mientérico em 10 casos normais e 10 casos de MEC, em três níveis diferentes (terços superior, médio e inferior), referindo haver diminuição acentuadíssima dos neurônios nesses três níveis do órgão. Depois adicionaram, também, os resultados obtidos em 10 casos de CSME (KÖBERLE, 1961, 1963a). Em trabalho posterior, Köberle (1963b) referiu que seria necessária denervação acima de 50% para haver alterações funcionais e maior que 90% para o aparecimento do megaesôfago.

Köberle (1968) acreditava que a denervação na doença de Chagas ocorreria basicamente na fase aguda e afirmava que o “destino do chagásico decidia-se na fase aguda”. Explicava o aparecimento do megaesôfago e megacólon décadas depois pela somatória da denervação da fase aguda com a denervação decorrente do próprio envelhecimento, associadas à morte dos neurônios residuais sobrecarregados pelo exaustivo trabalho para compensar a intensa denervação.

Adad (1989 e 1996) acrescentou que a ganglionite, presente também na fase crônica e persistindo por décadas, desencadearia uma denervação lenta, contudo, persistente, agravando a perda neuronal. Ademais, estudos feitos com cortes seriados e PCR demonstraram a persistência do DNA do *T. cruzi*, perpetuando a estimulação do sistema imune e contribuindo para o agravamento da denervação nos chagásicos crônicos mesmo na fase crônica (ADAD et al., 1991; VAGO et al., 1996, 2000, 2003; SILVEIRA et al., 2005; CÔBO et al., 2012).

Silveira et al. (2005) encontraram DNA de *T. cruzi* em 100% dos casos de MEC e em 60% de CSME, ao avaliarem diferentes terços do esôfago. Todos os chagásicos que apresentavam processo inflamatório na muscular do esôfago, mesmo os casos sem megaesôfago, apresentaram positividade ao PCR e denervação. Concluíram que o processo

de denervação no esôfago de pacientes chagásicos na fase crônica poderia ser, pelo menos em parte, uma consequência dos mecanismos imunes citotóxicos, os quais são dependentes da persistência do parasita no tecido.

Ademais, a resposta auto-imune em chagásicos crônicos foi detectada como uma reação cruzada entre os antígenos do *T. cruzi* e tecidos do hospedeiro (BRENER, 1987) e com anticorpos contra neurônios do SNE (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1979; TEIXEIRA et al., 1980; GIRONÈS, CUERVO & FRESNO, 2005). Os neurônios poderiam ser alvos desses ataques imunes por apresentarem epítomos de reação cruzada em sua superfície, como um mimetismo molecular (VAN VOORHIS, SCHLEKEWY & TRONG, 1991).

Tafuri, Maria & Lopes (1971) acreditavam que a estase alimentar e fecal no lúmen do órgão constituía um dos fatores importantes no mecanismo de formação dos megas, pois determinaria compressão e atrofia da mucosa. Por sua vez, a compressão levaria à isquemia e, secundariamente, à degeneração, necrose e ulceração da mucosa. Essa mucosa comprimida se tornaria predisposta à inflamação, a qual levaria a fibrose intersticial, um dos fatores responsáveis pela modificação dos componentes do interstício intermuscular. Segundo esses autores, esse processo inflamatório atingiria também o plexo mientérico, já previamente lesado pelo *T. cruzi*, agravando ainda mais a destruição do SNE. Com o tempo ocorreriam hipertrofia e alterações degenerativas das miocélulas. Como o plexo mientérico mantém relação íntima com as células musculares, sugeriram que a miosite e suas sequelas poderiam lesar ainda mais os gânglios.

Segundo Köberle (1963a, 1963b) e Tafuri & Raso (1983), a macroscopia do megaesôfago caracteriza-se por dilatação de grau variável do órgão, espessamento de sua parede, ausência de obstáculo mecânico, aspecto normal da porção terminal do órgão (imediatamente abaixo da parte dilatada) e presença ou não de alterações secundárias à estase na mucosa. Adad (1989) referiu que alguns casos de MEC apresentavam diâmetro menor que o normal na porção mais distal, o que já fora assinalado pelo exame radiológico (REZENDE, 1982).

Destacam-se duas classificações radiológicas de MEC, a de Ferreira-Santos (1961) e a classificação de Rezende (1982). Este último autor, inicialmente, classificava como megaesôfago as alterações presentes no grau I; porém, posteriormente, passou a utilizar o termo esofagopatia grau I, porque, embora exista dificuldade no esvaziamento do órgão, ainda não há dilatação. No outro extremo encontra-se o dolicomegaesôfago, ou esofagopatia grau IV, que, alongado, muda sua forma e dobra-se sobre o diafragma. O grau IV é de fácil

correlação com peças anatômicas fixadas, pelo alongamento e formato em “J”. No entanto, o patologista não consegue reconhecer macroscopicamente o grau I, por não haver dilatação, e, por isso, esta lesão deixa de ser diagnosticada nos casos de necrópsias. Diâmetro transverso da imagem do esôfago é importante no exame radiológico contrastado para a classificação do megaesôfago, porém as medidas são muito maiores que no esôfago após fixação, cujo diâmetro reduz bastante. Segundo dados de Liebermann-Meffert et al. (1979), a redução de volume pode ser de 35 a 45 % após três semanas de fixação.

Adad (1989) e Adad et al. (1991) com base na análise de 56 esôfagos de chagásicos crônicos (17 MEC e 39 CSME) e de 26 não chagásicos, concluíram que esôfagos com diâmetro acima de 2,5cm após fixação em formol, na ausência de obstáculo mecânico, poderiam ser considerados como megas. Os esôfagos normais dos não chagásicos apresentavam, após fixação em formol, diâmetro máximo de 2,2cm. Os esôfagos do grupo MEC, com diagnóstico clínico/radiológico de megaesôfago, apresentavam diâmetro maior que 2,5cm. Todavia, não havia, neste estudo, nenhum caso com diagnóstico de esofagopatia chagásica grau I. Os autores analisaram microscopicamente o TI, seguindo a metodologia idealizada por Köberle para contagem neuronal. Verificaram que as principais lesões microscópicas localizavam-se na muscular própria (miosite e fibrose) e no plexo mientérico (denervação e inflamação), sendo mais intensas nos casos de MEC que nos CSME. No grupo CSME encontraram denervação muito variável, observando raros casos com denervação muito intensa (maior que 90%) e, inclusive, um caso com aganglionose no TI, sem dilatação do esôfago, o que não fora descrito por Köberle. Ponderaram que, além da denervação, talvez outras alterações poderiam contribuir para desencadeamento da dilatação, tais como miosite, fibrose na muscular, alterações do simpático ou também lesão do nervo vago.

Anteriormente, Lopes, Tafuri & Chapadeiro (1969) tinham realizado estudo morfológico e quantitativo dos núcleos dorsal do vago e hipoglosso em chagásicos crônicos com e sem megaesôfago e constataram despopulação neuronal em ambos os grupos, mais intensa no núcleo dorsal do vago. Admitiram que não era possível excluir a participação da lesão do núcleo dorsal do vago na gênese da fisiopatologia do MEC.

Em síntese, a patogênese das lesões na fase crônica da doença de Chagas baseia-se em duas hipóteses: 1) a persistência do *T. cruzi* em locais específicos nos hospedeiros infectados resultaria em uma reatividade inflamatória crônica; 2) a infecção pelo *T. cruzi* induziria uma resposta imune na qual os tecidos do próprio indivíduo seriam alvos independentes da persistência do parasita (TARLETON, 2001).

Com relação à patogênese do MEC, o principal fator seria a denervação do plexo mientérico. No entanto, alguns casos com denervação intensa no TI, podem não apresentar dilatação do órgão.

2.3. A Importância de estudos comparativos entre megas

Earlam (1972) ressalta que as técnicas empregadas na avaliação da denervação na doença de Chagas (KÖBERLE, 1968), poderiam auxiliar no esclarecimento da história natural da denervação gastrointestinal pela perda de seu suprimento nervoso intrínseco, bem como no entendimento da etiopatogênese do MEI e da doença de Hirschsprung. De fato, na UFTM, temos utilizado o conhecimento adquirido nos estudos dos megas chagásicos como modelo para avaliar outras disganglionoses (ADAD et al., 2002, 2008, 2010; LAGUNA-TORRES et al., 2003), alterações da doença de Chagas em outros órgãos (CREMA et al., 2007; MURTA et al., 2002), ou em estudos experimentais (MACHADO et al., 2001a, 2001b). Tais técnicas também possibilitaram observar diferenças histológicas entre o esôfago e o cólon, como o maior número de mastócitos na muscular do esôfago normal (PINHEIRO et al., 2008) e a presença de vascularização nos gânglios mientéricos esofágicos, o que não ocorre no cólon, que podem contribuir para a maior intensidade de denervação e inflamação no esôfago, assim como para a maior frequência de megaesôfago em relação ao megacólon (ADAD et al., 2014).

Adad (1996) e Adad et al. (2001) observaram que havia hipertrofia dos neurônios intramurais residuais no megacólon chagásico, no qual, em geral, existe hipoganglionose (mas não aganglionose como é comum no MEC), sendo necessário aplicar um fator de correção para precisar o grau de denervação. Esses conhecimentos também possibilitaram realizar comparação entre megacólon chagásico e andino, verificando-se que não havia denervação no dolicomegacólon andino (LAGUNA-TORRES *et al*, 2003), o que tem aplicações no esclarecimento da patogênese das disganglionoses do SNE.

Temos observado, em nossa região, um aumento da frequência de MEI, que pode não ser absoluto, mas, sim, decorrente da diminuição do número de casos de MEC. Porém, com base na experiência adquirida nas pesquisas em chagásicos, acreditamos que estudos comparativos sistematizados entre MEC e MEI, poderiam fornecer elementos para o entendimento da etiopatogênese e, quem sabe, para novas intervenções terapêuticas em megas.

2.4. Lacunas no conhecimento do MEC e MEI

Não encontramos estudos anatomopatológicos **sistematizados amplos** de contagem neuronal em cortes histológicos convencionais (corados por HE) **na junção esofagogástrica (cárdia)** comparando MEI, MEC, CSME e NC. Köberle (1963b) realizou estudos no TI e Cd em 10 MEC “avançados”, porém no Cd foram comparados com apenas 2 MEI e 3 NC.

Em outro estudo, Köberle (1963a) analisou apenas os chagásicos, contando neurônios no TI, TM e TS de 10 MEC “avançados” e 10 CSME, comparados a 10 NC. Esses resultados são repetidos em outras publicações, porém os dados parecem os mesmos.

Por outro lado, o estudo de MEI realizado por Goldblum et al. (1994) utilizou outra metodologia de contagem neuronal não padronizada e não detalhada para repetição, trabalhando com faixas longitudinais de todo o esôfago de casos avançados de MEI.

Intensa destruição neuronal é considerada fundamental para o início da disperistalse. Entretanto, curiosamente, em cortes escalonados dos terços esofágicos, foram observados casos de denervação intensa e, até mesmo, de ausência de neurônios em chagásicos sem dilatação do esôfago (ADAD, RESENDE & JORGE, 1992; ANDRADE, 2000). Todavia, esses autores não avaliaram a região da cárdia/EEI.

Algumas das dificuldades para estudar o EEI decorrem da difícil visualização macroscópica e de sua variável extensão. Porém, essa região é muito importante na patogênese do megaesôfago e no estudo da fisiologia esofágica. Em geral, o EEI permanece em contração tônica, ao contrário da porção média do esôfago, que permanece em estado de relaxamento. No MEC, a musculatura da porção inferior do esôfago não relaxa (PAULA COSTA & RESENDE, 1978; DANTAS, 1998) e o plexo mientérico perde a capacidade de transmissão de sinais para a produção de "relaxamento receptivo" do EEI após a deglutição. Na ausência de relaxamento do EEI, o esôfago não consegue esvaziar seu conteúdo e, depois de meses ou anos, torna-se dilatado, originando o megaesôfago (PAULA-COSTA & REZENDE, 1978; REZENDE, 1982).

Acreditamos que seria interessante avaliar casos menos avançados de MEC e MEI e compará-los a CSME e NC, além de realizar a contagem neuronal ao HE de modo sistematizado nos mesmos casos, nos três terços (TI, TM e TS) e na região correspondente ao EEI (Cd).

Com relação à possibilidade de denervação seletiva nos megas, embora existam alguns estudos sobre neuropeptídios no MEI e MEC avaliando fibras nervosas na muscular e nervos, em geral não foram contados os neurônios e, quando se referem a neurônios

inibitórios, não fazem contraposição aos excitatórios. Não encontramos estudos anatomopatológicos sistematizados avaliando neurônios inibitórios e excitatórios no esôfago humano de MEC, MEI e CSME.

Não é bem conhecida nem mesmo a proporção desses neurônios ao longo do esôfago humano normal. Encontramos apenas o trabalho de Singaram et al. (1994), no qual foi avaliada a proporção de neurônios inibitórios e excitatórios na parte normal do esôfago de poucos pacientes com carcinoma, em amostras que não foram padronizadas em relação à distância da Cd. Portanto, é necessário avaliar, inicialmente em esôfagos normais (NC), a proporção de neurônios NO positivos (inibitórios) e SP positivos (excitatórios) na cárdia em relação aos terços esofágicos e, a seguir, comparar se existe denervação seletiva na doença de Chagas e no MEI.

Observa-se, portanto, que existem lacunas no conhecimento da patogênese do megaesôfago.

Seriam os casos de esôfagos não ectásicos com intensa denervação mientérica explicados por denervação não uniforme ao longo do esôfago?

Considerando a possibilidade da denervação não ser uniforme, haveria alguma região, como por exemplo, a cárdia, cujas alterações no plexo mientérico seriam mais importantes na fisiopatogenia da esofagopatia?

As alterações no plexo mientérico e sua distribuição são semelhantes no MEC e MEI?

A perda de neurônios inibitórios e excitatórios no MEC e no MEI seria aleatória ou haveria denervação seletiva?

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar a denervação na cárdia e nos terços esofágicos entre os grupos MEC, MEI e CSME, com relação ao número total de neurônios e à proporção de neurônios excitatórios e inibitórios.

Hipótese

A denervação da região distal do esôfago, especialmente da cárdia, seria mais importante que a denervação das outras regiões na fisiopatogenia do megaesôfago, o que explicaria denervação, por vezes intensa, nos terços esofágicos de chagásicos sem mega.

A perda de neurônios inibitórios e excitatórios seria aleatória, e não seletiva, no MEC e no MEI.

Objetivos

Em material de necrópsia e de biópsia (esofagectomia) do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM):

1. Em esôfagos normais (grupo NC):

- Avaliar a distribuição do número global de neurônios no plexo mientérico na cárdia (Cd) e nos diferentes terços esofágicos (TI, TM e TS).
- Avaliar a proporção de neurônios inibitórios (NOS +) e excitatórios (SP +) em relação ao total de neurônios na cárdia e nos diferentes terços esofágicos.

2. Em esôfagos de chagásicos sem mega (CSME):

- Verificar se a denervação da cárdia é maior que nos diferentes terços do esôfago.
- Verificar se a denervação é seletiva em relação a neurônios inibitórios ou excitatórios.

3. Em esôfagos de chagásicos com mega (MEC):

- Verificar se a denervação da cárdia é maior que nos diferentes terços do esôfago.
- Verificar se a denervação é seletiva em relação a neurônios inibitórios ou excitatórios.

4. Em esôfagos de não chagásicos com mega (megaesôfago idiopático - MEI):

- Verificar se a denervação da cárdia é maior que nos diferentes terços do esôfago.
- Verificar se a denervação é seletiva em relação a neurônios inibitórios ou excitatórios.

5. Verificar se há diferenças entre os grupos MEC e MEI e também em relação aos grupos CSME e NC, quanto à:

- Diminuição do número global de neurônios na cárdia e nos diferentes terços esofágicos.
- Diminuição seletiva de neurônios inibitórios *versus* excitatórios.

Material e Métodos

1. Material

Trata-se de estudo retrospectivo de 87 esôfagos, 62 provenientes de necrópsias e 25 de esofagectomias subtotais, examinadas no Serviço de Patologia Cirúrgica/Disciplina de Patologia Especial do Hospital de Clínica da UFTM, aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (pareceres números 2109 de 2011 e 2.060.268 de 2017 – Anexos 1 e 2). Parte deste material foi estudado anteriormente em teses que abordaram a anatomia patológica e patogênese do megaesôfago chagásico (ADAD, 1989) e estudo comparativo entre MEC e MEI (SILVEIRA, 2012).

Os casos foram subdivididos em quatro grupos:

- **NC** – Controle-Não Chagásico: **19 casos** (todos de necropsias) - esôfagos normais
- **MEI** - Megaesôfago Idiopático: **18 casos** (1 necropsia e 17 esofagectomias)
- **MEC** - Megaesôfago Chagásico: **22 casos** (14 necropsias e 8 esofagectomias)
- **CSME** - Chagásicos Sem Megaesôfago: **28 casos** (todos de necropsias).

Para inclusão dos casos nos grupos de estudo, foram revistos dados clínico-radiológicos, testes sorológicos para doença de Chagas, laudos de necropsias e de biópsias.

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

Todos os casos de esofagectomia tinham diagnóstico clínico-radiológico de megaesôfago, assim como vários casos de MEC de necropsia. Os casos de necropsia sem diagnóstico de mega em vida foram caracterizados morfológicamente como tendo megaesôfago quando apresentavam dilatação difusa nos terços médio e inferior do órgão (diâmetro externo maior que 2,5cm) e afilamento da cárdia, na ausência de obstáculo mecânico (ADAD et al., 1991).

2. Metodologia

Os esôfagos foram fixados “*in totum*” em formaldeído a 4%. Em seguida, era medida a circunferência externa do esôfago no terço inferior e calculava-se o diâmetro (circunferência dividida por 3,14). Eram retirados três anéis de cada espécime, com 0,5cm de altura, distando cerca de 5cm, 12cm e 19cm da junção esofagogástrica, correspondendo aos terços inferior (**TI**), médio (**TM**) e superior (**TS**). Também eram retirados, sempre que possível, dois fragmentos longitudinais na região distal, diametralmente opostos,

constituídos por 3cm distais do esôfago em continuidade com 0,5cm do estômago (medida total de cada fragmento: 3,5cm de extensão) para representar a região do esfíncter inferior do esôfago/cárdia (**Cd**). Os fragmentos e anéis foram processados para inclusão em parafina.

2.1. Análise geral da denervação – contagem neuronal em cortes corados por HE

Nesta primeira etapa foram obtidos, de cada bloco, 35 cortes seriados com espessura de 7 μ m, utilizando-se cortes escalonados múltiplos de 7 para a contagem neuronal, para evitar a contagem repetida de um mesmo neurônio (KÖBERLE, 1963a, b; KÖBERLE et al., 1961). Esta contagem foi feita ao microscópio de luz, com ocular de 10x e objetiva de 40x, contando-se todos os neurônios no plexo mientérico de 5 cortes escalonados corados por Hematoxilina-Eosina (HE), de cada terço do esôfago (TI, TM e TS) e de 5 cortes de cada lado dos dois fragmentos longitudinais distais (total de 10 cortes do Cd). Para a contagem neuronal desta última região (**Cd**) **delimitou-se, nos cortes histológicos corados ao HE, extensão de 2,5cm de cada fragmento (0,5cm de estômago e 2cm de esôfago)**, na tentativa de avaliar a região correspondente ao esfíncter inferior do esôfago e, ao mesmo tempo, analisar uma área com extensão similar (dois cortes de 2,5cm = 5cm) a dos anéis dos terços esofágicos dos casos normais, cuja circunferência ou perímetro externo é, em média, 5cm. Na expressão tabular dos dados, o número de neurônios representa a soma do número de neurônios de cada região. Todos os 87 casos incluídos nesta etapa do estudo tinham amostras de pelo menos três regiões e, em 58 deles, havia amostras adequadas das quatro regiões do esôfago. Em todos os 87 casos havia amostras do TI e TM; no entanto, em 4 casos não havia amostras do TS e, em 25 casos, faltavam amostras longitudinais do Cd para contagem neuronal ao HE.

2.2. Avaliação através de imuno-histoquímica da proporção de neurônios NOS positivos (inibitórios) versus SP positivos (excitatórios)

Nesta segunda etapa foram confeccionados novos cortes histológicos, para realização de estudo imuno-histoquímico, empregando-se a técnica de polímeros.

Os novos cortes seriados, com espessura de 5 μ m, foram dispostos em lâminas histológicas com carga elétrica (Leica BOND® Plus Slides, S21.2113.A, Leica Biosystems Richmond, Inc.). A seguir, as lâminas foram levadas para a estufa, a 65°C, durante 24 horas. Em seguida, foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol, permanecendo cerca de 5 minutos

em cada um e hidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e um banho de álcool a 80%, durante 10 segundos cada um. Depois de lavadas em água corrente, foi feita a recuperação de antígenos: as lâminas foram colocadas em cubas com 70ml de tampão citrato pH 6 (Reagen) para as lâminas de NOS e tampão tris EDTA para as lâminas de SP; a incubação foi feita na panela Pascal (vapor de água a 121°C e 18psi) por 30 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente e seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena: lâminas dispostas em bandeja, adicionando-se água oxigenada a 3% sobre cada corte durante 15 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em tampão PBS e foi feito o bloqueio de proteínas por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com seus respectivos anticorpos primários por 18 horas em câmara úmida com temperatura de 3 a 4°C. Os anticorpos foram diluídos em soro de albumina bovina (Sigma ®) de acordo com as indicações presentes em suas especificações. Foram utilizados os anticorpos **NOS** (óxido nítrico sintase – NOS1-R20, Santa Cruz-648, policlonal, obtido de coelho, diluição 1:2000) e **SP** (Anti-substância P, Abcam, EUA, monoclonal SP-DE4-21, ab14184, obtido de camundongo, diluição 1:500).

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

Após 3 lavagens em PBS, por 5 minutos cada uma, as lâminas foram reveladas através da adição de uma solução cromógena (Liquid DAB, Dako®, Carpinteria, CA) por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas e contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. Finalmente, as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool absoluto por cerca de 10 segundos cada um e, a seguir, utilizou-se *entellan* para a montagem das lamínulas.

Nesta etapa foram contados, ao microscópio de luz, com ocular de 10x e objetiva de 40x, todos os neurônios positivos, em uma lâmina marcada com cada tipo de anticorpo. Utilizou-se um corte pareado, corado por HE, para calcular o percentual de neurônios positivos para NOS e SP de cada região, tendo como referencial de 100% o número obtido na lâmina de HE. Para a **contagem da Cd utilizou-se a extensão total de cada fragmento que era 3,5cm** (0,5cm de estômago e 3cm de esôfago), tendo em vista que o objetivo era calcular a proporção de neurônios inibitórios e excitatórios em relação ao número total. Esse aumento de 1cm na extensão do fragmento avaliado na primeira etapa foi feito porque verificamos, em

um estudo piloto preliminar da imuno-histoquímica, que vários casos, especialmente com hipoganglionose, apresentavam mais neurônios na extremidade proximal do fragmento. Nesta segunda etapa, na qual foram incluídos apenas os casos que possuíam amostras adequadas das quatro regiões, foi possível analisar 28 casos: NC = 6, MEI = 7, MEC = 7 e CSME = 8 casos.

2.3. Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados, na comparação entre os grupos, os testes de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) ou ANOVA (análise de variância - para variáveis com distribuição normal). Para comparação entre diferentes regiões do esôfago de um mesmo indivíduo, utilizaram-se os testes de Friedman (teste não-paramétrico para dados amostrais vinculados) ou ANOVA com medidas repetidas (distribuição normal). Os resultados foram considerados significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$). Os programas GraphPad InStat e Assistat foram utilizados para a análise estatística.

Resultados

1. Dados Gerais

A **Tabela 1** mostra média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo da **idade** dos pacientes em cada grupo de estudo.

Tabela 1 - Média, desvio padrão (DP), mediana, valores mínimo e máximo da idade dos pacientes em cada grupo de estudo.

| | n | MÉDIA | DP | MEDIANA | Valores mínimo e máximo |
|------|----|-------------------|------|---------|-------------------------|
| NC | 19 | 54,5 ^a | 17,4 | 54,0 | 25-83 |
| MEI | 18 | 41,3 ^a | 16,9 | 36,5 | 20-79 |
| MEC | 22 | 52,3 ^a | 12,5 | 51,5 | 28-72 |
| CSME | 28 | 53,8 ^a | 16,0 | 50,5 | 20-93 |

Teste: ANOVA; médias seguidas de letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). NC = não chagásico; MEI = megaesôfago idiopático; MEC = megaesôfago chagásico; CSME = chagásico sem megaesôfago.

Embora a média da idade no grupo MEI tenha sido um pouco menor que nos demais, essa diferença não foi estatisticamente significativa (ANOVA; $p > 0,05$).

Com relação ao sexo, 84%, 44%, 77% e 71% dos casos dos grupos NC, MEI, MEC e CSME, eram masculinos, respectivamente. No entanto, deve-se ressaltar que todos os casos de NC e CSME, e a maioria dos casos de MEC, foram obtidos de necrópsias e, em nossa instituição, o número de autorizações para realização de necrópsias em mulheres é muito menor que o de homens.

A **Tabela 2** mostra média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo do **diâmetro** do esôfago dos pacientes em cada grupo de estudo.

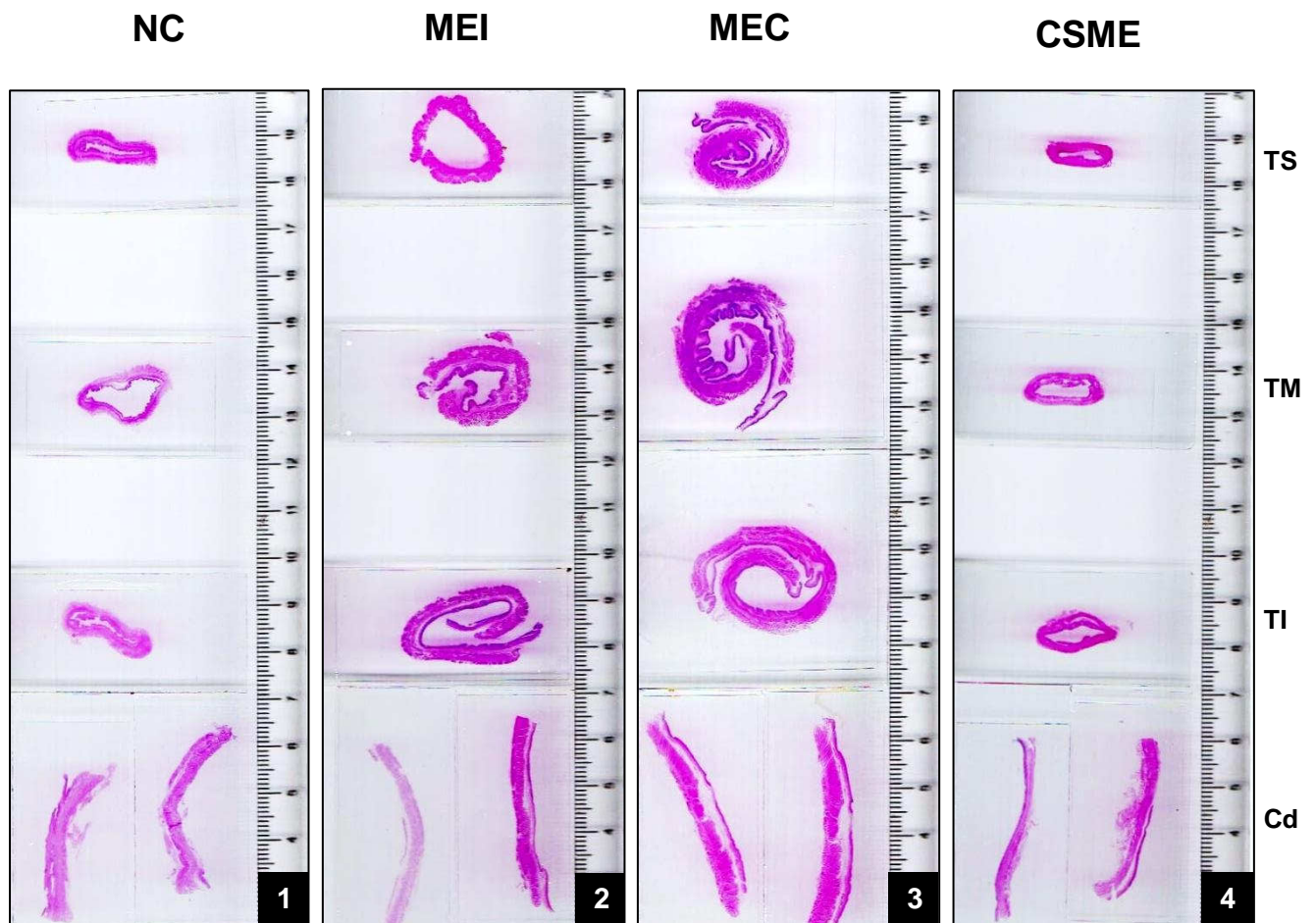
Tabela 2 - Média, desvio padrão (DP), mediana, valores mínimo e máximo do diâmetro do esôfago dos pacientes em cada grupo de estudo.

| | n | MÉDIA | DP | MEDIANA | Valores mínimo e máximo |
|------|----|------------------|-----|---------|-------------------------|
| NC | 19 | 1,5 ^a | 0,2 | 1,6 | 1,0-1,8 |
| MEI | 18 | 3,3 ^b | 0,7 | 3,1 | 2,2-4,8 |
| MEC | 22 | 3,9 ^b | 1,1 | 3,9 | 2,4-7,6 |
| CSME | 28 | 1,7 ^a | 0,3 | 1,8 | 1,1-2,3 |

Teste: ANOVA; médias seguidas de letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$) e letras diferentes denotam diferenças significantes ($p < 0,05$). NC = não chagásico; MEI = megaesôfago chagásico; MEC = megaesôfago chagásico; CSME = chagásico sem megaesôfago.

A análise da Tabela 2 evidencia que o diâmetro do esôfago nos grupos MEC e MEI foi maior que o dos grupos NC e CSME, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Embora a média do diâmetro no grupo MEC tenha sido um pouco maior em relação ao MEI, a diferença não foi estatisticamente significativa; achado similar ocorreu também na comparação entre os grupos CSME e NC.

As **Figuras 1 a 4** ilustram o aspecto dos cortes histológicos dos anéis dos terços esofágicos e dos fragmentos longitudinais da Cd, em cada grupo de estudo. Através desses cortes, é possível observar a diferença dos diâmetros dos casos de NC e CSME, em relação ao MEC e MEI, sobretudo no TI e TM, nos quais observa-se também espessamento da muscular. Esse espessamento da muscular pode auxiliar na avaliação de esôfago normal *versus* mega, quando ocorre sobreposição do diâmetro. Vários casos de megas necessitaram ser enrolados sobre si mesmos no momento da fixação e processamento para evitar a divisão do anel em vários fragmentos. Além disso, para esses anéis maiores foram utilizadas lâminas com o dobro do tamanho usual.



As **Figuras 1 a 4** representam **fotografias das lâminas** com cortes histológicos dos anéis dos terços superior (TS), médio (TM) e inferior (TI) do esôfago e, dos dois cortes longitudinais da cárdia (Cd), de um caso de cada grupo de estudo.

NC = não chagásico; MEI = megaesôfago idiopático; MEC = megaesôfago chagásico e CSME = chagásico sem megaesôfago.

Observar aspecto semelhante nos grupos sem mega (Fig. 1 - NC e Fig. 4 - CSME), cujos anéis são menores que dos grupos com mega (Fig. 2 - MEI e Fig. 3 - MEC), os quais frequentemente necessitaram ser cortados e enrolados sobre si mesmos.

Além disso, vários anéis de megas, como o TI e TM da Fig. 3 foram montados em lâminas com o dobro do tamanho normal.

Notar ainda espessamento da muscular nesses casos de megaesôfagos. Comparando-se, por exemplo, os anéis do NC e do MEI no TM, observam-se perímetros/diâmetros similares; entretanto, a muscular do MEI é bem mais espessa que do NC e do CSME.

2. Análise geral da denervação – contagem neuronal em cortes corados por HE

Os Quadros 1, 2, 3 e 4 resumem os dados gerais e o resultado da contagem neuronal mientérica ao HE, de cada caso, por grupo.

Quadro 1 – Grupo NC

Distribuição dos casos do grupo controle – não chagásico segundo idade, diâmetro máximo do esôfago, contagem neuronal no plexo mientérico ao HE e dados/observações correlatas.

| CASO | GRUPO | IDADE (anos) | Diâm (cm) | Cd | TI | TM | TS | PCR | Observações |
|----------|-------|--------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| E2 | NC | 76 | 1,6 | 262 | 171 | 209 | 238 | Ng | Cardiomiectomia dilatada (idiopática) |
| E5 | NC | 54 | 1,4 | 134 | 176 | 161 | 145 | Ng | Aneurisma dissecante de aorta. HAS |
| ML29-87 | NC | 54 | 1,6 | 248 | 190 | 206 | 182 | Ng | Morte violenta |
| HE90-98 | NC | 48 | 1,6 | 307 | 232 | 183 | 189 | - | Cardiopatia hipertensiva/Suicídio |
| HE25-99 | NC | 74 | 1,5 | 363 | 209 | 61 | 148 | - | Alcoolismo. Adenocarcinoma Papila de Vater |
| HE43-99 | NC | 45 | 1,1 | 186 | 177 | 190 | 95 | - | Embolia Pulmonar |
| ML94-87 | NC | 61 | 1,4 | 72 | 125 | 40 | 62 | - | Cardiopatias isquêmica e hipertensiva |
| ML70-88 | NC | 77 | 1,7 | 48 | 102 | 84 | 105 | - | Abscesso cerebral e broncopneumonia |
| ML143-88 | NC | 60 | 1,6 | 400 | 229 | 209 | 107 | Ng | Rotura traumática da aorta |
| ML02-89 | NC | 59 | 1,6 | 345 | 300 | 144 | 100 | - | TCE |
| ML49-89 | NC | 40 | 1,6 | 240 | 184 | 287 | 120 | - | Morte súbita/Infarto do miocárdio |
| HE87-98 | NC | 25 | 1,0 | 293 | 176 | 118 | 86 | - | Trombose venosa e infarto cerebral |
| HE111-87 | NC | 83 | 1,4 | 217 | 188 | 148 | 59 | Ng | Adenocarcinoma de próstata - Broncopneumonia |
| E17 | NC | 79 | 1,6 | 188 | 171 | 178 | - | Ng | Aneurisma cerebral. HAS. Cardiopatia isquêmica |
| ML26-85 | NC | 38 | 1,7 | - | 207 | 245 | 253 | - | TCE |
| ML51-85 | NC | 25 | 1,6 | - | 238 | 188 | 124 | - | Morte Violenta. Anel antigo junção esofagogástrica (5 lâm = 91 neurônios) |
| ML04-86 | NC | 41 | 1,5 | - | 292 | 236 | 133 | - | Morte violenta - Politraumatismo |
| ML23-87 | NC | 51 | 1,8 | - | 142 | 137 | 165 | - | Morte Violenta. Anel junção esofagogástrica (5 lâm = 265 neurônios) |
| ML54-88 | NC | 45 | 1,7 | - | 218 | 182 | 167 | - | HAS; AVC. Anel antigo junção esofagogástrica (5 lâm = 168 neurônios) |

NC = não chagásico-controle; Diâm = diâmetro máximo do esôfago; Contagem neuronal: número de neurônios em 5 cortes histológicos de cada anel dos terços inferior (TI), médio (TM) e superior (TS) e em 10 cortes (5 de cada um dos 2 fragmentos longitudinais com extensão de 2,5cm) da região da cárdia (Cd); Ng = negativo. HAS = Hipertensão arterial sistêmica; TCE = traumatismo crânio-encefálico. AVC = acidente vascular cerebral.

Quadro 2 - Grupo MEI

Distribuição dos casos do grupo megaesôfago idiopático segundo idade, diâmetro máximo do esôfago, contagem neuronal no plexo mientérico ao HE e dados/observações correlatas.

| CASO | GRUPO | IDADE (anos) | Diâm (cm) | Cd | TI | TM | TS | PCR | Grau ME | Disfagia | Observações |
|----------|-------|--------------|-----------|----|-----|-----|-----|-----|---------|----------|---|
| B06-4421 | MEI | 25 | 4,2 | 0 | 0 | 234 | 148 | Ng | IV | 2 anos | |
| B07-2719 | MEI | 30 | 3,1 | 0 | 0 | 4 | 257 | - | - | 2 anos | |
| B07-2941 | MEI | 43 | 3,2 | 7 | 7 | 33 | 22 | Ng | - | 2 meses | Granuloma no plexo mientérico |
| B09-0374 | MEI | 27 | 3,2 | 35 | 0 | 6 | 54 | Ng | - | 14 anos | "Megaesôfago avançado" |
| B09-4506 | MEI | 44 | 2,8 | 82 | 113 | 115 | 34 | Ng | III | 15 meses | Disfagia para sólidos há 15 meses. Hipertrofia neuronal |
| B02-4057 | MEI | 37 | 2,6 | 0 | 2 | 101 | 406 | Ng | - | 2,6 anos | "Megaesôfago avançado" |
| B11-3879 | MEI | 79 | 3,8 | 0 | 0 | 0 | 82 | - | IV | - | "Disfagia total" |
| B00-2571 | MEI | 28 | 4,2 | 0 | 6 | 1 | 2 | Ng | IV | 10 anos | |
| B03-3047 | MEI | 36 | 2,8 | 0 | 1 | 2 | 3 | Ng | - | 1 ano | Miosite discreta e focal |
| B04-5267 | MEI | 27 | 2,7 | 0 | 1 | 0 | 0 | Ng | IV | 2 anos | Disfagia lentamente progressiva há 2 anos |
| B09-2006 | MEI | 44 | 2,9 | 0 | 9 | 8 | 3 | Ng | IV | 1 ano | |
| B12-4532 | MEI | 63 | 4,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | IV | 15 anos | Disfagia há 15 anos, recentemente até para líquidos |
| B13-4880 | MEI | 56 | 3,8 | 2 | 0 | 0 | 0 | - | IV | - | |
| HE12-89 | MEI | 71 | 3,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ng | - | - | Eletrocardiograma normal. Tremores tipo Parkinson |
| B06-5970 | MEI | 52 | 4,6 | 0 | 0 | 0 | - | - | IV | - | Miosite e granuloma no plexo mientérico |
| B12-3566 | MEI | 35 | 2,2 | 0 | 0 | 45 | - | - | III | 7 anos | Cardiomiectomia há 3,5 anos |
| B08-5828 | MEI | 27 | 2,6 | - | 1 | 1 | 2 | - | - | 6 anos | Disfagia lentamente progressiva há 6 anos |
| E25 | MEI | 20 | 3,2 | - | 2 | 0 | 10 | Ng | - | 8 anos | |

MEI = megaesôfago idiopático; Diâm = diâmetro máximo do esôfago; Contagem neuronal: número de neurônios em 5 cortes histológicos de cada anel dos terços inferior (TI), médio (TM) e superior (TS) e em 10 cortes (5 de cada um dos 2 fragmentos longitudinais com extensão de 2,5cm) da região da cárdia (Cd); Ng = negativo; Grau ME = grau de megaesôfago.

Quadro 3 - Grupo MEC

Distribuição dos casos do grupo megaesôfago chagásico segundo idade, diâmetro máximo do esôfago, contagem neuronal no plexo mientérico ao HE e dados/observações correlatas.

| CASO | GRUPO | IDADE (anos) | Diâm (cm) | Cd | TI | TM | TS | PCR | Grau ME | Disfagia | Observações |
|----------|-------|--------------|-----------|----|-----|----|----|-----|---------|----------|--|
| ML97-85 | MEC | 59 | 3,0 | 1 | 7 | 10 | 36 | - | III | - | CChCr. Perfuração intestinal idiopática |
| HE30-00 | MEC | 52 | 4,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | III | Sim | Cardiomiotomia há anos. CChCr; megacólon. Politraumatismo |
| HE46-01 | MEC | 43 | 3,0 | 0 | 35 | 0 | 0 | - | II | Sim | Disfagia há 1 ano. CChCr. Megacólon |
| E8 | MEC | 46 | 3,0 | 0 | 1 | 0 | 4 | Pos | III | Sim | Cardiomiotomia há 3 anos |
| E21 | MEC | 72 | 3,8 | 0 | 0 | 0 | 40 | Pos | IV | Sim | Cardiomiotomia há vários anos. CChCr |
| E24 | MEC | 51 | 4,5 | 7 | 1 | 0 | 32 | Pos | III | Sim | Sem cirurgia anterior |
| HE25-07 | MEC | 72 | 2,4 | 0 | 154 | 79 | 63 | | II | Sim | Disfagia há 1,5 ano. Diâm Cd=1,8cm. Ninho T cruzi coração |
| HE36-05 | MEC | 34 | 4,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | IV | - | CChCr - ICC |
| ML39-86 | MEC | 54 | 3,4 | 0 | 0 | 0 | 0 | | II | - | CChCr – ICC - Megacólon |
| ML20-87 | MEC | 59 | 2,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | | II | Sim | CChCr-ICC - Ninho T. cruzi esôfago - Trab. Imuno-histoq. Disfagia há 6 anos. Megacólon operado há 5 anos. Diâmetro Cd = 1,7cm. |
| HE35-88 | MEC | 72 | 7,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | | IV | Sim | Megacólon discreto |
| ML05-91 | MEC | 50 | 3,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | Sim | CChCr |
| E12 | MEC | 57 | 4,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | Pos | III | Sim | Cardiomiotomia há 15 anos; CChCr - ICC |
| B88-0414 | MEC | 46 | 4,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | | IV | Sim | Cardiomiotomia há 13 anos. Diâmetro Cd = 1,5cm |
| B89-1005 | MEC | 62 | 3,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | | IV | Sim | Disfagia há vários anos |
| B90-1415 | MEC | 42 | 4,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | IV | Sim | Disfagia há 16 anos. Sem cirurgia anterior |
| B91-1989 | MEC | 45 | 4,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | IV | Sim | Disfagia há vários anos |
| E11 | MEC | 38 | 3,9 | 0 | 0 | 0 | 5 | Pos | IV | Sim | Cardiomiotomia há 9 anos |
| HE10-86 | MEC | 43 | 2,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | | - | - | Cardiomiotomia há alguns anos. Megacólon. CChCr |
| ML28-84 | MEC | 28 | 3,3 | - | 5 | 46 | 44 | | III | - | CChCr. Anel junção esofagogástrica (5 lâm=4 neurônios) |
| ML34-87 | MEC | 71 | 5,3 | - | 0 | 0 | 0 | | IV | Sim | Ninho T. cruzi no esôfago – Trabalho Imuno-histoquímica. CChCr – Megacólon – ME perfurado terço distal |
| E26 | MEC | 54 | 3,5 | - | 0 | 3 | 3 | Pos | III | Sim | Sem cirurgia anterior |

MEC = megaesôfago chagásico; Diâm = diâmetro máximo do esôfago; Contagem neuronal: número de neurônios em 5 cortes histológicos de cada anel dos terços inferior (TI), médio (TM) e superior (TS) e em 10 cortes (5 de cada um dos 2 fragmentos longitudinais com extensão de 2,5cm) da região da cárdia (Cd); Pos = positivo; Grau ME = grau de megaesôfago. CChCr = Cardiopatia chagásica crônica. ICC = insuficiência cardíaca congestiva; TCE = traumatismo crânio-encefálico.

Quadro 4 - Grupo CSME

Distribuição dos casos do grupo chagásico sem megaesôfago segundo idade, diâmetro máximo do esôfago, contagem neuronal no plexo mientérico ao HE e dados/observações correlatas.

| CASO | GRUPO | IDADE (anos) | Diâm (cm) | Cd | TI | TM | TS | PCR | Disfagia | Observações |
|---------|-------|--------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|---|
| E1 | CSME | 74 | 1,6 | 83 | 58 | 93 | 1 | - | Não | CChCr - ICC; Megacólon |
| E3 | CSME | 49 | 1,1 | 48 | 165 | 114 | 152 | - | Não | CChCr - HAS |
| E4 | CSME | 61 | 1,6 | 48 | 20 | 68 | 60 | Pos | Não | CChCr – Morte súbita |
| E7 | CSME | 66 | 1,4 | 0 | 28 | 03 | 11 | Pos | Não | CChCr – Morte súbita. Discreto espessamento da muscular na Cd |
| E9 | CSME | 47 | 1,3 | 0 | 98 | 03 | 60 | Ng | Não | CChCr - ICC |
| E14 | CSME | 70 | 1,7 | 78 | 157 | 154 | 72 | Ng | Não | CChCr - ICC |
| E15 | CSME | 40 | 1,9 | 9 | 44 | 36 | 14 | Ng | Sim; meses | CChCr – ICC. Disfagia sem dilatação, mas com discreto afinamento na Cd = 1,4cm (TI = 1,9cm) |
| ML27-87 | CSME | 60 | 1,7 | 28 | 65 | 78 | 30 | - | - | Cardiopatas isquêmica e chagásica crônica |
| E10 | CSME | 49 | 1,8 | 19 | 13 | 0 | 0 | Pos | Não | TCE. Chagásico assintomático. Sem afinamento do Cd=2,2cm (TI=1,8cm) |
| E13 | CSME | 52 | 1,1 | 216 | 141 | 90 | 92 | Pos | Não | Alcoolismo; endocardite séptica |
| E23 | CSME | 38 | 1,5 | 328 | 138 | 208 | 100 | - | - | Chagásico assintomático; provável forma indeterminada. TCE. |
| HE06-03 | CSME | 93 | 1,9 | 3 | 156 | 75 | 56 | - | Sim; 5 meses | CChCr; câncer de pulmão. Cd = TI = 1,9cm. |
| HE26-99 | CSME | 72 | 1,7 | 111 | 208 | 110 | - | - | - | CChCr; megacólon (C47=E28); megavesícula |
| E22 | CSME | 66 | 1,9 | - | 143 | 129 | 87 | Ng | - | CChCr e isquêmica - ICC. |
| ML37-85 | CSME | 77 | 2,3 | - | 44 | 09 | 41 | - | - | CChCr e hipertensiva . Anel antigo na junção esofagogástrica (5 lâm = 8 neurônios) |
| HE54-85 | CSME | 51 | 2,2 | - | 08 | 0 | 50 | - | - | CChCr. Morte Súbita. Sem afinamento da Cd (diâmetro similar ao TI) |
| ML13-86 | CSME | 44 | 1,8 | - | 175 | 157 | 45 | - | Não | CChCr – Morte súbita |
| HE24-86 | CSME | 43 | 2,2 | - | 189 | 39 | 05 | - | Não | CChCr – ICC |
| ML26-86 | CSME | 29 | 1,6 | - | 140 | 136 | 34 | - | Sim | CChCr – Morte Súbita. Necessitava ingerir água nas refeições. Cd = TI |
| ML44-86 | CSME | 20 | 1,9 | - | 97 | 138 | 16 | - | - | CChCr – Morte Súbita. |
| ML52-86 | CSME | 45 | 1,5 | - | 19 | 0 | 0 | - | - | CChCr - ICC |
| ML80-86 | CSME | 45 | 1,8 | - | 99 | 122 | 10 | - | - | CChCr |
| ML14-87 | CSME | 38 | 2,3 | - | 147 | 107 | 95 | - | - | CChCr . Anel antigo na junção esofagogástrica (5 lâm = 52 neurônios) |
| ML21-87 | CSME | 44 | 1,9 | - | 57 | 33 | 57 | - | - | CChCr |
| HE60-88 | CSME | 59 | 1,8 | - | 37 | 67 | 71 | - | - | CChCr |
| HE81-88 | CSME | 73 | 1,9 | - | 161 | 129 | 60 | - | - | Chagásico assintomático. Morte violenta |
| ML13-89 | CSME | 51 | 1,7 | - | 0 | 13 | 72 | - | - | Chagásico assintomático. TCE. Sem afinamento de Cd=2,2cm (TI=1,7cm) |
| HE62-92 | CSME | 50 | 1,8 | - | 53 | 30 | 46 | - | - | Chagásico assintomático. Alcoolismo; cirrose. |

CSME = chagásico sem megaesôfago; Diâm = diâmetro máximo do esôfago; Contagem neuronal: número de neurônios em 5 cortes histológicos de cada anel dos terços inferior (TI), médio (TM) e superior (TS) e em 10 cortes (5 de cada um dos 2 fragmentos longitudinais com extensão de 2,5cm) da região da cárdia (Cd);); Ng = negativo; Pos = positivo. CChCr = Cardiopatia chagásica crônica. ICC = insuficiência cardíaca congestiva; TCE = traumatismo crânio-encefálico.

A **Tabela 3** mostra o resultado da comparação da **contagem neuronal ao HE** no plexo mientérico do esôfago **em cada grupo** de estudo, **segundo a região estudada**. Em todos os **87 casos** foram analisadas, **pelo menos, três regiões**. No TI e TM foi possível avaliar todos os 87 casos (NC = 19, MEI = 18, MEC = 22 e CSME = 28). Entretanto, no TS foram avaliados 83 casos (NC = 18, MEI = 16, MEC = 22 e CSME = 27) e, na extremidade distal (Cd), só foi possível analisar 62 casos (NC = 14, MEI = 16, MEC = 19 e CSME = 13).

Tabela 3 - Mediana (Med), valores mínimo (mín) e máximo (máx) da contagem neuronal ao HE no plexo mientérico de cada região do esôfago, segundo o grupo de estudo.

| REGIÃO | Cd | | TI | | TM | | TS | |
|--------|------------------|---------|-------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx |
| GRUPOS | | | | | | | | |
| NC | 244 ^a | 48-400 | 188 ^a | 102-300 | 182 ^a | 40-287 | 128,5 ^a | 59-253 |
| MEI | 0 ^b | 0-82 | 0,5 ^b | 0-113 | 1,5 ^{b,c} | 0-234 | 6,5 ^{b,c} | 0-406 |
| MEC | 0 ^b | 0-7 | 0 ^b | 0-154 | 0 ^b | 0-79 | 0 ^b | 0-63 |
| CSME | 48 ^a | 0-328 | 97,5 ^c | 0-208 | 76,5 ^c | 0-208 | 50 ^c | 0-152 |

Teste: Kruskal-Wallis. Letras iguais nas **colunas** indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$) e letras diferentes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$). NC = não chagásico; MEI = megaesôfago chagásico; MEC = megaesôfago chagásico; CSME = chagásico sem megaesôfago.

A análise da Tabela 3 evidencia que, na **Cd**, houve denervação estatisticamente significativa nos grupos MEI e MEC em relação aos grupos NC e CSME, os quais não diferiram entre si, estatisticamente. Nota-se, também, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos MEI x MEC. Observa-se que, nesta região, a contagem neuronal conseguiu separar nitidamente os grupos com e sem megaesôfago. Entretanto, os valores mínimo e máximo (0 - 328) da contagem neuronal mostram a extrema variabilidade no grupo CSME, pois, embora a denervação média neste grupo, na Cd, tenha sido aproximadamente 80%, analisando-se os casos isoladamente, observa-se sobreposição de alguns desses casos com os megas e, outros, com casos do grupo NC.

Como regra geral, observou-se nos megas, aganglionose ou hipoganglionose com denervação maior que 95% na Cd. Contudo, houve duas exceções no grupo MEI, um caso com denervação de 86% (B09-0374) e, outro, de 66% (B09-4506).

Com relação ao **TI**, houve denervação significativa nos grupos MEC, MEI e CSME quando comparados ao NC. A denervação média no grupo CSME foi de aproximadamente de 52%, tendo sido menor que nos grupos MEC e MEI, os quais não diferiram entre si, estatisticamente. Esses dados mostram de certa forma que esta também é uma boa região para a análise da denervação, pois permite, de modo geral, a diferenciação entre os grupos

com e sem mega. A exemplo do descrito para a Cd, a regra geral no TI foi aganglionose ou hipoganglionose intensa com denervação maior que 95% nos megas. Todavia, houve uma exceção no grupo MEI, com denervação de apenas 40% no TI (B09-4506) e, duas exceções no grupo MEC, com denervação de 81% em um caso (HE46-01) e de apenas 18% em outro (HE 25-07).

Quanto ao **TM** e **TS**, houve denervação significativa nos grupos MEC, MEI e CSME em relação ao NC e, do MEC, em relação ao CSME. Talvez esses dados indiquem que denervação nessas regiões seja menos importante para desencadear megaesôfago e que as melhores regiões para o estudo de megaesôfago sejam TI e Cd. Em nosso material, a denervação no MEC foi mais uniforme, com raros casos ainda apresentando neurônios. Entretanto, no grupo MEI foi menos uniforme, talvez porque neste presente estudo havia casos com pouco tempo de doença. O grupo CSME foi bastante heterogêneo com denervação bem variável de um caso para outro.

A **Tabela 4** apresenta o resultado da comparação da **contagem neuronal ao HE**, no plexo mientérico, em **58 dos 87 casos**, nos quais foi possível realizar a análise das **quatro regiões** do esôfago, **segundo o grupo de estudo**.

Tabela 4 - Mediana (Med), valores mínimo (mín) e máximo (máx) da contagem neuronal ao HE no plexo mientérico, em cada região do esôfago, segundo o grupo de estudo.

| GRUPOS | REGIÃO | | | | | | | | |
|--------|--------|------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | Cd | | TI | | TM | | TS | | |
| N | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx | |
| NC* | 13 | 248^f | 48-400 | 184^{fg} | 102-300 | 161^{gh} | 40-287 | 107^h | 59-238 |
| MEI** | 14 | 0^f | 0-82 | 0,5^f | 0-113 | 3^f | 0-234 | 12,5^f | 0-406 |
| MEC** | 19 | 0^f | 0-7 | 0^f | 0-154 | 0^f | 0-79 | 0^f | 0-63 |
| CSME* | 12 | 38^f | 0-328 | 81,5^f | 13-165 | 76,5^f | 0-208 | 58^f | 0-152 |

*Teste - ANOVA com medidas repetidas; **Teste: Friedman. Letras iguais nas **linhas** indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões em cada grupo ($p > 0,05$) e letras diferentes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$); NC = não chagásico; MEI = megaesôfago chagásico; MEC = megaesôfago chagásico; CSME = chagásico sem megaesôfago.

A Tabela 4 mostra que no grupo NC (controle) há um número significativamente maior de neurônios na Cd em relação ao TM e TS e, sem diferença estatisticamente significativa, em relação ao TI. Nota-se, ainda, maior número de neurônios no TI quando comparado ao TS. Observa-se que os valores do TI e TM são intermediários entre Cd e TS, evidenciando um aumento da população neuronal no sentido crânio-caudal.

Nos grupos MEI e MEC não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de neurônios entre as regiões, observando-se, frequentemente, aganglionose. Entretanto, em alguns casos, ainda havia frequentes neurônios, principalmente nas regiões proximais.

No grupo CSME, o percentual médio de denervação foi em torno de 85% na Cd, e de 46% a 55%, nos terços esofágicos. Entretanto, talvez pela heterogeneidade deste grupo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões. Interessante destacar que dois casos deste grupo, em que havia referência à disfagia em vida (HE06-03 e E15), a maior denervação era na Cd e, em ambos, ultrapassava 95% apenas nesta região. Contudo, outros dois casos com denervação similar, segundo os familiares, não queixavam de disfagia em vida.

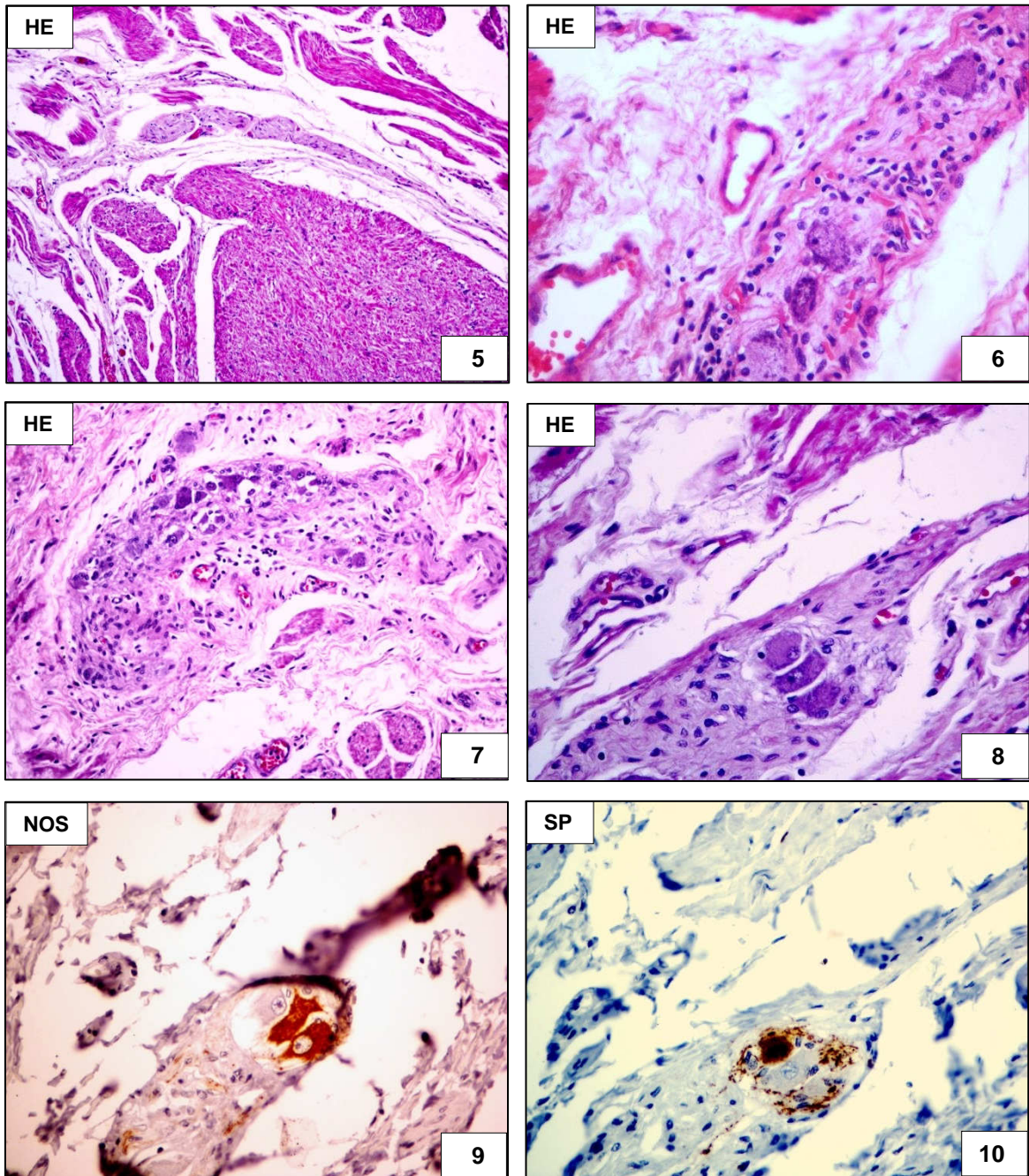
Embora não tenha sido objetivo deste presente estudo, durante o exame das lâminas para contagem neuronal pudemos observar diversas alterações como ganglionite e miosite. As Figuras 5 a 28 exemplificam o aspecto microscópico mais frequente, distribuído em uma prancha para cada grupo de estudo, tanto nas lâminas coradas ao HE, como por imuno-histoquímica.

No **grupo NC (Figuras 5 a 10)** não foi vista miosite em nenhum caso, porém ganglionite discreta, compreendida como a presença de infiltrado predominantemente mononuclear discreto, foi vista, pelo menos em uma região, em todos os casos. No entanto, não havia alterações degenerativas nos neurônios, os quais se mostravam bem preservados, tanto ao HE quanto à imuno-histoquímica e foram vistos vasos sanguíneos no interior dos gânglios. Em raros casos parecia haver espessamento na muscular circular e distribuição das miocélulas em diferentes sentidos na região mais distal (Cd), lembrando um esfíncter anatômico.

No grupo NC o número de neurônios nas 5 lâminas de HE variou de 40 a 300 células na Cd e de 48 a 400 nos terços (**Anexo 3**).

As **figuras 8, 9 e 10** exemplificam o modo como foi feito o estudo quantitativo de neurônios inibitórios (NOS+) *versus* excitatórios (SP+). Em um corte histológico corado por HE eram contados todos os neurônios do plexo mientérico (Fig. 8). Em cortes pareados, corados por imuno-histoquímica, um para NOS e outro para SP, eram computados os neurônios positivos. Posteriormente, calculava-se o percentual positivo para cada anticorpo, em relação ao número total obtido ao HE, considerado como 100%. Alguns neurônios não se coravam com nenhum desses anticorpos, como já era esperado, pois existem outros neurotransmissores, além dos que foram utilizados neste estudo.

Grupo NC

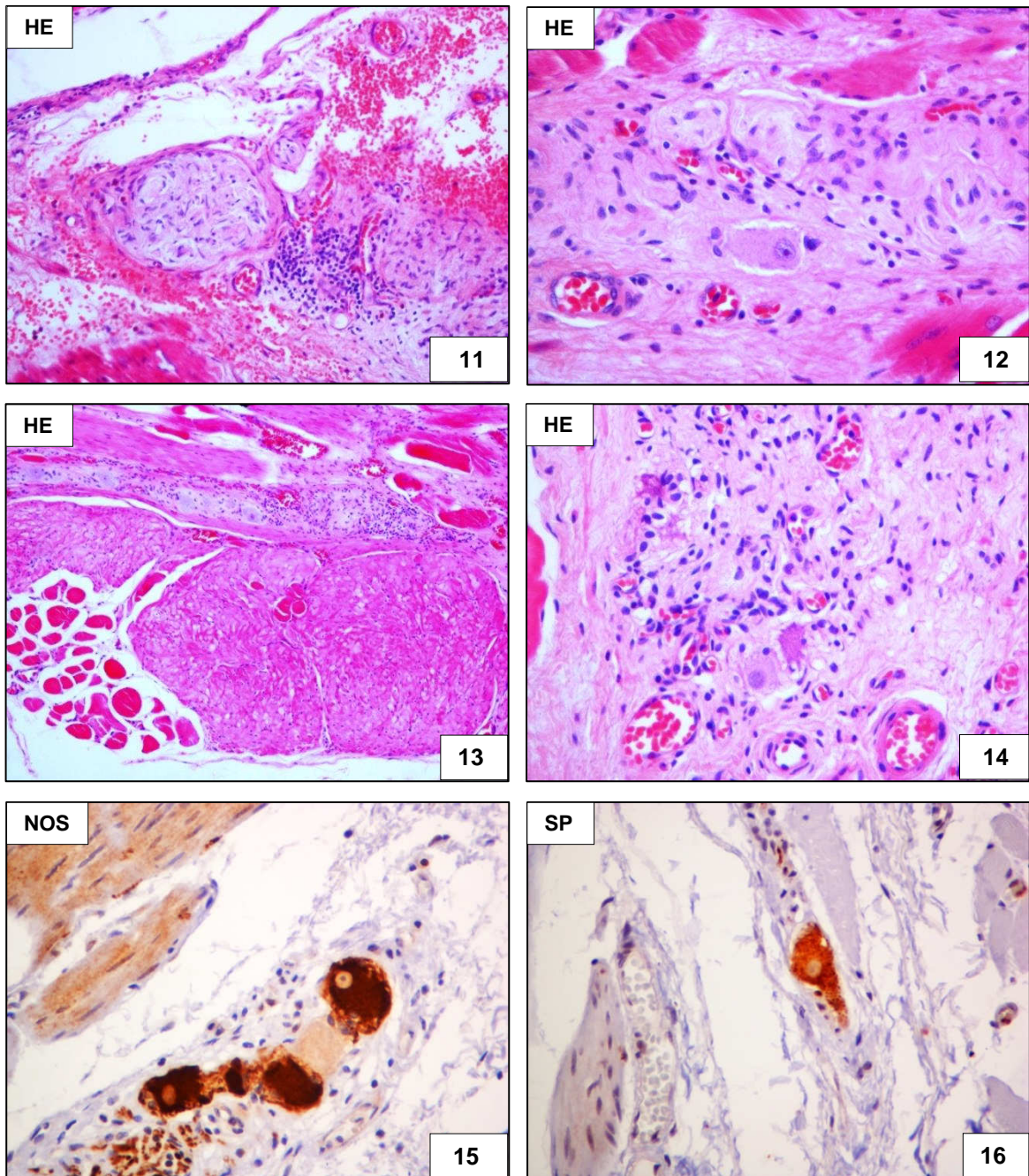


Figuras 5 a 10 - Fotomicrografias do grupo controle – não chagásico (NC)

Na **Fig. 5** observa-se plexo mientérico normal e camada muscular circular, sem miosite, que apresenta área de espessamento neste corte longitudinal (Cd) da região correspondente ao esfíncter inferior do esôfago (HE, 100x). A **Fig. 6** representa o padrão mais frequente neste grupo: ganglionite discreta, neurônios normais e vasos sanguíneos de permeio (HE, 400x). Na **Fig. 7** nota-se gânglio com grande número de neurônios, que estava localizado na parte proximal do fragmento longitudinal da Cd (HE, 100x). **As Figs. 8, 9 e 10** representam cortes seriados de um mesmo gânglio no qual se observam 3 neurônios corados pela técnica de HE (**Fig. 8** - 400x), sendo que pela técnica de imuno-histoquímica, 2 deles foram positivos para NOS (**Fig. 9** - 400x) e um para SP (**Fig. 10** - 400x). Notar que filetes nervosos SP positivos envolvem neurônios SP negativos.

As **Figuras 11 a 16** ilustram as alterações mais frequentes no **grupo MEI**. Ganglionite foi um pouco mais frequente neste grupo que no NC, mas bem menos intensa que no grupo MEC. Granuloma no plexo mientérico foi visto em um caso, assim como um caso apresentou miosite discreta e focal. Notou-se, também, fibrose no plexo mientérico em vários casos, por vezes aderindo os gânglios à muscular. Fibrose focal foi vista na muscular em raros casos, notando-se ocasionalmente miocitólise adjacente, sugerindo alteração isquêmica. Notou-se aganglionose difusa (ausência de neurônios em todas as regiões) em 3 (17%) casos e, em outros 7 (39%), observou-se hipoganglionose muito intensa, encontrando-se raríssimos neurônios em algumas regiões (**Anexo 4**). Em 7 (39%) casos havia denervação intensa na Cd e TI e menor denervação no TM e/ou TS. Apenas em um (5%) caso não havia denervação intensa na Cd e/ou TI; este paciente tinha queixa de disfagia para sólidos somente há 15 meses (B09-4506). As figuras 15 e 16 mostram neurônios inibitórios (NOS+) e excitatórios (SP+) bem preservados. Embora não tenha sido feita medida do diâmetro dos neurônios, em vários casos do grupo MEI, pareciam maiores que os do grupo NC, ou seja, tinham aspecto hipertrofiado.

Grupo MEI



Figuras 11 a 16 - Fotomicrografias do grupo megaesôfago idiopático (MEI)

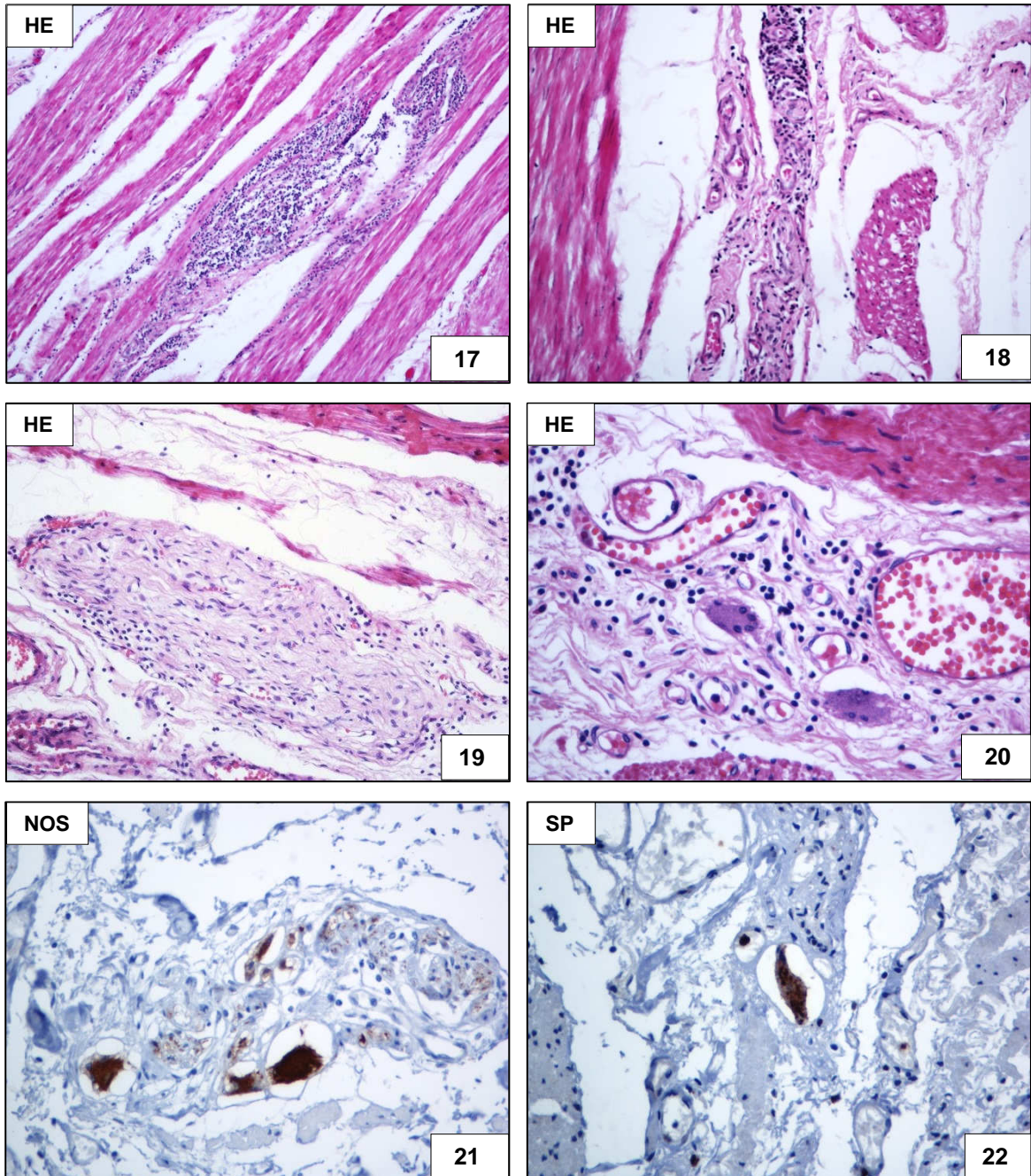
Na **Fig. 11** observa-se o padrão mais frequente neste grupo: aganglionose e inflamação crônica no plexo mientérico (HE, 200x). Na **Fig. 12**, neurônios residuais que foram vistos mais frequentemente no TM e no TS, por vezes hipertrofiados (HE, 400x). Na **Fig. 13** observar a camada muscular sem miosite, que foi o padrão usual no MEI (HE, 100x). Na **Fig.14** observa-se ganglionite e hipoganglionose com fibrose aderindo o gânglio ao tecido em torno (HE, 400x). Na **Fig. 15** nota-se gânglio do TS corado por imuno-histoquímica apresentando 4 neurônios positivos para NOS e um negativo (400x). Na **Fig. 16** nota-se apenas um neurônio positivo para SP (400x).

As **Figuras 17 a 22** ilustram as alterações mais frequentes no **grupo MEC**. Miosite, ganglionite, fibrose no plexo e na muscular, foram achados frequentes e intensos, além de aganglionose. Nenhum neurônio foi visto, em nenhuma região (aganglionose difusa), em 13 (59%) casos e, em outros 6 (27%) dos 22 casos do grupo MEC, observou-se aganglionose ou hipoganglionose muito intensa em pelo menos 3 das 4 regiões estudadas, encontrando-se raríssimos neurônios, por vezes com alterações degenerativas (**Anexo 5**). Em 2 (10%) casos ainda havia esparsos neurônios no TM e TS e, apenas em 1 (5%) caso, a denervação intensa era localizada somente em uma região. Este último caso (HE25-07), que tinha queixa de disfagia apenas há 18 meses, apresentava aganglionose na Cd; porém, no TI a denervação era discreta (18%) e, em torno de 50%, no TM e TS.

Granulomas no plexo gástrico foram vistos em metade dos casos de MEC, em pelo menos uma região. Miosite crônica foi vista em todos os casos deste grupo, ocasionalmente formando granuloma focal.

As figuras 21 e 22 mostram neurônios inibitórios (NOS+) e excitatórios (SP+) com discreta retração citoplasmática, comum em material obtido de necrópsia, porém com marcação bem evidente e discreta ganglionite.

Grupo MEC



Figuras 17 a 22 - Fotomicrografias do grupo megaesôfago chagásico (MEC)

O padrão mais frequente neste grupo foi miosite crônica (**Fig. 17** - HE, 100x) e aganglionose com ganglionite crônica (**Fig. 18** - HE, 100x). Um único caso deste grupo, com diagnóstico de megaesôfago discreto e recente, apresentou aganglionose apenas na Cd (**Fig. 19**- HE, 200x). Nas demais regiões desse caso, observaram-se frequentes neurônios em meio à ganglionite (**Fig. 20** - HE, 400x). As **Fig. 21** e **22** mostram, no TI deste mesmo caso, maior número de neurônios NOS positivos (**Fig. 21**- NOS, 400x), em relação aos SP positivos (**Fig. 22** - SP, 400x).

As **Figuras 23 a 28** ilustram as alterações mais frequentes no **grupo CSME**.

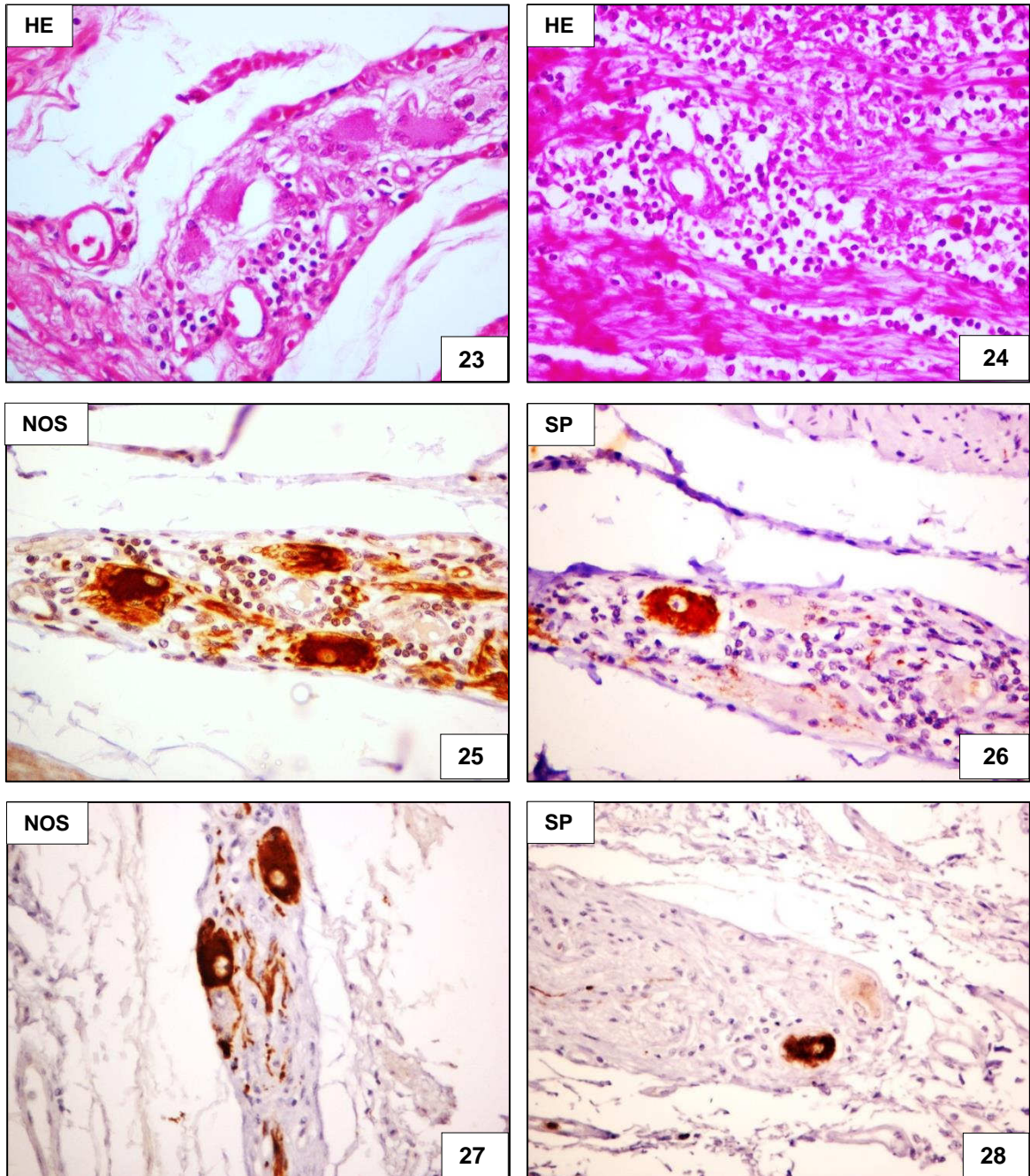
Ganglionite foi vista em todos os casos, sendo, mais frequentemente, discreta, ocasionalmente moderada, podendo ser percebida até mesmo nas lâminas coradas por imuno-histoquímica. Todavia, a intensidade da ganglionite no grupo CSME era, em geral, menor que no grupo MEC e mais frequente que nos grupos MEI e NC.

Miosite, predominantemente discreta, foi vista em mais da metade dos casos. Foram identificados, ainda, esparsos focos de fibrose no plexo e na muscular. Essas alterações, em geral, eram mais discretas e menos frequentes que no grupo MEC.

A denervação foi muito variável, observando-se casos com número de neurônios ora semelhante ao grupo NC, ora próximo do grupo MEI. Alguns casos mostravam denervação intensa em diversas regiões, porém outros eram mais heterogêneos (**Anexo 6**).

Em 4 (31%) dos 13 casos de CSME em que foi possível a contagem neuronal na Cd, havia denervação maior que 95% nesta região. Dois desses pacientes queixavam de disfagia antes do óbito, conforme já referido anteriormente. Esses dois pacientes com disfagia apresentavam denervação de 77% e 27% no TI e, os outros dois, de 85% e 48%. O estudo imuno-histoquímico foi possível em 3 desses 4 casos com denervação intensa na Cd e evidenciou certa desproporção de NOS *versus* SP, com perda maior de NOS no caso com disfagia (E15), o que não foi visto nos outros dois que não apresentavam queixa de disfagia.

Grupo CSME



Figuras 23 a 28 - Fotomicrografias do grupo chagásico sem megaesôfago (CSME) Neste grupo observaram-se frequentes ganglionite (**Fig. 23** - HE, 400x) e miosite crônica (**Fig. 24** - HE, 400x), embora menos intensas que no MEC. Houve grande variação na contagem neuronal neste grupo. As **Figs. 25 a 28** mostram neurônios corados por imuno-histoquímica, notando-se ganglionite na Cd (**Fig. 25** - NOS, 400x; **Fig. 26** - SP, 400x) e sem ganglionite no TM (**Fig. 27** - NOS, 400x; **Fig. 28** - SP, 400x).

3. Avaliação através de imuno-histoquímica da proporção de neurônios NOS positivos (inibitórios) versus SP positivos (excitatórios)

O **Quadro 5** mostra o resultado da contagem do tipo de neurônio no plexo mientérico do esôfago através de imuno-histoquímica, nos **28 casos** em que foi possível realizá-la nas **quatro regiões** (NC = 6, MEI = 7, MEC = 7 e CSME = 8), marcando-se com **NOS** os neurônios inibitórios e, com **SP**, os neurônios excitatórios, tendo como referencial de 100% o número obtido na lâmina pareada, corada ao HE.

Quadro 5 – Distribuição dos casos segundo grupos de estudo, número de neurônios/percentual correspondente no plexo mientérico, ao HE e imuno-histoquímica - neurônios imunorreagentes a NOS (inibitórios) e a SP (excitatórios) - na cárdia e nos diferentes terços esofágicos.

| Caso | Grupo | Cd - número | | | Cd % | | | TI - número | | | TI % | | | TM - número | | | TM % | | | TS - número | | | TS % | | |
|----------|-------|-------------|-----|----|------|-----|----|-------------|-----|----|------|-----|----|-------------|-----|----|------|-----|----|-------------|-----|----|------|-----|----|
| | | HE | NOS | SP | HE | NOS | SP | HE | NOS | SP | HE | NOS | SP | HE | NOS | SP | HE | NOS | SP | HE | NOS | SP | HE | NOS | SP |
| E2 | NC | 59 | 40 | 6 | 100 | 68 | 10 | 48 | 31 | 7 | 100 | 65 | 15 | 62 | 44 | 12 | 100 | 71 | 19 | 55 | 52 | 2 | 100 | 94 | 4 |
| E5 | NC | 72 | 52 | 8 | 100 | 72 | 11 | 38 | 26 | 7 | 100 | 68 | 18 | 29 | 18 | 4 | 100 | 62 | 14 | 32 | 28 | 2 | 100 | 87 | 6 |
| ML29-87 | NC | 62 | 43 | 8 | 100 | 69 | 13 | 43 | 26 | 6 | 100 | 60 | 14 | 32 | 26 | 2 | 100 | 81 | 6 | 32 | 30 | 1 | 100 | 94 | 3 |
| HE90-98 | NC | 87 | 60 | 21 | 100 | 69 | 24 | 25 | 16 | 5 | 100 | 64 | 20 | 48 | 30 | 13 | 100 | 62 | 27 | 17 | 12 | 2 | 100 | 71 | 12 |
| HE25-99 | NC | 50 | 36 | 5 | 100 | 72 | 10 | 41 | 31 | 8 | 100 | 76 | 19 | 12 | 7 | 3 | 100 | 58 | 25 | 39 | 34 | 3 | 100 | 87 | 8 |
| HE43-99 | NC | 46 | 29 | 8 | 100 | 63 | 17 | 25 | 16 | 6 | 100 | 64 | 24 | 40 | 24 | 9 | 100 | 60 | 22 | 37 | 35 | 1 | 100 | 95 | 3 |
| B06-4421 | MEI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 69 | 42 | 10 | 100 | 61 | 14 | 36 | 27 | 3 | 100 | 75 | 8 |
| B07-2719 | MEI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 55 | 44 | 10 | 100 | 80 | 18 |
| B07-2941 | MEI | 2 | 1 | 0 | 100 | 50 | 0 | 2 | 2 | 0 | 100 | 100 | 0 | 10 | 8 | 1 | 100 | 80 | 10 | 2 | 2 | 0 | 100 | 100 | 0 |
| B09-0374 | MEI | 3 | 2 | 1 | 100 | 67 | 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 100 | 100 | 0 | 4 | 3 | 0 | 100 | 67 | 0 |
| B09-4506 | MEI | 7 | 3 | 2 | 100 | 43 | 29 | 8 | 5 | 1 | 100 | 62 | 12 | 8 | 6 | 1 | 100 | 75 | 12 | 5 | 4 | 0 | 100 | 80 | 0 |
| B02-4057 | MEI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 100 | 100 | 0 | 19 | 16 | 1 | 100 | 84 | 5 | 77 | 58 | 8 | 100 | 75 | 10 |
| B11-3879 | MEI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 12 | 1 | 100 | 80 | 7 |
| ML97-85 | MEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 100 | 67 | 0 | 20 | 18 | 0 | 100 | 90 | 0 |
| HE30-00 | MEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HE46-01 | MEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 1 | 100 | 60 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E8 | MEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E21 | MEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 100 | 100 | 0 |
| E24 | MEC | 4 | 3 | 0 | 100 | 75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 1 | 100 | 60 | 20 |
| HE25-07 | MEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 30 | 1 | 100 | 94 | 3 | 25 | 22 | 1 | 100 | 88 | 4 | 15 | 13 | 1 | 100 | 87 | 7 |
| E1 | CSME | 19 | 14 | 2 | 100 | 74 | 11 | 9 | 5 | 1 | 100 | 55 | 11 | 17 | 12 | 2 | 100 | 72 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E3 | CSME | 30 | 24 | 3 | 100 | 80 | 10 | 35 | 31 | 2 | 100 | 89 | 6 | 26 | 24 | 0 | 100 | 92 | 0 | 45 | 38 | 0 | 100 | 84 | 0 |
| E4 | CSME | 11 | 8 | 0 | 100 | 73 | 0 | 10 | 9 | 1 | 100 | 90 | 10 | 7 | 5 | 0 | 100 | 71 | 0 | 18 | 18 | 0 | 100 | 100 | 0 |
| E7 | CSME | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 5 | 1 | 100 | 83 | 17 | 1 | 1 | 0 | 100 | 100 | 0 | 5 | 4 | 0 | 100 | 80 | 0 |
| E9 | CSME | 6 | 5 | 0 | 100 | 83 | 0 | 26 | 22 | 4 | 100 | 85 | 15 | 1 | 1 | 0 | 100 | 100 | 0 | 17 | 14 | 0 | 100 | 82 | 0 |
| E14 | CSME | 38 | 30 | 4 | 100 | 79 | 11 | 22 | 20 | 1 | 100 | 91 | 5 | 66 | 53 | 3 | 100 | 80 | 5 | 9 | 8 | 0 | 100 | 89 | 0 |
| E15 | CSME | 12 | 7 | 3 | 100 | 58 | 25 | 7 | 6 | 0 | 100 | 86 | 0 | 9 | 7 | 0 | 100 | 78 | 0 | 6 | 5 | 0 | 100 | 83 | 0 |
| ML27-87 | CSME | 18 | 12 | 1 | 100 | 67 | 6 | 35 | 27 | 2 | 100 | 77 | 6 | 16 | 12 | 0 | 100 | 75 | 0 | 6 | 4 | 0 | 100 | 67 | 0 |

NC = não chagásico-controle; CSME = chagásico sem megaesôfago; MEC = megaesôfago chagásico; MEI = megaesôfago idiopático; Cd = Cárdia; TI = Terço Inferior; TM = Terço Médio; TS = Terço Superior.

Como se observa no Quadro 5, a variabilidade foi grande quanto ao percentual de cada tipo de neurônio e, por outro lado, a quantidade de neurônios nos megas foi muito pequena.

O **Gráfico 1** compara as medianas do número de neurônios NOS+ e SP+ em cada região, segundo os grupos de estudo.

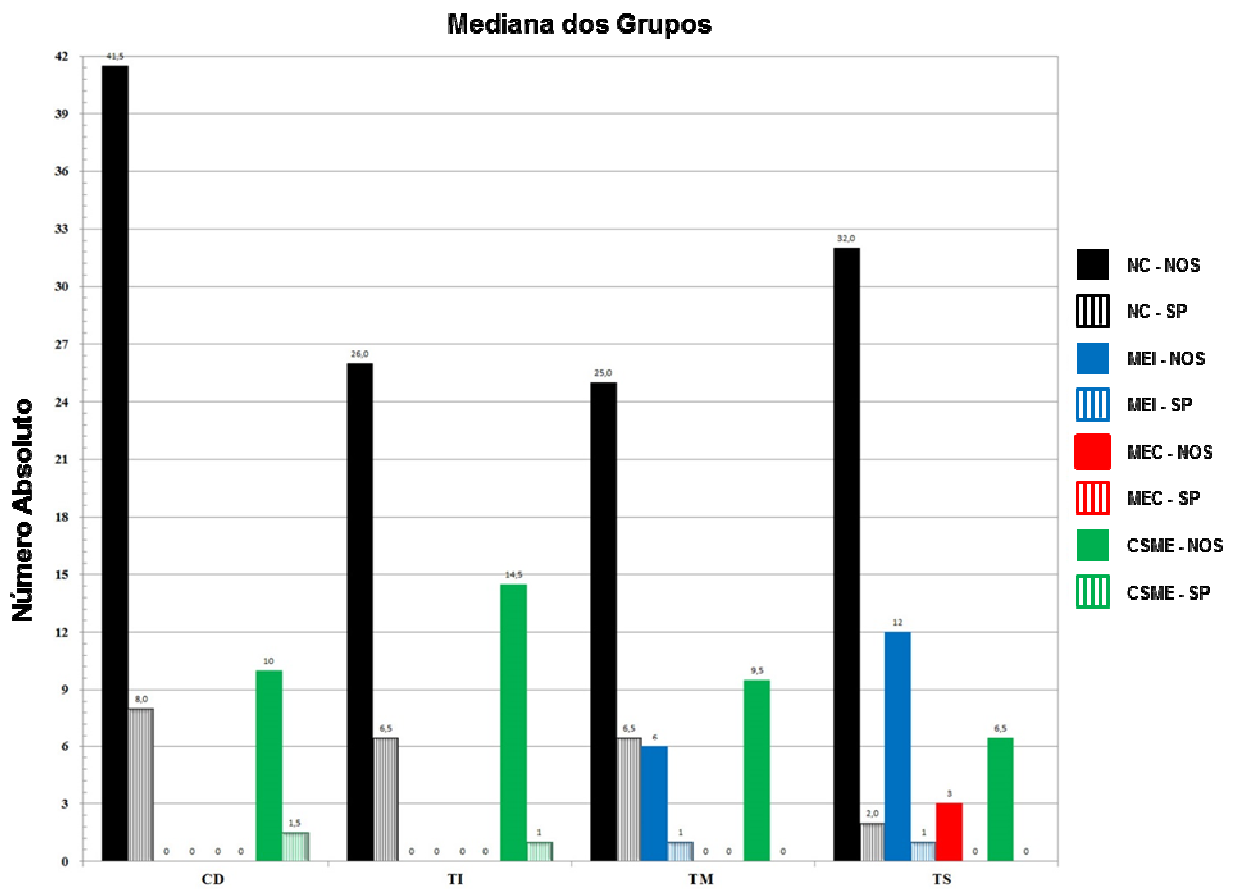


Gráfico 1 – Medianas do número de neurônios NOS+ e SP+, em cada região, segundo os grupos de estudo.

NC = não chagásico-controle; MEI = megaesôfago idiopático; MEC = megaesôfago chagásico; CSME = chagásico sem megaesôfago; Cd = Cárdia; TI = Terço Inferior; TM = Terço Médio; TS = Terço Superior.

Como se observa no Gráfico 1, há uma quantidade muito maior de neurônios NOS+ (inibitórios), que SP+ (excitatórios), em todas as regiões, notando-se perda neuronal (denervação) de ambos os tipos de neurônios nos grupos com megaesôfago, sobretudo na Cd e TI.

A comparação do número de neurônios NOS+ e SP+ entre os grupos (Teste de

Kruskal-Wallis), em cada região, seguiu o resultado obtido na comparação da contagem neuronal ao HE, não evidenciando tendência de redução maior de neurônios NOS ou SP em nenhum grupo.

Vale ressaltar que três casos apresentaram percentual de redução de neurônios NOS+ (inibitórios) na Cd maior, desproporcionalmente, ao dos SP+ (excitatórios): dois no grupo MEI (B09-0374 e B09-4506) e, outro, no grupo CSME (E15), que tinha queixa de disfagia.

A **Tabela 5** apresenta o resultado da comparação da contagem de **neurônios NOS+**, no plexo mientérico, nos 28 casos em que foi possível realizar a análise imuno-histoquímica nas quatro regiões do esôfago, segundo o grupo de estudo.

Tabela 5 - Mediana (Med), valores mínimo (mín) e máximo (máx) da contagem de neurônios NOS positivos, no plexo mientérico, em cada região do esôfago, segundo o grupo de estudo.

| GRUPOS | REGIÃO | | | | | | | | |
|--------|--------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|
| | | Cd | | TI | | TM | | TS | |
| | N | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx |
| NC* | 6 | 41 ^f | 29-60 | 26 ^f | 16-31 | 25 ^f | 7-44 | 32 ^f | 12-52 |
| MEI* | 7 | 0 ^f | 0-3 | 0 ^f | 0-5 | 6 ^f | 0-42 | 12 ^f | 2-58 |
| MEC* | 7 | 0 ^f | 0-3 | 0 ^f | 0-30 | 0 ^f | 0-22 | 0 ^f | 0-18 |
| CSME* | 8 | 10 ^f | 0-30 | 14 ^f | 5-31 | 9 ^f | 1-53 | 6 ^f | 0-38 |

*Teste: Friedman. Letras iguais nas **linhas** indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões em cada grupo ($p > 0,05$) e letras diferentes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$); NC = não chagásico; MEI = megaesôfago chagásico; MEC = megaesôfago chagásico; CSME = chagásico sem megaesôfago.

A Tabela 5 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de neurônios NOS+ (inibitórios) entre as regiões, em nenhum grupo de estudo.

A **Tabela 6** apresenta o resultado da comparação da contagem de neurônios **SP+** (**excitatórios**), no plexo mientérico, nos 28 casos em que foi possível realizar a análise imuno-histoquímica nas quatro regiões do esôfago, segundo o grupo de estudo.

Tabela 6 - Mediana (Med), valores mínimo (mín) e máximo (máx) da contagem de neurônios SP positivos, no plexo mientérico, em cada região do esôfago, segundo o grupo de estudo.

| GRUPOS | REGIÃO | | | | | | | | | |
|--------|--------|----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|----------------------|---------|--|
| | | Cd | | | TI | | TM | | TS | |
| | n | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx | Med | mín-máx | |
| NC* | 6 | 8^f | 5-21 | 6^{fg} | 5-8 | 6^{fg} | 2-13 | 2^g | 1-3 | |
| MEI* | 7 | 0^f | 0-2 | 0^f | 0-1 | 1^f | 0-10 | 1^f | 0-10 | |
| MEC* | 7 | 0^f | 0-1 | 0^f | 0-1 | 0^f | 0-1 | 0^f | 0-1 | |
| CSME* | 8 | 1^f | 0-4 | 1^f | 0-4 | 0^f | 0-3 | 0^f | 0-0 | |

*Teste: Friedman. Letras iguais nas **linhas** indicam que não houve diferença estatisticamente significante entre as regiões em cada grupo ($p > 0,05$) e letras diferentes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$); NC = não chagásico; MEI = megaesôfago chagásico; MEC = megaesôfago chagásico; CSME = chagásico sem megaesôfago.

A Tabela 6 mostra que no grupo **NC** (controle) há um número significamente maior de neurônios **SP+** (excitatórios) na Cd em relação ao TS. Nos demais grupos, não houve diferença estatisticamente significante na contagem de neurônios excitatórios entre as regiões. Vale ressaltar que o caso de MEC com aganglionose na Cd e sem denervação intensa nos terços (HE25-07) apresentou maior redução de neurônios **SP+** (excitatórios) nos terços esofágicos, em relação aos **NOS+** (inibitórios).

Discussão

1. Dados Gerais

A média da **idade** no grupo MEI deste estudo é semelhante a dados da literatura (HOCHINO et al., 2013; SODIKOFF et al., 2016). Foi um pouco menor no MEI que nos demais grupos deste estudo; contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa. A escolha dos casos dos grupos NC e CSME para este estudo foi feita inicialmente tentando pareá-los ao grupo MEC, para evitar viés eventual em decorrência da denervação esofágica fisiológica, que pode ocorrer com o envelhecimento (KOBBERLE, 1968). O grupo MEI foi formado de modo sequencial, à medida que recebíamos as peças de esofagectomia, pois esse era o grupo mais difícil de obter casos em nossa região. Todavia, a menor idade do grupo MEI em relação ao MEC poderia ser pela doença surgir em idade mais precoce, ou talvez porque a intervenção cirúrgica de esofagectomia ocorreu, em nossa instituição, mais precocemente no MEI do que no MEC. Ademais, vários casos do grupo MEC foram de necrópsias, ao contrário do grupo MEI. Vale lembrar ainda que os pacientes chagásicos frequentemente provêm da zona rural, na qual é bem conhecido esse problema de disfagia e, o paciente, sem maiores recursos financeiros, muitas vezes demora a buscar auxílio médico, usando por muitos anos a manobra de ingerir mais líquido durante as refeições para vencer mecanicamente a resistência do EEI. Por outro lado, o MEI pode surgir em uma faixa etária mais precoce e de modo rápido, em pacientes que não apresentavam nenhum problema anterior e, que assustados, além de terem mais facilidade na zona urbana, buscam mais rapidamente o auxílio médico.

Com relação ao **sexo**, talvez o visto no grupo MEI seja o que mais corresponda ao que se observa clinicamente e, em outros estudos de peças cirúrgicas (HOCHINO et al., 2013; SODIKOFF et al., 2016). Embora MEC e doença de Chagas sejam, em geral, um pouco mais frequentes no sexo masculino, a diferença mais acentuada no presente estudo, deve-se provavelmente ao fato de termos trabalhado mais com casos de necrópsias, que na UFTM, são autorizadas mais frequentemente em homens que em mulheres.

Quanto à dilatação esofágica, dois casos de megas do presente estudo apresentavam **diâmetros** menores que o característico para o diagnóstico anatomopatológico macroscópico de megaesôfago (ADAD et al., 1991), sendo um do grupo MEI (2,2cm) e outro de MEC (2,4cm). Esses casos foram mantidos neste estudo porque tinham diagnóstico clínico-radiológico pré-cirúrgico (MEI) e *premortem* (MEC) de megaesôfago. Além disso, ao contrário dos casos dos grupos NC e CSME, apresentavam menor diâmetro na cárdia que no TI, confirmando o afinamento desta região que em geral ocorre no megaesôfago (Adad, 1989; Rezende, 1982). O caso do grupo MEI (B12-3566) também apresentava hipertrofia da muscular, que tinha espessura de 0,3cm no TI e TM, enquanto nos controles a muscular tinha em geral espessura de 0,1 a 0,2cm. Ademais, este paciente fora submetido à cardiomiectomia 3,5 anos antes, o que pode favorecer redução da dilatação do órgão. Por essas razões, acreditamos ser válida a regra geral de diagnosticar macroscopicamente como megaesôfago, o órgão com diâmetro a partir de 2,5cm, após fixação em formol, proposta por Adad et al. (1991). Porém, acreditamos que nos casos com diâmetros entre 2,0 e 2,5cm no TI, seria necessário analisar também outros elementos. O melhor deles seria a correlação clínico-radiológica, que muitas vezes não é possível em material de necrópsia. Entretanto, um dado muito útil é verificar se existe afinamento na extremidade distal do esôfago, pois nos controles, o diâmetro nesta região é um pouco maior que no TI (ADAD, dados não publicados). Outro elemento que poderia auxiliar nesta caracterização macroscópica de megaesôfago é o possível espessamento/hipertrofia da muscular, a exemplo do proposto no megacólon (ADAD, 1996), aonde esta caracterização torna-se ainda mais difícil, devido à distensão por gases. Embora no esôfago, não seja tão comum a distensão *postmortem* como no cólon, alguns casos apresentam dilatação discreta por refluir conteúdo gástrico após o óbito. A hipertrofia da muscular é um achado comum tanto no MEC, quanto no MEI (KOBBERLE, 1963b) e constitui um indicativo de que a dilatação é permanente (ADAD et al, 1991). Apesar de tudo o que foi exposto, ainda poderá haver, ocasionalmente, uma dificuldade: a definição de megaesôfago em um chagásico com importante denervação que esteja migrando de uma forma anectásica para ectásica, que certamente não deve ocorrer de um dia para outro, pois provavelmente a dilatação se faz gradual e lentamente. Alteração similar poderá ocorrer em relação ao grupo idiopático.

2. Análise geral da denervação – contagem neuronal em cortes corados por HE

Com relação à contagem neuronal, nossos dados mostraram, no esôfago normal (NC), maior número de neurônios na Cd em relação ao TM e TS, evidenciando maior população neuronal no sentido crânio-caudal, com certa estabilização a partir do TI, o que está de acordo com os dados de Koberle (1963a, b). No entanto, nesta região avaliamos cortes longitudinais ao invés de anéis. Na realidade, há alguns anos, quando iniciamos um estudo piloto da região distal, retiramos em mais de 10 casos do presente estudo, um anel na região imediatamente acima da junção escamo-colunar. Porém, como dados da literatura (LIBERMANN-MEFFERT et al., 1979) sugeriam que o EEI teria uma extensão longitudinal de 2,5 a 3,1cm (pequena e grande curvatura), optamos por amostrar duas faixas longitudinais de 3,5cm, na pequena e grande curvatura, iniciando 0,5cm abaixo da junção escamo-colunar. Todavia, ao iniciarmos as contagens ao HE, preferimos delimitar uma extensão de 2,5cm em cada uma das duas faixas longitudinais, para analisar área similar a dos anéis esofágicos normais (perímetro em torno de 5cm), pois assim poderíamos comparar com a contagem neuronal nos terços esofágicos. A metodologia de contagem neuronal utilizada no presente estudo foi basicamente similar à criada por Koberle, utilizada por ele e seus colaboradores em diversos estudos (KÖBERLE, 1961, 1963a, b, 1968; KÖBERLE, PENHA & KÖBERLE, 1961). Entretanto, após trabalhar com esta mesma metodologia (ADAD et al., 1991), verificamos que, no esôfago normal, as contagens estabilizavam com cerca de 4 a 5 cortes escalonados; por isso, o número de lâminas utilizadas neste estudo foi de 5 ao invés de 20 cortes para cada bloco.

Nossos achados mostram que a denervação média, na Cd, no grupo CSME como um todo, foi evidente e em torno de 80-85%, o que estaria de acordo com a afirmativa de Köberle (1968) de que o limite crítico de denervação para desencadear megaesôfago seria cerca de 90 ou 95%. Todavia, ao que nos consta, este autor não analisou Cd em CSME, embora tenha realizado contagem neuronal comparativa no TI, TM e TS, de 10 chagásicos sem mega (KÖBERLE, 1961, 1963a). Referia ser a denervação uniforme no esôfago e passou a contar neurônios apenas no TI. Embora em várias publicações, tenha apresentado maior número de casos com contagens apenas no TI (KÖBERLE, 1961, 1963a, b, 1968), não descreveu casos, de grupo CSME, com aganglionose ou hipoganglionose maior que 95% neste terço esofágico, apesar de ter ocorrido essa situação no TM e TS quando analisou os três terços dos 10 casos já mencionados (KÖBERLE, 1961). Talvez também por isso acreditasse que a melhor região para avaliar denervação era o TI (5cm da cárdia), além da

maior proximidade do esfíncter, em relação aos outros terços esofágicos. Entretanto, no presente estudo, a denervação no grupo CSME não foi uniforme, variando de um indivíduo para outro e, até mesmo nas diferentes regiões de um mesmo indivíduo. A análise isolada desses casos do grupo CSME, evidenciou esparsos casos com aganglionose ou denervação maior que 95%, na Cd ou TI, e que apresentavam diâmetro esofágico normal. Por isso acreditamos que a análise isolada do número de neurônios em cada caso, não permite diagnosticar megaesôfago, pois há casos com intensa denervação que não apresentam dilatação. Essa observação já havia sido feita por Adad et al. (1991), em estudo isolado do TI, no qual foram encontrados 2 (5%) em 36 casos de CSME com denervação acentuada/aganglionose, sobrepondo com casos de MEC. Andrade (2000) também apresenta, em seu livro, tabela de contagem neuronal em 11 casos de necrópsias de chagásicos cardiopatas sem megaesôfago, na qual observam-se 2 (19%) casos com aganglionose nos três terços esofágicos. Contudo, não podemos excluir que seja necessário transcorrer algum tempo para que, após a denervação, mesmo que intensa, haja dilatação do esôfago possibilitando caracterizar anatomicamente o megaesôfago, como já referimos anteriormente ao discutirmos a questão do diâmetro esofágico.

Os dados clínico-radiológicos (REZENDE, 1982) indicam que, a princípio, ocorre a disfunção motora (megaesôfago/esofagopatia grau I), na qual não há dilatação do órgão, não podendo ser reconhecida macroscopicamente pelo patologista como megaesôfago, o que seria possível apenas a partir do grau II. Segundo Oliveira (1972), enquanto a cárdia responder à deglutição, não ocorreria dilatação do esôfago. Esta observação reforça a importância do estudo da parte distal do esôfago na patogênese do megaesôfago.

Lembraríamos que o caso de MEC com menor diâmetro (HE25-07) deste estudo, com diagnóstico radiológico de megaesôfago grau II só dois anos antes do óbito (precedendo a queixa de disfagia que só foi referida 6 meses depois desse diagnóstico), apresentava aganglionose somente na Cd e, não tinha denervação intensa nas demais regiões, sendo apenas discreta no TI (em torno de 18%). Este e outros casos do presente estudo evidenciam que embora exista uma tendência de denervação difusa no esôfago de chagásicos e, até mesmo no MEI, nem sempre a denervação é uniforme. Aparentemente existe maior uniformidade de denervação nos casos avançados de megas, como observado nos estudos de Köberle (1961; 1963a, b; 1968).

Nossos dados apoiam a ideia de que a denervação na região da cárdia seria mais importante para desencadear disfagia/megaesôfago, mesmo quando não acompanhada de denervação intensa em outras regiões. Sugerem ainda que a segunda região mais indicada

para avaliar denervação, seria o TI, sendo que a denervação no TM e TS parecem ser menos importantes para desencadear megaesôfago. Esses dados apoiam a ideia de Köberle (1968) sobre a maior frequência de megas em órgãos com esfíncteres, sobretudo quando trabalham com conteúdo sólido como é o caso do esôfago e do sigmóide/reto.

3. Avaliação através de imuno-histoquímica da proporção de neurônios NOS positivos (inibitórios) versus SP positivos (excitatórios)

Quanto ao número de casos utilizados na parte da imuno-histoquímica, ser bem menor em relação ao número total de casos, houve diversos problemas. Nos grupos NC e CSME deveu-se, principalmente, ao fato de terem sido obtidos de necrópsias antigas, cujos esôfagos ficaram muito tempo em formol, não se conseguindo uma marcação ideal para serem analisados. Por outro lado, a grande dificuldade nos megas foi encontrar neurônios para serem marcados nas lâminas, pela intensa denervação nesses grupos. Além disso, a orientação estatística foi para que utilizássemos apenas os casos completos nas 4 regiões e, alguns casos completos ao HE, não puderam ser analisados porque alguns cortes desgarraram durante a realização da imuno-histoquímica, embora tenham sido feitas várias tentativas.

Apesar de todas as dificuldades na realização do estudo imuno-histoquímico e de não termos encontrado denervação seletiva em nenhum grupo de estudo, acreditamos que obtivemos algumas informações importantes. Não encontramos estudo similar morfológico quantitativo de neurônios inibitórios *versus* excitatórios em esôfagos de chagásicos e/ou de MEC *x* MEI para comparação.

Embora a comparação do número de neurônios NOS+ e SP+ entre os grupos tenha acompanhado o resultado da contagem neuronal global ao HE, não evidenciando tendência de denervação seletiva, a análise isolada dos casos mostrou alguns dados interessantes. Um desses casos pertencia ao grupo MEI (B09-4506), tinha queixa de disfagia apenas há 15 meses e foi classificado como megaesôfago grau III. Apresentava relativa preservação de neurônios em diversas regiões, com denervação em torno de 65% na Cd e de 40% no TI, quando comparada com o grupo NC, não se enquadrando na regra de Köberle (1963a, b, 1968) do limite crítico de denervação de 90-95% para ocorrer dilatação do esôfago. Entretanto, observou-se neste caso uma redução maior de neurônios inibitórios na Cd, em relação à redução dos excitatórios, o que poderia gerar uma disfunção, embora a denervação

global fosse menor que a usualmente encontrada no megaesôfago. Talvez especificamente para este caso, o desequilíbrio entre neurônios inibitórios e excitatórios (43% *versus* 29% enquanto a proporção média no grupo NC foi de 69% *versus* 14%) tenha sido um importante fator adicional, somado à perda global moderada de neurônios. Entretanto, deve ser lembrado que a provável hipertrofia neuronal no megaesôfago, como já foi demonstrada no megacólon, pode dificultar a avaliação do grau real de denervação, necessitando ser aplicado um valor de correção à contagem neuronal (Adad et al, 2001). Estudos morfométricos são necessários para confirmar a aparente hipertrofia neuronal, neste caso específico e, em outros de MEI, além de alguns casos de MEC ainda sem aganglionose e, raros casos de CSME com denervação, nos quais foram vistos neurônios volumosos, com aspecto hipertrofiado.

Interessante destacar também um caso do grupo CSME que tinha queixa de disfagia, porém sem dilatação esofágica (E15). Talvez ainda não tivesse decorrido tempo suficiente para que o órgão se dilatasse. Todavia, apresentava denervação acima de 95% na Cd, o que poderia explicar o sintoma de disfagia; porém, outros casos de denervação semelhante ou mais intensa do grupo CSME, como o E7 (sem neurônios nesta região; ausência de ambos os tipos de neurônios na Cd), não tinham esta queixa. Diferente de outros casos deste grupo, observou-se no E15, uma alteração na proporção de neurônios inibitórios *versus* excitatórios (58% *versus* 25%), quando comparada ao grupo NC (69% *versus* 14%). Talvez esta alteração possa ter dificultado o relaxamento do EEI.

4. Considerações gerais sobre a etiopatogênese do MEC x MEI e sobre a gênese da denervação nos megas

Os mecanismos patogênicos que desencadeiam o MEC e o MEI parecem ser similares, observando-se em ambos denervação mientérica, em geral intensa, o que está de acordo com o descrito por Köberle (1963b).

Entretanto, nos casos avançados examinados por esse pesquisador, a denervação era quase total e uniforme. Os nossos dados acrescentam a possibilidade de alguns casos de megaesôfago não terem denervação intensa difusamente, sobretudo naqueles que parecem ter um tempo menor da doença. Essa observação pode sugerir que parte da denervação ocorra após a instalação do mega, como já suspeitado anteriormente por Tafuri, Maria & Lopes (1979), associada à estase alimentar, desencadeando erosão/ulceração, inflamação, fibrose,

agravando a agressão sobre os plexos intramurais e a muscular. A intensa hipertrofia da muscular (KÖBERLE, 1963b; ADAD et al., 1991) exigiria maior trabalho dos poucos neurônios ainda existentes, que se hipertrofiariam, não apenas para compensar os que já teriam morrido anteriormente, mas também para comandar a massa muscular aumentada (ADAD et al., 2001). Surgiriam os processos degenerativos e gradativamente iriam morrendo os neurônios restantes. A morte dos neurônios expõe antígenos dessas células, suscitando então a formação de anticorpos contra neurônios e agressão contra os próprios componentes do indivíduo. Essa situação transitória de agressão aos próprios componentes do indivíduo acontece em qualquer órgão submetido à isquemia e necrose, como ocorre, por exemplo, no infarto do miocárdio. Porém, interrompida a morte celular pela isquemia, cessaria tal agressão. No entanto, no caso dos megas é provável que a agressão contra os neurônios, lenta, porém continuada, persista enquanto essas células existirem, porque continuam os fatores que induzem degeneração e necrose.

Embora no MEI, a etiologia ainda não tenha sido esclarecida e, possivelmente, existam causas diversas, tais como alterações degenerativas e fatores genéticos, vários autores têm sugerido, nos últimos anos, que o MEI poderia ser desencadeado por resposta retardada a infecções virais, em indivíduos geneticamente susceptíveis a desenvolverem uma resposta anti-inflamatória crônica (BOECKXSTAENS, 2008; GHOSHAL, DASCHAKRABORTY & SINGH, 2012; PRESSMAN & BEHAR, 2017).

No caso do MEC já se comprovou que o agente etiológico, persiste no esôfago, embora o parasitismo pelo *T. cruzi* seja baixo (ADAD et al., 1991; CÔBO et al., 2012) e, por isso, mais facilmente detectável através de PCR (VAGO et al., 1996, 2000, 2003). Outro estudo de PCR, aumentando as amostras esofágicas para os três terços evidenciou DNA de *T. cruzi* em 100% dos casos de MEC e, em 60%, dos CSME (SILVEIRA et al., 2005), havendo associação entre a positividade do PCR, inflamação e denervação. Fizeram parte desta pesquisa de PCR 6 casos controles (todos com PCR negativo), 6 casos de MEC (todos com PCR positivo) e 8 casos de CSME (60% positivos), os quais são comuns ao presente estudo. A persistência do parasitismo esofágico nos chagásicos, que inclusive é maior nos pacientes com MEC, pode explicar a maior intensidade da inflamação no plexo mientérico no MEC, em relação ao MEI (SILVEIRA, 2012).

Esses dados podem contribuir para se entender porque a denervação no MEC pode ser mais intensa do que no MEI, como sugerem os estudos clínicos e de fisiopatologia.

Além de poder ocorrer uma denervação intensa na fase aguda da doença de Chagas, que inclusive induziu Köberle (1968) a afirmar que “o destino do chagásico decidia-se na fase

aguda”, a agressão também persiste na fase crônica (ADAD et al., 1991; SILVEIRA et al., 2005). Nos chagásicos, a agressão pode iniciar diretamente nos gânglios mientéricos (ganglionite primária), visto que no esôfago humano os gânglios são vascularizados (ADAD et al., 2014), como também indiretamente através da frequente miosite, que pode se propagar ao plexo mientérico induzindo ganglionite secundariamente (ADAD et al., 1991; SILVEIRA, 2012). A existência de vascularização nos gânglios esofágicos poderia, ainda, ajudar a explicar porque um vírus neurotrópico, como o herpesvírus poderia gerar mais facilmente agressão e denervação no esôfago, favorecendo o aparecimento de megaesôfago, do que no cólon, pois os gânglios intestinais não são vascularizados. Desse modo, para atingi-los, precisaria haver inflamação em torno (miosite), gerando secundariamente ganglionite. Talvez isto ajude a explicar porque nos casos idiopáticos a destruição neuronal, em geral, seja restrita ao plexo do esôfago, como destacaram Pressman & Behar (2017), sendo muito mais raro o megacólon idiopático. Na doença de Chagas, a miosite frequente no cólon pode gerar ganglionite secundariamente, e desse modo ocasionar denervação, que em geral é menos intensa que no esôfago (ADAD, 1996; CÔBO et al., 2012).

Não podemos esquecer também que o próprio envelhecimento ocasiona morte neuronal contribuindo para a denervação (KÖBERLE, 1961, 1968). Talvez o tempo maior de vida, além de contribuir com a perda neuronal por envelhecimento, aumente também a possibilidade de haver contato com um agente agressor que possa ocasionar ganglionite primária em gânglios esofágicos. O encontro de linfócitos nos gânglios do esôfago é um achado muito comum em controles (CASSELLA et al., 1964; GOLDBLUM et al., 1994; ADAD et al., 1991, 2014; SILVEIRA, 2012), mas não foi descrito no cólon de controles (ADAD, 1996; ADAD et al., 2014).

No entanto, se por um lado há elementos que sugerem maior facilidade de denervação no esôfago em relação ao cólon, e maior agressão inflamatória no MEC em relação ao MEI, não encontramos ainda elementos para entender se poderia haver destruição seletiva de neurônios inibitórios *versus* excitatórios, como sugerem estudos clínicos de MEI. Nossos dados favorecem mais a hipótese de que a destruição neuronal não é seletiva, mas sim aleatória. Talvez o que seja diferente é a repercussão funcional. Por exemplo, para o esfíncter, cuja posição de repouso é a contração (que depende principalmente do tônus miogênico), necessitaria de estímulo inibitório eficaz para relaxar e deixar passar o alimento. Nesta região é possível que mesmo não sendo a denervação tão intensa, se por acaso ocorrer maior destruição de neurônios inibitórios poderia gerar um desequilíbrio, favorecendo a repercussão

clínica. A sintomatologia poderia fazer o paciente procurar o médico, sobretudo em países mais desenvolvidos, o qual poderia fazer o diagnóstico da disfunção mais precocemente.

Quanto à questão de ser a denervação não uniforme e haver alguma região mais importante, nossos achados, juntos com os dados da literatura sugerem alguns elementos. De modo geral, nos casos de megas avançados e/ou com maior tempo de evolução, tanto no MEI (GOLDBLUM et al., 1994; KÖBERLE, 1963b), quanto no MEC (KÖBERLE, 1961, 1963a, b, 1968) a denervação é total (aganglionose), ou quase total. Embora não seja possível comparação estrita com os achados de MEI de Cassella et al. (1964), cuja metodologia de exame foi diferente da que empregamos, e por isso não corrigia o viés da dispersão neuronal pela dilatação esofágica, esses autores encontraram casos com denervação menos intensa em pacientes com menor tempo de sintomatologia. Descreveram inclusive um caso de MEI com denervação moderada na parte distal e sem denervação na parte dilatada. Talvez, por isto, supervalorizaram as lesões do vago e interrogaram se as lesões esofágicas não seriam secundárias.

Entretanto, existem casos tanto de MEC (ADAD et al., 1991 e dados do atual estudo), quanto de MEI, com menor intensidade de denervação do que o limite crítico de 90-95% no TI, proposto por Köberle (1968) para desencadear MEC, podendo ainda não ser uniforme a denervação. Essas situações foram encontradas em casos com pouco tempo de evolução do megaesôfago e havia denervação mais importante na Cd (HE25-07). Caso similar em termos de denervação heterogênea foi visto no grupo CSME (HE06-03), que apresentava denervação intensa na Cd, com queixa de disfagia e alteração do peristaltismo esofágico, ao exame contrastado de esôfago; porém, ainda não característico de MEC. No entanto, tivemos dois casos com denervação similar, aparentemente assintomáticos, segundo os familiares informaram após a necrópsia. Interessante lembrar que o outro caso de CSME, com denervação intensa na Cd (E15), tinha queixa de disfagia e apresentava perda mais intensa de neurônios inibitórios em relação aos excitatórios.

Concluindo, acreditamos que a contagem neuronal sistematizada na Cd, que ao que nos consta, não havia ainda sido feita nos casos de CSME, assim como a análise da Cd e dos terços esofágicos simultaneamente em casos de MEI e MEC com pouco tempo de evolução da doença, trouxeram contribuições para o entendimento da patogênese do megaesôfago. Ademais, o estudo morfológico quantitativo comparando neurônios inibitórios x excitatórios, ajudou a explicar alguns casos com menor intensidade de denervação.

Finalmente, acreditamos que a análise dos nossos casos e dos dados da literatura permitem concluir que em geral no megaesôfago, tanto chagásico quanto idiopático, ocorre

denervação muito intensa, sendo a Cd a região mais importante para avaliar a denervação. Entretanto, ocasionalmente se observa megaesôfago com menor grau de denervação, sobretudo aqueles com menor tempo de evolução. É possível que em casos com denervação menos intensa, o desequilíbrio entre a proporção de neurônios inibitórios *versus* excitatórios, seja também um fator patogenético importante. De modo similar, casos isolados de CSME também poderiam ter repercussões decorrentes desse desequilíbrio, apresentando disfagia, apesar de não terem ainda dilatação, que poderia surgir posteriormente. Aganglionose ou denervação muito intensa e difusa parece ser a regra nos casos de MEC e MEI avançados, sugerindo que parte da denervação, sobretudo na região média e proximal, possa ocorrer após a instalação do megaesôfago, pelo menos em alguns casos.

Conclusões

1. No grupo NC (esôfago normal) observou-se maior número de neurônios na Cd e TI em relação ao TS, e os valores do TI e TM foram intermediários entre Cd e TS, evidenciando um aumento da população neuronal no sentido crânio-caudal.
2. No grupo CSME houve grande variação na intensidade da denervação. O percentual de denervação na Cd foi em média 85%, enquanto nas demais regiões, foi em torno de 50%; porém, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, comparando-se a intensidade da denervação neste grupo, segundo as regiões do esôfago, provavelmente porque diversos casos apresentavam grau de denervação semelhante ao longo do órgão. Todavia, os dois casos de CSME com queixa de disfagia apresentavam denervação intensa na Cd, acima de 95%.
3. No grupo MEC, a denervação na Cd foi intensa, frequentemente observando-se aganglionose; no entanto, isso ocorreu, em geral, difusamente, em todas as regiões do esôfago, notando-se raros casos ainda com neurônios, hipertrofiados, predominantemente na parte proximal. Apenas um caso de MEC, recente e discreto, tinha denervação intensa somente em uma região (Cd).
4. No grupo MEI, a denervação foi intensa na Cd, porém também foi acentuada em todas as regiões, sendo um pouco menos intensa, em alguns casos, no TS e TM, onde se observaram neurônios hipertrofiados. Apenas um caso recente de MEI não apresentava denervação intensa em nenhuma região, sendo moderada no Cd e TS e, discreta, no TI e TM.
5. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a denervação no MEC *x* MEI em nenhuma região, observando-se frequente aganglionose. Estes grupos mostraram denervação significativa em relação ao NC em todas as regiões. O grupo MEC mostrou denervação significativa em relação ao CSME em todas as regiões; todavia, o MEI diferiu do CSME apenas na Cd e TI. No grupo CSME a denervação foi muito variável, sendo significativa em relação ao NC no TI, TM e TS, mas não na Cd. Esses dados sugerem que a denervação na Cd pode ser mais importante para desencadear megaesôfago, assim como disfagia, que estava presente em dois casos de CSME com denervação maior que 95% somente na Cd.

6. Observou-se, no esôfago normal (grupo NC), maior número de neurônios excitatórios (SP+) na cárdia em relação ao TS (14% *versus* 6%), porém não houve diferença, estatisticamente significativa, com relação à quantidade de neurônios inibitórios (NOS+) nas diferentes regiões do esôfago normal, que variou em média de 69% a 88%.
7. Não foi evidenciada denervação seletiva em relação a neurônios NOS ou SP, em nenhum grupo. Em geral, nos megas, a destruição foi total (aganglionose), ou quase total, dos dois tipos de neurônios e, no grupo CSME, a variabilidade foi muito grande. Todavia, em um caso de MEI sem denervação intensa e, em um CSME com disfagia, houve maior perda de neurônios NOS que SP.
8. A denervação global e intensa na parte distal do esôfago parece ser o principal fator para a patogênese do megaesôfago; entretanto, é possível que, em alguns casos, o desequilíbrio entre a proporção de neurônios inibitórios *versus* excitatórios, sobretudo na cárdia, possa contribuir para a disfunção motora.

Referências

- 1- ADAD, S. J. **Contribuição ao estudo da anatomia patológica e patogênese do megaesôfago chagásico.** [Tese, mestrado]. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 1989.
- 2- ADAD, S. J. **Contribuição ao estudo da anatomia patológica e patogênese do megacólon chagásico.** [Tese, doutorado]. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro; 1996.
- 3- ADAD, S. J. et al. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 443-450, 1991.
- 4- ADAD, S. J.; RESENDE, A. V.; JORGE, B. H. Estudo sistematizado do plexo mientérico nos diferentes terços do esôfago de chagásicos crônicos com e sem megaesôfago. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. supl III, p. 101, 1992.
- 5- ADAD, S. J. et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Archiv**, v. 438, n. 3, p. 254-258, 2001.
- 6- ADAD, S. J. et al. Estudo anatomopatológico comparativo entre megacólon chagásico, megacólon congênito e doença de Hirschsprung e displasia intestinal neuronal tipo B. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35(supl), p. 45, 2002.
- 7- ADAD, S. J. et al. Acquired non-Chagas megacolon associated with the use of psychiatric medication: case report and differential diagnosis with Chagas megacolon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 293-295, 2008.
- 8- ADAD, S. J. et al. Hirschsprungs' disease frequency in rectum biopsies in UFTM in 1983–2008 period. **Histopathology**, v. 57(supl.1), p. 213, 2010.
- 9- ADAD, S. J.; E SILVA, G. B.; JAMMAL, A. A. The significantly reduced number of interstitial cells of Cajal in chagasic megacolon (CM) patients might contribute to the pathophysiology of CM. **Virchows Archiv**, v. 461, n. 4, p. 385-392, 2012.
- 10- ADAD, S. J.; ETCHEBEHERE, R. M.; JAMMAL, A. A. Blood vessels in ganglia in human esophagus might explain the higher frequency of megaesophagus compared with megacolon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 529-532, 2014.
- 11- ADAMS, C. W. et al. Achalasia of the cardia. **Guys Hosp Rep**, v. 110, p. 191-236, 1961.
- 12- ADAMS, C. W. M.; BRAIN, R. H. F.; TROUNCE, J. R. Ganglion cells in achalasia of the cardia. **Virchows Archiv A**, v. 372, n. 1, p. 75-79, 1976.
- 13- ADAMS, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 7, p. 1297-1302, 1996.
- 14- AGGESTRUP, S. et al. Lack of vasoactive intestinal polypeptide nerves in esophageal achalasia. **Gastroenterology**, v. 84, n. 5, p. 924-927, 1983.
- 15- AGGESTRUP, S. et al. Regulatory peptides in the lower esophageal sphincter of man. **Regulatory peptides**, v. 10, n. 2, p. 167-178, 1985.

- 16- AMORIM, D. S., CORREA NETTO, A. Histopathologia e pathogenese do megaesôfago e megarreto (Considerações em torno de um caso de “Mal de Engasgo”). **An. Fac. Med. Univ. São Paulo**, v. 8, p. 101-27, 1932.
- 17- ANDRADE, Z. A. **Patologia**. In: Andrade, Z. A.; Brener, Z.; Barral Neto, M. (ed) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 201-7.
- 18- BARRACHINA, M. D.; PANES, J.; ESPLUGUES, J. V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 1, p. 31-48, 2001.
- 19- BIRGISSON, S. et al. Achalasia is not associated with measles or known herpes and human papilloma viruses. **Digestive diseases and sciences**, v. 42, n. 2, p. 300-306, 1997.
- 20- BOECKXSTAENS, G. E. Achalasia: virus-induced euthanasia of neurons? **The American journal of gastroenterology**, v. 103, n. 7, p. 1610, 2008.
- 21- BRANT, C. et al. Intraspincteric botulinum toxin injection in treatment of chagasic achalasia. **Dis Esophagus**, v. 16, n. 1, p. 33-8, 2003.
- 22- BRASIL, A. Mais um elemento a favor da etiologia chagásica para explicar a acalásia do esôfago (megaesôfago, cardiospasma) tão frequente no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 7, p. 226, 1954.
- 23- BRASIL, A. Aperistalses of the oesophagus. **Rev. Bras. Gastroenterol.**, v. 7, p. 21-44, 1955.
- 24- BRASIL, A. O plexo de Auerbach e a aperistalse do esôfago. **Rev. Ass. Méd. Bras.**, v. 5, p. 120-7, 1959.
- 25- BREDENOORD, A. J. et al. Chicago classification criteria of esophageal motility disorders defined in high resolution esophageal pressure topography. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 24, n. s1, p. 57-65, 2012.
- 26- BRENER, Z. et al. (ed.) *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 27- BRUCH, H. P. et al. Störung der adrenergen Innervation bei Achalasia. **Leber Magen Darm**, v. 8, p. 17-20, 1978.
- 28- BULT, H. et al. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, n. 6273, p. 346-347, 1990.
- 29- BURNSTOCK, G. Structure of smooth muscle and its innervation. **Smooth muscle**, p. 1-69, 1970.
- 30- CAMACHO-LOBATO, L.; CASTELL, D. O. **Função motora normal do esôfago**. In: NASI, A.; MICHELSON, N. H. (ed) Avaliação funcional do esôfago. Manometria e pHmetria esofágicas. São Paulo: Roca, 2001.
- 31- CASSELLA, R. et al. Achalasia of the esophagus pathologic and etiologic considerations. **Annals of surgery**, v. 160, n. 3, p. 474, 1964.
- 32- CASTELL, D. O. The spectrum of esophageal motility disorders. **Gastroenterology**, v. 76, n. 3, p. 639-640, 1979.

- 33- CASTELL, J. A.; GIDEON, R. M.; CASTELL, D. O. Esophagus. In: Schuster, M. M. (ed) **Atlas of GI Motility in Health and Disease**, 1. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993.
- 34- CHAN, W. W.; DIAMANT, N. E. Electrical off response of cat esophageal smooth muscle: an analog simulation. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 230, n. 1, p. 233-238, 1976.
- 35- CHRISTENSEN, J.; ROBISON, B. A. Anatomy of the myenteric plexus of the opossum esophagus. **Gastroenterology**, v. 83, n. 5, p. 1033-1042, 1982.
- 36- CLARK, S. B. et al. The nature of the myenteric infiltrate in achalasia: an immunohistochemical analysis. **The American journal of surgical pathology**, v. 24, n. 8, p. 1153-1158, 2000.
- 37- CÔBO, E. C. et al. Research on *Trypanosoma cruzi* and analysis of inflammatory infiltrate in esophagus and colon from chronic chagasic patients with and without mega. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, 2012.
- 38- COCKS, T. M. et al. Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle. **Gastroenterology**, v. 116, n. 3, p. 586-592, 1999.
- 39- COHEN, S.; LIPSHUTZ, W.; HUGHES, W. Role of gastrin supersensitivity in the pathogenesis of lower esophageal sphincter hypertension in achalasia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 6, p. 1241, 1971.
- 40- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS. Ministério da Saúde. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, n.38, Sup. 3, p. 1-29, 2005.
- 41- CORSI, P. R. et al. Incidência de megacólon sintomático em portadores de megaesôfago chagásico. **Rev Ass Med Bras**, n. 38, v. 1, p. 9-12, 1992.
- 42- COUPAR, I. M.; DI IULIO, J. L. Effects of tachykinins and 5-hydroxytryptamine on intestinal secretion. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 30, n. 10, p. 764-768, 2003.
- 43- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, p. S6, 2010.
- 44- CREMA, E. et al. Gallbladder neuron count in cholelithiasis patients with and without Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 15-17, 2007.
- 45- CROSS, F. S. Pathologic change in megaesophagus. **Surgery**, n. 31, p. 647-53, 1952.
- 46- CSENDES, A., STRAUSZER, T., URIBE, P. Alterations in normal esophageal motility in patients with Chagas' disease. **Am J Dig Dis.**, v. 20, n. 5, p. 437-42, 1975.
- 47- CSENDES, A. et al. Gastroesophageal sphincter pressure and histological changes in distal esophagus in patients with achalasia of the esophagus. **Digestive diseases and sciences**, v. 30, n. 10, p. 941-945, 1985.
- 48- CSENDES, A. et al. Histological studies of Auerbach's plexuses of the oesophagus, stomach, jejunum, and colon in patients with achalasia of the oesophagus: correlation with gastric acid secretion, presence of parietal cells and gastric emptying of solids. **Gut**, v. 33, n. 2, p. 150-154, 1992.

- 49- D'AVILA REIS, D. et al. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 2, p. 177-178, 2001.
- 50- DA FONSECA, D. N. **Avaliação da inervação adrenérgica do esfíncter inferior do esôfago em megaesôfago chagásico**. 1999. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- 51- DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. 5, p. 627-634, 2005.
- 52- DANTAS, R. O. Idiopathic achalasia and Chagasic megaesophagus. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 10, n. 1, p. 13-15, 1988.
- 53- DANTAS, R. O. Dysphagia in patients with Chagas' disease. **Dysphagia**, v. 13, n. 1, p. 53-57, 1998.
- 54- DANTAS, R. O. Comparison between idiopathic achalasia and achalasia caused by Chagas' disease: a review about the pathophysiology of the diseases. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 40, n. 2, p. 126-130, 2003.
- 55- DANTAS, R. O. et al. Effect of isosorbide dinitrate and atropine on the lower esophageal sphincter pressure in Chagasic patients. **Acta physiologica et pharmacologica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y de la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia**, v. 38, n. 2, p. 151-158, 1987.
- 56- DANTAS, R. O. et al. Lower esophageal sphincter pressure in Chagas' disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 35, n. 4, p. 508-512, 1990.
- 57- DANTAS, R. O.; DEGHAIDE, N. H. S.; DONADI, E. A. Esophageal manometric and radiologic findings in asymptomatic subjects with Chagas' disease. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 28, n. 3, p. 245-248, 1999.
- 58- DANTAS, R. O.; DEGHAIDE, N. H. S.; DONADI, E. A. Esophageal motility of patients with Chagas' disease and idiopathic achalasia. **Digestive diseases and sciences**, v. 46, n. 6, p. 1200-1206, 2001.
- 59- DE GIORGIO, R. et al. Esophageal and gastric nitric oxide synthesizing innervation in primary achalasia. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2357-2362, 1999.
- 60- DE OLIVEIRA, R. B. et al. The spectrum of esophageal motor disorders in Chagas' disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 90, n. 7, p. 1119-24, 1995.
- 61- DIAMANT, N. E. Physiology of esophageal motor function. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 179-194, 1989.
- 62- DIAMANT, N. E. Neuromuscular mechanisms of primary peristalsis. **The American journal of medicine**, v. 103, n. 5, p. 40S-43S, 1997.
- 63- DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 25, n. esp, p. 7-86, 2016.
- 64- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 1997.

- 65- DODDS, W. J. et al. Paradoxical lower esophageal sphincter contraction induced by cholecystokinin-octapeptide in patients with achalasia. **Gastroenterology**, v. 80, n. 2, p. 327-333, 1981.
- 66- DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208-218, 2009.
- 67- EARLAM, R. J. Gastrointestinal aspects of Chagas' disease. **Am J Dig Dis.**, v.17, n. 6, p.559-571, 1972.
- 68- ELLIS, F. G. et al. Further studies in achalasia of the cardia. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 29, n. 2, p. 305-312, 1960.
- 69- ETZEL, E. Neuropatologia do megaesôfago e megacolo. Estudo de 5 casos. **An. Fac. Med. Univ. S. Paulo**, v.10, p. 383-395, 1934.
- 70- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Assessing the burden of key infectious diseases affecting migrant populations in the EU/EEA: Technical report**. Stockholm: ECDC, 2014.
- 71- FARROKHI, F.; VAEZI, M. F. Idiopathic (primary) achalasia. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 2, n. 1, p. 38, 2007.
- 72- FELDMAN, M. Esophageal achalasia syndromes. **Am J Med Sci.**, v. 295, n.1, p. 60-81, 1988.
- 73- FERRARI Jr, A. P. et al. **Atlas de Endoscopia Digestiva**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2009.
- 74- FERREIRA, M. S. et al. **Doença de Chagas**. In: Focaccia R, editor. Veronesi: Tratado de Infectologia. 3ªed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 1487-531-7.
- 75- FERREIRA-SANTOS, R. Aperistalsis of the esophagus and colon (magaesophagus and magacolon) etiologically related to Chagas' disease. **Amer. J. Dig. Dis.**, v. 6, p. 700-26, 1961.
- 76- FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 1121-1131, 1994.
- 77- FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1980.
- 78- FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The enteric nervous system**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. 290p.
- 79- FURUZAWA-CARBALLEDA, J. et al. New insights into the pathophysiology of achalasia and implications for future treatment. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 35, p. 7892, 2016.
- 80- GANONG, W. F. As bases gerais e celulares da fisiologia médica. **Fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, p. 28-33, 1998.
- 81- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Elsevier Brasil, 1997.
- 82- GERHARDT, D. C.; CASTELL, D. O. **Anatomy and physiology of the esophageal sphincters**. In: CASTELL, D. O.; JOHNSON, L. F. (ed) Esophageal function in health and disease. New York: Elsevier Biomedical, 1983. p.17-29.

- 83- GHOSHAL, U. C.; DASCHAKRABORTY, S. B.; SINGH, R. Pathogenesis of achalasia cardia. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 18, n. 24, p. 3050, 2012.
- 84- GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 296, p. 89-123, 2005.
- 85- GOCKEL, I. et al. Spectrum of histopathologic findings in patients with achalasia reflects different etiologies. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 21, n. 4, p. 727-733, 2006.
- 86- GOCKEL, I. et al. Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. **The American journal of gastroenterology**, v. 103, n. 4, p. 856, 2008.
- 87- GOLDBLUM, J. R. et al. Achalasia: a morphologic study of 42 resected specimens. **The American journal of surgical pathology**, v. 18, n. 4, p. 327-337, 1994.
- 88- GOLDBLUM, J. R.; RICE, T. W.; RICHTER, J. E. Histopathologic features in esophagomyotomy specimens from patients with achalasia. **Gastroenterology**, v. 111, n. 3, p. 648-654, 1996.
- 89- GONZALEZ-REY, E. et al. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3632-3638, 2006.
- 90- GOYAL, R. K.; CHAUDHURY, A. Physiology of normal esophageal motility. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 42, n. 5, p. 610, 2008.
- 91- GOYAL, R. K.; RATTAN, S. Genesis of basal sphincter pressure: effect of tetrodotoxin on lower esophageal sphincter pressure in opossum in vivo. **Gastroenterology**, v. 71, n. 1, p. 62-67, 1976.
- 92- GOYAL, R. K.; RATTAN, S.; SAID, S. I. VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurones. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 378-380, 1980.
- 93- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 1014p.
- 94- HEITMANN, P.; ESPINOZA, J. Oesophageal manometric studies in patients with chronic Chagas disease and megacolon. **Gut**, v. 10, n. 10, p. 848-851, 1969.
- 95- HIRANO, I. et al. Manometric heterogeneity in patients with idiopathic achalasia. **Gastroenterology**, v. 120, n. 4, p. 789-798, 2001.
- 96- HIRANO, I. Pathophysiology of achalasia. **Current gastroenterology reports**, v. 1, n. 3, p. 198-202, 1999.
- 97- HOLLOWAY, R. H. et al. Integrity of cholinergic innervation to the lower esophageal sphincter in achalasia. **Gastroenterology**, v. 90, n. 4, p. 924-929, 1986.
- 98- HOSHINO, M. et al. Immunohistochemical study of the muscularis externa of the esophagus in achalasia patients. **Diseases of the Esophagus**, v. 26, n. 1, p. 14-21, 2013.

- 99- HURST, A. F.; RAKE, G. W. Achalasia of the Cardia: So-Called Cardiospasm. **QJM: Quarterly Journal of Medicine**, n. 92, p. 491-508, 1930.
- 100- JONES, D. B. et al. Preliminary report of an association between measles virus and achalasia. **Journal of clinical pathology**, v. 36, n. 6, p. 655-657, 1983.
- 101- KAHRILAS, P. J. Anatomy and physiology of the gastroesophageal junction. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 467-486, 1997.
- 102- KAHRILAS, P. J. et al. Upper esophageal sphincter function during deglutition. **Gastroenterology**, v. 95, n. 1, p. 52-62, 1988.
- 103- KAHRILAS, P. J. et al. The Chicago Classification of esophageal motility disorders, v3. 0. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 27, n. 2, p. 160-174, 2015.
- 104- KAHRILAS, P. J.; CLOUSE, R. E.; HOGAN, W. J. American Gastroenterological Association technical review on the clinical use of esophageal manometry. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1865-1884, 1994.
- 105- KHELIF, K. et al. Achalasia of the cardia in Allgrove's (triple A) syndrome: histopathologic study of 10 cases. **The American journal of surgical pathology**, v. 27, n. 5, p. 667-672, 2003.
- 106- KIECHELE, F. L.; MALINSKY, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol.**, v. 100, n. 5, p. 567-75, 1993.
- 107- KILIC, A. et al. Variations in inflammation and nerve fiber loss reflect different subsets of achalasia patients. **Journal of Surgical Research**, v. 143, n. 1, p. 177-182, 2007.
- 108- KÖBERLE, F. et al. Pathogenesis of the "Megas". **Revista Goiana de Medicina**, v. 2, n. 2, p. 101-10, 1956.
- 109- KÖBERLE, F. Patogenia da moléstia de Chagas: estudo dos órgãos musculares ocos. **Rev. Goiana Med.**, v.3, p.155-180, 1957.
- 110- KÖBERLE, F. Megaesophagus. **Gastroenterol.**, v.34, p.460-466, 1958.
- 111- KÖBERLE, F. Hiperplasia muscular no megaesôfago chagásico. **Rev. Goiana Med.**, v.6, p.147-153, 1960.
- 112- KÖBERLE, F. Patologia y anatomia patológica de la enfermedad de Chagas. **Bol. Ofic. Sanit. Panamer.**, v.51, p.404-428, 1961.
- 113- KÖBERLE, F. Enteromegaly and cardiomegaly in Chagas' disease. **Gut**, v.4, p.399-405, 1963a.
- 114- KÖBERLE, F. Patogenia do megaesôfago brasileiro e europeu. **Rev. Goiana Med.**, v.9, p.79-116, 1963b.
- 115- KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in parasitology**, v. 6, p. 63-116, 1968.
- 116- KÖBERLE, F.; NADOR, E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. **Rev Paul Med**, v. 47, n. 6, p. 643-661, 1955.
- 117- KÖBERLE, G.; PENHA, D.; KÖBERLE, F. Aperistalse chagásica do esôfago. **An. Congr. Int. Doenç. Chagas**. Rio de Janeiro, 1959, 2: 717-22, 1961.
- 118- KRAICHELY, R. E.; FARRUGIA, G. Achalasia: physiology and etiopathogenesis. **Diseases of the Esophagus**, v. 19, n. 4, p. 213-223, 2006.

- 119- LAGUNA-TORRES, V. A. et al. Estudo comparativo clínico anatomopatológico entre o dolico megacólon andino e o megacólon chagásico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 25, 2003.
- 120- LANG, I. M.; SHAKER, R. Anatomy and physiology of the upper esophageal sphincter. **The American journal of medicine**, v. 103, n. 5, p. 50S-55S, 1997.
- 121- LARSSON, L. T. et al. Lack of neuronal nitric oxide synthase in nerve fibers of aganglionic intestine: a clue to Hirschsprung's disease. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 20, n. 1, p. 49-53, 1995.
- 122- LEMME, E. M. O. et al. Lower esophageal sphincter pressure in idiopathic achalasia and Chagas disease-related achalasia. **Diseases of the Esophagus**, v. 14, n. 3-4, p. 232-234, 2001.
- 123- LIEBERMANN-MEFFERT, D. et al. Muscular equivalent of the lower esophageal sphincter. **Gastroenterology**, v. 76, n. 1, p. 31-38, 1979.
- 124- LOPES, E. R.; TAFURI, W. L.; CHAPADEIRO, E. Estudo morfológico e quantitativo dos núcleos dorsal do vago e hipoglosso em chagásicos crônicos com e sem megaesôfago. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 11, p. 123-129, 1969.
- 125- LOPES, E. R. Megaesophagus, megacólon and cancer. **Rev Soc Bras Med Trop**, n. 21, v. 3, p. 91-94, 1988.
- 126- LOWICKA, E.; BELTOWSKI, J. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. **Pharmacological reports: PR**, v. 59, n. 1, p. 4-24, 2007.
- 127- LUI, H. et al. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of children with cardiac achalasia. **Chinese medical journal**, v. 110, n. 5, p. 358-361, 1997.
- 128- MACHADO, E. M. et al. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 6, p. 958-965, 2001a.
- 129- MACHADO, E. M. et al. Morphometry of submucous and myenteric esophageic plexus of dogs experimentally reinfected with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 545-548, 2001b.
- 130- MARTINS, M. A. Sistema Nervoso Autônomo Não-Adrenérgico Não-Colinérgico Pulmonar: Possível Envolvimento na Fisiopatologia da Asma. In: Tavres, P. (ed). **Atualizações em Fisiologia-Respiração**. Rio de Janeiro: Ed. Cultura Médica Ltda; 1991. p. 100-115.
- 131- MATSUDA, N. M.; LEMOS, M. C.; FEITOSA Jr., R. L. The effect of guanylate cyclase inhibitors on non-adrenergic and non-cholinergic neurogenic relaxations of the South American opossum lower esophageal sphincter. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 299-304, 2008.
- 132- MEARIN, F. et al. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. **European journal of clinical investigation**, v. 23, n. 11, p. 724-728, 1993.
- 133- MEYER, G. W. et al. Muscle anatomy of the human esophagus. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 8, n. 2, p. 131-134, 1986.

- 134- MISIEWICZ, J. J. et al. Achalasia of the cardia: pharmacology and histopathology of isolated cardiac sphincteric muscle from patients with and without achalasia. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 38, n. 1, p. 17-30, 1969.
- 135- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-91, 2003.
- 136- MORAES FILHO, J. P. P., KAHATSU, O. S., BATARELLO, A. Pressão basal do esfíncter inferior do esôfago na doença de Chagas: Megaesôfago e forma indeterminada. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 32, p. 51-53, 1986.
- 137- MOSES, P. L. et al. Antineuronal antibodies in idiopathic achalasia and gastro-oesophageal reflux disease. **Gut**, v. 52, n. 5, p. 629-636, 2003.
- 138- MURTA, E. F. C. et al. Association of uterine leiomyoma and Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 3, p. 321-324, 2002.
- 139- NASCIMENTO, R. D. et al. Characterization of enteroglia cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. **Human pathology**, v. 41, n. 4, p. 528-534, 2010.
- 140- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992.
- 141- OLIVEIRA, A. R. Fisiopatologia do megaesôfago (estudo radiológico). **Rev. Pat. Trop.**, v. 3, p. 429-492, 1972.
- 142- PADOVAN, W. et al. Lower oesophageal sphincter response to pentagastrin in chagasic patients with megaesophagus and megacolon. **Gut**, v. 21, n. 2, p. 85-90, 1980.
- 143- PARKMAN, H. P.; PAGANO, A. P.; RYAN, J. P. PACAP and VIP inhibit pyloric muscle through VIP/PACAP-preferring receptors. **Regulatory peptides**, v. 71, n. 3, p. 185-190, 1997.
- 144- PASRICHA, P. J. et al. Botulinum toxin for achalasia: long-term outcome and predictors of response. **Gastroenterology**, v. 110, n. 5, p. 1410-1415, 1996.
- 145- PAULA-COSTA, M. D.; REZENDE, J. M. Pressão basal do esfíncter inferior do esôfago no megaesôfago chagásico. **Rev Assoc Méd Bras**, v. 24, p. 269-72, 1978.
- 146- PENHA, D. P.; KÖBERLE, G. Megaesôfago chagásico. **Rev. Goiana Med**, v. 5, p. 185-92, 1959.
- 147- PINHEIRO, S. W. et al. The different concentrations of mast cells in the musculature of the esophagus and the colon. **Human pathology**, v. 39, n. 5, p. 793, 2008.
- 148- POLAK, J. M. et al. Hormônios gastrointestinais. In: DANI, R.; CASTRO, L.P. **Gastroenterologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p.1107-2015,1993.
- 149- POZO, D.; DELGADO, M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? **The FASEB journal**, v. 18, n. 12, p. 1325-1334, 2004.
- 150- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.
- 151- PRATA, A. R. Formas clínicas da doença de Chagas. In: CANÇADO Jr, editor. **Doença de Chagas**. Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte: Imprensa; 1968. p.

- 344-58.
- 152- PRESSMAN, A., BEHAR, J. Etiology and Pathogenesis of idiopathic Achalasia. **J. Clin Gastroenterol.**, v. 51, n. 3, p. 195-202, 2017.
- 153- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
- 154- RATTAN, S.; CHAKDER, S. Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 265, n. 4, p. G799-G804, 1993.
- 155- RAYMOND, L.; LACH, B.; SHAMJI, F. M. Inflammatory aetiology of primary oesophageal achalasia: an immunohistochemical and ultrastructural study of Auerbach's plexus. **HISTOPATHOLOGY-OXFORD**, v. 35, p. 445-453, 1999.
- 156- REID, I. A. Peptídios vasoativos. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 854p.
- 157- REZENDE, J. M. **Clínica: manifestações digestivas**. In: Brener, Z.; Andrade, Z. (ed) *Trypanossoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 312-61.
- 158- REZENDE, J. M. Classificação radiológica do megaesôfago. **Rev. goiana med**, v. 28, n. 3/4, p. 187-91, 1982.
- 159- REZENDE, J. M. Manifestações digestivas da doença de Chagas. **Gastroenterologia clínica**, v. 3, p. 1729-1755, 1993.
- 160- REZENDE-FILHO, J. Esofagopatia por desnervação. In: NASI, A.; MICHELSON, N. H. (ed) Avaliação funcional do esôfago. Manometria e pHmetria esofágicas. São Paulo: Roca, 2001.
- 161- RIBEIRO DOS SANTOS, R. et al. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. **Tropenmed Parasitol**, v. 30, n. 1, p 19-23, 1979.
- 162- RICHTER, J. Motility disorders of the esophagus. **Textbook of Gastroenterology**, 2.ed. Philadelphia: JB Lippincot Co, 1995.
- 163- ROBERTSON, C. S.; MARTIN, B. A.; ATKINSON, M. Varicella-zoster virus DNA in the oesophageal myenteric plexus in achalasia. **Gut**, v. 34, n. 3, p. 299-302, 1993.
- 164- SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 262, n. 3, p. G379-G392, 1992.
- 165- SCHWÖRER, H. et al. Pituitary adenylate cyclase activating peptide, a novel VIP-like gut-brain peptide, relaxes the guinea-pig taenia caeci via apamin-sensitive potassium channels. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 346, n. 5, p. 511-514, 1992.
- 166- SHAPIRA, S.; KADAR, T.; WEISSMAN, B. A. Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. **Brain research**, v. 668, n. 1, p. 80-84, 1994.
- 167- SIFRIM, D.; JANSSENS, J.; VANTRAPPEN, G. A wave of inhibition precedes primary peristaltic contractions in the human esophagus. **Gastroenterology**, v. 103, n. 3, p. 876-882, 1992.

- 168- SIGALA, S. et al. Different neurotransmitter systems are involved in the development of esophageal achalasia. **Life sciences**, v. 56, n. 16, p. 1311-1320, 1995.
- 169- SILVEIRA, A. B. et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patient with and without megaesophagus. **Parasitol.**, v. 131, n.5, p. 627-34, 2005.
- 170- SILVEIRA, T. P. **Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático.** [Tese, mestrado]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2012.
- 171- SINGARAM, C. et al. Nitrinergic and peptidergic innervation of the human oesophagus. **Gut**, v. 35, n. 12, p. 1690-1696, 1994.
- 172- SMITH, B. The neurological lesion in achalasia of the cardia. **Gut**, v. 11, n. 5, p. 388-391, 1970.
- 173- SODIKOFF, J. B. et al. Histopathologic patterns among achalasia subtypes. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 28, n. 1, p. 139-145, 2016.
- 174- SREEDHARAN, S. P. et al. Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 7, p. 2939-2943, 1995.
- 175- STEIN, D. T.; KNAUER, C. Michael. Achalasia in monozygotic twins. **Digestive diseases and sciences**, v. 27, n. 7, p. 636-640, 1982.
- 176- STUCKEY, B. G. et al. Glucocorticoid insufficiency, achalasia, alacrima with autonomic and motor neuropathy. **Annals of internal medicine**, v. 106, n. 1, p. 62-64, 1987.
- 177- SWAIN, J. M.; ST PETER, S. D. Achalasia. A comprehensive review. **Surg Laparosc Endosc Percutan Tech**, v. 13, n. 4, p. 227-40, 2003.
- 178- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**, 11. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856p.
- 179- TAFURI, W. L. Patogenia da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 4, p. 194-199, 1987.
- 180- TAFURI, W. L.; RASO, P. Anatomia Patológica. In: Raia, A.A., editor. **Manifestações digestivas da moléstia de Chagas**. São Paulo: Sarvier; 1983. p. 61-79.
- 181- TAFURI, W. L. et al. **Patologia das doenças tropicais no Brasil. Doença de Chagas**. In: Brasileiro Filho G (ed.) Bogliolo Patologia, 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 1369-86.
- 182- TAFURI, W.L.; MARIA, T.A.; LOPES, E.R. Lesões do plexo mientérico do esôfago, do jejuno e do colo de chagásicos crônicos. Estudo ao microscópio eletrônico. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.13, p.76-91, 1971.
- 183- TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5, p. 550-554, 2001.
- 184- TEIXEIRA, M. L. et al. Chagas' disease: selective affinity and cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*-immune lymphocytes to parasymphetic ganglion cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 3, p. 33-45, 1980.
- 185- TEIXEIRA, M. M; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-5, 2002.

- 186- TENÓRIO, P. R. et al. Esôfago-Aspecto normal. In: **Atlas de Endoscopia Digestiva da Sobed**, 2011. p 3-7.
- 187- TRONCON, L. E. A. et al. Fasting and food-stimulated plasma gastrin levels in chronic Chagas' disease. **Digestion**, v. 29, n. 3, p. 171-176, 1984.
- 188- TRONCON, L. E. et al. Plasma gastrin and gastric acid responses to insulin hypoglycemia in Chagas' disease. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 18, n. 3, p. 273-278, 1985.
- 189- TRONCON, L. E. A.; DANTAS, R. O. Distúrbios inespecíficos da motilidade esofágica. In: NASI, A.; MICHELSON, N. H. (ed) Avaliação funcional do esôfago. Manometria e pHmetria esofágicas. São Paulo: Roca, 2001.
- 190- TROUNCE, J. R. et al. Studies in achalasia of the cardia. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 26, n. 4, p. 433-443, 1957.
- 191- VAGO, A. R. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **The Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891-892, 1996.
- 192- VAGO, A. R. et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 5, p. 1805-1809, 2000.
- 193- VAGO, A. R. et al. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaesophagus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 308-309, 2003.
- 194- VAN VOORHIS WC, SCHLEKEWY L, TRONG HL. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 14, p. 5593-7, 1991.
- 195- VERNE, G. N.; SALLUSTIO, J. E.; EAKER, E. Y. Anti-Myenteric Neuronal Antibodies in Patients with Achalasia (A Prospective Study). **Digestive diseases and sciences**, v. 42, n. 2, p. 307-313, 1997.
- 196- VILLANACCI, V. et al. An immunohistochemical study of the myenteric plexus in idiopathic achalasia. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 44, n. 6, p. 407-410, 2010.
- 197- WATTCHOW, D. A.; COSTA, M. Distribution of peptide-containing nerve fibres in achalasia of the oesophagus. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 11, n. 5, p. 478-485, 1996.
- 198- WHO. **Control of Chagas disease**. Second report of the WHO expert committee. WHO technical report series 905. World Health Organization, Geneva, 2002.
- 199- WONG, G. K. T.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 11, n. 1, p. 215-220, 1996.

Anexos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Sheila Jorge Adad
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 10/10/2011
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2109

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Comparar o megaesôfago chagásico e o megaesôfago idiopático do ponto de vista anatomopatológico.

Objetivos Específicos

Comparar os megaesôfagos chagásicos e idiopáticos em relação às seguintes alterações na cárdia e nos terços inferior, médio e superior do esôfago:

- Presença e intensidade da denervação no plexo mientérico;
- Presença e intensidade da inflamação no plexo mientérico;
- Presença e intensidade da inflamação na muscular própria;
- Presença e intensidade da fibrose na muscular própria;
- Características imuno-histoquímicas do infiltrado inflamatório no plexo mientérico e na muscular própria.

2. JUSTIFICATIVA

Endêmica no Brasil Central, a forma digestiva da doença de Chagas também tem prevalência significativa em outras regiões brasileiras, assim como no Chile, Argentina e Uruguai (Andrade, 2000). Devido à intensificação de movimentos populacionais a doença de Chagas tornou-se um desafio mundial; áreas não endêmicas como a Europa e o Japão tem registrado casos da doença e, nos Estados Unidos, estima-se que atualmente mais de 300.000 indivíduos sejam infectados pelo *T. cruzi* (Coura, 2010).

O megaesôfago idiopático ou acalásia idiopática é a principal forma de megaesôfago na Europa e América do Norte. Foi descrito pela primeira vez em 1672 por Willis e apresenta-se clinicamente de forma muito semelhante ao chagásico; no entanto, até hoje sua etiologia não foi esclarecida (Birgisson et al, 1997).

Tanto o megaesôfago chagásico quanto o idiopático cursam clinicamente com disfagia, regurgitação, pirose e emagrecimento e ambas as condições aumentam o risco de câncer esofágico (Dias, 1997; Swain, 2003).

Atualmente, em nosso serviço, cerca de 5 a 10% dos casos de megaesôfago apresentam sorologia e dados epidemiológicos negativos para a doença de Chagas, podendo representar casos de megaesôfago idiopático.

O esôfago é tubo muscular que conduz o alimento da orofaringe até o estômago. Apresenta-se, em um curto segmento proximal da muscular própria (4,1 a 5,6% de sua extensão), constituído exclusivamente por músculo estriado esquelético (Meyer, 1986), com ondas peristálticas controladas por impulsos dos nervos glossofaríngeo e vago. No sentido distal, as células musculares esqueléticas e lisas misturam-se em extensão variável, até que a muscular própria torna-se exclusivamente composta por musculatura lisa (Meyer, 1986), sendo neste segmento controlada pelos nervos vagos, que atuam por meio de suas conexões com o plexo mientérico (Guyton, 2006 a). A medida que a onda peristáltica propaga-se para o estômago, os neurônios inibitórios mientéricos transmitem uma onda de relaxamento que, ao alcançar a extremidade inferior do esôfago, prepara o estômago e o duodeno para receber o alimento (Guyton, 2006 b).

Em seus estudos que abordam a esofagopatia chagásica Köberle (1956) definiu o megaesôfago como uma dilatação esofágica não decorrente de obstrução mecânica. Adad (1989), em estudo anatomopatológico, verificou que os casos de megaesôfago com diagnóstico clínico/radiológico apresentavam diâmetros acima de 2,5cm após fixação em formol. Segundo Köberle (1963 a, 1963 b) e Tafuri et al (1983, 2011), a macroscopia do megaesôfago caracteriza-se por dilatação de grau variável do órgão, espessamento de sua parede, ausência de obstáculo mecânico, aspecto normal da porção terminal do órgão (imediatamente abaixo da parte dilatada) e presença ou não de alterações secundárias na mucosa.

Na forma digestiva da doença de Chagas ocorrem alterações na motilidade do tubo digestivo, do esôfago ao cólon, devidas à destruição dos neurônios dos plexos intramurais, especialmente do plexo mientérico (Köberle, 1958, 1963 a, 1963 b, 1968; Adad, 1989, 1996; Adad et al, 1989, 1991, 1992, 1997, 1999, 2001).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado

PROTÓCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS
IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Sheila Jorge Adad
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 10/10/2011
PROTÓCOLO CEP/UFTM: 2109

Intensa destruição neuronal é considerada fundamental para o início da disperistalse na esofagopatia chagásica (Köberle, 1957; Köberle, 1963; Adad, 1989 e Adad et al, 1991). Segundo Köberle (1963) seria necessária denervação maior que 50% para haver alterações funcionais e acima de 90% para se desenvolver megaesôfago.

Köberle (1968) acreditava que a denervação na doença de Chagas ocorreria basicamente na fase aguda e por isso afirmava que o “destino do chagásico decidia-se na fase aguda”. Explicava o surgimento do mega décadas depois da fase aguda pela somatória da denervação desta época, mais a denervação pelo processo de envelhecimento, associadas à morte dos neurônios residuais sobrecarregados pelo exaustivo trabalho para compensar a intensa denervação.

Adad (1989 e 1996) acrescentou, ainda, que a ganglionite que existe na fase crônica e que persiste por décadas gera denervação lenta, porém, persistente, agravando a perda neuronal. Por outro lado, estudos através de PCR feitos por nosso grupo mostram a persistência do DNA do *T. cruzi* no megaesôfago chagásico, o que pode perpetuar a estimulação do sistema imune, contribuindo para o agravamento da denervação nos chagásicos mesmo na fase crônica (Vago et al, 1996, 2000, 2003; Silveira et al, 2005; Adad et al, 1991).

Apesar da acalásia idiopática ter sido descrita há mais de 300 anos e de terem sido parcialmente estudados os aspectos morfológicos e a patogênese, sua etiologia permanece indefinida. Diversos possíveis fatores promotores de denervação mientérica têm sido investigados (Kraichely et al, 2006; Di Nardo et al, 2008) como infecção por vírus neurotrópicos (Birgisson et al, 1997), fatores imunes (Verne et al, 1997; Clark et al, 2000) e genéticos (De Giorgio et al, 2004; Di Nardo et al, 2008).

Além de dilatação na ausência de obstrução mecânica, apresenta, à microscopia, inflamação crônica e intensa denervação, em geral no plexo mientérico; observam-se, ainda, alterações secundárias à obstrução (hipertrofia e fibrose focal da muscular própria) e à estase (hiperplasia epitelial) (Goldblum, 1994; Di Nardo, 2008).

As características macro e microscópicas semelhantes entre esses diferentes megas, assim como o raro encontro de *T. cruzi* na pesquisa direta no tecido de megas chagásicos (Tafari et al, 1983), dificultam o diagnóstico diferencial anatomopatológico entre o megaesôfago chagásico e o idiopático. Por outro lado, Adad (1989) ressalta a tendência de se encontrar, no megaesôfago chagásico, intensa inflamação no plexo mientérico e a possibilidade de se encontrar *T. cruzi* à medida que se aumenta a quantidade de cortes histológicos examinados e que se utilizam técnicas mais sensíveis como imuno-histoquímica e, sobretudo o PCR, que facilitam a detecção do parasita (Adad et al, 1991; Vago et al, 1996; 2000; 2003; Silveira et al, 2005). Observa-se, ainda, freqüente miosite crônica em chagásicos (Adad, 1989; Adad et al, 1991; D'Ávila Reis et al, 2001), o que não está descrito em estudos de megaesôfago idiopático.

Na doença de Chagas a lesão primária (Köberle, 1968; Adad et al, 1991, 2001) seria a destruição de neurônios pós-gangliônicos do sistema nervoso entérico (SNE), anteriormente chamado de sistema parassimpático e por isso denominada de teoria parassimpaticopriva por Köberle (1968). No entanto, também foram descritas lesões pré-gangliônicas (Lopes et al, 1969) com redução de neurônios no núcleo motor dorsal do vago. Para Earlam (1972), esta alteração seletiva na região central do núcleo do vago, poderia ser causada por degeneração retrógrada, secundária à denervação do plexo mientérico gastrointestinal. Na acalasia idiopática, lesões similares foram demonstradas no núcleo motor dorsal do vago, assim como no núcleo ambíguo, que é responsável pelo músculo estriado do esôfago (Cassella et al, 1964; Kimura, 1929).

Segundo Earlam (1972), pesquisador da Mayo Clinic – EUA, que realizou revisão sobre as alterações gastrointestinais na doença de Chagas, haveria muito para se aprender sobre as técnicas empregadas na avaliação da denervação na doença de Chagas, nas quais foram utilizados cortes histológicos subseriados de anéis de órgãos gastrointestinais. Inclusive, destaca que um subproduto desses estudos indicou uma redução evidente de neurônios à medida que aumenta a idade (Köberle, 1968). Earlam (1972) ressalta ainda que esses estudos em doença de Chagas poderiam auxiliar na elucidação da história natural da denervação gastrointestinal pela perda de seu suprimento nervoso intrínseco e possibilitar auxílio no entendimento da causa da acalasia idiopática e da doença de Hirschsprung.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Sheila Jorge Adad
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 10/10/2011
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2109

Essa idéia coincide com o nosso pensamento e por isso temos usado a doença de Chagas e o conhecimento adquirido nos estudos que realizamos nos megas chagásicos como um modelo para estudarmos diversas outras disganglionoses (Adad et al, 2002, 2008, 2010; Laguna-Torres et al, 2003; Pinheiro et al, 2008), ou alterações da inervação de outros órgãos (Crema et al, 2007; Murta et al, 2002), ou em estudos experimentais (Machado et al, 2001 a, b).

Estudos em megacólon chagásico (Adad, 1996; Adad *et al*, 2001) evidenciaram que a hipertrofia dos neurônios residuais decorrente da hipoganglionose do SNE no megacólon chagásico necessitava da aplicação de um fator de correção para precisar o grau de denervação nos plexos intramurais. Se esta correção não é feita pode resultar em aparente aumento paradoxal do número de neurônios no SNE de camundongos, como descrito por Gabella (1984) na estenose intestinal cirúrgica experimental. Esses conhecimentos prévios adquiridos em estudos realizados na doença de Chagas nos possibilitaram estudo comparativo entre megacólon chagásico e andino, evidenciando ausência de denervação no dolico megacólon andino (Laguna-Torres et al, 2003), o que tem aplicações no esclarecimento da patogênese das disganglionoses do SNE.

Com base na experiência adquirida em exames de megaesôfagos em nosso serviço, acreditamos existirem alterações anatomopatológicas que podem sugerir etiologia chagásica, como a presença de miofibrilas crônicas e a maior intensidade de fibrose de substituição na muscular própria. Entretanto, essa hipótese não foi avaliada em estudos sistematizados.

Não sabemos até o momento a etiologia da acalásia ou megaesôfago idiopático, mas a patogênese pode ser similar à doença de Chagas, no sentido de persistir algum estímulo sobre o sistema imune e seria, portanto, interessante realizar estudo nos megas idiopáticos para se tentar avaliar a etiopatogênese, o que poderia favorecer intervenção terapêutica evitando progressão e piora das lesões.

3. DESCRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Serão estudados 30 esôfagos previamente coletados e processados, obtidos de necrópsias ou biópsias (esofagectomias), divididos em 3 grupos pareados por faixa etária, sendo 10 megaesôfagos não chagásicos (acalasia idiopática), 10 megaesôfagos chagásicos e 10 esôfagos controles normais.

4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Crítérios de inclusão:

Grupo megaesôfago chagásico: esôfagos com dilatação não decorrente de obstrução mecânica, com diâmetro maior que 2,5cm após fixação em formol e com positividade em pelo menos 2 dos 3 seguintes exames para pesquisa de infecção pelo *T. cruzi*, no sangue e/ou líquido pericárdico: Elisa, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta.

Grupo megaesôfago idiopático: esôfagos com dilatação não decorrente de obstrução mecânica, com diâmetro maior que 2,5cm após fixação em formol. Neste grupo serão incluídos casos com negatividade nos 3 exames para pesquisa de infecção pelo *T. cruzi*, no sangue e/ou líquido pericárdico: Elisa, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta.

Grupo controle: esôfagos com diâmetro menor que 2,5cm após fixação em formol, de indivíduos sem alterações no sistema digestório, com negatividade nos 3 exames para pesquisa de infecção pelo *T. cruzi*, no sangue e/ou líquido pericárdico: Elisa, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta.

Crítérios de exclusão:

Como pode ocorrer falha sorológica em chagásicos (Batista *et al*, 2010), casos de megaesôfago com sorologia negativa para doença de Chagas que tenham sido inicialmente incluídos no grupo de megaesôfago idiopático, serão excluídos desse grupo se apresentarem positividade na pesquisa de DNA de *T. cruzi* (PCR) em amostras de cortes do esôfago. Esses eventuais casos serão também estudados, com a mesma metodologia, e incluídos no grupo megaesôfago chagásico.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS
IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Sheila Jorge Adad
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 10/10/2011
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2109

5. ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA

Obtenção das amostras para histopatologia

Os esôfagos foram fixados "*in totum*" em formaldeído a 4% para avaliação anatomopatológica de rotina feita em biópsias e necrópsias. Em seguida foi medida a circunferência externa do órgão no terço inferior e calculado o diâmetro. Foram retirados, então, três anéis de cada espécime, com 0,5cm de altura, distando cerca de 5cm, 12cm e 19cm da junção esofagogástrica, correspondendo aos terços inferior (TI), médio (TM) e superior (TS), respectivamente. Também foram retirados dois fragmentos longitudinais, diametralmente opostos, constituídos por 2cm distais do esôfago em continuidade com 0,5cm do estômago (medida total de cada fragmento: 2,5cm de extensão) para representar a região do esfíncter inferior do esôfago/cárdia (Cd). Os fragmentos e anéis foram processados para inclusão em parafina. De cada bloco serão obtidos 35 cortes seriados, com espessura de 7µm, e serão corados 5 cortes subseriados (de 7 em 7 cortes), pela técnica da hematoxilina-eosina (HE), para contagem neuronal, além de corte corado pela técnica de Giemsa e tricrômico de Masson. Cortes intermediários serão dispostos em lâminas silanizadas, para imuno-histoquímica e reserva de colorações especiais.

Obtenção dos dados: serão examinados microscopicamente, de cada caso dos três grupos, 25 cortes histológicos subseriados corados por HE, sendo 5 cortes de cada anel dos terços esofágicos (TS, TM e TI) e 10 da cárdia (5 lâminas de cada bloco de fragmento longitudinal). Será feita a contagem de todos os neurônios do plexo mientérico, ao microscópio de luz, com ocular de 10x e objetiva de 40x; os dados serão expressos em número absoluto de neurônios para cada região.

Tratamento dos dados: a contagem de neurônios obtida em cada região do esôfago será comparada com as da mesma região dos outros grupos. Será feita análise estatística descritiva, com utilização de tabelas com frequência absoluta, frequência relativa e gráficos, e análises comparativas entre os dados obtidos em cada região e entre os grupos de estudo.

Em cada grupo de pacientes e em cada região do esôfago estudada, se a contagem neuronal média apresentar distribuição normal, simétrica, será expressa em média \pm desvio padrão e o teste utilizado será ANOVA. Caso apresente distribuição não normal (assimétrica) será expressa em mediana, com valores mínimo e máximo. Neste caso será utilizado o teste Kruskal-Wallis. As correlações entre esta variável nos grupos estudados serão feitas através do teste de Pearson para distribuições simétricas e o teste de Spearman para assimétricas, seguidos de testes de hipóteses. Os resultados serão considerados significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor que 5% ($p < 0,05$).

Estudo comparativo da presença e intensidade da inflamação no plexo mientérico

Obtenção dos dados: nos três grupos será feita avaliação semi-quantitativa do infiltrado de células mononucleares no plexo mientérico, que será classificado em ausente ou presente; quando presente, o infiltrado será subclassificado em discreto (raros e pequenos focos), moderado (frequentes pequenos focos ou escassos focos de tamanho médio) ou intenso (frequentes focos médios ou volumosos). Portanto os dados serão expressos em quatro categorias. Esta avaliação será feita em todos os cortes histológicos obtidos de cada região, por dois observadores independentes. Em casos de discordância, os cortes serão reavaliados em conjunto pelos dois observadores.

Tratamento dos dados: a presença e intensidade de inflamação no plexo mientérico avaliada em cada região de cada grupo será comparada com as da mesma região dos outros grupos. Será feita análise estatística descritiva, com utilização de tabelas com frequência absoluta, frequência relativa e gráficos, e análises comparativas entre os dados obtidos pelo teste exato de Fisher. Os resultados serão considerados significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor que 5% ($p < 0,05$).

Estudo comparativo da presença e intensidade da inflamação na muscular própria

Obtenção dos dados: Nos três grupos será feita avaliação semi-quantitativa da miosite crônica na muscular própria (infiltrado mononuclear e degeneração e/ou necrose de miocélulas), que quando presente será graduada de modo semelhante ao descrito para a inflamação no plexo mientérico. Esta avaliação será feita em todos os cortes histológicos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Sheila Jorge Adad
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 10/10/2011
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2109

obtidos de cada região, por dois observadores independentes. Em casos de discordância, os cortes serão reavaliados em conjunto pelos dois observadores.

Tratamento dos dados: a presença e intensidade de inflamação na muscular própria avaliada em cada região de cada grupo serão comparadas com as da mesma região dos outros grupos. Será feita análise estatística descritiva, com utilização de tabelas com frequência absoluta, frequência relativa e gráficos, e análises comparativas entre os dados obtidos pelo teste exato de Fisher. Os resultados serão considerados significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor que 5% ($p < 0,05$).

Estudo comparativo da presença e intensidade da fibrose na muscular própria

Obtenção dos dados: nos três grupos será feita avaliação semi-quantitativa da fibrose na muscular própria que substitua miócélulas; esta fibrose será graduada de forma semelhante à descrita para a inflamação no plexo mientérico. Esta avaliação será feita em todos os cortes histológicos obtidos de cada região, por dois observadores independentes. Em casos de discordância, os cortes serão reavaliados em conjunto pelos dois observadores.

Tratamento dos dados: a presença e intensidade da fibrose na muscular própria avaliada em cada região de cada grupo serão comparadas com as da mesma região dos outros grupos. Será feita análise estatística descritiva, com utilização de tabelas com frequência absoluta, frequência relativa e gráficos, e análises comparativas entre os dados obtidos em cada região de cada grupo de estudo pelo teste exato de Fisher. Os resultados serão considerados significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor que 5% ($p < 0,05$).

Estudo comparativo das características imuno-histoquímicas do infiltrado inflamatório no plexo mientérico e na muscular própria

Obtenção dos dados: será feita avaliação qualitativa do tipo de célula presente no infiltrado inflamatório no plexo mientérico e muscular própria do esôfago, através de imuno-histoquímica para macrófagos (CD68), linfócitos B (CD20), linfócitos T (CD3), subpopulação de linfócitos T (CD8) e o estado de ativação dessa subpopulação de linfócitos T (granzyme B), empregando metodologia utilizada por nós em trabalho anterior em megaesôfago chagásico (D'Ávila Reis et al, 2001).

Tratamento dos dados: a avaliação qualitativa da inflamação no plexo mientérico e na muscular própria em cada grupo de estudo, quando presente, será comparada com a dos outros grupos. Será feita análise estatística descritiva, com utilização de tabelas com frequência absoluta, frequência relativa e gráficos, e análises comparativas entre os dados obtidos em cada grupo de estudo pelo teste exato de Fisher. Os resultados serão considerados significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor que 5% ($p < 0,05$).

Pesquisa de dna do *t. cruzi*

A pesquisa de DNA de *T. cruzi* será feita através da técnica de PCR, para afastar falha de sorologia para doença de Chagas nos casos de megaesôfago com sorologia negativa e, nos chagásicos, para avaliar a persistência do parasitismo. Essa pesquisa será feita no material colhido do terço inferior, conforme metodologia já empregada por nós (Vago et al, 1996; 2003; Silveira et al, 2005).

6. ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES

O serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro realiza necrópsias e biópsias, dispõe de sala de necrópsia, laboratórios de histotecnologia, imuno-histoquímica, equipamentos de trabalho e segurança adequados, profissionais da área de necrópsia (técnicos), histotecnologia e fotografia, microscópio comum de luz com câmera fotográfica acoplada, micrótomo de parafina, criostato, estufa, Panela PASCAL de pressão microprocessada para recuperação antigênica para imuno-histoquímica, terminais de computadores para consulta dos dados necessários para a pesquisa. O Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro dispõe de laboratório de Patologia Clínica para a realização das sorologias para doença de Chagas. A parte do estudo de PCR será



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS
IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Sheila Jorge Adad
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 10/10/2011
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2109

feita em colaboração com a pesquisadora da UFTMG, com a qual já realizamos vários trabalhos em conjunto, contando com toda a infra-estrutura necessária para realização desta técnica.

7. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Por um lado, há o risco de perda da confidencialidade. Por outro lado, este risco será prevenido pela identificação dos casos por letras e números; além disso, esta pesquisa poderá trazer os benefícios de fornecer melhor exatidão ao diagnóstico anatomopatológico de megaesôfagos e este conhecimento ser aplicado para melhor entendimento de diferenças na patogênese de megaesôfago chagásico e idiopático, investigações da etiopatogênese e para novas intervenções terapêuticas em megas.

8. RETORNO DE BENEFÍCIOS PARA O SUJEITO E/OU PARA A COMUNIDADE

Informado no item anterior.

9. JUSTIFICATIVA DE SUSPENSÃO TERAPÊUTICA ("Wash out") – Não pertinente.

10. JUSTIFICATIVA DO USO DE PLACEBO – Não pertinente.

11. ORÇAMENTO FINANCEIRO DETALHADO DA PESQUISA

O trabalho é retrospectivo e serão revistos prontuários, laudos e lâminas pré-existentes. Entretanto, serão cortadas novas lâminas e realizadas colorações adicionais, assim como imuno-histoquímica para diferenciação das células do infiltrado inflamatório e PCR para identificação de agentes infecciosos. Foi solicitado financiamento ao CNPq em agosto de 2011 que será descrito a seguir.

MATERIAL DE CONSUMO

Micropipetas, lâminas, laminulas, navalhas para microtomia, corantes, luvas, compressas, plásticos especiais para plastificar peças, caneta especial resistente a solventes, cassetes histológicos, recipientes plásticos e vidrarias, pinças, tesouras, estiletes, caixa metálica para armazenamento de material para esterilização.

Acessórios, componentes e peças de reposição, recuperação e manutenção de equipamentos para microscópios (condensador, objetiva) e computador (teclado e mouse, memória), melhoria em computadores que já possuímos e impressoras, softwares, serviço de terceiros, tinta para impressora, papel especial para impressão, material bibliográfico, plotagem de pôsteres para apresentação em eventos científicos, pagamento para custos em periódicos científicos indexados internacionalmente.

Subtotal: R\$13.000,00.

Passagem aérea e 4 diárias para apresentação dos resultados em evento científico internacional (US\$: 2200,00 = cerca de R\$3.700,00).

Subtotal: R\$3.700,00.

Material para imuno-histoquímica: micropipetas, lâminas especiais para imuno-histoquímica, laminulas, IHC-pen, bandejas para incubação e coloração de imuno-histoquímica, Kit novolink ou sistema de técnica de polímeros similar, bloqueador de proteínas, DAB, solução de recuperação antigênica, anticorpos primários para diferenciação de células do infiltrado inflamatório (tais como CD3, CD8, CD20, CD68, Granzyme B).

Subtotal: R\$19.000,00

Material para realização de PCR: micropipetas, microtubos eppendorf, ponteiras descartáveis, reagentes e primers para PCR.

Subtotal: R\$14.000,00

12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR

A pesquisadora responsável receberá apenas o vencimento de docente da UFTM.

13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO

O Termo não será obtido, tendo em vista que obter novo consentimento nos casos de biópsias (esofagectomia para tratamento do megaesôfago) implicaria em novo contato com o indivíduo vários anos após a cirurgia ou com sua família

Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar. Sala H – Abadia
38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854
E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



7/7

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP

Parecer Consubstanciado

PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico comparativo entre megaesôfago chagásico e idiopático
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Sheila Jorge Adad
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 10/10/2011
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2109

vários anos após o óbito do paciente, podendo criar uma situação de constrangimento e angústias, sem benefícios para eles.

14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.

15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES

PARECER DO CEP: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 26/10/2011

Prof.^a Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise comparativa da denervação no sistema nervoso entérico no megaesôfago chagásico versus idiopático, na cárdia e nos terços esofágicos, em relação ao número total de neurônios e a proporção de neurônios excitatórios inibitórios.

Pesquisador: IRACEMA SALDANHA JUNQUEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 00018417.2.0000.5154

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.000.208

Apresentação do Projeto:

Segundo o pesquisador: "Endêmica no Brasil, a doença de Chagas também tem prevalência significativa em outros países da América do Sul (Andrade, 2000). Devido à intensificação de movimentos populacionais, a doença de Chagas tornou-se um desafio mundial; áreas não endêmicas, tais como a Europa e o Japão, têm registrado casos dessa doença e, nos Estados Unidos, estima-se que mais de 300.000 indivíduos sejam infectados pelo *T. cruzi* (Coura, 2010).

No Brasil central, é comum o megaesôfago chagásico (MEC) como forma de expressão da doença de Chagas. Na Europa e na América do Norte, a principal forma de megaesôfago tem causa desconhecida, sendo denominado de megaesôfago idiopático (MEI) ou acalásia idiopática. Foi descrito pela primeira vez em 1072 por Willis e apresenta-se clinicamente de forma muito semelhante ao chagásico; no entanto, até hoje sua etiologia não foi esclarecida (Birgisson et al, 1997).

Tanto o MEC quanto o MEI cursam clinicamente com disfagia, regurgitação, pirose e emagrecimento e ambos aumentam o risco de câncer esofágico (Dias, 1997; Swain, 2003).

MEC e MEI têm manifestações clínicas e tratamento semelhantes. Em ambos observa-se redução do número de neurônios do plexo mientérico do esôfago (GOLDBLUM, 1994; KÖBERLE, 1998).

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadía

UF: MG Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6776

CEP: 38.025-100

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.060.286

Entretanto, segundo HIRANO (1999), no MEI prevalece a lesão da inervação inibitória e, no MEC, há comprometimento tanto da inervação inibitória, quanto da excitatória. Todavia, são muito escassos os trabalhos sistematizados sobre MEI.

A inervação do esfíncter inferior do esôfago (EEI), bem como do restante do músculo liso do esôfago, é dependente do sistema nervoso autônomo, parassimpático e simpático, em conexão com o Sistema Nervoso Entérico com seus dois plexos, mientérico ou de Auerbach e submucoso ou de Meissner. A inervação parassimpática é dependente do nervo vago que contém fibras aferentes e eferentes em conexão com o núcleo motor dorsal do vago. A inervação simpática é dependente da cadeia simpática torácica. As fibras colinérgicas atuam pela liberação da acetilcolina, as adrenérgicas de noradrenalina e as fibras inibidoras não-adrenérgicas não-colinérgicas pela liberação de Peptídeo Intestinal Vascoativo (VIP), Óxido Nítrico (NO) e ATP (SINGARAM et al, 1994).

A pressão basal do EEI é devida ao tônus miogênico e sua posição de repouso é a contração. A contração é dependente da atividade colinérgica e o relaxamento principalmente pela liberação do NO. O controle do tônus miogênico basal do EEI é modulado por grande variedade de hormônios e neurotransmissores, dentre eles VIP e NO, neurotransmissores liberados pelos neurônios inibitórios que atuam reduzindo a pressão do EEI. Ao contrário, a substância P (SP) é um neurotransmissor excitatório que causa aumento da pressão (GOYAL, CHAUDHURY, 2008).*

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador: *1. Em esôfagos de chagásicos sem mega (CSME):

- 1.A. Verificar se a denervação da cárdia é maior que nos demais terços do esôfago.
- 1.B. Verificar se a denervação é seletiva em relação a neurônios inibitórios ou excitatórios.

2. Em esôfagos de chagásicos com mega (MEC):

- 2.A. Verificar se a denervação da cárdia é maior que nos demais terços do esôfago.
- 2.B. Verificar se a denervação é seletiva em relação a neurônios inibitórios ou excitatórios.

3. Em esôfagos de não chagásicos com mega (megaesôfago idiopático - MEI):

- 3.A. Verificar se a denervação da cárdia é maior que nos demais terços do esôfago.
- 3.B. Verificar se a denervação é seletiva em relação a neurônios inibitórios ou excitatórios.

4. Verificar se há diferenças entre o MEC e o MEI e também em relação aos grupos CSME e NC, quanto à diminuição do número:

- 4.A. total de neurônios nos diferentes terços e cárdia.
- 4.B. de neurônios inibitórios e excitatórios.*

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

UF: MG

Telefone: (34)3700-6776

Município: UBERABA

CEP: 38.025-100

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.060.266

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

*Por um lado, o único risco previsto é o de perda de confidencialidade, que será prevenida pela identificação dos participantes por números. Esta forma de prevenção nos parece eficiente.

Por outro lado, esta pesquisa pode fornecer elementos para o diagnóstico diferencial, para o entendimento da etiopatogênese e para novas intervenções terapêuticas em pacientes megas. Assim, nos parece que os benefícios suplantam os riscos.*

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo retrospectivo quantitativo comparativo em material de necropsia e de biópsia (esofagectomia) do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da UFTM.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados adequadamente.

O pesquisador efetuou o pedido de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de material de biópsia e necropsia do serviço de patologia. O pesquisador justificou a dispensa de afirmando que a obtenção do TCLE poderia causar desconfortos aos participantes ou ao seus familiares, além da inviabilidade de localização de grande parte amostra, por se tratar de voluntários que já não residem no endereço do prontuário.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 400/12 e norma operacional 001/2013, o colegiado do CEP-UFTM manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto, em reunião dia 12/05/2017.

Considerações Finais e critério do CEP:

A aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFTM dá-se em decorrência do atendimento à Resolução CNS 400/12 e norma operacional 001/2013, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Conforme prevê a legislação, são responsabilidades, indelegáveis e indeclináveis, do pesquisador responsável, dentre outras: comunicar o início da pesquisa ao CEP; elaborar e apresentar os relatórios parciais (semestralmente) e final. Para isso deverá ser utilizada a opção 'notificação' disponível na Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6776 E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.060.266

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--|--|------------------------|-----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_881411.pdf | 21/03/2017 08:40:23 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Protocolo_CEP.doc | 21/03/2017 08:47:58 | LUCINDA CALHEIROS GUIMARÃES | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | autorizacao_GEP.pdf | 21/03/2017 08:42:27 | LUCINDA CALHEIROS GUIMARÃES | Aceito |
| Folha de Rosto | FOLHA_DE_ROSTO.pdf | 21/03/2017 08:41:03 | LUCINDA CALHEIROS GUIMARÃES | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 12 de Maio de 2017

Assinado por:

Marty Aparecida Spadotto Balarin
(Coordenador)

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-0770 E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br