

UNIVERSIDADE DE UBERABA

CRISTINA MENEZES GATTONI

**REATIVAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS EM INDIVÍDUOS
COINFECTADOS PELO HIV: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

UBERABA-MG
2014

CRISTINA MENEZES GATTONI

**REATIVAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS EM INDIVÍDUOS
COINFECTADOS PELO HIV: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Biopatologia da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sanívia Aparecida de Lima Pereira

UBERABA-MG
2014

CRISTINA MENEZES GATTONI

**REATIVAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS EM INDIVÍDUOS
COINFECTADOS PELO HIV: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Biopatologia da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Uberaba, 28 de Fevereiro de 2014

Banca Examinadora:

Sanívia Aparecida de Lima Pereira

César Penazzo Lepri

Vicente De Paula Antunes Teixeira

Dedico este trabalho à minha família,
particularmente a meus pais Angela e Hugo.

AGRADECIMENTO

Expresso aqui minha sincera gratidão:

A Deus, por minha vida, por minha saúde e por colocar em meu caminho pessoas que me ajudaram nessa caminhada.

Aos meus pais, Angela e Hugo, pelo amor, pela companhia, pelo exemplo inestimável que sempre me proporcionaram e que certamente me ajudou e ajuda em todos os sentidos da minha vida.

A minha orientadora Sanívia, por aceitar o convite para ser minha orientadora, pela confiança em mim depositada, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis e por seu exemplo de professora, pesquisadora e mulher.

Aos professores Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e Tony de Paiva Paulino pelo apoio e por me permitirem utilizar o laboratório do Cefores.

Ao professor Vicente Teixeira pelo apoio e por compartilhar seus valiosos conhecimentos.

A todos os professores da pós-graduação, pela dedicação e empenho em cultivar nos alunos o desejo pela pesquisa, pela docência e por todos os bons e sábios ensinamentos.

Aos demais alunos da pós-graduação que me acompanharam nas disciplinas e muitos dos quais se tornaram meus amigos.

A Poliana Alves, secretária da Pró-Reitoria de Pesquisa da Uniube que muito me ajudou, sempre com muito carinho.

A Polyanna, colaboradora do CEFORES que muito me ensinou e que me motiva sempre com seu otimismo, sua paciência e alegria de viver.

Aos alunos do curso de medicina da Uniube: Tácito, Daniel, Isadora, Luiz Fernando e Fernando pela colaboração.

Aos técnicos da Patologia Geral da UFTM: Adalberto e Aloísio, pela atenção e inestimável ajuda no processamento de nosso material.

Aos amigos de Belo Horizonte, principalmente Mariana, Ana Flávia e Daniel, pelo carinho, apoio e por torcerem por minhas realizações e por minha felicidade.

Aos amigos de Uberaba, Márcia, Viviane, Laís, Ana Cristina, Renato e Marcela, que me ajudaram e me deram apoio em todos os momentos.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, que é fruto de muito esforço.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado graças aos auxílios financeiros recebidos da Universidade de Uberaba (UNIUBE), Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

Introdução – A reativação da doença de Chagas (DC) tem sido descrita em indivíduos imunodeprimidos graves por etiologias diversas, dentre elas devido à coinfeção pelo HIV. **Objetivo** – Realizar avaliação histopatológica e imuno-histoquímica do cérebro, do miocárdio, do esôfago e do intestino grosso de indivíduos necropsiados com DC e/ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) comparando com indivíduos controle. **Material e Métodos** – Foi realizado levantamento de laudos de necropsias no período de 1998 a 2012 e selecionados oito indivíduos adultos que foram divididos em quatro grupos: Reativação (RE) (n=2), doença de Chagas (CH) (n=2), AIDS (AI) (n=2) e Controle (CO) (n=2). De cada indivíduo foram coletados e processados fragmentos de cérebro, miocárdio, esôfago e intestino grosso cujos fragmentos foram processados para análise histopatológica e imuno-histoquímica. As lâminas com os cortes corados por Hematoxilina e eosina, Giemsa e Picrossírius foram utilizadas para quantificar a densidade de células inflamatórias, a densidade de mastócitos e a porcentagem de colágeno, respectivamente. Foi realizada análise imuno-histoquímica para IL17 e CD31. **Resultados** – No miocárdio a densidade de mastócitos foi significativamente maior no grupo CH quando comparado aos demais grupos. No esôfago e no intestino grosso, a densidade de mastócitos foi significativamente maior quando comparado aos demais grupos. A porcentagem de colágeno no esôfago, no miocárdio e no intestino grosso do grupo RE foi significativamente menor quando comparado ao grupo CO. O grupo CH apresentou maior porcentagem de colágeno no miocárdio e no intestino grosso quando comparado aos demais grupos. A densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 foi significativamente maior no intestino grosso e no miocárdio no grupo CH quando comparado ao grupo CO. No miocárdio e no esôfago do grupo AI foram encontrados maior densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 quando comparado aos demais grupos. Não houve correlações significativas quanto a densidade de mastócitos e porcentagem de colágeno nos grupos RE, CO, AI e CH. **Conclusões** – As lesões cerebrais encontradas nos indivíduos com reativação da DC e a maior densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 nesses locais sugere que essa citocina estaria intensificando o quadro inflamatório local com consequentes danos teciduais em decorrência da inflamação. Além disso, nesses indivíduos, a maior densidade de mastócitos no esôfago e no intestino sugere que essas células estariam exercendo atividade relevante no processo inflamatório esofágico e intestinal.

Palavras-chave: AIDS, Doença de Chagas, Reativação.

ABSTRACT

Introduction – Reactivation of Chagas disease (CD) has been described in severe immunocompromised patients by various etiologies, among them those due to coinfection with HIV. **Objective** – Perform histopathological and immunohistochemical evaluation of the brain, myocardium, esophagus and large bowel of autopsied patients with CD and/or Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) compared with control patients. **Material and Methods** – A survey of autopsy reports was conducted in the period from 1998 to 2012 and selected eight adult subjects who were divided into four groups: Reactivation of Chagas disease (RE) (n=2), Chagas disease (CH) (n=2), AIDS (AI) (n=2) and Control (CO) (n=2). From each subject were collected and processed fragments of brain, myocardium, esophagus and large bowel whose fragments were processed for histological and immunohistochemical analysis. The histological sections stained with hematoxylin and eosin, Giemsa and Picrossirius were used to quantify the density of inflammatory cells, the density of mast cells and the percentage of collagen, respectively. Immunohistochemical analysis was performed to IL17 and CD31. **Results** – In the myocardium the density of mast cells was significantly higher in the CH group when compared to other groups. In the esophagus and large intestine, the density of mast cells was significantly higher when compared to other groups. The percentage of collagen in the esophagus, heart and intestine in the RE group was significantly lower when compared to the CO group. The CH group had a higher percentage of collagen in the myocardium and in the large bowel when compared to other groups. The density of cells immunostained by anti-IL17 was significantly higher in the large bowel and myocardium in the CH group when compared to the CO group. The myocardium and esophagus AI group higher density of vessels immunostained by anti-CD31 when compared to the other groups found. No significant correlations as the density of mast cells and percentage of collagen in groups RE, CO, CH and AI. **Conclusion** – Brain lesions found in patients with reactivation of DC and the highest density of immunostained cells by anti-IL17 at these sites suggests that this cytokine was intensifying local inflammation with consequent tissue damage due to inflammation. In addition, in these subjects, the highest density of mast cells in the esophagus and intestine suggests that these cells would be exercising relevant activity in esophageal and intestinal inflammation..

Keywords: AIDS, Chagas disease, Reactivation.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 DOENÇA DE CHAGAS | 12 |
| 1.1.1 Conceito e Etiologia | 12 |
| 1.1.2 Prevalência | 13 |
| 1.1.3 Diagnóstico | 14 |
| 1.1.4 Fase Aguda | 14 |
| 1.1.5 Fase Crônica | 15 |
| 1.1.5.1 Forma Indeterminada | 15 |
| 1.1.5.2 Forma Cardíaca | 16 |
| 1.1.5.3 Forma Digestiva | 17 |
| 1.1.5.4 Forma Mista | 18 |
| 1.2 HIV / AIDS | 19 |
| 1.3 REATIVAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NA COINFECÇÃO PELO HIV | 21 |
| 1.3.1 Diagnóstico da reativação da doença de Chagas | 22 |
| 1.3.2 Sinais e sintomas da reativação da doença de Chagas na AIDS | 23 |
| 1.3.3 Tratamento da reativação da doença de Chagas na AIDS | 23 |
| 1.3.4 Órgãos alvos da reativação da doença de Chagas na AIDS | 24 |
| 1.4 Mastócito, IL17 e CD31 na AIDS e na doença de Chagas | 26 |
| 2 HIPÓTESE | 29 |
| 3 OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 32 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 32 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2 | FORMAÇÃO DOS GRUPOS | 34 |
| 4.3 | COLETA DOS FRAGMENTOS | 35 |
| 4.4 | IDENTIFICAÇÃO DE PROCESSOS PATOLÓGICOS NOS CORTES HISTOLÓ- GICOS | 35 |
| 4.5 | DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE MASTÓCITOS | 35 |
| 4.6 | ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO | 36 |
| 4.7 | REALIZAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA IL17 E CD31 | 36 |
| 4.8 | DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POR ANTI- IL17 E DE VASOS IMUNOMARCADOS POR ANTI- CD31..... | 37 |
| 4.9 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 38 |
| 5 | RESULTADOS | 39 |
| 6 | DISCUSSÃO | 43 |
| 7 | CONCLUSÃO | 49 |
| | REFERÊNCIAS | 51 |
| | ANEXOS | 57 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1 Conceito e Etiologia

A doença de Chagas (DC) é uma doença parasitária sistêmica, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004), resultante da infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (COUTINHO; DIAS, 1999).

O parasito *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo. A partir do momento em que o inseto vetor ingere o sangue do hospedeiro infectado, ele adquire o parasito na forma tripomastigota. No intestino posterior do inseto, os tripomastigotas sofrem transformação para epimastigotas e então, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são então eliminados através das fezes e da urina do inseto vetor, podendo infectar o hospedeiro vertebrado (RASSI JUNIOR; RASSI; REZENDE, 2012). O parasita não penetra a pele intacta, somente infectando o hospedeiro via mucosa ou ferimentos na pele. Nos mamíferos, os parasitas se desenvolvem no interior das células, sendo liberados no sangue circulante após estas células se romperem (HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012).

Após o *T. cruzi* penetrar as células do hospedeiro, ele se multiplica na forma amastigota, criando pseudocistos, que eclodem e originam reação inflamatória, provocando fibrose no tecido. Através da ruptura os pseudocistos, são liberados tripomastigotas que ficam livres no organismo, invadindo novas células e repetindo o ciclo (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

As células hospedeiras apresentam comportamento diferente durante a infecção pelo *T. cruzi*. Estudos prévios sugeriram a entrada do parasita nas células do hospedeiro através da fagocitose como a maioria dos outros parasitas intracelulares, porém novas investigações demonstraram um mecanismo alternativo, com penetração ativa do parasita na célula do hospedeiro. Estudos mais recentes, utilizando microscópio eletrônico de varredura demonstraram parasitas invadindo células epiteliais e fibroblastos que são células que não possuem nenhuma formação pseudópode ou qualquer outra alteração da membrana plasmática (ROMANO et al., 2012).

A DC também pode ser transmitida ao homem por mecanismos que não dependem de vetores, tais como transfusão de sangue e transmissão congênita. Estas são as principais causas de infestação nas zonas urbanas e países não endêmicos. O risco de desenvolvimento da DC após a transfusão sanguínea por um doador infectado é elevado, pois na fração de plaquetas encontramos predominantemente formas tripomastigotas durante a centrifugação. Sendo assim, na transfusão de plaquetas o risco de contaminação é mais elevado quando comparado à transfusão de outro componente sanguíneo (RASSI JUNIOR; RASSI; REZENDE, 2012).

1.1.2 Prevalência

A DC encontra-se entre as 20 mais importantes doenças tropicais negligenciadas no mundo. É uma das doenças de larga distribuição no continente americano (MATTA et al., 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 15 milhões de pessoas encontram-se infectadas nas Américas, sendo que dessas, 10 milhões estão na América Latina (COURA; DIAS, 2009).

Calcula-se que 80 a 100 milhões de pessoas têm risco de contrair DC, com uma incidência de 41.200 novos casos por ano, uma prevalência de 8 até 10 milhões de casos e 12.500 mortes por ano (FUENTES; MATURANA; DE LA CRUZ, 2011).

A grande maioria dos indivíduos contaminados pela DC encontra-se na fase crônica da doença, sendo um terço sob a forma cardíaca, o que provoca morbidade elevada (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006).

No Brasil a quantidade de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* situa-se em torno de 3,5 milhões de pessoas, sendo que aproximadamente 600 mil residem no estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2006). São entre 10.000 a 20.000 novos casos anualmente no Brasil, sendo responsáveis por cerca de 20.000 mortes por ano nas duas últimas décadas (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004).

Para o controle da DC, os melhores exemplos de prevenção primária são o controle vetorial (baseado na vigilância) e controle de doadores de sangue e de órgãos (SOSA-ESTANI; COLANTONIO; SEGURA, 2012). Mesmo em áreas onde a

transmissão é controlada há risco contínuo de transmissão em função da sobrevivência dos vetores devido à baixa fiscalização da vigilância sanitária (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004).

1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, emprega métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (MAYA et al., 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Na fase aguda, o diagnóstico precoce pode ser feito através a detecção direta de tripomastigotas no sangue ou líquido cefalorraquidiano (PY, 2011).

Já na fase crônica da doença o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da ausência de parasitemia (MAYA et al., 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Sendo assim, o diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico, e deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasito) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*) (MAYA et al., 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

1.1.4 Fase Aguda

Em mamíferos contaminados, incluindo humanos, a DC pode apresentar duas fases características e distintas, sendo elas a fase aguda e a fase crônica, que pode se apresentar principalmente sob a forma cardíaca ou digestiva, além da fase indeterminada, onde ainda não podem ser observadas alterações cardíacas, nem digestivas (GURGEL; ALMEIDA, 2007).

A fase aguda pode não apresentar sinais e sintomas ou apresentar características clínicas de infecção generalizada de gravidade variável, como febre, dores musculares, mal-estar, sudorese, aumento do tamanho do fígado, aumento do tamanho do baço e insuficiência cardíaca. A suspeita diagnóstica inicia-se pela

observação de sinais de porta de entrada como chagoma e sinal de Romaña. Os indivíduos podem apresentar ainda febre, calafrios, náuseas, vômitos, diarreia, erupções cutâneas, irritação meníngea, conjuntivite, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia aguda, anemia, trombocitopenia e elevação das enzimas hepáticas (HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012).

Apesar dos pacientes apresentarem todos esses sintomas, o diagnóstico só é comprovado pela presença dos parasitos no sangue periférico (MAYA et al., 2010). Nessa fase, os pacientes podem ir a óbito devido a complicações diretas da infecção pelo parasita, pela miocardite, pela meningoencefalite ou ainda por complicações secundárias tais como broncopneumonia (JUNQUEIRA JUNIOR, 2012).

A fase aguda é de curta duração e mais de 95% dos pacientes podem se recuperar de forma espontânea, apesar da cura da doença não ocorrer sem o tratamento adequado. Durante a fase aguda o tratamento com os medicamentos levam a regressão da parasitemia e dos sintomas clínicos. (FUENTES; MATURANA; DE LA CRUZ, 2011).

1.1.5 Fase Crônica

A fase crônica da DC é longa e evolui a partir da fase aguda que dura entre 2 e 3 meses. Na fase crônica os parasitas invadem os tecidos dos hospedeiros, principalmente o músculo esquelético cardíaco e o sistema digestório onde se converte em formas intracelulares e proliferam-se podendo alcançar qualquer órgão (LOPES et al., 2000).

A fase crônica é caracterizada por apresentar quatro formas: a indeterminada, a cardíaca a digestiva e a mista.

1.1.5.1 Forma Indeterminada

Após a fase aguda, inicia-se um período que é caracterizado pela presença de alguns anticorpos e ausência de manifestações clínicas, conhecido como forma indeterminada. Para se diagnosticar como forma indeterminada da DC, os pacientes não devem apresentar sintomas clínicos relacionados à infecção pelo *T. cruzi* nem

alterações em eletrocardiogramas, assim como alterações radiológicas do coração, do esôfago e do cólon. No entanto, os pacientes na fase indeterminada permanecem parasitêmicos. Esta fase pode durar alguns meses ou até uma vida inteira (HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012).

Estudos sobre a evolução da DC em diferentes regiões do Brasil têm demonstrado que, aproximadamente 30% dos casos da forma indeterminada podem evoluir para a forma cardíaca, enquanto aproximadamente 40% dos casos da forma indeterminada não evoluem para a forma cardíaca nem digestiva. Em um estudo observacional realizado no Rio de Janeiro ao longo de um período de 30 anos em 510 indivíduos sorologicamente positivo para a DC, 39% permaneceram na forma indeterminada, 52,1% apresentavam a forma cardíaca e 14,3% apresentaram a forma digestiva. Apenas 5,4% apresentavam a forma mista, com associações de cardiopatia e megas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011).

1.1.5.2 Forma Cardíaca

A forma cardíaca crônica ocorre quando os parasitas penetram as células musculares cardíacas se transformando em amastigotas (REIS et al., 2000). Vários estudos demonstram parasitos situados entre as fibras do miocárdio em um grande número de pacientes, mesmo durante a fase de latência. Achados histológicos usuais incluem infiltrado de células mononucleares e fibrose. A fibrose é causada por diferentes mecanismos patológicos, tais como inflamação, microisquemia e danos autoimunes do miocárdio (STRASEN et al., 2014).

A inflamação no miocárdio geralmente é muito intensa, difusa e em desproporção com o número de células parasitadas (JUNQUEIRA JUNIOR, 2012).

Na miocardite chagásica crônica ocorre uma inflamação essencialmente fibrosante, sendo um processo dinâmico e progressivo com a idade (JUNQUEIRA JUNIOR, 2012). Este processo se estende ao tecido de formação e condução de estímulo elétrico com fibrose, ectasia cardiovascular e graus variáveis de esclerose vascular (ANDRADE, 1997).

A presença de linfócitos e macrófagos no infiltrado inflamatório pode estar relacionada diretamente ao processo de fibrose, pela produção de citocinas e fatores

de crescimento que provocariam destruição tecidual e ativariam a fibrogênese (REIS et al., 2000).

A fibrose caracteriza-se por ser fina e difusa, envolvendo cada fibra cardíaca, com áreas mais densas. As áreas de fibrose mais extensas podem ser explicadas por isquemia, principalmente nas regiões distais de dupla irrigação, causadas possivelmente pela intensa dilatação da microcirculação (REIS et al., 2000).

Muitas vezes ocorre uma lesão altamente característica, ao nível da ponta do ventrículo esquerdo, comumente designada como "lesão de ponta" ou "aneurisma". Trata-se de um adelgaçamento, sem fibrose, mas com atrofia das fibras miocárdicas e protrusão da ponta do ventrículo esquerdo do coração (GURGEL et al., 2010). Embora ocorra essa lesão no ventrículo esquerdo, na maioria das vezes, o coração é congesto e moderadamente aumentado de volume e peso (JUNQUEIRA JUNIOR, 2012), possuindo uma forma arredondada, globóide, com vasos venosos congestos fazendo um proeminente desenho vascular na sua superfície que é habitualmente lisa, transparente e brilhante (VINHAES; DIAS, 2000).

A miocardite aguda chagásica é caracterizada pela presença de intenso parasitismo, destruição das células musculares cardíacas parasitadas e presença de infiltrado inflamatório mononuclear, sendo atribuída diretamente ao parasito e à resposta imune humoral e/ou celular dirigida aos seus antígenos. Por outro lado, a miocardite chagásica crônica distingue-se por apresentar infiltrado inflamatório multifocal com células mononucleares, destruição de fibras miocárdicas no foco inflamatório e áreas de fibrose (FREITAS et al., 2011).

1.1.5.3 Forma Digestiva

A forma crônica digestiva é caracterizada pela destruição dos gânglios intramurais e denervação parassimpática em todo o trato digestório, afetando aproximadamente um terço dos pacientes infectados. Os pacientes podem desenvolver dilatação do trato gastrointestinal e distúrbios gastrointestinais motores como acalásia da cárdia, distúrbios de esvaziamento gástrico, alterações no trânsito intestinal e desordens no cólon (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009).

Estas manifestações se iniciam como descoordenação motora, devido ao comprometimento do sistema nervoso autônomo do plexo mioentérico. Embora as

lesões neuronais afetem o plexo mioentérico em várias partes do tubo digestório, as maiores repercussões ocorrem no esôfago e cólon (ANDRADE, 1997). Nestes locais o conteúdo é geralmente sólido e, portanto mais dependente das forças peristálticas. Também a presença de esfíncteres nestes locais contribui para agravar a disperistalse. Esta estimula o peristaltismo, que provoca hipertrofia das camadas musculares, seguida pela dilatação ou ectasia dos órgãos comprometidos. Nos megas digestivos é possível visualizar na porção mais distal do órgão uma zona mais estreitada fusiforme ou cilíndrica, fazendo transição entre a parte normal e a zona dilatada. A mucosa pode apresentar áreas de metaplasia, sendo vistas no esôfago como zonas esbranquiçadas. Na mucosa do cólon são mais comuns áreas ulceradas. O aparecimento de câncer pode ser uma complicação dos megas, especialmente do megaesôfago (ANDRADE, 1997). A prevalência do surgimento de câncer nos pacientes com megaesôfago é variável e o tipo histológico mais frequente é o carcinoma espinocelular. Nos pacientes com megaesôfago o tumor pode se localizar em qualquer porção do órgão e as características clínicas dos pacientes com megaesôfago e câncer não diferem daqueles com neoplasia maligna esofágica não associada ao megaesôfago, principalmente no que se refere ao prognóstico desfavorável frente ao tratamento instituído (HENRY; LERCO; OLIVEIRA., 2007).

Também foi demonstrado que a DC pode induzir alterações nos tecidos da cavidade oral, tal como na língua (de LIMA PEREIRA et al., 2009). Possivelmente, o *T. cruzi* possa ter um papel na destruição das células da língua, resultando em fibrose local, através de um mecanismo de reparação semelhante à descrita no coração de pacientes chagásicos crônicos (de LIMA PEREIRA et al., 2007).

1.1.5.4 Forma Mista

A forma mista, também denominada cardiodigestiva, é uma combinação de doença na forma cardíaca com o megaesôfago, com o megacólon, ou com ambos. Na maioria dos casos, o desenvolvimento de megaesôfago normalmente precede a doença cardíaca, mas ainda não é conhecida a prevalência exata da forma mista (RASSI JUNIOR; RASSI; REZENDE, 2012).

Em um estudo realizado em idosos, os autores observaram que a forma clínica predominante entre os idosos foi a forma cardíaca, seguida pela forma mista. Na forma mista houve maior incidência de megaesôfago que de megacólon (ALVES et al., 2009). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Almeida et al. (2007), onde os autores verificaram a forma cardíaca da DC em 88,5% dos pacientes chagásicos.

1.2 HIV / AIDS

A descoberta do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ocorreu há pouco mais de trinta anos, porém, o número de indivíduos contaminados e doentes tem aumentado consideravelmente nesse curto período de tempo (CANINI et al., 2004).

Desde seu surgimento, nos anos 80, a AIDS se disseminou pelo mundo tornando-se um dos maiores desafios de saúde pública das três últimas décadas. A OMS estima que, no mundo, aproximadamente 33,2 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus HIV ou apresentam a doença (CHRISTO, 2010).

Desde o início da epidemia, em 1980, até junho de 2012, o Brasil registrou 656.701 casos de AIDS, de acordo com o último Boletim Epidemiológico (BRASIL, 2012). Em 2011 foram notificados 38.776 casos da doença e a taxa de incidência de AIDS no Brasil foi de 20,2 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2012).

O HIV é um retrovírus que causa disfunção imunológica crônica e progressiva devido ao declínio dos níveis de linfócitos T CD4⁺ (CANINI et al., 2004). O HIV invade o núcleo das células T CD4⁺, que são as principais células envolvidas na proteção contra infecções, causando depleção progressiva dessas células (KRAUSE; MAHAN, 2005). Sendo assim, quanto mais baixo o nível dessas células, maior o risco do indivíduo de desenvolver AIDS (KRAUSE; MAHAN, 2005).

As principais formas de transmissão do HIV são por via sexual, por transmissão vertical (transmissão em que a mãe passa para o filho durante a gestação, parto ou aleitamento materno) e por via sanguínea. Outra forma de transmissão menos frequente é a transmissão causada por acidentes com instrumentos perfurocortantes infectados com sangue de portadores do vírus (SEBEN et al., 2008).

O período entre a contaminação do HIV e a manifestação da AIDS pode levar alguns anos. Apesar do indivíduo portador do vírus estar muitas vezes assintomático pode apresentar importantes transtornos na esfera psicossocial, a partir do momento em que fica ciente do diagnóstico (CANINI et al., 2004). Desde o momento da infecção até o surgimento de algum sintoma podem transcorrer meses ou anos, sendo esse intervalo difícil de definir (CARVALHO et al., 2007).

A infecção pelo vírus HIV se divide em quatro fases clínicas. A primeira é a fase de infecção aguda caracterizada pela carga viral elevada. Essa fase é seguida pela fase assintomática onde existe pouco ou nenhum sinal clínico, sendo marcada por forte interação entre as células de defesa e as constantes e rápidas mutações do vírus. Nesta fase não existe debilitação do organismo o suficiente para permitir novas doenças, pois os vírus amadurecem e morrem de forma equilibrada. A terceira fase é a fase sintomática inicial onde o portador pode apresentar sinais e sintomas de intensidade variável, além de processos oportunistas de menor gravidade, tais como sudorese, fadiga e emagrecimento. Por último, a AIDS onde se instalam doenças oportunistas, geralmente de origem infecciosa, decorrentes da queda da imunidade do indivíduo (PAULA et al., 2010).

O surgimento dos antirretrovirais, para o tratamento dos indivíduos com HIV/AIDS (terapia antirretroviral de alta potência - HAART), proporciona aumento no tempo de sobrevivência, porém, é de alto custo e acarreta inúmeros efeitos colaterais aos pacientes. A inexistência de cura para a doença tem direcionado investigações sobre o impacto dessa terapêutica na qualidade de vida destes pacientes (CANINI et al., 2004). Pesquisas evidenciam que o uso prolongado da HAART, particularmente dos inibidores de protease, tem um impacto importante sobre o estado nutricional dos usuários. Antes da chamada “Era HAART”, a perda de peso e a desnutrição, fortes consequências das infecções oportunistas, eram a causa dos maiores problemas nutricionais (JAIME et al., 2004).

Em pacientes com AIDS podem ser observadas diversas alterações no sistema digestório. Estudo retrospectivo avaliando necropsias de indivíduos com HIV positivo demonstrou a frequência do comprometimento do sistema digestório, sendo: língua (48,6%), esôfago (44,8%), estômago (44,7%), intestino grosso (43,2%) e intestino delgado (28,9%) (GUIMARAES et al., 2012).

O trato gastrointestinal possui grande importância durante as infecções pelo HIV, pois abriga aproximadamente 40% de todos os linfócitos no corpo. Cerca de 60

- 80% destas células no trato gastrointestinal são esgotadas em poucos dias após a infecção. Esta perda precoce dos linfócitos T CD4⁺ compromete a capacidade do hospedeiro de gerar respostas imunes secundárias diante dos patógenos e acredita-se que elas desempenham um papel fundamental na progressão da doença (NIGAM et al., 2011).

1.3 REATIVAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NA COINFECÇÃO PELO HIV

Com o surgimento da infecção pelo HIV e o desenvolvimento da AIDS, passou a ser descrita a coinfeção desse vírus com o *T. cruzi*. Os pacientes imunodeprimidos graves, como os portadores de neoplasias hematológicas, usuários de drogas imunodepressoras, ou ainda os pacientes coinfectedados pelo HIV, podem apresentar reativação da DC (OLIVEIRA et al., 2010).

O sistema imunitário de pacientes com imunodeficiência grave pode ser incapaz de manter o controle na multiplicação do *T. cruzi*, ocorrendo danos teciduais e manifestações clínicas graves. No entanto, quando a imunodeficiência é mais discreta pode haver o controle desse processo resultando em níveis mais baixos do parasitismo e conseqüentemente, menor chance do ressurgimento da doença (SARTORI et al., 2002).

No Brasil a reativação da DC em pacientes coinfectedados pelo HIV foi considerada como uma condição da AIDS em 2003. Posteriormente, em 2006, foi implantada a Rede Brasileira de Atenção e Estudos em Coinfeção por *T. cruzi* e HIV, embora o primeiro caso da associação das duas doenças tenha sido relatado na década de 1980 (ALMEIDA et al., 2011). Devido ao movimento migratório das áreas rurais pobres para as grandes cidades ocorreu aumento da possibilidade dos indivíduos contaminados com a DC se infectarem com o HIV (ALMEIDA et al., 2009; PINAZO et al., 2013).

A reativação da DC é uma condição rara, tendo sido publicados aproximadamente 120 casos de reativação da DC em pacientes com AIDS. Os casos registrados não ocorreram apenas no Brasil, mas também em outros países da América Latina. Dos 120 pacientes citados acima, cerca de 80% desenvolveram quadro de meningoencefalite, com necrose e hemorragia, cujo exame histológico,

quando realizado, demonstrava grande quantidade de parasitas. Clinicamente, os doentes apresentavam cefaléia, febre, vômitos e distúrbios neurológicos, por vezes evoluindo para o coma (FERREIRA, 2009).

1.3.1 Diagnóstico da reativação da doença de Chagas

Embora não se conheça a real prevalência da coinfeção entre o HIV e o *T. cruzi* e a frequência da reativação da DC (ALMEIDA et al., 2011), estima-se que a reativação da DC ocorra em cerca de 20% dos indivíduos coinfectados com HIV/*T. cruzi* sendo caracterizada pelo elevado nível da parasitemia. Em pacientes infectados pelo parasita *T. cruzi* e coinfectados pelo HIV, observam-se níveis mais elevados da parasitemia do que naqueles que apresentam somente a DC. Semelhantes à infecção aguda o diagnóstico da DC pode ser realizado por técnicas parasitológicas e/ou PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), mesmo na ausência de sintomas clínicos (FREITAS et al., 2011; PINAZO et al., 2013). No entanto, o sinal definitivo da reativação da DC é a visualização de tripomastigotas na circulação periférica ou no sistema nervoso central (SNC) dos pacientes (BERN, 2012). A presença de tripomastigotas no fluido cérebro-espinhal fornece o diagnóstico definitivo para a reativação da DC no SNC. Resultados de análises no fluido cérebro-espinhal geralmente demonstram uma baixa contagem de leucócitos (menor que 100 por ml), linfocitose predominantemente moderada, proteínas elevadas e baixa glicemia (BERN, 2012).

Esse diagnóstico não é usualmente realizado na fase inicial da reativação, uma vez que muitos pacientes evoluem para o óbito pouco tempo depois da realização do diagnóstico ou mesmo durante o tratamento. Sabe-se que as taxas de mortalidade são mais elevadas em pacientes com diagnóstico tardio de reativação (FREITAS et al., 2011), portanto é necessário que os métodos para o monitoramento da parasitemia em pacientes com DC e imunodeprimidos sejam rápidos e precisos. O xenodiagnóstico e a hemocultura são altamente sensíveis para o diagnóstico da doença aguda, mas são métodos demorados e os resultados levam entre 30 e 120 dias para serem concluídos (FREITAS et al., 2011) e não devem ser interpretados como confirmatórios do diagnóstico de reativação, pois o resultado pode ser positivo

em qualquer fase da doença. Por outro lado, testes parasitológicos negativos não excluem a possibilidade de reativação da doença (OLIVEIRA et al., 2010).

Recentemente, a técnica da PCR, capaz de detectar o DNA do protozoário, trouxe importantes contribuições para o diagnóstico precoce pela detecção de reativação parasitária e controle da efetividade do tratamento. Apresenta alta sensibilidade (96%-100%) comparada à hemocultura e ao xenodiagnóstico. Todavia, a técnica não está rotineiramente incorporada à prática clínica (OLIVEIRA et al., 2010).

Um dos critérios clínicos da reativação é a ocorrência da infecção em locais do organismo onde, geralmente não ocorrem com frequência na fase crônica da doença. Podemos exemplificar o SNC, onde ocorre uma das principais expressões da reativação da DC na coinfeção com o HIV (ALMEIDA et al., 2009). Em regiões alvo de lesões da DC crônica, tais como o miocárdio, esôfago e cólon, o diagnóstico da reativação é mais difícil, pois são comuns sinais e sintomas nessas regiões devido à evolução natural da DC (ALMEIDA et al., 2009).

1.3.2 Sinais e sintomas da reativação da doença de Chagas na AIDS

Os sinais e sintomas mais comuns na reativação da DC na AIDS são o surgimento de nódulos subcutâneos (chagomas), paniculite, miocardite com sinais de insuficiência cardíaca, febre, meningite, encefalite e acidente vascular cerebral. No entanto outros sintomas, tais como fadiga, anorexia e diarreia, também podem ser observados (PINAZO et al., 2013).

1.3.3 Tratamento da reativação da doença de Chagas na AIDS

Existem diversos estudos que foram realizados visando o tratamento para pacientes imunodeprimidos e com DC, porém não há consenso internacional sobre como deve ser o tratamento da reativação nestes pacientes (VAIDIAN; WEISS; TANOWITZ, 2004).

Atualmente, existem apenas dois medicamentos específicos para o tratamento da DC, sendo eles o Benzonidazol e o Nifurtimox, que agem de forma

tripanocida contra todas as formas de *T. cruzi*. O tratamento é recomendado durante todas as fases, bem como em indivíduos com AIDS, os transplantados de órgãos ou recebendo drogas imunossupressoras (FUENTES; MATURANA; DE LA CRUZ, 2011).

O tratamento com Benzonidazol tem mostrado ser efetivo na redução da parasitemia, na estabilização do quadro clínico e no controle do dano tecidual resultante da presença do parasita. Embora o tratamento com benzonidazol não esteja formalmente incorporado nos protocolos de gestão de HIV/AIDS (PINAZO et al., 2013), quando é iniciado com mais de 30 dias da coinfeção, a taxa de mortalidade dos pacientes é de 80%. No entanto, quando o tratamento é iniciado antes de completarem 30 dias da coinfeção a taxa de mortalidade é de cerca de 20%. Isso indica que quanto mais cedo for o diagnóstico e o início do tratamento, maior a sobrevivência do paciente (FREITAS, et al., 2011). No entanto, sabe-se que essa medicação pode provocar efeitos adversos, além de não ser 100% eficaz na destruição do parasita (PINAZO et al., 2013).

Por outro lado, a introdução da terapia antirretroviral contribuiu para a diminuição considerável dos casos de reativação da DC, confirmando a teoria de que, semelhante a outras infecções oportunistas, a elevação do número de células T CD4⁺ nesses indivíduos previne o aparecimento de reativação de infecções, como por exemplo, pelo *T. cruzi* (FERREIRA, 2009).

1.3.4 Órgãos alvos da reativação da doença de Chagas na AIDS

Em pacientes infectados concomitantemente pelo *T. cruzi* e pelo HIV, o envolvimento do SNC tem sido relatado entre 75-80% dos pacientes (PINAZO et al., 2013). A meningoencefalite e a miocardite podem ocorrer simultaneamente na reativação da DC, embora alguns estudos descrevam a presença da miocardite sem o acometimento do SNC. As manifestações da reativação no SNC são mais fáceis de ser observadas, enquanto as manifestações cardíacas podem passar despercebidas ou serem semelhante às manifestações da progressão natural da cardiomiopatia chagásica crônica (BERN, 2012).

Na reativação da DC, o encéfalo mostra-se aumentado de peso e volume e com estreitamento dos sulcos. Aos cortes, observam-se áreas pseudotumorais

extensas, amolecidas e com áreas hemorrágicas de limites imprecisos. Tais lesões têm sido verificadas nos diferentes lobos dos hemisférios cerebrais e, com menor frequência, no tronco cerebral e no cerebelo. As lesões atingem a substância branca e a cinzenta, parecendo predominar na primeira. Microscopicamente, especialmente nas áreas amolecidas, tem-se constatado encefalite associada ao parasitismo pelo *T. cruzi*, de grau variável. A inflamação é composta por exsudato perivascular e parenquimatoso de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e, em menor grau, de neutrófilos. Existem também nódulos microgliais na substância branca e na cinzenta, gliose astrocítica multifocal, necrose vascular e parenquimatosa, focos de hemorragia recente e antiga, edema e amastigotas do *T. cruzi* em células gliais, em macrófagos livres (LAZO et al., 1998) e em neurônios (PINAZO et al., 2013). Além disso, já foi demonstrada meningite discreta ou moderada, com exsudato mononuclear e neutrofílico, associada à encefalite (LAZO et al., 1998).

O acometimento cardíaco é a segunda manifestação mais comum encontrada em pacientes com reativação da DC, ocorrendo entre 25% e 44% dos casos. Os pacientes podem apresentar arritmias, derrame no pericárdio, descompensação cardíaca aguda ou progressão acelerada da doença cardíaca crônica já existente (BERN, 2012). A manifestação cardíaca mais observada é a miocardite (BERN, 2012; FREITAS, et al., 2011). Estudos de necropsia sugerem que grande parte dos pacientes com DC e HIV/AIDS tem doença cardíaca clinicamente silenciosa, apesar de terem focos inflamatórios associados cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi* (PINAZO et al., 2013).

Microscopicamente, o coração apresenta infiltração focal ou difusa por leucócitos mononucleados, necrose focal de cardiomiócitos e ninhos de amastigotas de *T. cruzi* em miofibrilas. Em alguns casos podem ser observados neutrófilos e eosinófilos. A inflamação também pode atingir o epicárdio e o endocárdio (FREITAS, et al., 2011).

Relatos isolados de reativação em outros órgãos, tais como no trato gastrointestinal também foram observadas, no entanto em menor frequência (PINAZO et al., 2013). Lesões na pele, eritema nodoso ou invasão parasitária no peritônio, estômago ou intestino são manifestações menos comumente observadas na reativação da DC na AIDS (FREITAS, et al., 2011; BERN, 2012).

1.4 Mastócito, IL17 e CD31 na AIDS e na doença de Chagas

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo, originadas de células mesenquimatosas com grânulos citoplasmáticos contendo proteínas (de LIMA PEREIRA et al., 2009). Eles estão envolvidos em uma grande variedade de funções biológicas e existe uma relação direta de causa e efeito entre a ativação de mastócitos e o início da ativação e proliferação de fibroblastos. Além disso, os mastócitos podem participar diretamente no processo fibrótico através de sua capacidade de produzir glicoproteínas da matriz extracelular (PINHEIRO et al., 2003).

Pacientes portadores da forma digestiva apresentam uma série de sintomas relacionados à obstrução do órgão, sendo a disfagia e constipação crônica os principais sintomas relacionados com megaesôfago e megacolon, respectivamente (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009). Sendo um dos fatores que contribui para a patogênese dos megas em pacientes portadores de DC, a fibrose encontrada no esôfago e no cólon, apresenta correlação significativa com a presença de infiltrado de mastócitos (PINHEIRO et al., 2003).

Na AIDS, o vírus HIV e suas proteínas virais contribuem para a persistência da inflamação e conseqüentemente a ativação imunitária, sendo um estímulo para a deposição de colágeno (MALUF; BARROS; MACHADO FILHO, 2009) com distorção da matriz extracelular, que se torna mais espessa e às vezes colabada (PAIVA et al., 1996).

Com base na capacidade das células T CD4⁺ produzirem diferentes tipos de citocinas que ativam os dois perfis da resposta imunológica determina o perfil celular Th1 ou Th2. O conjunto de células Th1 que inicia uma resposta imunitária celular, expressa principalmente IL2, IFN- γ , TNF- α , e β -quimiocinas e estão associadas a respostas contra patógenos intracelulares. O conjunto de células Th2 que inicia uma resposta imune humoral expressa a IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13 e é capaz de proporcionar proteção contra patógenos extracelulares, tais como bactérias e parasitas. Estas citocinas, principalmente a IL4, promovem a ativação de células B e a produção de anticorpos (REUTER; POMBO; BETTS, 2012).

Células Th17, um novo subconjunto funcional de linfócitos T CD4⁺ é uma linhagem distinta de células Th1 e Th2. As células Th17 são caracterizadas pela produção de interleucina 17 (IL17) e desempenham um papel importante na

resposta inflamatória através da expressão e liberação de citocinas inflamatórias e recrutamento de neutrófilos (ELHED; UNUTMAZ, 2010) e contribuem diretamente para a manutenção da integridade da superfície das mucosas (REUTER et al., 2012).

A relação entre as células Th17 e a patogênese do HIV não está totalmente conhecida (SALGADO et al., 2011). As citocinas produzidas durante a infecção pelo HIV contribuem para a ativação da resposta imune na infecção pelo HIV, com grandes efeitos sobre os linfócitos na circulação e em vários tecidos que possuem células infectadas pelo HIV (REUTER; POMBO; BETTS, 2012).

A fase aguda da infecção pelo HIV é um período de expressiva ativação imune e perda rápida de células T CD4+ nos tecidos, tais como no trato gastrointestinal, porém o tratamento precoce com a terapia antirretroviral pode reverter estes efeitos (KANWAR; FAVRE; McCUNE, 2010).

Em um estudo foi demonstrada a associação entre os níveis de células Th17 tanto na progressão da AIDS quanto na replicação do HIV, onde a diminuição dessas células ocasionou a deficiência no controle da replicação viral e consequente desenvolvimento da AIDS (SALGADO et al., 2011).

Infecções crônicas por HIV estão diretamente associadas ao sistema digestório, prejudicando a permeabilidade e translocação microbiana. A IL17 desempenha um papel crítico na regulação da permeabilidade do epitélio intestinal e controle de infecções por fungos e bactérias, além do aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias que podem facilitar o surgimento de danos no tecido da mucosa (NIGAM et al., 2011). A grave perda de células Th17 no início da infecção pelo HIV pode ser uma causa significativa das alterações na mucosa diante da resposta imune aos agentes patógenos (DANDEKAR; GEORGE; BAUMLER, 2010).

No entanto, pouco se sabe sobre a modulação das células Th17 durante as infecções crônicas pelo HIV e não há informações disponíveis sobre o estado dessas células no tecido do colo retal, um dos principais locais de replicação do HIV (NIGAM et al., 2011) além de existirem poucos estudos em necropsias avaliando especificamente alterações gastrointestinais associadas à AIDS no Brasil. Portanto o melhor conhecimento das alterações gastrointestinais associadas ao HIV e à AIDS poderá auxiliar nas condutas preventivas e terapêuticas (GUIMARAES et al., 2012).

Na doença de Chagas, estudos têm demonstrado que a inflamação cardíaca observada nos pacientes com DC na forma cardíaca está associada com a presença de células T CD8⁺ e citocinas inflamatórias. As respostas de IL17 têm sido associados à patogênese de diversas doenças inflamatórias e doenças autoimunes, embora estudos na infecção por *T. cruzi* experimental sugerem que esta citocina está associada à proteção contra a infecção (MAGALHÃES et al., 2013). Foi realizado um estudo para avaliar a expressão de IL17 por células T de pacientes com a forma indeterminada e cardíaca da DC e investigar se existe correlação entre a expressão de IL17 e função cardíaca. Pacientes chagásicos cardíacos tiveram menor frequência e intensidade da expressão de IL17, em comparação aos indivíduos não chagásicos e chagásicos na forma indeterminada (MAGALHÃES et al., 2013).

Durante a evolução da inflamação existe neoformação vascular, formando vasos a partir de vasos preexistentes. É uma característica essencial dos processos patológicos e fisiológicos, tais como desenvolvimento dos tecidos de granulação, reparação tecidual e cicatrização de feridas (YAMANAKA et al., 2012). Durante o quadro inflamatório existe expressão de moléculas de adesão, dentre elas a molécula CD31, presente na membrana das células endoteliais, sendo importante no recrutamento de leucócitos circulantes para o local infectado. Sendo assim, a expressão de CD31 nas células endoteliais pode ser utilizada para determinar a densidade de vasos sanguíneos e angiogênese (YAMANAKA et al., 2012).

Tendo em vista que o número de indivíduos contaminados com HIV tem aumentado no mundo e a alta taxa de mortalidade nos pacientes coinfectados pelo *T. cruzi*, torna-se necessário o melhor entendimento das lesões teciduais na reativação da DC diante da coinfeção pelo HIV. Isso colaboraria para o diagnóstico e abordagem terapêutica precoces reduzindo a taxa de mortalidade nesses pacientes.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

No grupo com reativação da doença de Chagas esperamos encontrar: maior intensidade dos processos patológicos como inflamação, necrose, hiperemia, hemorragia e edema; maior densidade de mastócitos; maior densidade de células imunomarcadas por anti-IL17; maior densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 e maior porcentagem de colágeno no miocárdio, no esôfago, no intestino grosso e no cérebro.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar avaliação histopatológica e imuno-histoquímica do cérebro, do miocárdio, do esôfago e do intestino grosso de indivíduos necropsiados com doença de Chagas e/ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida comparando com indivíduos controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Ao analisar os cortes histológicos do cérebro, do miocárdio, do esôfago e do intestino grosso dos indivíduos pertencentes aos grupos com AIDS e com reativação da doença de Chagas (RE); com doença de Chagas crônica (CH); com AIDS e sem doença de Chagas (AI); e indivíduos controle (CO), tivemos como objetivos específicos:

- Identificar processos patológicos como inflamação, necrose, hiperemia, hemorragia e edema no cérebro, no miocárdio e na camada muscular do esôfago e do intestino grosso;
- Determinar a porcentagem de colágeno no miocárdio e na camada muscular do esôfago e do intestino grosso;
- Determinar a densidade de mastócitos no cérebro, no miocárdio e na camada muscular do esôfago e do intestino grosso;
- Determinar a densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 no cérebro, no miocárdio e na camada muscular do esôfago e do intestino grosso;
- Determinar a densidade de vasos imunomarcadas por anti-CD31 no cérebro, no miocárdio e na camada muscular do esôfago e do intestino grosso;
- Correlacionar a densidade de mastócitos e densidade de células imunomarcadas com anti-IL17 com a porcentagem de colágeno no miocárdio e na camada muscular do esôfago e do intestino grosso.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP/UFTM), Uberaba/MG, Brasil, sob o protocolo número 2635.

Foi realizado um levantamento retrospectivo de 326 laudos de necropsias completas realizadas através da disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba, Minas Gerais, Brasil, no período entre 1998 e 2012.

4.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Durante a avaliação dos laudos, foram selecionados indivíduos que apresentavam AIDS com reativação da doença de Chagas (RE) (n=2), indivíduos chagásicos crônicos sem AIDS (CH) (n=2), indivíduos com AIDS e sem doença de Chagas (AI) (n=2) e indivíduos sem doença de Chagas e sem AIDS (CO) (n=2).

Os indivíduos foram classificados em brancos e não brancos, de acordo com a cor da pele descrita no laudo de necropsia. Foram considerados não brancos os indivíduos registrados, por exemplo, como negros, morenos, pardos ou mulatos. Foram considerados chagásicos, os indivíduos que apresentarem pelo menos uma reação sorológica positiva para *T. cruzi*.

Foram incluídos no grupo experimental (RE) estudo todos os indivíduos com reativação da doença de Chagas na AIDS. Os critérios de exclusão para os demais grupos foram: a) casos em que não foram encontrados fragmentos ou peças anatômicas dos órgãos a serem analisados: cérebro, miocárdio, esôfago e intestino grosso; b) casos onde não foram encontrados os prontuários clínicos; c) indivíduos menores de 18 anos.

Dos indivíduos do grupo CH, um apresentava a forma digestiva (megaesôfago) e um apresentava a forma mista (megaesôfago, megacólon e cardiomiopatia). Dos indivíduos do grupo RE, um deles apresentava a forma digestiva (megacólon) e outro a forma indeterminada.

4.3 COLETA DOS FRAGMENTOS

Dos casos selecionados, foram obtidos fragmentos do miocárdio, do cérebro, do esôfago e do intestino grosso medindo aproximadamente 1x1x1cm. Foram selecionados fragmentos referentes a esses órgãos, uma vez que são os órgãos que, apresentam com maior frequência, alterações diante da infecção pelo *T. cruzi* e na reativação da DC pelo HIV (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009; STRASEN et al., 2014). Os fragmentos foram retirados das seguintes regiões: a) coração: no terço médio do miocárdio do ventrículo esquerdo; b) cérebro: na porção frontal, na porção temporal e na porção occipital do lado esquerdo; c) intestino grosso: na região retro-sigmóide; d) esôfago: na porção posterior. No intestino grosso e esôfago foram obtidos fragmentos transversais abrangendo, mucosa, submucosa e camada muscular. Esses fragmentos que já estavam fixados em formol foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Cortes sagitais seriados de seis micrômetros foram montados em lâmina histológica e corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) para análise de inflamação, pelo Picrossírius para quantificação da porcentagem colágeno e pelo Giemsa para determinação da densidade de mastócitos.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE PROCESSOS PATOLÓGICOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS

As lâminas coradas com HE foram utilizadas para identificar processos patológicos como inflamação, necrose, hiperemia, hemorragia e edema. Em cada caso foram analisados todos os campos dos fragmentos do miocárdio, do cérebro, do esôfago e do intestino grosso utilizando microscópio de luz (BIOVAL, Valência, Espanha) e objetiva de 40x. Os processos patológicos foram classificados em discretos, moderados ou acentuados.

4.5 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE MASTÓCITOS

Para a determinação da densidade dos mastócitos foi realizada a quantificação dessas células no cérebro, no miocárdio, na musculatura do esôfago e na musculatura

do intestino grosso. Foi realizada a quantificação dos mastócitos em todos os campos. A área de cada campo foi calculada com o auxílio de uma ocular micrometrada, e a densidade de mastócitos, expressa em número de mastócitos por mm^2 .

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO

Para a determinação da porcentagem de colágeno foi utilizado um sistema de análise de imagem, constituído por um microscópio (Zeiss, Berlim, Alemanha), com câmera de captura de imagem AxioCam (Zeiss, Berlim, Alemanha) e um computador com o *software* Axiovision (KontronElektronik, Berlim, Alemanha). Para a avaliação morfológica do colágeno, as lâminas coradas pelo Picrossírius foram polarizadas com filtro de luz. A imagem final foi aumentada 1.600x, com a imagem exibida no monitor do computador. Foram avaliados todos os campos do miocárdio, da musculatura do esôfago e da musculatura do intestino grosso. A quantidade de colágeno foi expressa em porcentagem de colágeno por área em μm^2 .

4.7 REALIZAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA IL17 E CD31

Os cortes histológicos destinados para a reação imuno-histoquímica foram montados em lâminas pré-tratadas com *3-aminopropyltriethoxy-silane* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e utilizados para a análise de IL17 e de CD31.

Para as reações imuno-histoquímicas, após desparafinização e reidratação, os cortes histológicos foram lavados com PBS 0,01 M, pH 7,2, durante cinco minutos à temperatura ambiente. A etapa seguinte foi a recuperação antigênica com calor úmido. As lâminas foram encubadas com PBS e ácido cítrico durante 30 minutos. Para o bloqueio de ligações inespecíficas foi utilizado o PBS-BSA (*Bovine Serum Albumin*) 2% durante 30 minutos, a temperatura ambiente.

Os anticorpos foram diluídos em BSA nas seguintes concentrações: IL17(R&D, Minnesota, EUA) (1:30) e CD31 (R&D, Minnesota, EUA) (1:50). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído por 18 horas (*overnight*) a 4°C.

No dia seguinte, os cortes foram lavados duas vezes, com PBS e Tween20, 0,05% e tratados com metanol e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% durante 15

minutos para bloquear a peroxidase endógena dos tecidos. Para a detecção dos anticorpos foi utilizada a técnica de Avidina-Biotina conjugada com peroxidase utilizando-se o Kit Lsab-plus (DAKO, Carpinteria, EUA). Os cortes foram incubados por 30 minutos com o link vermelho e posteriormente por 30 minutos com o link amarelo, à temperatura ambiente.

A reação imuno-histoquímica de cada anticorpo foi visualizada utilizando solução cromógena de diaminobenzidina – DAB (Sigma Chemical CO, Missouri, USA) e H₂O₂, a qual foi aplicada e incubada durante sete minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada, contracolorados com hematoxilina de Harris e as lâminas montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Os controles negativos foram obtidos por omissão dos anticorpos primários. Como controle positivo foram utilizados cortes histológicos de granuloma periapical.

4.8 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POR ANTI-IL17 E DE VASOS IMUNOMARCADOS POR ANTI- CD31

As lâminas imunomarcadas com anti-CD31 foram utilizadas para determinar a densidade de vasos sanguíneos e as lâminas imunomarcadas com anti-IL17 foram utilizadas para determinar a densidade de células imunomarcadas por esse anticorpo. A determinação da densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 e de células imunomarcadas por anti-IL17 foi realizada no cérebro, no miocárdio, na musculatura do esôfago e na musculatura do intestino grosso. A determinação da densidade de células imunomarcadas com anti-IL17 foi realizada também na região cortical e medular do cérebro.

Para a quantificação dos vasos sanguíneos e das células imunomarcadas por anti-IL17, foi utilizado um microscópio de luz comum (Nova Optical Systems, Utah, USA), com objetiva de 40x e um sistema de análise de imagem com câmera de captura AxioCam (Zeiss, Berlim, Alemanha) e um computador com o *software* Axiovision (KontronEletronik, Berlim, Alemanha). O número de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 e de células imunomarcadas para anti-IL17 foi determinado em cada campo. Para a determinação da área de cada campo a imagem foi projetada na tela do monitor, sendo a área determinada automaticamente. Com a área de cada campo e o

número total de campos, foi possível calcular a densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 e de células imunomarcadas por anti-IL17 sendo expressa em número de vasos ou de células por milímetros quadrados.

Para as análises dos processos patológicos, da densidade de mastócitos, da porcentagem de colágeno, da densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 e da densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 no cérebro, no miocárdio, na camada muscular do esôfago e do intestino grosso, foram analisados entre 100 e 300 campos em cada corte histológico.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism 5* (GraphPad, San Diego, California, USA), e o teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para a avaliação da normalidade. A comparação entre os quatro grupos com distribuição não-normal foi realizada através do teste *Kruskal-Wallis*. Para variáveis qualitativas (masculino/feminino; branco/não branco) foi utilizado o teste exato de *Fisher*. Para as correlações foi utilizado o *software* BioEstat 5.0 (Sociedade Civil Mimirauá, CNPq, Brasil) e realizado o teste de Spearman. O nível de significância assumido foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à idade, ao gênero e à etnia entre os indivíduos dos quatro grupos, demonstrando distribuição homogênea (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição da idade, do gênero e da etnia de indivíduos dos grupos RE, CO, AI e CH.

| | Grupos | | | |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | RE (n = 2) | CO (n = 2) | AI (n = 2) | CH (n = 2) |
| Idade (anos) ^a X±S | 50,0 ± 15,6 | 51,0 ± 24,0 | 31,0 ± 11,3 | 65,0 ± 12,7 |
| Gênero ^b M:F | 1:1 | 1:1 | 1:1 | 1:1 |
| Etnia ^c B:NB | 2:0 | 1:1 | 2:0 | 2:0 |

Legenda: X: média; S: desvio padrão; M: masculino; F: feminino; B: branco; NB: não-branco; RE: AIDS com reativação da doença de Chagas; CH: doença de Chagas crônica; AI: AIDS sem doença de Chagas; CO: controle.

^a Teste Kruskal-Wallis, K = 3,08; p = 0,38;

^b Teste Exato de Fisher, P = 1,0; p > 0,05;

^c Teste Exato de Fisher, P = 1,0; p > 0,05.

No miocárdio a densidade de mastócitos foi significativamente maior no grupo CH quando comparado aos demais grupos. Ao analisarmos o esôfago e o intestino grosso, observamos densidade significativamente maior de mastócitos no grupo RE quando comparado aos demais grupos (Figura 1B;Tabela 2).

A porcentagem de colágeno foi significativamente maior no grupo CH quando comparado aos demais grupos, tanto no miocárdio como no intestino grosso. No esôfago, a porcentagem de colágeno foi significativamente maior no grupo CO quando comparado aos demais grupos. A porcentagem de colágeno foi significativamente menor no grupo RE quando comparado ao grupo CO, tanto no esôfago, como no miocárdio e no intestino grosso (Figura 1C;Tabela 2).

Não houve correlação significativa entre a densidade de mastócitos e a densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 com a porcentagem de colágeno nos grupos RE, CO, AI e CH (dados não demonstrados).

Ao analisarmos a densidade de células imunomarcadas por anti-IL17, encontramos densidade significativamente maior no intestino grosso e no miocárdio

dos indivíduos do grupo CH quando comparados aos demais grupos. No esôfago, a densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 foi significativamente maior no grupo AI quando comparado aos demais grupos (Tabela 2).

Houve maior densidade de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 no cérebro, no miocárdio e no esôfago do grupo AI quando comparado aos demais grupos, embora sem diferença significativa. No intestino grosso, a densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 foi maior no grupo CH, porém também sem diferença significativa entre os grupos (Figura 1F; Tabela 2).

Tabela 2 – Densidade de mastócitos, porcentagem de colágeno e densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 e de vasos imunomarcados por anti-CD31 no miocárdio, na musculatura do esôfago e na musculatura do intestino grosso dos grupos RE, CO, AI e CH.

| Órgãos | Parâmetros | RE med (min-max) | CO med (min-max) | AI med (min-max) | CH med (min-max) |
|------------------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Cérebro | Mastócito | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Colágeno | - | - | - | - |
| | IL17* | 0(0-34) | 1(0-15) | 4(0-16) | 0(0-9) |
| | CD31* | 0(0-4) | 0(0-3) | 0(0-6) | 0(0-4) |
| Miocárdio | Mastócito* | 0(0-2) | 0(0-3) | 0(0-10) | 0(0-44) |
| | Colágeno* | 1,20(0,28-6,41) a | 2,04(0,36-21,46) a | 1,55(0,14-6,28) | 2,04(0,33-77,04) |
| | IL17* | 0(0-6) | 1(0-1) | 1(0-25) | 4(0-34) |
| | CD31* | 2(0-12) | 1(0-8) | 3(0-13) | 2(0-17) |
| Esôfago | Mastócito* | 0(0-7) | 0(0-12) | 0(0-2) | 0(0-3) |
| | Colágeno* | 2,33(0,34-27,82) b | 6,94(0,67-27,21) b | 2,52(0,17-42,59) | 5,33(0,47-23,45) |
| | IL17* | 0(0-3) | 0(0-8) | 7(0-17) | 2(0-11) |
| | CD31* | 2(0-9) | 2(0-8) | 2(0-12) | 2(0-15) |
| Intestino Grosso | Mastócito* | 0(0-10) | 0(0-3) | 0(0-3) | 0(0-2) |
| | Colágeno* | 0,97(0,15-5,97) c | 2,28(0,2-11,93) c | 0,92(0,18-4,88) | 4,43(0,33-10,80) |
| | IL17* | 0(0-9) | 0(0-1) | 0(0-5) | 5(0-19) |
| | CD31 | 2(0-10) | 1(0-10) | 2(0-6) | 1(0-13) |

Legenda: med(min-max): mediana com valores mínimo e máximo; RE: AIDS com reativação da doença de Chagas; CH: doença de Chagas crônica; AI: AIDS sem doença de Chagas; CO: controle.

Teste *Kruskal-Wallis*; $p < 0,0001$.

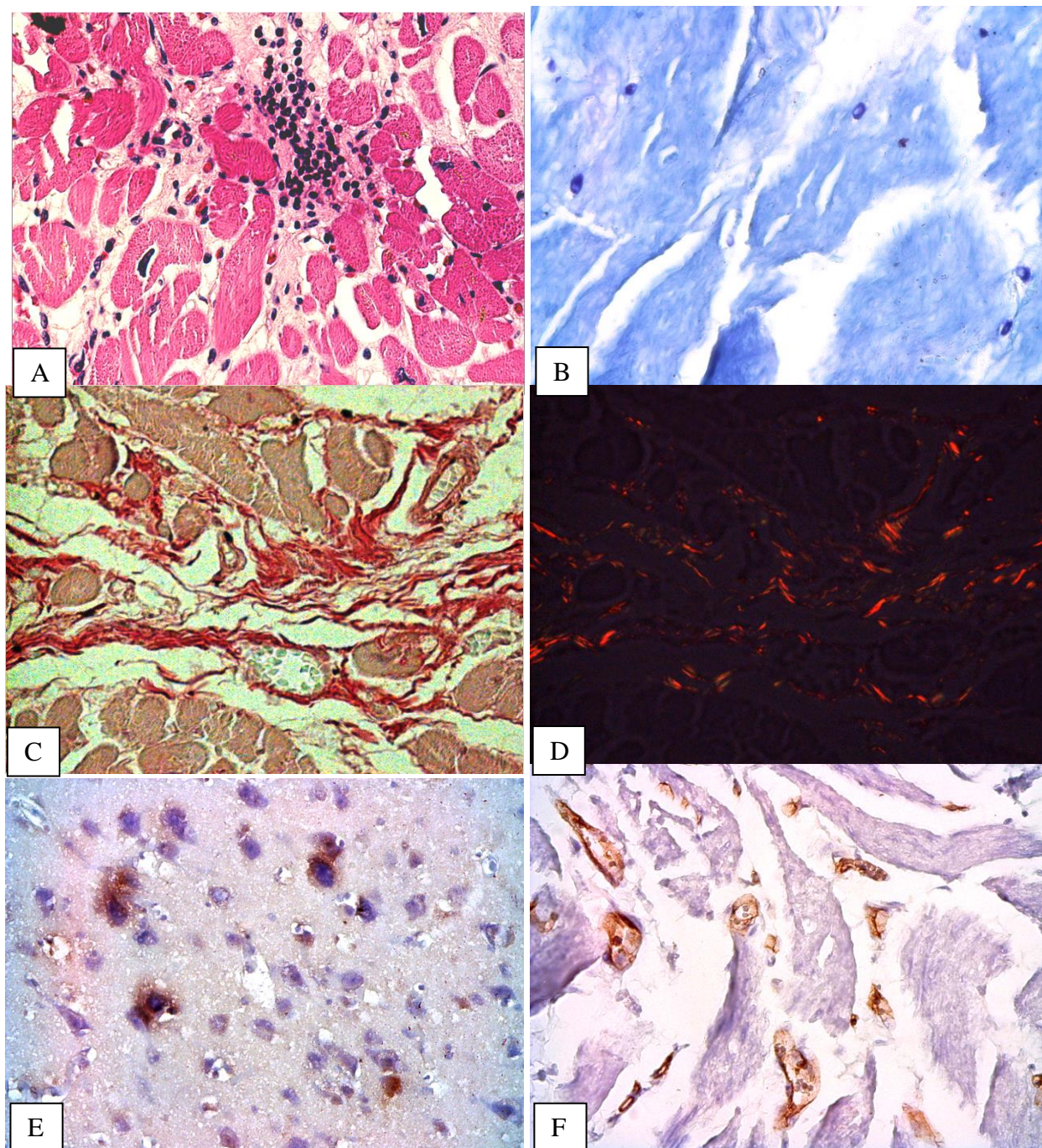
Asterisco (*) e letras semelhantes indicam diferença significativa para cada um dos parâmetros avaliados no mesmo órgão.

Os valores em negrito representam as maiores medianas encontradas.

Encontramos infiltrado inflamatório de mononucleares, necrose, hiperemia, hemorragia e edema em todos os órgãos de todos os grupos, porém sem diferença significativa entre eles (Figura 1A). Não encontramos o parasita *T. cruzi* em nenhum órgão analisado.

Não foram encontrados mastócitos no cérebro em nenhum dos grupos estudados. A densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 no cérebro foi significativamente maior no grupo RE quando comparado aos demais grupos ($p < 0,0001$) (Figura 1E).

Figura 1 - Análise histopatológica e imuno-histoquímica no miocárdio, na musculatura do esôfago e no cérebro dos grupos RE, AI e CH.



- A.** Leucócitos exsudados no miocárdio (grupo CH) (HE 50x). **B.** Mastócitos na camada muscular do esôfago (grupo RE) (Giemsa 100x) **C.** Colágeno no miocárdio (grupo CH) (Picrosirius não-polarizado 1600x) **D.** Colágeno no miocárdio (grupo CH) (Picrosirius polarizado 1600x) **E.** Células imunomarcadas por anti-IL17 no cérebro (grupo RE) (imunohistoquímica, 1600x). **F.** Vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 no esôfago (grupo AI) (imunohistoquímica, 1.600x).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os mastócitos, derivados da medula óssea e circulantes nos vasos sanguíneos e linfáticos, migram para os tecidos, como músculo e mucosas, onde assumem maturidade morfológica e funcional, influenciados pelos fatores locais (MEUSER-BATISTA et al., 2011). Uma das vias de ativação dos mastócitos é a ativação o sistema complemento, que produz vários fragmentos, dentre eles C5a que ativa os mastócitos durante a infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Assim, em processos infecciosos como na DC, a densidade dos mastócitos é proporcional à evolução do processo inflamatório (MEUSER-BATISTA et al., 2011). No presente estudo observamos densidade significativamente maior de mastócitos no miocárdio do grupo CH quando comparado aos demais grupos. Esse achado está de acordo com um estudo que demonstrou grande densidade de mastócitos no miocárdio dos chagásicos (TAFURI et al., 2011) e com um estudo prévio realizado pelo nosso grupo onde demonstramos densidade significativamente maior de mastócitos no miocárdio de pacientes chagásicos crônicos quando comparados ao grupo controle (ROLDÃO et al., 2012).

No grupo RE a densidade de mastócitos no miocárdio foi menor que no grupo CH talvez porque nenhum dos indivíduos do grupo RE apresentava a forma cardíaca da DC. No grupo CH um dos indivíduos apresentava a forma cardíaca da DC, o que justificaria maior densidade de mastócitos no miocárdio desses indivíduos. Portanto, como a densidade de mastócitos no coração de chagásicos está associada à insuficiência cardíaca (MEUSER-BATISTA et al., 2011), a maior densidade de mastócitos no miocárdio do grupo CH encontrada no presente estudo indicaria mau prognóstico da DC.

Já foi demonstrado na literatura que nos pacientes chagásicos com AIDS existe aumento da densidade de mastócitos nos tecidos perivasculares contribuindo para a instalação do quadro inflamatório (MALUF; BARROS; MACHADO FILHO, 2009). No presente estudo, houve densidade significativamente maior de mastócitos no esôfago e no intestino grosso do grupo RE quando comparado aos demais grupos. Sabe-se que nos pacientes infectados pelo parasita *T. cruzi* e coinfectedados pelo HIV, observam-se níveis mais elevados da parasitemia do que naqueles que apresentam somente a DC (PINAZO et al., 2013; FREITAS et al., 2011). Esse aumento da parasitemia estaria

contribuindo para a maior gravidade da DC nos casos de reativação quando comparada à fase de infecção inicial pelo *T. cruzi* (NIGAM et al., 2011).

Sabendo que no grupo RE um dos indivíduos apresentava megacólon e o outro a forma indeterminada da DC, e que no grupo CH os dois indivíduos apresentavam megaesôfago e um deles apresentava também megacólon, a maior densidade de mastócitos no esôfago e no intestino grosso do grupo RE indicaria envolvimento desses órgãos na fase de reativação. Esse envolvimento estaria ocorrendo mesmo sem evidências clínicas, pois nenhum dos indivíduos do grupo RE apresentava megaesôfago embora o grupo apresentasse maior densidade de mastócitos no esôfago quando comparado aos demais órgãos. Portanto, a maior da densidade de mastócitos no esôfago e intestino grosso do grupo RE, encontrada no presente estudo, sugere maior participação dos mastócitos nessas regiões no quadro de reativação quando comparada à DC crônica sem reativação.

Na DC crônica existe reação inflamatória ativa e fibrosante com deposição progressiva de fibronectina, laminina e colágeno no interstício levando à expansão e distensão da matriz extracelular (TAFURI et al., 2011). Na forma cardíaca da DC existe comprometimento do miocárdio com inflamação crônica persistente e neoformação de colágeno permeando os feixes musculares (REIS et al., 2000; GURGEL et al., 2010). Estudo prévio realizado pelo nosso grupo demonstrou maior porcentagem de colágeno no miocárdio de pacientes com DC crônica quando comparado ao grupo controle (ROLDÃO et al., 2012). Já na forma digestiva da DC crônica existe comprometimento da camada muscular do intestino com redução da densidade de fibras neuronais na musculatura, destruição do plexo mioentérico além da neoformação de colágeno (SILVEIRA et al., 2007). No que se refere à porcentagem de colágeno, esses estudos corroboram os achados do presente estudo, pois no grupo CH encontramos maior porcentagem de colágeno no miocárdio e no intestino grosso quando comparado aos demais grupos. Entretanto, no grupo CH não encontramos grande porcentagem de colágeno no esôfago, embora os dois indivíduos apresentassem megaesôfago, discordando de outros estudos que já demonstraram maior porcentagem de colágeno no esôfago de indivíduos chagásicos (VAGO et al., 1996; MADY et al., 1997).

No grupo RE a porcentagem de colágeno foi significativamente menor que o grupo CO, tanto no esôfago, como no miocárdio e no intestino grosso. Sabe-se que na fase crônica da DC dificilmente se detecta o parasita no miocárdio (REIS et al., 2000). No entanto na reativação da DC pelo HIV, o sistema imunitário pode ser incapaz de

manter o controle na multiplicação do *T. cruzi*, elevando a parasitemia (SARTORI et al., 2002) e consequente parasitismo celular (TAFURI et al., 2011). Sabendo que o *T. cruzi* é capaz de produzir grande variedade de proteases capazes de degradar proteínas da matriz extracelular (TAFURI et al., 2011), a menor porcentagem de colágeno encontrada no grupo RE poderia ser justificada pela elevada parasitemia e consequente lise do colágeno.

Embora já tenha sido descrito na literatura que indivíduos chagásicos cardíacos apresentam menor intensidade da expressão de IL17 em comparação aos indivíduos não chagásicos e chagásicos na forma indeterminada (MAGALHÃES et al., 2013), no presente estudo encontramos densidade significativamente maior de células imunomarcadas por anti-IL17 no miocárdio e no intestino grosso dos indivíduos do grupo CH quando comparados aos demais grupos. Sabendo que, no presente estudo os indivíduos do grupo CH apresentavam a forma cardíaca e a forma digestiva com megacólon e que a IL17 desempenha papel importante em numerosas respostas imunes e inflamatórias (PARK; LEE, 2010), justifica o fato de termos encontrado maior densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 nesses órgãos no grupo CH. Nesses locais essa citocina estaria regulando a expressão de vários mediadores inflamatórios que incluem citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, como já demonstrado em outro estudo (PARK; LEE, 2010), contribuindo assim, para a defesa do hospedeiro frente à infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto como no grupo RE encontramos menor densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 quando comparado ao grupo CH tanto no miocárdio, como no esôfago e no intestino grosso, levantamos a hipótese de que nos casos de reativação da DC a menor densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 nesses locais indicaria resposta imune deficiente e mau prognóstico (DANDEKAR; GEORGE; BAUMLER., 2010; MIYAZAKI et al., 2010). Além disso, como essa citocina está associada com proteção do organismo frente à infecção pelo *T. cruzi* (MIYAZAKI et al., 2010), a menor expressão de IL17 no miocárdio, no esôfago e no intestino grosso do grupo RE poderia favorecer o surgimento de doenças oportunistas, como já demonstrado em outro estudo uma vez que níveis normais de IL17 promovem a proteção (VENKETARAMAN et al., 2011).

Entretanto no cérebro a densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 foi significativamente maior no grupo RE quando comparado aos demais grupos, sugerindo intensa atividade imunitária cerebral frente à infecção pelo *T. cruzi*. Embora não tenhamos encontrado na literatura estudos de IL-17 na reativação da DC, esses

achados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que as lesões cerebrais durante a reativação da DC são as mais frequentes e as mais acentuadas (DIAS; COURA, 1997). Como outros estudos demonstram que a IL17 estaria associada à destruição tecidual (NIGAM et al., 2011), talvez no cérebro grande parte das lesões teciduais encontradas no grupo RE seja em decorrência do aumento da expressão de IL17 nesse local.

Com a progressão da AIDS e o aumento da resposta inflamatória e imune, ocorre diminuição da quantidade de linfócitos nos tecidos, além da proliferação do estroma vascular com aumento do número de vasos sanguíneos (ALÒS et al., 2005). Esses achados estão de acordo com o presente estudo, pois observamos maior densidade de vasos sanguíneos no cérebro, no miocárdio e esôfago no grupo AI quando comparado aos demais grupos. Portanto, nesses órgãos, a maior densidade de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 nos indivíduos com AIDS estaria associado ao processo inflamatório em decorrência da infecção pelo HIV. Entretanto, como no intestino grosso não houve diferença significativa entre os grupos com relação à densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31, acreditamos que nesse órgão não estaria acontecendo proliferação vascular associada a nenhum dos casos de infecção.

Durante a evolução da inflamação existe neoformação vascular, formando vasos a partir de vasos preexistentes, além da expressão de moléculas de adesão, dentre elas da molécula CD31, presente na membrana das células endoteliais (YAMANAKA et al., 2012). Embora na DC crônica exista inflamação persistente com neoformação de colágeno e de vasos sanguíneos (HENRIQUES-PONS; PINTO, 2007), não encontramos maior densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 no grupo CH e no grupo RE. Como não encontramos na literatura estudos a respeito da expressão de CD31 na DC, acreditamos que outras moléculas de adesão estariam envolvidas no processo inflamatório nessa doença, dentre elas o aumento dos níveis de *Soluble Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (s-PECAM-1) como já demonstrado em outro estudo (LAUCELLA et al., 2001).

Encontramos inflamação, necrose, hiperemia, hemorragia e edema em todos os órgãos de todos os grupos, no entanto sem diferença estatística entre os grupos. Embora não tenhamos encontrado na literatura estudos que fizeram comparação entre processos patológicos em tecidos de indivíduos com reativação da DC, existem relatos de casos isolados que já demonstraram inflamação, necrose, hemorragia e edema no

cérebro desses pacientes (LAZO et al., 1998; PINAZO et al., 2013). No presente estudo não encontramos parasitismo nos tecidos analisados embora já tenha sido descrito parasitismo em vários órgãos na DC (LOPES et al., 2000), inclusive parasitismo cerebral nos casos de reativação da DC com acometimento de neurônios, células gliais e macrófagos livres (LAZO et al., 1998; PINAZO et al., 2013).

Ao analisarmos o cérebro, observamos inflamação constituída por exsudato perivascular de mononucleares, com hiperemia, edema, hemorragia e necrose. Não foram encontrados mastócitos no cérebro em nenhum dos grupos estudados. Embora não tenhamos encontrado relato de mastócitos no cérebro de indivíduos com reativação da DC, nossos achados estão de acordo com outros estudos que demonstraram infiltrado inflamatório mononuclear, hemorragia e necrose no cérebro de indivíduos com reativação da DC (LAZO et al., 1998; DIAS; COURA, 1997). No entanto, embora não tenhamos encontrado ninhos de *T. cruzi* em nenhum órgão analisado, estudos já demonstraram infecção cerebral por esse parasita em células gliais, em macrófagos livres (DIAS; COURA, 1997; LAZO et al., 1998) e em neurônios (PINAZO et al., 2013).

Desta forma, a hipótese de que no grupo RE haveria maior densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 no cérebro, no miocárdio, na musculatura do esôfago e na musculatura do intestino grosso, foi confirmada apenas no cérebro. Além disso, a hipótese de que haveria maior densidade de mastócitos em todos os órgãos analisados do grupo RE foi confirmada apenas no esôfago e no intestino grosso. As demais hipóteses foram rejeitadas.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, as lesões cerebrais encontradas nos indivíduos com reativação da DC e a maior densidade de células imunomarcadas por anti-IL17 no cérebro sugere que essa citocina estaria intensificando o quadro inflamatório local com consequentes danos teciduais em decorrência da inflamação. Além disso, nesses indivíduos, a maior densidade de mastócitos no esôfago e no intestino sugere que essas células estariam exercendo atividade relevante no processo inflamatório esofágico e intestinal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2008. 564p.
2. ALMEIDA, Eros Antonio de et al. Clinical presentation of chronic Chagas disease in elderly individuals. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.3, Jun. 2007.
3. ALMEIDA, Eros Antonio de et al. Brazilian Network of Attention and Studies on Trypanosoma cruzi/HIV Co-infection and others immunosuppression conditions. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, n.5, p.605-608, Oct. 2009.
4. ALMEIDA, Eros Antonio de et al. Co-infection Trypanosoma cruzi/HIV: systematic review (1980-2010). **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.6, p.762-770, Nov-Dec. 2011.
5. ALÒS, Llúcia et al. Immunoarchitecture of lymphoid tissue in HIV-infection during antiretroviral therapy correlates with viral persistence. **Modern Pathology**, v.18, n.1, p.126-136, Jan. 2005.
6. ALVES, Rosalía Matera de Angelis et al. Chagas' disease and ageing: the coexistence of other chronic diseases with Chagas' disease in elderly patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, n.6, p.622-628, Nov-Dec. 2009.
7. ANDRADE, Zilton A et al. The indeterminate phase of Chagas disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n.3, p.328-336, Sep. 1997.
8. BERN, C. Chagas disease in the immunosuppressed host. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v.25, n.4, p.450-457, Aug. 2012.
9. BRASIL.Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico HIV-AIDS**. Brasília: Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde, Divisão de Doenças Sexualmente Transmissíveis e SIDA/AIDS, 2012.
10. CANINI, Silvia Rita Marim da et al. Qualidade de vida de indivíduos com HIV/AIDS: uma revisão de literatura. **Rev Latino-Am Enfermagem**, v.12, n.6, p.940-945, Nov-Dec. 2004.
11. CARVALHO, Fernanda Torres de et al. Protective factors and resilience in people living with HIV/AIDS. **Cad Saúde Pública**, v.23, n.9, Sep. 2007.
12. CHRISTO, Paulo Pereira. Cognitive alterations associated with HIV-1 infection and AIDS. **Rev Assoc Med Bras**, v.56, n.2, p.242-247, Mar-Apr. 2010.
13. COURA José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease- 100 yers after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, p.31-40, Jul. 2009.
14. COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, n.6, p.641-645, Sep. 2011.

15. COURA, José Rodrigues, BORGES-PEREIRA, José. Chagas Disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.45, n.3, p.286-296, Jun. 2012.
16. COUTINHO, Marília; DIAS, João Carlos Pinto. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.16, n.2, p.11-51, 1999.
17. DANDEKAR, Satya; GEORGE, Michael D.; BAUMLER, Andreas J. Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.5, n.2, p.173-178, Mar. 2010.
18. de LIMA PEREIRA, Sanívia Aparecida et al. Expression of cytokines and chemokines and microvasculature alterations of the tongue from patients with chronic Chagas' disease. **Parasitology Research**, v.105, n.4, p.1031-1039, Oct. 2009.
19. de LIMA PEREIRA, Sanívia Aparecida et al. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v.37, n.4, p.229-233, Apr. 2007.
20. DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p.
21. ELHED, Aimee; UNUTMAZ, Derya. Th17 cells and HIV infection. Th17 cells and HIV infection. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.5, n.2, p.146-150, Mar. 2010.
22. FERREIRA, Marcelo Simão. **Boletim de Atualização da Sociedade Brasileira de Infectologia**, ano III, n.9, p.1-2, 2009.
23. FREITAS, Vera Lucia Teixeira et al. Real-Time PCR in HIV/Trypanosoma cruzi Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4+ Level. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.5, n.8, Aug. 2011.
24. FUENTES, Rodrigo B; MATURANA, Mário A; DE LA CRUZ, Rodrigo M. Efficacy of nifurtimox for the treatment of chronic Chagas disease. **Rev Chil Infect**, v.29, n.1, p.82-86, Feb. 2011.
25. GUIMARAES, Lucinda Calheiros et al. Morphological changes in the digestive system of 93 human immunodeficiency virus positive patients: an autopsy study. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.54, n.2, Apr. 2012.
26. GURGEL, Cristina Brandt Friedrich Martin et al. A lesão apical em cardiopatas chagásicos crônicos: estudo necroscópico. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.43, n.6, Dec. 2010.
27. GURGEL, Cristina Brandt Friedrich Martin; ALMEIDA, Eros Antonio de. Frequência da hipertensão arterial em chagásicos crônicos e sua repercussão no coração: estudo clínico e anatomopatológico. **Arq Bras Cardiol**, v.89, n.3, Sep. 2007.
28. HEMMIGE, Vagish; TANOWITZ, Herbert; SETHI, Aisha. Trypanosoma cruzi infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **International Journal of Dermatology**, v.51, n.5, p.501-508, May. 2012.

29. HENRY, Maria Aparecida Coelho de Arruda; LERCO, Mauro Masson; OLIVEIRA, Walmar Kerche de. Câncer do esôfago em paciente com megaesôfago chagásico. **Arq Gastroenterol**, v.44, n. 2, June 2007.
30. HENRIQUES-PONS, Andrea; PINTO, Luzia Maria de Oliveira. Citotoxicidade na infecção por *Trypanosoma cruzi*. **Portal de Doença de Chagas**, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166>>. Acesso em: 07 fev. 2014.
31. JAIME, Patricia Constante et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade abdominal em indivíduos portadores de HIV/AIDS, em uso de terapia antiretroviral de alta potência. **Rev Bras Epidemiol**, v.7, n.1, p.65-72, 2004.
32. JUNQUEIRA JUNIOR, Luiz Fernando. Insights into the clinical and functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.45, n.2, p.243-252, Apr. 2012.
33. KANWAR, Bittoo; FAVRE, David; McCUNE, Joseph M. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.5, n.2, p.151-157, Mar. 2010.
34. KRAUSE, Marie V; MAHAN, Kathleen L. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 11ed. São Paulo: Roca, 2005.
35. LAUCELLA, SA et al. alpha 4 Integrins and sialyl Lewis x modulation in chronic Chagas disease: further evidence of persistent immune activation. **Scand J Immunol**, v.53, n.5, p.514-519, May. 2001.
36. LAZO, Javier et al. Chagasic meningoencephalitis in the immunodeficient. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v.56, n.1, p.93-97, Mar. 1998.
37. LOPES, Edison Reis et al. Patologia das principais doenças tropicais. In: BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo, Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 11, p. 1165-1185.
38. MADY, Charles et al. Capacidade funcional máxima e função diastólica em portadores de cardiomiopatia chagásica sem insuficiência cardíaca congestiva. **Arq Bras Cardiol**, v.69, n.4, Oct. 1997.
39. MAGALHAES, Luisa MD et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal Of Infectious Diseases**, v.207, n.4, p.661-665, Fev. 2013.
40. MALUF, Luciana Cirillo; BARROS, Jefferson Alfredo; MACHADO FILHO, Carlos D'Aparecida dos Santos. Mastocytosis. **An Bras Dermatol**, v.84, n.3, Jul. 2009.
41. MATSUDA, Nilce Mitiko; MILLER, Steven M; EVORA, Paulo R Barbosa. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v.64, n.12, p.1219-1224, 2009.
42. MATTA, José Alberto Martins et al. Strokes Correlates in Chagasic and Non-Chagasic Cardiomyopathies. **PLOS One**, v.7, n.4, 2012.
43. MAYA, Juan Diego et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v.43, n.3, 2010.

44. MEUSER-BATISTA, Marcelo et al. Mast Cell Function and Death in Trypanosoma cruzi Infection. **The American Journal Of Pathology**, v.179, n.4, p.1894-1904, Oct. 2011.
45. MIYAZAKI, Yoshiyuki et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Immunology**, v.185, n.2, p.1150-1157, Jul. 2010.
46. NIGAM, Pragati et al. Loss of IL-17-producing CD8 T cells during late chronic stage of pathogenic simian immunodeficiency virus infection. **The Journal of Immunology**, v.186, n.2, p.745-753, Jan. 2011.
47. OLIVEIRA, Fabiola Adriane Souza et al. Epidemiological characteristics of patients with Chagas Disease. **Rev Bras Med Família e Com**, v.2, n.6, p.107-113, Sep. 2006.
48. OLIVEIRA, Leonardo R et al. Reativação da doença de Chagas com envolvimento do sistema nervoso central durante tratamento de linfoma não Hodgkin. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.32, n.3, 2010.
49. PAIVA, DD et al. Spectrum of Morphologic Changes of 16 Lymph Nodes in HIV Infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, n.3, Jun. 1996.
50. PARK, Seoung Ju; LEE, Yong Chul. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. **Respiratory Research**, v.11, n.1, Jun. 2010.
51. PAULA, Emmyline Perin de et al. Considerações nutricionais para adultos com HIV/AIDS. **Revista Matogrossense de Enfermagem**, v.1, n.2, p.148-165, 2010.
52. PINAZO, María-Jesús et al. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.1, 2013.
53. PINHEIRO, Simone Wanderley et al. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.4, Jul. 2003.
54. PY, Marco Oliveira. Neurologic Manifestations of Chagas Disease. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v.11, n.6, p.536-542, Dec. 2011.
55. RASSI JUNIOR, Anis; RASSI, Anis; REZENDE, Joffre Marcondes de. American Trypanosomiasis: Chagas Disease. **Infect Dis Clin North Am**, v.26, n.2, p.275-291, Jun. 2012.
56. REUTER, Morgan A.; POMBO, Carolina; BETTS, Michael R. Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: Lessons for development of therapeutics and vaccines. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.23, p.181-191, Aug-Oct. 2012.
57. REIS, Marcia Martins et al. Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33, n.6, Dec. 2000.
58. ROLDÃO, José A et al. Comparison between the collagen intensity and mast cell density in the lingual muscles and myocardium of autopsied chronic chagasic and nonchagasic patients. **Parasitology Research**, v.111, n.2, p.647-654, Aug. 2012.

59. ROMANO, Patricia Silvia et al. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. **IMBMB Life**, v.64, n.5, p.387-396, May. 2012.
60. SALGADO, María et al. Long-term non-progressors display a greater number of Th17 cells than HIV-infected typical progressors. **Clinical Immunology**, v.139, n.2, p.110-114, May. 2011.
61. SARTORI, Ana Marli C et al. *Trypanosoma cruzi* Parasitemia in Chronic Chagas Disease: Comparison between Human Immunodeficiency Virus (HIV)–Positive and HIV-Negative Patients. **The Journal of Infectious Diseases**. v.186, n.6, p.872-875, Sep. 2002.
62. SCHOFIELD, Chris J; JANNIN, Jean; SALVATELLA, Roberto. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitology**, v.22, n.12, p.583-588, Dec. 2006.
63. SEBEN, Gabriela et al. Adultos jovens portadores de HIV: análise dos processos subjetivos no enfrentamento da doença. **Revista de Psicologia da Vetor Editora**, v.9, n.1, p.63-72, Jan-Jun. 2008.
64. SILVEIRA, Alexandre Barcelos Morais et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human Pathology**, v.38, n.8, p.1256-1264, Aug. 2007.
65. SOSA-ESTANI, Sergio; COLANTONIO, Lisandro; SEGURA, Elsa Leonor. Therapy of Chagas' Disease: Implications for Levels of Prevention. **Journal of Tropical Medicine**, v.2012, Mar. 2012.
66. STRASEN, Jörn et al. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology**, v.103, n.1, p.1-10, Jan. 2014.
67. TAFURI, Washington Luiz et al. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. In: BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo, Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap. 33, p. 1369-1384.
68. TARTAROTTI, Ester; AZEREDO-OLIVEIRA, Maria Tercilia Vilela; CERON, Carlos Roberto. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arq Ciênc Saúde**, v.11, n.1, p.44-47, Jan-Mar. 2004.
69. VAGO, Annamaria R et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v.348, n.9031, p.891-892, Sep. 1996.
70. VAIDIAN, Anil K; WEISS, Louis W; TANOWITZ, Herbert B. Chagas' disease and AIDS. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.3, n.1, May. 2004.
71. VENKETARAMAN, Vishwanath et al. Role of Cytokines and Chemokines in HIV Infection. In: DUMAIS, Nancy. **HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies**. Rijeka: InTech, 2011. cap.11, p.281-300. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/22340>>. Acesso em: 01 fev. 2014.
72. VINHAES, Marcio C; DIAS, João Carlos Pinto. Doença de Chagas no Brasil. **Cad Saúde Pública**, v.16 (sup.2), p.7-12, 2000.

73. YAMANAKA, Yusuke et al. Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.38, n.3, p.313-317, Mar. 2012.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar – Bairro Nossa Senhora da Abadia
38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854
E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DA LÍNGUA, ESÔFAGO, ESTÔMAGO, INTESTINO GROSSO E INTESTINO DELGADO DE PACIENTES AUTOPSIADOS COM DOENÇA DE CHAGAS E/OU SÍNDROMI DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA
PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: SANÍVIA APARECIDA DE LIMA PEREIRA
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 11/04/2013
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2635

PARECER

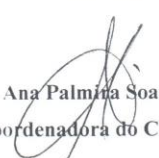
De acordo com as disposições da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM considera o protocolo de pesquisa **aprovado**, na forma (redação e metodologia) como foi apresentado ao Comitê.

Conforme a Resolução 196/96, o pesquisador responsável pelo protocolo deverá manter sob sua guarda, pelo prazo de no mínimo cinco anos, toda a documentação referente ao protocolo (formulário do CEP, anexos, relatórios e/ou Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLE assinados, quando for o caso) para atendimento ao CEP e/ou à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Toda e qualquer alteração a ser realizada no protocolo deverá ser encaminhada ao CEP, para análise e aprovação.

O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início da realização do projeto.

Uberaba, 13 de setembro de 2013.


Prof.^a Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP/UFTM