

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
MARIANA PACIFICO GARVIL**

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POR
ANTI-GALECTINA-3, DENSIDADE DE MASTÓCITOS, FIBROSE, MIOSITE
E GANGLIONITE EM BIÓPSIAS DE MEGACÓLON CHAGÁSICO**

**UBERABA-MG
2016**

MARIANA PACIFICO GARVIL

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POR
ANTI-GALECTINA-3, DENSIDADE DE MASTÓCITOS, FIBROSE, MIOSITE
E GANGLIONITE EM BIÓPSIAS DE MEGACÓLON CHAGÁSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico 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

2016

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Garvil, Mariana Pacífico.

G199a Avaliação da densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3, densidade de mastócitos, fibrose, miosite e ganglionite em biópsias de megacólon chagásico / Mariana Pacífico Garvil. – Uberaba, 2016.

46 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Sanívia Aparecida de Lima Pereira.

1. Chagas, Doença de. 2. Megacolon. 3. Moléculas. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

CDD 616.9363

MARIANA PACIFICO GARVIL

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POR
ANTI-GALECTINA-3, DENSIDADE DE MASTÓCITOS, FIBROSE, MIOSITE
E GANGLIONITE EM BIÓPSIAS DE MEGACÓLON CHAGÁSICO**

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

MARIANA PACIFICO GARVIL

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POR
ANTI-GALECTINA-3, DENSIDADE DE MASTÓCITOS, FIBROSE, MIOSITE
E GANGLIONITE EM BIÓPSIAS DE MEGACÓLON CHAGÁSICO**

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

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Renata Margarida Etchebehere
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Universidade de Uberaba

Prof.^a Dr.^a Sanívia Aparecida de Lima Pereira
Universidade de Uberaba

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros recebidos da Universidade de Uberaba (UNIUBE), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho aos meus pais, Alexandrina e Creso, à minha avó Fanny pelo incentivo e a minha orientadora Sanívia pela dedicação e amizade ao longo desses meses.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à Deus pela minha vida e pela força que me deu durante os momentos difíceis, mostrando sempre os caminhos certos durante as minhas incertezas. Obrigada pelas pessoas que Tu colocaste em minha vida durante esta trajetória e obrigada pelos exemplos que tive durante esta caminhada.

Aos meus pais, Maria Alexandrina Alves Pacifico Garvil e Creso Garvil, que estiveram comigo em todos os momentos, sendo meus professores mais inspiradores, sempre me incentivando no caminho do conhecimento, nunca medindo esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos e me tornar sempre uma pessoa melhor. Amo vocês.

À minha avó Fanny Garcia, que sempre acreditou que o conhecimento é a nossa arma fundamental. Graças ao empenho que a senhora teve para que eu não desistisse, eu pude conquistar este título.

Ao meu irmão Marcelo Pacifico Garvil, aos meus familiares, aos meus amigos, muito obrigada por sempre estarem perto e torcendo pela minha conquista.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Sanívia Aparecida de Lima Pereira por ter me acolhido em seu projeto, acreditando sempre na minha capacidade. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada pelo comprometimento e pela dedicação que teve comigo durante a execução do nosso trabalho. Agradeço também pela atenção, carinho, compreensão e amizade que sempre estiveram presentes em todos os momentos dessa trajetória. Expresso aqui meu profundo respeito ao seu trabalho.

Aos professores do programa de mestrado da Uniube que contribuíram com seus conhecimentos.

Aos meus colegas e amigos do programa, que sempre tiveram carinho e paciência em todos os momentos.

À amiga Marcela Beghini que foi fundamental nessa caminhada que sempre estive ao meu lado. Obrigada pela contribuição em meu trabalho.

Aos meus alunos da Unitri e aos meus gestores, que sempre compreenderam minhas ausências durante estes anos e me apoiaram para que eu conseguisse terminar meus estudos. Meu muito obrigada.

À Universidade de Uberaba e ao programa de mestrado pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à UNIUBE, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

A todos que participaram desse projeto, aos alunos da iniciação, aos técnicos do laboratório.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A galectina-3 (Gal-3) é uma molécula que tem sido associada a uma grande variedade de neoplasias malignas, sendo conhecida como um marcador de metástase tumoral. A grande expressão de Gal-3 em câncer colorretal está associada com mau prognóstico e com metástase. **Objetivo:** Avaliar, através de biópsia, a presença de processos patológicos, a densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3, a porcentagem de colágeno e a densidade de mastócitos na musculatura intestinal de pacientes com megacólon chagásico. **Metodologia:** Foram selecionados 35 pacientes que haviam sido submetidos à biópsia de intestino entre os anos de 1997 a 2015, os quais foram divididos em três grupos: chagásicos com lesão de mucosa (CLM) (n=13), chagásicos com mucosa íntegra (CMI) (n=12) e não chagásicos sem lesão de mucosa (N) (n=10). Os fragmentos biopsiados foram processados histologicamente e corados pelo picrossírius para realizar a morfometria do colágeno e pelo azul de toluidina para avaliar a densidade de mastócitos. A densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3 foi determinada através da imunohistoquímica. A análise estatística foi realizada utilizando os testes *Shapiro-Wilk*, *ANOVA*, *Kruskall Wallis*, qui-quadrado e teste de correlação de *Spearman*, com nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$). **Resultados:** Os pacientes chagásicos apresentavam maior presença de ganglionite e miosite quando comparado aos não chagásicos, com diferença significativa. A densidade das células imunomarcadas por anti-galectina-3 foi significativamente maior no grupo CMI quando comparado ao grupo N. Não houve diferença significativa com relação à densidade de mastócitos entre os três grupos. O grupo CMI apresentou maior porcentagem de colágeno em relação aos grupos CLM e ao grupo N, com diferença significativa. **Conclusão:** Acreditamos que a Gal-3 está associada ao quadro inflamatório intestinal dos pacientes chagásicos que apresentaram densidade significativamente maior de células imunomarcadas por anti-galectina-3. No entanto, novos estudos deverão ser realizados com intuito de compreender melhor o papel dessa galectina no megacólon chagásico.

Palavras-chave: doença de Chagas, galectina-3, megacólon chagásico.

ABSTRACT

Introduction: Galectin-3 (Gal-3) is a molecule that has been associated with a variety of malignancies and is known as a tumor metastasis marker. Increase in Gal-3 expression in colorectal cancer is associated with poor prognosis and metastasis. **Aim:** To evaluate, by biopsy, the presence of pathological processes, the density of immunostained cells by anti-galectin-3, the percentage of collagen and mast cell density in the bowel musculature of patients with chagasic megacolon. **Methods:** We selected 35 patients who had undergone biopsy of the intestine between the years 1997-2015, which were divided into three groups: chagasic patients with mucosal injury (CLM) (n = 13), chagasic patients with intact mucosa (CMI) (n = 12) and non chagasic patients without mucosal damage (N) (n = 10). The biopsied fragments were processed histologically and stained with picrosirius to perform morphometry of collagen and toluidine blue to assess mast cell density. The density of cells immunostained by anti-galectin-3 was determined by immunohistochemistry. Statistical analysis was performed using the tests Shapiro-Wilk, ANOVA, Kruskal Wallis, chi-square and Spearman correlation test, with a significance level of 5% ($\alpha < 0,05$). **Results:** Chagas disease patients had greater presence of ganglionitis and myositis compared to non chagasic patients, with significant difference. The density of cells immunostained by anti-galectin-3 was significantly higher in the CMI group compared to the group N. There was no significant difference regarding the density of mast cells among the three groups. The CMI group had a higher percentage of collagen compared to CLM groups and the N group, with significant difference. **Conclusion:** We believe that Gal-3 is associated with the inflammatory bowel disease of chagasic patients who had a significantly higher density of anti-galectin-3-immunolabelled cells. However, new studies should be carried out in order to better understand the role of this galectin in the chagasic megacolon.

Keywords: Chagas disease, galectin-3, megacolon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1: Correlação entre a densidade de mastócitos e a porcentagem de colágeno nos pacientes chagásicos (chagásicos com lesão de mucosa e chagásicos com mucosa íntegra)..... 32

Gráfico 2: Correlação entre porcentagem de colágeno e a densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3 nos pacientes chagásicos (chagásicos com lesão de mucosa e chagásicos com mucosa íntegra). 32

Figura 1: Mastócitos na camada muscular própria do cólon de pacientes dos grupos CLM e CMI. A – Mastócitos no grupo CLM (Azul de toluidina, 400x); B – Mastócitos no grupo CLM (Azul de toluidina, 400x) 33

Figura 2: Miosite, ganglionite, expressão de Gal-3 e fibrose na camada muscular própria do cólon de pacientes dos grupos chagásicos com lesão de mucosa, chagásicos com mucosa íntegra e não chagásicos..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de idade e gênero dos indivíduos dos grupos chagásicos com lesão de mucosa, chagásicos com mucosa íntegra e não chagásicos 31

Tabela 2: Densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3, densidade de mastócitos e porcentagem de colágeno..... 31

Tabela 3: Distribuição dos processos patológicos nos grupos chagásicos com lesão de mucosa, chagásicos com mucosa íntegra e não chagásicos. 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC – Avidina-biotina conjugada com peroxidase.
- CLM – Grupo chagásico com lesão de mucosa.
- CMI – Grupo chagásico com mucosa íntegra.
- CRD – Domínio de reconhecimento de carboidratos.
- DAB – Diaminobenzidina.
- DC – Doença de Chagas.
- ELISA – Ensaio imunoenzimático.
- Gal-3 – Galectina-3.
- HAI – Hemoaglutinação indireta.
- HE – Hematoxilina de Haris e Eosina.
- IFI – Imunofluorescência indireta.
- LGALS3 – *Lectin GALactoside-binding soluble, 3*.
- MC – Megacólon chagásico.
- MMPs – Metaloproteases de matriz.
- N – Grupo controle.
- PBS/BSA – Phosphate buffered saline/Bovine serum albumin.
- PCR – Reação em cadeia da polimerase.
- WB – *Western blot*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A doença de Chagas	17
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2.1	Fase Aguda	19
1.2.2	Fase Crônica	20
1.2.2.1	Megacólon chagásico (MC)	20
1.3	O papel dos mastócitos da doença de Chagas	22
1.4	Galectinas.....	24
1.4.1	Galectina-3 (Gal-3).....	24
2	HIPÓTESE	27
3	OBJETIVO.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	<i>Seleção dos pacientes</i>	28
4.2	<i>Processamento histológico</i>	28
4.3	<i>Processamento e avaliação imunohistoquímica para galectina-3</i>	29
4.4	<i>Determinação da porcentagem de colágeno</i>	30
4.5	<i>Densidade de mastócitos</i>	30
4.6	<i>Avaliação processos patológicos</i>	31
4.7	<i>Análise estatística</i>	31
5	RESULTADOS	31
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	38
	ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	46
	ANEXO B – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA	47

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada, representando um grave problema de saúde e econômico para humanidade (ALMEIDA et al., 2009). É causada pelo *T. cruzi*, parasita que utiliza a galectina-3 (Gal-3) para interagir com a laminina e aumentar sua patogênese (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2000).

A Gal-3 é uma molécula que tem sido associada a uma grande variedade de neoplasias malignas, sendo conhecida como um marcador de metástase tumoral. A grande expressão de Gal-3 em câncer colorretal está associada com mau prognóstico e com metástase (KLESHCHENKO et al., 2004; PEREIRA et al., 2016; SHIMURA et al., 2016). Além disso, sabe-se que na doença de Chagas a Gal-3, além de induzir fibrose (PSARRAS et al., 2011), é utilizada pelo *T. cruzi* para interagir com a laminina, principal componente das membranas basais, facilitando a fixação e entrada do parasita (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2000).

1.1 A doença de Chagas

A *Tripanossomíase americana*, também conhecida como doença de Chagas (DC), foi descrita pelo médico Carlos Chagas em 1909, quando encontrou protozoários no sangue de uma paciente. Anteriormente havia observado os mesmos protozoários no intestino de triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros” (GARCIA, 2009).

A DC é uma doença parasitária endêmica, que ocorre geralmente nos países em desenvolvimento (ALMEIDA et al., 2009). Originária da América Latina, a DC atinge também outros continentes devido à constante imigração populacional (GARCIA, 2009), sendo a Espanha o país europeu com maior índice populacional de DC, com soroprevalência em torno de 31% (CORTEZ et al., 2012). Grande parte dos indivíduos com sorologia positiva para DC nessas áreas não endêmicas possui algum tipo de cardiopatia, sendo que muitos deles desconhecem serem infectados, tornando-se potenciais fontes de transmissão (MACHADO et al., 2012a).

1 Novos casos da doença têm sido notificados em países não
2 endêmicos, como Estados Unidos, Canadá e Suíça, devido à migração
3 populacional e estão relacionados à transmissão congênita e/ou transfusional,
4 tornando-se um problema emergente também nessas regiões (GASCON;
5 BERN; PINAZO, 2010; RASSI & MARIN-NETO, 2010).

6 A DC é causada por um protozoário flagelado denominado
7 *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), transmitida ao homem e a outros mamíferos por
8 insetos da família Triatominae, os triatomíneos, conhecidos como barbeiros,
9 que são hematófagos. A forma de transmissão vetorial ainda é a mais
10 importante do ponto de vista de saúde pública, porém existem outras formas de
11 transmissão, sendo a que acontece por transfusão sanguínea a segunda em
12 importância epidemiológica (ALMEIDA et al., 2009).

13 14 1.2 *Trypanosoma cruzi*

15
16 O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à família
17 Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida e possui capacidade de infectar
18 muitos mamíferos, principalmente através das fezes contaminadas dos vetores
19 (DIAS & COURA, 1997).

20 A forma mais comum de transmissão do *T. cruzi* se dá pela forma
21 vetorial, mas além desta forma, existem ainda: (a) a transmissão transfusional,
22 que atualmente se encontra bem reduzida devido ao controle realizado com os
23 hemoderivados e hemocomponentes; (b) a transmissão congênita que ocorre
24 via transplacentária; (c) a transmissão acidental que ocorre por contaminação
25 em laboratórios e outros ambientes que manipulam sangue; (d) a transmissão
26 oral ocorre com a ingestão de alimentos contaminados; (e) a transmissão por
27 transplantes (COURA, 2015).

28 Independentemente da forma que se contraiu o *T. cruzi*, o ciclo de
29 evolução será sempre o mesmo. Os tripomastigotas metacíclicos acessam a
30 circulação sanguínea e penetraram em uma célula a fim de se diferenciarem
31 em amastigotas, o que acontece após um período de latência de 20 a 30 horas.
32 Este estágio de infecção é bastante ubiqüitário acontecendo em uma gama de
33 células como macrófagos, células musculares e epiteliais. Inicialmente, a forma
34 tripomastigota é fagocitada pelo macrófago, seguindo-se a formação do
35 vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo a forma tripomastigota se

1 diferencia para a forma amastigota e ocorre a lise da membrana do vacúolo. No
2 citoplasma das células parasitadas os amastigotas se reproduzem por
3 processo de divisão binária e iniciam sua diferenciação passando por uma
4 forma de transição e se diferenciando na forma tripomastigota antes da célula
5 hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitos (BRENER, 1997). A lise da
6 célula pode acontecer antes da total diferenciação de amastigotas para
7 tripomastigotas, aparecendo diferentes formas infectantes no meio extracelular
8 (MORTARA, 1991), prontas para infectar as células vizinhas e iniciando
9 novamente o ciclo (BRENER, 1997).

10 A DC pode acometer vários órgãos, sendo caracterizada por
11 apresentar duas fases distintas, a fase aguda e a fase crônica (COURA, 2003).

12

13 1.2.1 Fase Aguda

14

15 A fase aguda da DC refere-se ao período inicial da infecção pelo *T.*
16 *cruzi* e pode durar de duas a oito semanas com alta parasitemia (CORTEZ et
17 al., 2012). A mortalidade durante a fase aguda da doença é de cerca de 5%
18 dos casos geralmente relacionada à miocardite (DUBNER et al., 2008).

19 Quanto ao período do aparecimento dos sintomas, existem
20 divergências na literatura. Para alguns autores seria um período entre oito a
21 doze dias (DIAS; LARANJA; NOBREGA, 1945) e para outros um período entre
22 duas a oito semanas (CORTEZ et al., 2012).

23 As manifestações clínicas da fase aguda incluem febre, erupção
24 cutânea, lesão no local de entrada (chagoma), dor muscular, sudorese, edema
25 dos gânglios linfáticos, hepato-esplenomegalia, edema subcutâneo localizado
26 ou generalizado (40% dos casos) (DUBNER et al., 2008).

27 Na DC aguda o diagnóstico patológico poderá ser realizado pela
28 detecção do parasito através de métodos laboratoriais de visualização do
29 parasito direta ou indiretamente e pela presença de anticorpos no soro
30 detectados por meio de testes específicos conhecidos como
31 imunofluorescência indireta (IFI), hemoaglutinação indireta (HAI) e ensaio
32 imunoenzimático (ELISA). Testes de maiores complexidades como testes
33 moleculares utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) acoplado à
34 hibridização com sondas moleculares, e o *western blot* (WB) têm apresentado

1 resultados promissores e podem ser utilizados como teste confirmatório em
2 qualquer fase da doença (COURA & BORGES-PEREIRA, 2012).

3 Quando existe término da fase aguda, e se o paciente não tiver sido
4 tratado, acontece atenuação espontânea da parasitemia e a doença evolui para
5 a fase crônica (DIAS & COURA, 1997).

6 7 1.2.2 Fase Crônica

8
9 A fase crônica da DC caracteriza-se por parasitemia baixa e alto nível
10 de anticorpos no sangue. Para o diagnóstico da fase crônica da DC procura-se
11 pela presença de anticorpos anti-IgG e anti-*T. cruzi* no sangue do indivíduo, por
12 meio de exames sorológicos (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA,
13 2003).

14 A fase crônica normalmente se apresenta na forma cardíaca e/ou
15 digestiva. As manifestações cardíacas são predominantes, embora em alguns
16 países as alterações digestivas também são frequentes juntamente com a
17 cardiopatia chagásica crônica (MACHADO et al., 2012a).

18 A forma digestiva da DC geralmente aparece na terceira década de
19 vida acometendo geralmente o esôfago, o reto e sigmoide (DIAS, 1996), sendo
20 caracterizada pela destruição dos gânglios intramurais e desnervação
21 parassimpática em todo o trato digestório (CREMA et al., 2011). A desnervação
22 do sigmoide provoca dilatação e alongamento do intestino grosso, situação
23 conhecida como megacólon chagásico (SANTOS JUNIOR, 2002).

24 25 1.2.2.1 Megacólon chagásico (MC)

26
27 O MC é provocado pela ação direta do *T. cruzi* no plexo mioentérico,
28 que causa neuropatia inflamatória, seguida por degeneração e destruição dos
29 neurônios (SOUZA et al., 1996). Como consequência desse processo, há
30 desnervação autonômica intramural do músculo liso do intestino grosso,
31 levando à dilatação anormal e em alguns casos acompanha o alongamento de
32 parte desse órgão (ADAD et al., 1991).

33 No Brasil, o MC afeta cerca de 2% a 5% dos indivíduos infectados pelo
34 *T. cruzi* e predomina no sexo masculino, em uma faixa etária de 20 a 60 anos,
35 com pico entre os 40 e 50 anos (SANTOS JÚNIOR, 2002).

1 Os sintomas de MC incluem constipação intestinal e dor abdominal,
2 podendo ter algumas complicações como fecaloma, megacólon tóxico e volvo,
3 que em alguns casos levam à obstrução da circulação local, com perfuração
4 resultante da isquemia e gangrena (GARCIA et al., 2003; LEAO et al., 2011).

5 Macroscopicamente o MC se caracteriza por dilatação permanente do
6 cólon, acompanhada de alongamento da alça (LOPES et al., 2000),
7 acrescentada de hipertrofia da parede muscular (PINHEIRO et al., 2003).

8 A complicação mais frequente nos casos de megacólon é a presença
9 de úlceras, podendo ser resultantes da ação traumática de fecaloma
10 preexistente, podendo evoluir com perfuração colônica (DIOGO-FILHO et al.,
11 2006). Essas úlceras surgem por isquemia devida à compressão da parede
12 colônica por fecaloma, podendo aprofundar-se a ponto de causar perfuração e
13 peritonite ou infectar-se por bactérias. A constipação intestinal, quando
14 persistente, torna-se um fator importante na patogênese do câncer colorretal,
15 por aumentar o tempo de exposição entre substâncias carcinogênicas
16 presentes nas fezes com a mucosa (GARCIA et al., 2003).

17 As alterações microscópicas mais comuns para MC são as dos plexos
18 nervosos intramurais e da musculatura. São representadas por ganglionite,
19 periganglionite, neurite, perineurite, desnervação e fenômenos degenerativos
20 dos neurônios, ocorrendo, por vezes, destruição completa de alguns gânglios,
21 mais frequentemente no plexo mioentérico (PINHEIRO et al., 2003).

22 Os pacientes chagásicos, com ou sem MC, demonstram quantidade
23 significativamente menor de células de Cajal ao nível do plexo mioentérico. As
24 células intersticiais de Cajal juntamente com os neurônios, atuam na
25 coordenação da motilidade intestinal, desempenhando a função de
26 marcapasso (ADAD; SILVA; JAMMAL, 2012). Entretanto, aqueles que
27 apresentam MC possuem redução pronunciada da quantidade dessas células,
28 além de redução significativa dos neurônios entéricos (BASSOTTI &
29 VILLANACCI, 2012).

30 A inflamação tecidual causada pela infecção pelo *T. cruzi* provoca
31 neoformação de colágeno tipo III sendo gradativamente substituído por
32 colágeno tipo I à medida que a infecção torna-se crônica. Os diferentes tipos de
33 colágeno podem ser distinguidos microscopicamente por apresentarem
34 diferenças na cor, no diâmetro e no arranjo estrutural das fibras (JUNQUEIRA
35 & CARNEIRO, 2008).

1 A maior deposição de colágeno deve-se à um mecanismo de defesa
2 tecidual vinculado à cronicidade da doença e é desencadeada pela ativação
3 latente de TGF- β , que tem se mostrado um potente agente pró-fibrótico
4 (DOGGRELL & WANSTALL, 2004). O TGF- β possui papel importante na
5 modulação do quadro infeccioso, na regulação da inflamação e da resposta
6 imune, na fibrose e neoconjuntivização cardíaca durante a fase aguda e
7 crônica da doença, na invasão de fibroblastos e miócitos cardíacos e no ciclo
8 do parasita intracelular (WAGHABI et al., 2005).

9 Em relação ao cólon, a inflamação focal pode danificar tanto as células
10 infectadas quanto as não infectadas. Áreas de fibrose são observadas na
11 musculatura e no plexo mioentérico com redução do número de neurônios. O
12 processo inflamatório consiste predominantemente de células mononucleares,
13 eosinófilos dispersos, alguns mastócitos e raros plasmócitos em volta da
14 musculatura e do plexo mioentérico. Focos de miosite com a formação de
15 granulomas podem ser identificados, principalmente no plexo mioentérico.
16 Miosite e ganglionite são mais frequentes nos órgãos com mega em relação
17 aos sem mega (CÔBO et al., 2012).

18 19 1.3 O papel dos mastócitos da doença de Chagas

20
21 No final do século XIX, Paul Enrich descobriu os tecidos conjuntivos
22 humanos, e desde então os mastócitos têm se destacado por sua diversidade
23 biológica. Os mastócitos são células importantes na imunidade natural e
24 adquirida por conter uma variedade de mediadores pré-formados que são
25 secretados após a ativação e consequente desgranulação (KIRSHENBAUM,
26 2000). Esses mediadores são: histamina, proteoglicanas (heparina, sulfato de
27 condroitina E), serotoninas, proteases (triptase, quimase, glucuronidase,
28 catepsina G, entre outras), algumas citocinas (TNF- β) e fator de crescimento
29 para fibroblastos. Os produtos neoformados incluem: mediadores lipídicos que
30 são prostaglandina D2 e leucotrienos, gerados do ácido araquidônico,
31 tromboxanas, radicais do nitrogênio e do oxigênio, citocinas e quimiocinas. A
32 consequência da liberação desses produtos provoca inflamação, vasodilatação,
33 recrutamento e adesão de células, fibrose e angiogênese (GARBUZENKO et
34 al., 2002; FARAHANI; NAVABAZAM; ASHKEVARI, 2010; VILELA, 2016).

1 Os mastócitos são células complexas, multifuncionais e
2 hematopoiéticas (BERTON et al., 2000; FARAHANI; NAVABAZAM;
3 ASHKEVARI, 2010), sendo classificados pelo seu conteúdo intracelular,
4 principalmente pela presença de duas proteases denominadas quimase e
5 triptase (MOON et al., 2010). São células que produzem as substâncias
6 necessárias para o recrutamento dos leucócitos incluindo selectinas, moléculas
7 de adesão e fatores quimiotáticos (RECH & GRAÇA, 2006).

8 O aumento de mastócitos está associado com uma grande variedade
9 de doenças fibrosantes e com tumores (PINHEIRO et al., 2003). Essas células
10 participam de processos de fibrose e de remodelação tecidual (RECH &
11 GRAÇA, 2006) e também migram para o foco de células tumorais (POOLE &
12 ZETTER, 1983).

13 O aumento na quantidade de mastócitos na DC acontece em órgãos
14 como no coração, no esôfago e no cólon. A fibrose intersticial está relacionada
15 com a mastocitose presente na DC experimentais e humana, sendo maior na
16 túnica muscular do grupo com megacólon (PINHEIRO et al., 2003). Em
17 experimentos com ratos, observou-se quantidade aumentada de mastócitos
18 nas áreas de reinoculação com *T. cruzi* na pele, na submucosa e na
19 musculatura do intestino com a doença crônica (VILELA, 2016).

20 Na DC os mastócitos aumentam progressivamente em número (ADAD;
21 SILVA; JAMMAL, 2012). Já foi demonstrado através da morfometria que existe
22 maior número de mastócitos nos chagásicos com mega em relação aos sem
23 mega e aos não chagásicos, mas os autores não conseguiram demonstrar a
24 relação entre a fibrose e o número de mastócitos (PINHEIRO et al., 2003). Na
25 fase aguda da DC há aumento no recrutamento de mastócitos, mas na fase
26 crônica da doença há uma redução dessa quantidade. Entretanto, mesmo na
27 fase crônica, a quantidade de mastócitos continua maior quando comparados a
28 grupos não contaminados pelo *T. cruzi* (SILVA, 2015).

29 Embora já tenha sido descrito aumento de mastócitos na DC, não
30 encontramos, até o presente momento, nenhum estudo na literatura que
31 avaliasse a expressão de galectina-3 (Gal-3) em lesões de cólon de pacientes
32 chagásicos. A grande expressão de Gal-3 nessas lesões indicaria maior
33 probabilidade de transformação maligna e maior probabilidade de metástase de
34 lesões cancerígenas. Portanto a avaliação de Gal-3 poderia contribuir como um

1 fator adicional para determinar o potencial de malignidade das lesões
2 encontradas nos megacólons chagásicos.

3 4 1.4 Galectinas

5
6 As galectinas são proteínas da família das lectinas que se ligam a
7 carboidratos e podem reconhecer glicoproteínas, glicolipídeos e outras
8 moléculas (SILVA, 2015). As galectinas são solúveis, possuem afinidade por β -
9 galactosídeos e requerem condições redutoras para manter sua atividade na
10 ausência de ligantes (MELO, 2005).

11 Foram isoladas cerca de 15 tipos de galectinas e subdividas em três
12 grupos de acordo com a sua estrutura: 1º grupo: são as galectinas
13 classificadas como monovalentes, ou seja galectinas que possuem um domínio
14 de reconhecimento de carboidratos; 2º grupo: são as galectinas bivalentes ou
15 seja, aquelas que possuem dois domínios de reconhecimento de carboidratos;
16 3º grupo: são as galectinas quiméricas, ou seja, aquelas que possuem um
17 único domínio de reconhecimento de carboidrato, porém, contém uma
18 terminação amino (OLIVEIRA et al., 2013).

19 De todas as galectinas a mais estudada até o momento é a Gal-3,
20 sendo a única representante do grupo quimérico (OLIVEIRA et al., 2013).

21 22 1.4.1 Galectina-3 (Gal-3)

23
24 A Gal-3 foi descrita pela primeira vez em 1982 e inicialmente foi
25 identificada como Mac-2, um antígeno expresso na superfície de macrófagos
26 peritoneais de camundongos (MELO, 2005). A Gal-3 é uma proteína quimérica,
27 com cerca de 30kDa com estrutura constituída de três domínios: um domínio
28 amino terminal composto por 12 aminoácidos, uma sequência semelhante ao
29 colágeno, rico em glicina, prolina e tirosina (GONG et al., 1999) e um domínio
30 de carboxi-terminal, que é composto de 140 resíduos de COOH dos
31 carboidratos, onde está localizado o domínio de reconhecimento de
32 carboidratos (CRD) (OLIVEIRA et al., 2013).

33 Esta proteína é codificada pelo gene LGALS3 (*Lectin, GALactoside-*
34 *binding, Soluble, 3*), que está localizado no cromossomo 14, no locus 14q21-
35 22, composto por 6 éxons e 5 íntrons. O gene promotor possui múltiplos

1 domínios Gcbox, mas não possui o TATABox no primer. O sítio de iniciação da
2 transcrição situa-se no primeiro éxon e o códon de iniciação da tradução se
3 encontra no segundo éxon (KADROFSKE; OPENO; WANG, 1998).

4 A Gal-3 é encontrada na forma de monômero, mas sofre polimerização
5 quando se liga em superfícies que contém glicoconjugados, sendo o terminal
6 NH₂ responsável para que isso aconteça (GONG et al., 1999). A Gal-3 é
7 encontrada nos meios intra e extracelular e tem sido associada à capacidade
8 de malignização de lesões. Essa galectina está presente em várias células, tais
9 como células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer (FLOTTE;
10 SPRINGER; THORBECKE, 1983), células do estroma tímico (VILLA-VERDE et
11 al., 2002), neutrófilos (YAMAOKA et al., 1995), eosinófilos (TRUONG et al.,
12 1993) e células epiteliais (PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998), sendo mais
13 frequentemente encontrada no citoplasma que no núcleo (DAVIDSON et al.,
14 2002).

15 A Gal-3 sofre modificações pós-tradução, tais como proteólise limitada
16 e fosforilação. A Gal-3 extracelular pode ser clivada por diferentes moléculas,
17 tais como metaloproteases de matriz (MMPs) e pelo antígeno específico da
18 próstata (PSA) (MARTINS et al., 2006). Embora o significado fisiológico da
19 modificação pós-tradução permanece incerto, tem sido sugerido que a
20 clivagem proteolítica da Gal-3 pode modular suas funções biológicas, afetando
21 uma variedade de processos celulares (OCHIENG et al., 1994).

22 Predominante no citoplasma, a Gal-3 pode ser transferida para o
23 núcleo ou secretada para o meio extracelular (OCHIENG; FURTAK;
24 LUKYANOV, 2004). O transporte da Gal-3 para o núcleo acontece por duas
25 vias distintas: difusão passiva ou por transporte ativo dependente da ligação às
26 proteínas facilitando o transporte através do poro nuclear (NAKAHARA et al.,
27 2006).

28 Quando a Gal-3 é expressa no núcleo participa da remodelação do pré-
29 mRNA (DAGHER; WANG; PATTERSON, 1995), na expressão gênica (PARON
30 et al., 2003), como supressor tumoral (CALIFICE et al., 2004) além de
31 apresentar função anti-apoptótica (ACOSTA-RODRÍGUEZ et al., 2004). Já no
32 citoplasma atua como promotor tumoral, aumenta a capacidade de invasão, o
33 crescimento tumoral *in vivo* e a angiogênese, além de diminuir a indução da
34 apoptose (CALIFICE et al., 2004). Quando no meio extracelular a Gal-3 pode
35 atuar nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular (KUKLINSKI et

1 al., 2000), além de ser descrito que possibilita a indução da apoptose pela
2 ligação a resíduos de carboidratos na superfície celular (SUZUKI & ABE, 2008).

3 O papel biológico da Gal-3 não é totalmente conhecido, mas está
4 relacionada com o *splicing* pré-mRNA, regulação da proliferação celular,
5 adesão celular e apoptose. Além disso, participa de processos patológicos
6 como hipertrofia celular, inflamação e transformação neoplásica (BINH et al.,
7 2013). Estudos recentes têm demonstrado que a Gal-3 regula a progressão
8 tumoral e metástases (KLESHCHENKO et al., 2004; PEREIRA et al., 2016;
9 SHIMURA et al., 2016).

10 A Gal-3 é um marcador tumoral presente na cascata metastática e
11 interage com o hidrato de carbono Thomsen-Freidenreich (TF), que está
12 expresso em 90% dos cânceres humanos. Esse hidrato de carbono se liga à
13 Gal-3, favorecendo a adesão ao endotélio vascular e consequente
14 transmigração das células tumorais para o tecido sendo, portanto, um fator
15 importante na formação do tumor metastático (HILL et al., 2010; NEWTON-
16 NORTHUP et al., 2013).

17 Pacientes com tumores na região colorretal e com imunexpressão
18 forte ou moderada de Gal-3 vão a óbito com mais frequência ou possuem mais
19 recidivas tumorais. O risco de morte é reduzido em pacientes com ausência ou
20 baixo grau de Gal-3. A imunexpressão citoplasmática de Gal-3 parece ser um
21 fator prognóstico no câncer colorretal, pois existe maior risco de recorrência em
22 tumores com níveis elevados de Gal-3 (POVEGLIANO et al., 2011).

23 Sabe-se também que a Gal-3 atua na interação parasito-hospedeiro.
24 As principais glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* são as mucinas e os
25 resíduos de açúcar, os quais estão envolvidos com a invasão de células de
26 mamíferos pelas formas tripomastigotas do parasito (VILLALTA &
27 KIERSZENBAUM, 1984).

28 Já foi demonstrado que o *T. cruzi* utiliza a Gal-3 para interagir com a
29 laminina, principal constituinte das membranas basais, aumentando assim a
30 patogênese do *T. cruzi*, promovendo a fixação e a entrada do parasita pela
31 membrana (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2000). A Gal-3 aumenta a
32 aderência normal dos tripomastigotas em células musculares lisas das artérias
33 coronárias humanas na ausência de lactose, a qual inibe essa adesão
34 (KLESHCHENKO et al., 2004).

1 A Gal-3 é expressa também em células B infectadas pelo *T. cruzi* e é
2 regulada positivamente após estímulos específicos, além de desenvolver um
3 papel importante na sobrevivência e diferenciação dessas células. A expressão
4 dessa galectina é aumentada quando há infecção pelo parasito (ACOSTA-
5 RODRÍGUEZ et al., 2004; VRAY et al., 2004). A Gal-3 é observada também
6 nos macrófagos presentes no local de entrada do parasita e também em torno
7 dos amastigotas extracelulares (MACHADO et al., 2014).

8 Células que apresentam menor expressão de Gal-3 apresentam
9 aumento na multiplicação dos amastigotas extracelulares, o que sugere que
10 essa galectina desempenhe um controle importante ao longo da infecção já
11 que a ausência de Gal-3 torna o ambiente favorável à multiplicação intracelular
12 de amastigotas (SILVA, 2015).

13 Já foi demonstrado que a Gal-3 é capaz de ativar neutrófilos e
14 mastócitos (LIU et al., 1995), sendo essas últimas células importantes na
15 formação de colágeno (YAMASHITA et al., 1992; FERRAO & MASON, 1993).
16 Monócitos inativos expressam Gal-3, mas quando ativados a concentração
17 dessa proteína aumenta, favorecendo a diapedese dessas células as quais irão
18 se diferenciar em macrófagos, contribuindo para a fibrogênese (LIU et al.,
19 1995). Além disso, como a Gal-3 é produzida por macrófagos e miofibroblastos,
20 essa proteína está associada também à inflamação e à fibrose (SHARMA et al.,
21 2004; HENDERSON et al., 2006; HENDERSON & FORBES, 2008).

22

23 **2 HIPÓTESE**

24

25 Os pacientes chagásicos, mesmo sem lesão de mucosa visível ao
26 exame de colonoscopia, apresentam mais processos patológicos frequentes
27 em megacólon como congestão, hemorragia, degeneração, necrose, miosite e
28 ganglione, maior densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3,
29 maior porcentagem de colágeno e maior densidade de mastócitos na camada
30 muscular.

31

32 **3 OBJETIVO**

33

34 Avaliar, através de biópsia na camada muscular, a presença de
35 processos patológicos, a densidade de células imunomarcadas por anti-

1 galectina-3, a porcentagem de colágeno e a densidade de mastócitos na
2 musculatura intestinal de pacientes com megacólon chagásico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção dos pacientes

8 O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da
9 Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, sob o número CAAE nº
10 22725013.4.0000.5154. Após aprovação foi realizado estudo retrospectivo
11 longitudinal com a análise de protocolos de biópsias completas realizadas em
12 um laboratório particular da cidade de Uberaba, MG, Brasil, no período entre
13 1997 a 2015.

14 Foram selecionados 35 fragmentos de cólon provenientes de biópsias
15 de 35 pacientes com idade entre 44 a 85 anos. Os pacientes foram divididos
16 em 3 grupos de acordo com a descrição presente nos laudos: chagásicos com
17 lesão de mucosa (CLM) (n=13); chagásicos com mucosa íntegra (CMI) (n=12)
18 e não chagásicos sem lesões de mucosa (N) (n=10). Os indivíduos foram
19 homogeneizados de acordo com a idade e o gênero.

20 Os critérios de inclusão foram: a) Para o grupo CLM: pacientes
21 chagásicos, apresentando megacólon com a mucosa intestinal ulcerada e/ou
22 com hipotrofia de mucosa; b) Para o grupo CMI: pacientes chagásicos,
23 apresentando megacólon com mucosa intestinal íntegra; c) Para o grupo N:
24 pacientes com infarto intestinal, não chagásicos e que não apresentavam
25 qualquer lesão de mucosa ou na musculatura intestinal. Para este grupo, os
26 fragmentos utilizados foram selecionados na fração onde não havia o infarto
27 nem outro processo.

28 Foram excluídos do estudo pacientes com megacólon de outras
29 etiologias, pacientes abaixo de 18 anos, pacientes chagásicos sem megacólon,
30 pacientes com lesões de mucosa, mas que não apresentavam MC.

5.2 Processamento histológico

34 Os fragmentos, que já se encontram incluídos em parafina, foram
35 cortados em micrótomo, de forma seriada, em quatro secções medindo 5µm de

1 espessura. Posteriormente os fragmentos foram colocados sobre lâminas de
2 vidro e corados pelos seguintes corantes: (a) Hematoxilina e eosina para
3 avaliação de processos patológicos gerais; (b) Picrosírius para avaliação do
4 colágeno; (c) Azul de toluidina para avaliação dos mastócitos. O outro
5 fragmento foi colocado em lâmina silanizada para o processamento
6 imunohistoquímico.

7 8 5.3 *Processamento e avaliação imunohistoquímica para galectina-3*

9
10 Para o processamento da imunohistoquímica para Gal-3, os cortes
11 foram desparafinados, reidratados e lavados com água ultra pura por cinco
12 minutos à temperatura ambiente. A etapa seguinte foi a de recuperação
13 antigênica ao calor úmido, com ácido cítrico 0,01 M e pH 6 durante 30 minutos.
14 Posteriormente os cortes foram incubados com PBS/BSA (*Phosphate buffered*
15 *saline/Bovine serum albumin*) 2% durante 30 minutos para bloqueio das
16 ligações inespecíficas.

17 Os anticorpos anti-galectina-3 foram diluídos em PBS/BSA 2% na
18 concentração de 1:75 (R&D, Minesota, EUA). Em seguida os cortes foram
19 incubados por 18 horas (*overnight*) a 4°C com anticorpo primário diluído,
20 posteriormente lavados duas vezes com PBS e tween 20 a 0,05%.
21 Posteriormente os cortes foram tratados com metanol e peróxido de hidrogênio
22 (H₂O₂) a 3% durante 15 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena dos
23 tecidos. Para a detecção do anticorpo a técnica utilizada foi a de avidina-biotina
24 conjugada com peroxidase (ABC) utilizando o kit Isab-plus (DAKO, Carpinteria,
25 EUA). O complexo foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente do
26 laboratório (22°C à 25°C) e lavados com PBS da mesma maneira que
27 anteriormente.

28 A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB). Esse sistema
29 foi revelado, por 5 a 20 minutos, usando DAB (0,5mg/mL) e peróxido de
30 hidrogênio (H₂O₂) 0,05% à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Logo após,
31 os cortes foram lavados em água destilada, contra corados com hematoxilina
32 de Harris (HE) e montados com entelan.

33 As lâminas, nas quais foram realizadas a técnica de imunohistoquímica
34 para Gal-3, foram visualizadas e analisadas sob microscopia de luz comum, na
35 objetiva de 63x utilizando o microscópio Eclipse (Nikon, Berlim, Alemanha). A

1 presença de Gal-3 foi avaliada no citoplasma dos fibroblastos. A contagem de
2 células foi realizada em todos os campos. Com o auxílio de uma lâmina
3 micrometrada foi calculada a área de cada campo, sendo multiplicada pelo
4 número total de campos analisados para obter a área total analisada. Com o
5 número total de células imunomarcadas e com a área total analisada foi
6 calculada a densidade de células imunomarcadas, sendo expressa em número
7 de células por μm^2 .

8 9 *5.4 Determinação da porcentagem de colágeno*

10
11 Para a avaliação da determinação da porcentagem de colágeno na
12 musculatura intestinal, foram utilizadas lâminas coradas pelo picrosírius, sendo
13 analisados todos os campos onde foi possível observar musculatura. As
14 imagens foram capturas utilizando um microscópico de luz comum Axio 4.1
15 (Zeiss, Berlim, Alemanha), uma câmera capturadora de imagem AxioCam
16 (Zeiss, Berlim, Alemanha), um computador e o *software* Axiovision 4.8 (Zeiss,
17 Berlim, Alemanha). As imagens vistas no microscópio foram transmitidas ao
18 monitor do computador. Para esta análise foi utilizada a objetiva de 40x e um
19 filtro polarizador. Na imagem polarizada, o colágeno apresentou birrefringência
20 com coloração amarelada, avermelhada ou esverdeada, sendo quantificado de
21 forma semi-automática.

22 23 *5.5 Densidade de mastócitos*

24
25 Para a avaliação da densidade de mastócitos, foram utilizadas lâminas
26 coradas pela técnica de azul de toluidina. Os cortes foram desparafinados,
27 lavados em água destilada, corados com fucsina-laranja G, e rapidamente
28 imerso em álcool a 60%. Em seguida, as lâminas foram rapidamente imersas
29 em azul de toluidina e, em seguida, rapidamente lavadas com água corrente.
30 As imagens foram analisadas em um microscópico de luz comum (Nikon,
31 Berlim, Alemanha), com a objetiva de 40x.

32 A contagem de células foi realizada em todos os campos da lâmina.
33 Com o auxílio de uma lâmina micrometrada foi calculada a área de cada
34 campo, sendo multiplicada pelo número total de campos analisados para obter
35 a área total analisada. Com o número total de mastócitos e com a área total

1 analisada foi calculada a densidade de mastócitos, sendo expressa em número
2 de mastócitos por μm^2 .

3 4 5.6 Avaliação processos patológicos

5
6 As lâminas coradas pela HE foram desparafinadas em xilol, hidratadas
7 em uma bateria de concentração decrescente de álcool, hidratadas em água
8 destilada, coradas com Hematoxilina e posteriormente com Eosina,
9 desidratadas com álcool e novamente passadas no xilol para colagem da
10 lamínula. A avaliação foi feita em todos os campos do fragmento. Foram
11 avaliados como presente ou ausente os seguintes processos patológicos
12 gerais: ganglionite, miosite, congestão, hemorragia, degeneração e necrose,
13 sendo estabelecido um escore de 0 e 1, onde 0 corresponde à ausente e 1 à
14 presente.

15 As análises histoquímica e imunohistoquímica foram realizadas por
16 examinador calibrado e às cegas.

17 18 5.7 Análise estatística

19
20 A análise estatística foi realizada através dos softwares *GraphPad*
21 *Prism 5* (GraphPad, San Diego, Califórnia, USA) e *BioEstat 5.0* (BioEstat,
22 Manaus, Brasil). O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para a avaliação da
23 normalidade. Nos casos de distribuição normal foi utilizado o teste *ANOVA* e
24 nos casos de distribuição não normal foi utilizado o teste *Kruskall Wallis*. Para
25 comparação entre gêneros utilizou-se o teste qui-quadrado. Para a avaliação
26 da presença de processos patológicos gerais utilizou-se o teste exato de
27 Fisher. Para as correlações utilizou-se o teste de correlação de *Spearman*. O
28 nível de significância assumido foi de 5% ($\alpha < 0,05$).

29 30 6 RESULTADOS

31
32 Ao avaliar os indivíduos dos três grupos não houve diferença
33 significativa em relação à idade e ao gênero, demonstrando distribuição
34 homogênea (Tabela 1).

1 Tabela 1 – Distribuição de idade e gênero dos indivíduos dos grupos chagásicos com lesão de
2 mucosa, chagásicos com mucosa íntegra e não chagásicos

	CLM (n=13)	CMI (n=12)	N (n=10)
Idade (Mediana) (máx-min) ^a	67 (85-44)	66 (82-54)	69 (80-56)
Gênero (M:F) ^b	4:9	4:8	6:4

Legenda: CLM chagásico com lesão de mucosa; CMI chagásico com mucosa íntegra; N não chagásico sem lesão de mucosa.

Letras iguais significam diferença estatística.

^a Teste ANOVA, $F = 0,8458$; $p > 0,050$;

^b Teste qui-quadrado, $\chi^2 = 2350,2$; $p = 0,309$.

3

4 Os pacientes chagásicos (CLM+CMI) apresentavam densidade
5 significativamente maior de células imunomarcadas por anti-galectina-3,
6 quando comparados aos não chagásicos ($p=0,003$) (Tabela 2).

7 A densidade das células imunomarcadas por anti-galectina-3 foi
8 significativamente maior no grupo CMI quando comparado ao grupo N ($p =$
9 $0,032$) (Figura 1C e 1D) (Tabela 2).

10 Ao comparar a densidade de mastócitos, não houve diferença
11 significativa entre os três grupos (Tabela 2) (Figuras 1A; 1B).

12 Os pacientes chagásicos (CLM+CMI) apresentavam porcentagem de
13 colágeno significativamente maior que os pacientes não chagásicos ($p=0,002$)
14 (Tabela 2).

15 A porcentagem de colágeno foi significativamente maior no grupo CMI
16 quando comparado ao grupo CLM e ao grupo N ($p < 0,0001$). O grupo CLM
17 apresentou porcentagem de colágeno significativamente maior que o grupo N
18 ($p < 0,0001$) (Tabela 2) (Figuras 2E; 2F; 2G; 2H).

19

20 Tabela 2 – Densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3, densidade de mastócitos
21 e porcentagem de colágeno entre os grupos chagásicos com lesão de mucosa, chagásicos
22 com mucosa íntegra e não chagásicos

	CLM (n=13)	CMI (n=12)	N (n=10)
	Mediana (máx-min)	Mediana (máx-min)	Mediana (máx-min)
Gal-3 (n° céls./ μm^2)	0,0025 (0,0909-0,0000)	0,0250 (0,0200-0,0000) ^a	0,0000 (0,0072-0,0000) ^a
Mastócitos ^b (n° céls./ μm^2)	0,0004 (0,0013-0,0000)	0,0004 (0,0033-0,0000)	0,0001 (0,0024-0,0000)
Colágeno (%)	0,3933 (1,2660-0,1373) ^{c,d}	0,7563 (1,0610-0,1477) ^{c,e}	0,1183 (0,4200-0,0159) ^{d,e}

Legenda: CLM chagásico com lesão de mucosa; CMI chagásico com mucosa íntegra; N não chagásico sem lesão de mucosa.

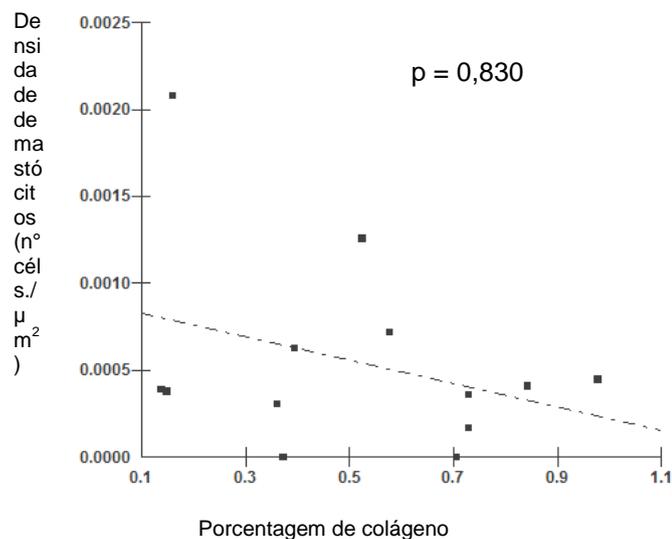
Letras iguais significam diferença estatística.

^a Teste *Kruskal Wallis*, $K = 6,9$; $p = 0,032$;

^b Teste *Kruskal Wallis*, $K = 1,061$; $p = 0,588$;

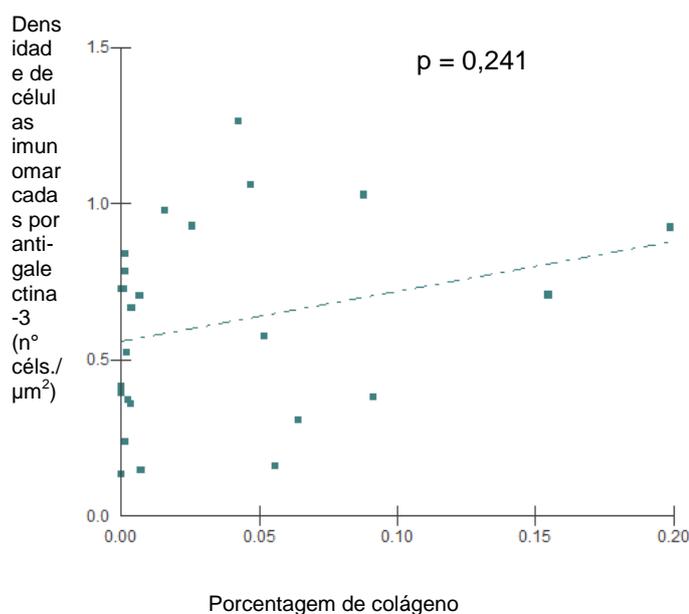
^{c,d,e} Teste *Kruskal Wallis*, $K = 92,89$; $p < 0,0001$.

1 Nos pacientes chagásicos não houve correlação significativa entre a
 2 densidade de mastócitos e a porcentagem de colágeno (CLM e CMI) (Gráfico
 3 1).



4
 5
 6 Gráfico 1: Correlação entre a densidade de mastócitos e a porcentagem de colágeno nos
 7 pacientes chagásicos (chagásicos com lesão de mucosa e chagásicos com mucosa íntegra).
 8 Coeficiente de *Spearman* (r_s) = -0,066; $p=0,830$.

9
 10 Nos pacientes chagásicos (CLM+CMI) não houve correlação
 11 significativa entre a porcentagem de colágeno e a densidade de células
 12 imunomarcadas por anti-galectina-3 (Gráfico 2).



14
 15
 16
 17 Gráfico 2: Correlação entre densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3 e a
 18 porcentagem de colágeno nos pacientes chagásicos (chagásicos com lesão de mucosa e
 19 chagásicos com mucosa íntegra). Coeficiente de *Spearman* (r_s)=0,243; $p=0,241$.

O grupo CLM apresentou presença significativamente maior de miosite ($p=0,025$) (Figura 2A) e de ganglionite ($p=0,039$) (Figura 2B) quando comparado aos demais grupos. Não houve diferença significativa em relação à degeneração, necrose, congestão e hemorragia entre os grupos (Tabela 3).

Ao comparar os indivíduos chagásicos (CMI + CLM), com os indivíduos não chagásicos (N), observou-se que os chagásicos apresentavam maior presença de miosite ($p=0,027$) e de ganglionite ($p=0,014$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos processos patológicos gerais nos grupos chagásicos com lesão de mucosa, chagásicos com mucosa íntegra e não chagásicos

	CLM n=13 (100%)	CMI n=12 (100%)	N n=10 (100%)
Congestão ^a	6 (46,15%)	10 (83,33%)	6 (60%)
Hemorragia ^b	0 (0%)	2 (16,67%)	1 (10%)
Degeneração ^c	3 (23,08%)	4 (33,33%)	2 (20%)
Necrose ^d	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)
Miosite* ^e	10 (76,92%)	6 (50%)	2 (20%)
Ganglionite* ^f	6 (46,15%)	5 (41,67%)	0 (0%)

Legenda: CLM chagásico com lesão de mucosa; CMI chagásico com mucosa íntegra; N não chagásico sem lesão de mucosa.

* indica diferença estatística

^a Teste qui-quadrado $\chi^2 = 3.744,2$; $p=0,153$;

^b Teste exato de Fisher (CLM+CMI x N); $p=1$;

^c Teste qui-quadrado $\chi^2 = 0.582$; $p= 0,747$;

^d Teste exato de Fisher (CLM+CMI x N); $p=1$;

^e Teste qui-quadrado $\chi^2 = 7.347,2$; $p= 0,025$;

^f Teste qui-quadrado $\chi^2 = 6.475,2$; $p= 0,039$.

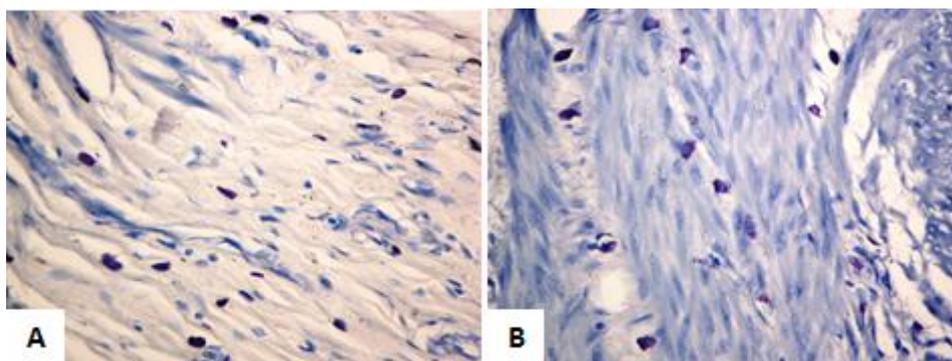
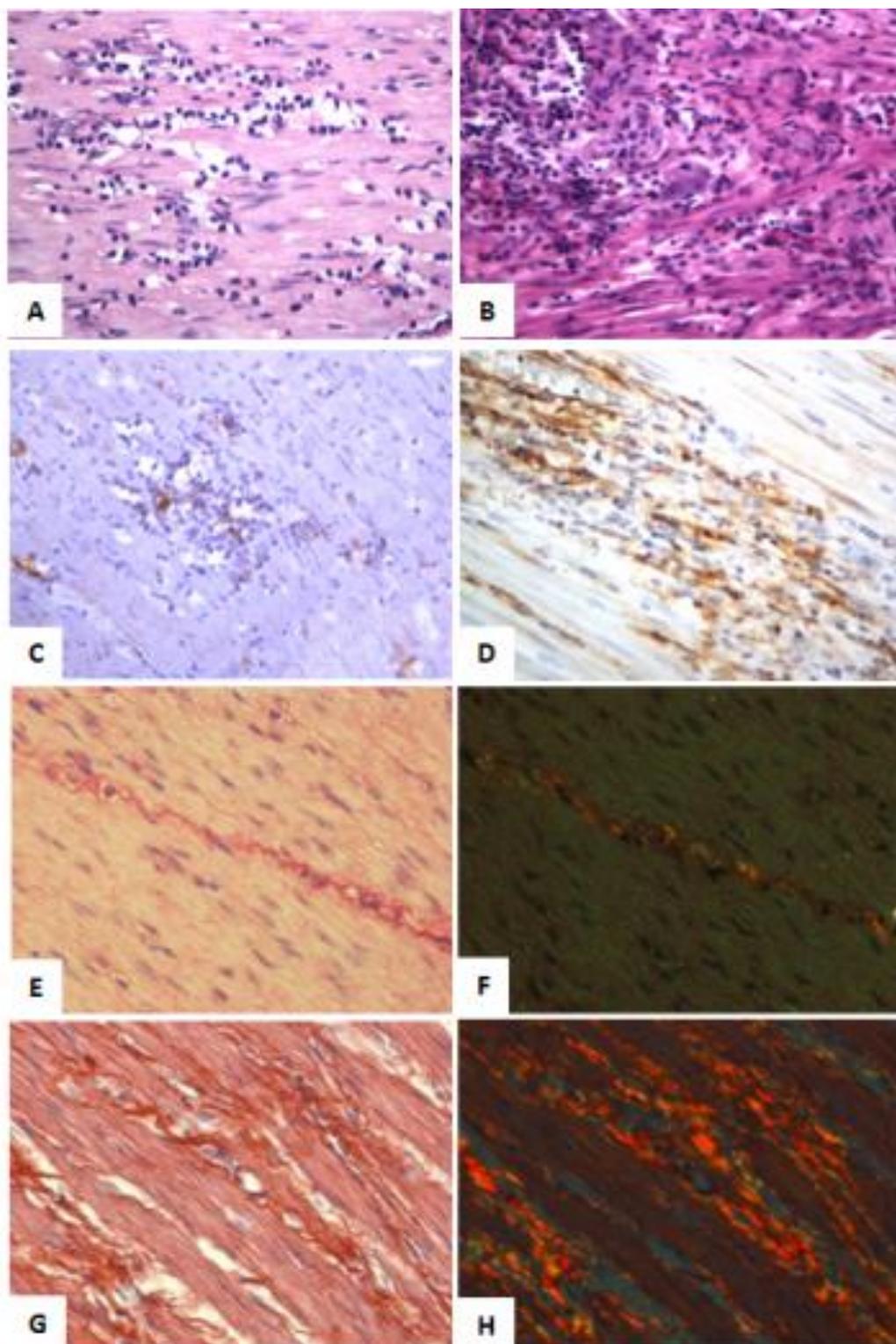


Figura 1: Mastócitos na camada muscular própria do cólon de pacientes dos grupos CLM e CMI. A – Mastócitos no grupo CLM (Azul de toluidina, 400x); B – Mastócitos no grupo CLM (Azul de toluidina, 400x).



1
 2 Figura 2: Miosite, ganglionite, expressão de Gal-3 e fibrose na camada muscular própria do
 3 cólon de pacientes dos grupos CLM, CMI e N. A – Miosite no grupo CLM (HE, 400x); B –
 4 Ganglionite no grupo CLM (HE, 400x); C – Expressão discreta de Gal-3
 5 (Imunohistoquímica, 400x) no grupo CLM; D – Expressão acentuada de Gal-3
 6 (Imunohistoquímica, 400x) no grupo CMI; E – Fibrose discreta no grupo CLM (Picrosírius,
 7 1600x); F – Fibrose discreta no grupo CLM (Picrosírius, imagem polarizada, 1600x); G –
 8 Fibrose acentuada no grupo CMI (Picrosírius, 1600x); H – Fibrose acentuada no grupo CMI
 9 (Picrosírius; imagem polarizada, 1600x).

10
11

7 DISCUSSÃO

Estudos realizados em biópsia demonstraram aumento de Gal-3 em carcinomas de língua (HONJO et al., 2000), carcinoma de nasofaringe (TAGLIARINI et al., 2011), de próstata (ARAÚJO-FILHO et al., 2006) e de tireoide (XU; EL-NAGGAR; LOTAN, 1995). Além de efeitos locais, já foi demonstrado na literatura aumento dos níveis séricos de Gal-3 em tumores de mama, de pulmão, de ovário, do sistema gastrointestinal, em linfoma não Hodgkin e em melanomas (IURISCI et al., 2000), sugerindo que esta proteína possua também uma ação sistêmica sobre a progressão dos tumores (BINH et al., 2013). No presente estudo, os pacientes chagásicos apresentavam densidade significativamente maior de células imunomarcadas por anti-galectina-3, quando comparados aos não-chagásicos, provavelmente em decorrência do quadro inflamatório local.

Sabe-se que Gal-3 apresenta papel importante no comportamento da doença inflamatória intestinal (LIPPERT et al., 2008), sendo importante para a migração de fibroblastos com consequente fibrose nessas áreas (LIU et al., 1995). Ao contrário do que se esperava, a densidade de células imunomarcadas por anti-galectina-3 não foi maior nos pacientes que apresentavam lesão de mucosa, sugerindo que nas áreas de lesão de mucosa, embora provavelmente existissem outros fatores fibrogênicos, não existia quantidade suficiente de Gal-3 para colaborar no processo de fibrogênese.

O fato de ter sido encontrada maior densidade de Gal-3 nos pacientes chagásicos com mucosa íntegra, quando comparados aos pacientes do grupo N, demonstra que os pacientes chagásicos, mesmo que não apresentem lesão clínica ao exame de colonoscopia, deveriam ser acompanhados periodicamente no sentido de prevenir o desenvolvimento de neoplasia de cólon.

Alguns estudos demonstraram maior densidade de mastócitos na DC, tanto na fase aguda em camundongos, como na fase crônica em humanos. Na fase crônica em humanos, alguns estudos realizados através de autópsias demonstraram maior densidade de mastócitos no coração (ALMEIDA; PEREIRA; TAFURI, 1975). Estudos realizados através de biópsias também demonstraram maior densidade de mastócitos na musculatura do esôfago (PEREIRA, 1972) e na musculatura intestinal (TAFURI, 1971; PINHEIRO et al.,

1 2003; DA SILVEIRA et al., 2007; MARTINS et al., 2015). Entretanto, no
2 presente estudo não houve diferença estatística em relação à densidade de
3 mastócitos entre os três grupos avaliados. Nossos achados estão de acordo
4 com um estudo onde não foi observado um aumento significativo de mastócitos
5 em pacientes com megaesôfago chagásico (PINHEIRO et al., 2003) e com
6 outro estudo onde os autores não encontraram diferença estatística com
7 relação à densidade de mastócitos na língua entre indivíduos chagásicos e não
8 chagásicos (LIMA PEREIRA et al., 2007).

9 Sabe-se que o *T. cruzi* pode ser o responsável direto ou indireto de
10 alterações moleculares em diferentes tecidos e órgãos, podendo induzir lesões
11 celulares, resposta inflamatória e fibrose (MACEDO & PENA, 1998). A fibrose
12 na DC acontece de forma lenta e progressiva por substituição de miocélulas
13 por áreas irregulares de neoformação colágena (ANDRADE, 1999). No
14 presente estudo a porcentagem de colágeno foi significativamente maior no
15 grupo CMI quando comparado ao grupo CLM e ao grupo N. O grupo CLM
16 apresentou porcentagem de colágeno significativamente maior que o grupo N.
17 O fato dos grupos de pacientes chagásicos pertencentes aos grupos CMI e
18 CLM terem apresentado maior porcentagem de colágeno quando comparados
19 aos pacientes do grupo N está de acordo com a literatura (MACHADO et al.,
20 2012b). Além disso, sabe-se que durante inflamação existe liberação de
21 substâncias que apresentam ação lítica, como metaloproteinases tipo 2,
22 enzimas proteolíticas que estão envolvidas na lise do colágeno (IKEBE et al.,
23 1999; KOYAMA et al., 2000), o que talvez justifique o fato do grupo CLM ter
24 apresentado menor porcentagem de colágeno que o grupo CMI.

25 Estudos em autópsias mostraram que os mastócitos estão
26 relacionados à fibrose em vários locais na DC, como no miocárdio (ROLDÃO et
27 al., 2012), em linfomas (FUKUSHIMA et al., 2006), na língua (LIMA PEREIRA
28 et al., 2007) e na musculatura intestinal (PINHEIRO et al., 2003). Entretanto, no
29 presente estudo não houve correlação significativa entre a densidade de
30 mastócitos e a porcentagem de colágeno no grupo dos chagásicos, CLM e
31 CMI, tanto na análise isolada de cada grupo como quando analisamos
32 conjuntamente os dois grupos.

33 A Gal-3 promove fibrose por meio do aumento da ativação da via de
34 sinalização do fator de crescimento transformador beta/Smad-3 (TGF-beta/
35 Smad-3) (PSARRAS et al., 2011). Já foi demonstrado que o aumento de Gal-3

1 está associado com aumento de fibrose na cirrose hepática (OLIVEIRA et al.,
2 2012) e que a infusão da Gal-3 em fibroblastos cardíacos de camundongos
3 sadios ocasionou aumento na proliferação fibroblástica e produção de colágeno
4 (SHARMA et al., 2004). No presente estudo não houve correlação significativa
5 entre a porcentagem de colágeno e a densidade de células imunomarcadas por
6 anti-galectina-3 nos pacientes chagásicos, sugerindo que a Gal-3 não exerceu
7 atividade relevante na fibrogênese.

8 As alterações mais frequentes no MC são ganglionite, periganglionite,
9 neurite, perineurite, desnervação e fenômenos degenerativos dos neurônios
10 (PINHEIRO et al., 2003), o que corrobora os achados do presente estudo pois
11 os chagásicos (CLM e CMI) possuíam presença significativamente maior de
12 ganglionite e miosite, quando comparados aos não chagásicos (N). Quando
13 realizou-se a comparação entre os três grupos observou-se que o grupo CLM
14 possuía presença significativamente maior de ganglionite e de miosite, quando
15 comparado aos demais grupos. Os pacientes do grupo CLM apresentam DC e
16 também lesão de mucosa, a qual poderia estar intensificando o quadro
17 inflamatório nos gânglios e músculos.

18

19 8 CONCLUSÃO

20 Acreditamos que a Gal-3 está associada ao quadro inflamatório
21 intestinal dos pacientes chagásicos que apresentaram densidade
22 significativamente maior de células imunomarcadas por anti-galectina-3. No
23 entanto, novos estudos deverão ser realizados com intuito de compreender
24 melhor o papel dessa galectina no megacólon chagásico.
25

26 REFERÊNCIAS

- 27 ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V. et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival
28 and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during
29 *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 493-
30 502, 2004.
- 31 ADAD, S. J. et al. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do
32 megaesôfago chagásico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São**
33 **Paulo**, v. 33, n. 6, p. 443-50, 1991.
- 34 ADAD, S. J.; SILVA, G. B.; JAMMAL, A. A. The significantly reduced number of
35 interstitial cells of Cajal in chagasic megacolon (CM) patients might contribute to
36 the pathophysiology of CM. **Virchows Archive**, v. 461, n. 4, p. 385-392, 2012.

- 1 ALMEIDA, H. O.; PEREIRA, F. E. L.; TAFURI, W. L. Estudo quantitativo dos
2 mastócitos na cardiopatia chagásica crônica. **Revista do Instituto de**
3 **Medicina Tropical de São Paulo**, v. 17, n. 1, p. 5-9, 1975.
- 4 ALMEIDA, E. A. et al. Evolução fatal da co-infecção doença de Chagas/Aids:
5 dificuldades diagnósticas entre a reagudização da miocardite e a
6 miocardopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de**
7 **Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 199-202, 2009.
- 8 ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Memorias do Instituto**
9 **Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 71-80, 1999.
- 10 ARAÚJO-FILHO, J. L. S. et al. Galectin-3 in prostatic tumours:
11 immunohistochemistry and digital image analysis. **Jornal Brasileiro de**
12 **Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 6, p. 469-475, 2006.
- 13 BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V. Colonic diverticular disease: abnormalities of
14 neuromuscular function. **Digestive Diseases**, v. 30, n. 1, p. 24-28, 2012.
- 15 BERTON, A. et al. Activation of fibroblasts in collagen lattices by mast cell
16 extract: a model of fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 4, p.
17 485-492, 2000.
- 18 BINH, N. H. et al. Galectin-3 in preneoplastic lesions of glioma. **Journal of**
19 **Neuro-Oncology**, v. 111, n. 2, p. 123-132, 2013.
- 20 BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. IN: DIAS, CP;
21 COURA, R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **FIOCRUZ**, p. 23-31,
22 1997.
- 23 CALIFICE, S. et al. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor
24 suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-
25 3. **Oncogene**, v. 23, n. 45, p. 7527-7536, 2004.
- 26 CÔBO, E. C. et al. Research on *Trypanosoma cruzi* and Analysis of
27 Inflammatory Infiltrate in Esophagus and Colon from Chronic Chagasic Patients
28 with and without Mega. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.
- 29 CORTEZ, J. et al. A Expressão Global da Doença de Chagas-Oportunidades
30 Emergentes e Impacto em Portugal. **Acta Medica Portuguesa**, v. 25, n. 5,
31 2012.
- 32 COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, n.
33 1, p. 30-33, 2003.
- 34 COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and
35 what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira**
36 **de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.
- 37 COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The
38 vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do**
39 **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

- 1 CREMA, E. et al. Prevalence of cholelithiasis in patients with chagasic
2 megaesophagus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.
3 44, n. 3, p. 324-326, 2011.
- 4 DAGHER, S. F.; WANG, J. L.; PATTERSON, R. J. Identification of galectin-3 as
5 a factor in pre-mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of**
6 **Sciences**, v. 92, n. 4, p. 1213-1217, 1995.
- 7 DAVIDSON, P. J. et al. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and
8 cytoplasm. **Glycobiology**, v. 12, n. 5, p. 329-337, 2002.
- 9 DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of
10 inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human Pathology**, v. 38, n.
11 8, p. 1256-1264, 2007.
- 12 DIAS, E.; LARANJA, F. S.; NOBREGA, G. Doença de Chagas. **Memórias do**
13 **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 43, n. 3, p. 495-581, 1945.
- 14 DIAS, J. C. P. Tropical Diseases and the Gender Approach. **Bulletin of PAHO**,
15 v. 30, n. 3, p. 242-260, 1996.
- 16 DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas:**
17 **uma abordagem prática para o clínico geral**. SciELO-Editora FIOCRUZ,
18 1997.
- 19 DIOGO-FILHO, A. et al. Úlceras em megacólons chagásicos operados na
20 urgência e eletivamente. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo , v.
21 43, n. 4, p. 280-283, 2006.
- 22 DOGGRELL, S. A.; WANSTALL, J. C. Vascular chymase: pathophysiological
23 role and therapeutic potential of inhibition. **Cardiovascular Research**, v. 61, n.
24 4, p. 653-662, 2004.
- 25 DUBNER, S. et al. Chagas disease: state-of-the-art of diagnosis and
26 management. **Cardiology Journal**, v. 15, n. 6, p. 493-504, 2008.
- 27 FARAHANI, S. S.; NAVABAZAM, A.; ASHKEVARI, F. S. Comparison of mast
28 cells count in oral reactive lesions. **Pathology-Research and Practice**, v. 206,
29 n. 3, p. 151-155, 2010.
- 30 FERRAO, A. V.; MASON, R. M. The effect of heparin on cell proliferation and
31 type-I collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. **Biochimica et**
32 **Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1180, n. 3, p. 225-
33 230, 1993.
- 34 FLOTTE, T. J.; SPRINGER, T. A.; THORBECKE, G. J. Dendritic cell and
35 macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal
36 sheets. **The American Journal of Pathology**, v. 111, n. 1, p. 112, 1983.
- 37 FUKUSHIMA, H. et al. Mast cells in diffuse large B-cell lymphoma; their role in
38 fibrosis. **Histopathology**, v. 49, n. 5, p. 498-505, 2006.

- 1 GARBUZENKO, E. et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation,
2 collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin
3 fibrosis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 32, n. 2, p. 237-246, 2002.
- 4 GARCIA, S. B. et al. A retrospective study of histopathological findings in 894
5 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic
6 cancer?. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2,
7 p. 91-93, 2003.
- 8 GARCIA, S. B. Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade
9 do pensamento do seu descobridor. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n.
10 4, p. 249-251, 2009.
- 11 GASCON, J; BERN, C; PINAZO, M. Chagas disease in Spain, the United
12 States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1, p. 22-27,
13 2010.
- 14 GONG, H. C. et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular
15 compartmentalization and functions in cancer cells. **Cancer Research**, v. 59, n.
16 24, p. 6239-6245, 1999.
- 17 HENDERSON, N. C. et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and
18 hepatic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the
19 United States of America**, v. 103, n. 13, p. 5060-5065, 2006.
- 20 HENDERSON, N. C.; FORBES, S. J. Hepatic fibrogenesis: from within and
21 outwith. **Toxicology**, v. 254, n. 3, p. 130-135, 2008.
- 22 HILL, M. et al. A novel clinically relevant animal model for studying galectin-3
23 and its ligands during colon carcinogenesis. **Journal of Histochemistry &
24 Cytochemistry**, v. 58, n. 6, p. 553-565, 2010.
- 25 HONJO, Y. et al. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in
26 tongue carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 12, p. 4635-4640, 2000.
- 27 IKEBE, T. et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor
28 tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. **Clinical &
29 Experimental Metastasis**, v. 17, n. 4, p. 315-322, 1999.
- 30 IURISCI, I. et al. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and
31 cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. 1389-1393, 2000.
- 32 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro:
33 Guanabara Koogan, 524p, 2008.
- 34 KADROFSKE, M. M.; OPENO, K. P.; WANG, J. L. The HumanLGALS3
35 (Galectin-3) Gene: Determination of the Gene Structure and Functional
36 Characterization of the Promoter. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,
37 v. 349, n. 1, p. 7-20, 1998.
- 38 KIRSHENBAUM, A. Regulation of mast cell number and function.
39 **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 14, n. 3, p. 497-516,
40 2000.

- 1 KLESHCHENKO, Y. Y. et al. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi*
2 adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infection and**
3 **Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6717-6721, 2004.
- 4 KOYAMA, H. et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and-9 in
5 oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. **European Journal**
6 **of Cancer**, v. 36, n. 16, p. 2164-2170, 2000.
- 7 KUKLINSKI, S. et al. Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell
8 lines. **Journal of Neuroscience Research**, v. 60, n. 1, p. 45-57, 2000.
- 9 LEAO, E. P. et al. Intervenção fisioterapêutica associada ao uso de coquetel de
10 frutas no tratamento do megacólon chagásico. (Physical therapy combined with
11 a laxative fruit drink for treatment of chagasic megacolon.) **Arquivos de**
12 **Gastroenterologia**, v. 48, n. 1, p. 52-57, 2011.
- 13 LIMA PEREIRA, S. A. et al. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in
14 the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. **Medecine et Maladies**
15 **Infectieuses**, v. 37, n. 4, p. 229-233, 2007.
- 16 LIPPERT, E. et al. Regulation of galectin-3 function in mucosal fibroblasts:
17 potential role in mucosal inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**,
18 v. 152, n. 2, p. 285-297, 2008.
- 19 LIU, F. T. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-
20 binding lectin, in human monocytes and macrophages. **The American Journal**
21 **of Pathology**, v. 147, n. 4, p. 1016, 1995.
- 22 LOPES, E. R. et al. In: BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia**. 6
23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1165-1275, 2000.
- 24 MACHADO, F. S. et al. Chagas heart disease: report on recent developments.
25 **Cardiology in Review**, v. 20, n. 2, p. 53, 2012a.
- 26 _____ Current understanding of immunity to *Trypanosoma*
27 *cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. In: **Seminars in**
28 **Immunopathology**. Springer-Verlag, v.34, p. 753-770. 2012b.
- 29 _____ Recruitment of galectin-3 during cell invasion and
30 intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes.
31 **Glycobiology**, v. 24, n. 2, p. 179-184, 2014.
- 32 MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*:
33 implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**, v.
34 14, n. 3, p. 119-124, 1998.
- 35 MARTINS, L. et al. Polymorphism on codon 98 of the galectin-3 gene are not
36 associated to benign and malignant thyroid tumors. **Arquivos Brasileiros de**
37 **Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1075-1081, 2006.
- 38 MARTINS, P. R. al. Mast cells in the colon of *Trypanosoma cruzi*-infected
39 patients: are they involved in the recruitment, survival and/or activation of
40 eosinophils? **Parasitology Research**, v. 114, n. 5, p. 1847-1856, 2015.

- 1 MELO, F. H. M. **Exploração funcional do processo de glicosilação**
2 **aberrante em tumores: mecanismos envolvidos na atividade pró-**
3 **migratória de galectina-3.** 169p. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina -
4 Universidade de São Paulo. 2005
- 5 MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that
6 *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by
7 human galectin-3. **FEBS Letters**, v. 470, n. 3, p. 305-308, 2000.
- 8 MOON, T. C. et al. Advances in mast cell biology: new understanding of
9 heterogeneity and function. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 2, p. 111-128, 2010.
- 10 MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact
11 with different structures on the surface of HeLa cells. **Experimental**
12 **Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 1-14, 1991.
- 13 NAKAHARA, S. et al. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-
14 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39649-39659, 2006.
- 15 NEWTON-NORTHUP, J. R. et al. Inhibition of metastatic tumor formation in vivo
16 by a bacteriophage display-derived galectin-3 targeting peptide. **Clinical &**
17 **Experimental Metastasis**, v. 30, n. 2, p. 119-132, 2013.
- 18 OCHIENG, J. et al. Galectin-3 is a novel substrate for human matrix
19 metalloproteinases-2 and-9. **Biochemistry**, v. 33, n. 47, p. 14109-14114, 1994.
- 20 OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-
21 3. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 527-535, 2004.
- 22 OLIVEIRA, S. A. et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after
23 cell therapy in a mouse model of cirrhosis. **Cytotherapy**, v. 14, n. 3, p. 339-349,
24 2012.
- 25 OLIVEIRA, D. H. I. P. et al. Expressão de galectinas em carcinoma
26 epidermóide oral. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 1, supl. 0, Porto Alegre,
27 2013.
- 28 PARON, I. et al. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a
29 role in transcriptional regulation. **Biochemical and Biophysical Research**
30 **Communications**, v. 302, n. 3, p. 545-553, 2003.
- 31 PEREIRA, F. E. L. Estudo quantitativo dos mastócitos na musculatura do
32 esôfago de chagásicos crônicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**
33 **de São Paulo**, v. 14, p. 30-32, 1972.
- 34 PEREIRA, J. X. et al. The deficiency of galectin-3 in stromal cells leads to
35 enhanced tumor growth and bone marrow metastasis. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1,
36 p. 636, 2016.
- 37 PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators
38 of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of Molecular**
39 **Medicine**, v. 76, n. 6, p. 402-412, 1998.

- 1 PINHEIRO, S. W. et al. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count
2 in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without
3 megacolon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.
4 4, p. 461-466, 2003.
- 5 POOLE, T. J.; ZETTER, B. R. Stimulation of rat peritoneal mast cell migration
6 by tumor-derived peptides. **Cancer Research**, v. 43, n. 12 Part 1, p. 5857-
7 5861, 1983.
- 8 PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas
9 crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da
10 polimerase. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003.
- 11 POVEGLIANO, L. Z. et al. Immunoexpression of galectin-3 in colorectal cancer
12 and its relationship with survival. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 42, n.
13 4, p. 217-221, 2011.
- 14 PSARRAS, S. et al. Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a
15 genetic heart failure model. **European Heart Journal**, p. ehr119, 2011.
- 16 RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723,
17 p. 1388-1402, 2010.
- 18 RECH, R. R.; GRAÇA, D. L. Mastócitos em condições normais e patológicas -
19 revisão. **Veterinária Notícias**. Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 51-60, 2006.
- 20 ROLDÃO, J. A. et al. Comparison between the collagen intensity and mast cell
21 density in the lingual muscles and myocardium of autopsied chronic chagasic
22 and nonchagasic patients. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 647-654,
23 2012.
- 24 SANTOS JÚNIOR, J. C. M.. Megacólon-parte II: Doença de chagas. **Revista**
25 **Brasileira Colo-Proctologia**. v. 22, n. 4, p. 266-277, 2002.
- 26 SHARMA, U. C. et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone
27 hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. **Circulation**, v.
28 110, n. 19, p. 3121-3128, 2004.
- 29 SHIMURA, T. et al. Circulating galectin-3 correlates with angiogenetic factors,
30 indicators of nutritional condition and systemic inflammation in patients with
31 thyroid cancer. **Annals of Cancer Research and Therapy**, v. 24, n. 1, p. 35-
32 40, 2016.
- 33 SILVA, A. A. **Impacto da galectina-3 no curso da infecção experimental por**
34 ***Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Universidade
35 Federal de Uberlândia. 104f. Uberlândia, 2015.
- 36 SOUZA, M. M. et al. *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system
37 pathology in experimental Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo**
38 **Cruz**, vol. 91, p. 217- 224, 1996.
- 39 SUZUKI, O.; ABE, M. Cell surface N-glycosylation and sialylation regulate
40 galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell
41 lymphoma. **Oncology Reports**, v. 19, n. 3, p. 743-748, 2008.

- 1 TAFURI, W. L. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous
2 system in experimental and human American trypanosomiasis. **Virchows**
3 **Archiv**, v. 354, n. 2, p. 136-149, 1971.
- 4 TAGLIARINI, J. et al. Carcinoma de nasofaringe: análise da importância
5 prognóstica da imunexpressão da galectina-3 e proteínas de matriz. **Revista**
6 **Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço**, v. 40, n. 3, 2011.
- 7 TRUONG, M. J. et al. IgE-binding molecules (Mac-2/εBP) expressed by human
8 eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. **European**
9 **Journal of Immunology**, v. 23, n. 12, p. 3230-3235, 1993.
- 10 VILELA, J. E. R. **Relação da angiogênese e da densidade de mastócitos**
11 **com a fibrose miocárdica em idosos com cardiopatia chagásica crônica.**
12 Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) Universidade
13 Federal de Goiás. 49f. Goiania. 2016.
- 14 VILLA-VERDE, D. M. S. et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent
15 thymocyte interactions with the thymic microenvironment. **European Journal of**
16 **Immunology**, v. 32, n. 5, p. 1434-1444, 2002
- 17 VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Host-cell invasion by *Trypanosoma cruzi*:
18 Role of cell surface galactose residues. **Biochemical and Biophysical**
19 **Research Communications**, v. 119, n. 1, p. 228-235, 1984.
- 20 VRAY, B. et al. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma*
21 *cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic
22 cells. **Glycobiology**, v. 14, n. 7, p. 647-657, 2004.
- 23 WAGHABI, M. C. et al. Activation of transforming growth factor β by
24 *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 511-517, 2005.
- 25 XU, X. C.; EL-NAGGAR, A. K.; LOTAN, R. Differential expression of galectin-1
26 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. **The**
27 **American Journal of Pathology**, v. 147, n. 3, p. 815, 1995.
- 28 YAMAOKA, A. et al. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates
29 superoxide production by neutrophils. **The Journal of Immunology**, v. 154, n.
30 7, p. 3479-3487, 1995.
- 31 YAMASHITA, Y. et al. Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular
32 cells. **Thorax**, v. 47, n. 8, p. 634-639, 1992.

33

34

35

36

37

38

1 ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MALIGNIDADE EM LESÕES DE MEGACÓLON E MEGAESÓFAGO DE PACIENTES CHAGÁSICOS

Pesquisador: SanVla Aparecida de Lima Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22725013.4.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Sociedade Educacional Uberabense

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 735.931

Data da Relatoria: 25/06/2014

Apresentação do Projeto:

OK

Objetivo da Pesquisa:

OK

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

OK

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

OK

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Situação do Parecer:

Aprovado

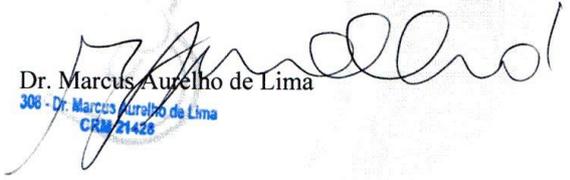
Endereço: Rua Madre Maria José, 122
Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
UF: MG Município: UBERABA
Telefone: (34)3318-5778 Fax: (34)3318-5778 E-mail: cep@pescpg.ufim.edu.br

1 ANEXO B – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA

Declaro que, estou de acordo com a realização da pesquisa científica das acadêmicas (os) NATÁLIA BIAGIONI DE LIMA e MARIA VITORIA MATTAR MARTELETO do Curso de MEDICINA da Universidade de UBERABA que serão realizadas com os materiais disponibilizados pelo Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia Ltda de Uberaba-MG – PATMED.

Uberaba, 04 de junho de 2014


Dr. Marcus Aurélio de Lima

308 - Dr. Marcus Aurélio de Lima
CRM 21428

PATMED
Anatomia Patológica e Citologia
(34) 3318-9888