

Marcelo Maia Caixeta de Melo

Doença de Chagas e Carcinogênese:
Influência do Interferon- γ e GBP-2

São José do Rio Preto

2014

Marcelo Maia Caixeta de Melo

Doença de Chagas e Carcinogênese:

Influência do Interferon- γ e GBP-2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto como requisito para obtenção do título de Doutor. Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

Co-Orientador: Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

São José do Rio Preto

2014

Ficha Catalográfica

Melo, Marcelo Maia Caixeta de

Doença de Chagas e carcinogênese: influência do interferon- γ e GBP-2/

Marcelo Maia Caixeta de Melo. São José do Rio Preto, 2014,
85 p.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

Co-Orientador: Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

1. Câncer; 2. Megacólon Chagásico ; 3. Megaesôfago Chagásico
4. Imunoistoquímica

Marcelo Maia Caixeta de Melo

Doença de Chagas e Carcinogênese:

Influência do Interferon- γ e GBP-2

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

2° Examinador: Prof. Dr. Vicente de Paula Antunes Teixeira

3° Examinador: Profa. Dra. Adilha Misson Rua Micheletti

4° Examinador: Profa. Dra. Patrícia da Silva Fucuta

5° Examinador: Profa. Dra. Maria Alice Sperto Ferreira Baptista

Suplentes: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga

São José do Rio Preto, 27/06/2014

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas e Quadros.....	x
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xii
Resumo	xv
Abstract.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Objetivo.....	24
2- MATERIAL E MÉTODO.....	25
2.1- Material.....	25
2.2- Método.....	25
2.3-Análise Estatística.....	29
3- RESULTADOS.....	31
3.1- Análise Geral.....	31
3.2- Análise de Associação.....	40
4- DISCUSSÃO.....	58
5- CONCLUSÕES.....	63
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
APÊNDICES.....	84
ANEXOS.....	85

*À minha esposa Ana Margarida, pelo amor,
dedicação e incentivo.*

*Ao meu filho Pedro, pela amizade,
convívio e estímulo*

*Ao meu pai João,
reconhecimento e eterna gratidão pelos
princípios que norteiam minha vida.*

*À minha mãe Anna Maria,
pelo carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), pela orientação, dedicação na análise imunoistoquímica, paciência e incentivo.

À Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas, do Departamento de Ciências Biológicas - UNIFESP – Diadema, pela orientação, dedicação e incentivo.

Aos Profs. Drs. Vicente de Paula Antunes Teixeira, Adilha Misson Rua Micheletti, Patricia da Silva Fucuta e Maria Alice Sperto Ferreira Baptista, membros da banca examinadora, pelas importantes sugestões e críticas.

Aos Profs. Drs. João Gomes Netinho e Aldenis Albanesi Borin, membros da banca examinadora, pelos comentários e sugestões.

À Profa. Dra. Patricia da Silva Fucuta do Departamento de Medicina II da FAMERP, pela orientação na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Aldenis Albanesi Borin do Departamento de Cirurgia da FAMERP, pelo estímulo e apoio.

Ao Prof. Dr. Eumildo de Campos Junior do Departamento de Cirurgia da FAMERP, pelo incentivo e colaboração.

À Profa. Dra. Adilha Misson Rua Micheletti da Disciplina Patologia Especial da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pela colaboração na avaliação imunoistoquímica.

Ao Prof. Dr. Renato Braz de Araujo do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de São José do Rio Preto, pela dedicação na formatação e revisão desta tese.

À técnica em Patologia Clínica Elaine Aparecida Gouveia Ribeiro do Serviço de Anatomia Patológica do HB, pela colaboração na imunoistoquímica.

Ao Dr. André Luis Volpato do Serviço de Endoscopia do Hospital de Base (HB) de São José do Rio Preto, pela colaboração.

Aos colegas da Disciplina de Coloproctologia da FAMERP, pelo convívio e incentivo.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP pelo incentivo e atenção.

Aos demais colegas, alunos e funcionários do HB e FAMERP, pelo convívio e incentivo.

Aos pacientes, pois a partir deles e por eles esse estudo aconteceu.

A Deus, pela luz e pela vida.

"Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade."

Santo Agostinho

"Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor"

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Desenho esquemático mostrando eventos e genes envolvidos no desenvolvimento do câncer colorretal.....1
- Figura 2- Desenho esquemático mostrando dois pontos onde ocorre controle do ciclo celular (G1-S e G2-M).....3
- Figura 3- Desenho esquemático mostrando ciclo celular, oncogenes (ciclina,CDKs e Myc) e genes supressores tumorais (RB, p53, p21, p27, p57, p16, p17, p18, p19, receptor de TGF- β , BRCA1, BRCA2 e ATM).....4
- Figura 4- Desenho esquemático mostrando fatores extracelulares e controladores internos da proliferação celular que atuam inibindo (dano ao DNA, p53, p21, p16 e p27) ou estimulando (sinais de crescimento extracelular, ciclina e CDKs) a progressão do ciclo. (CDK: Quinase dependente de ciclina; G1/S ChK: ponto de checagem G1/S; G2/M ChK: ponto de checagem G2/M).....5
- Figura 5 - Desenho esquemático mostrando atividades celulares coordenadas por meio do IFN- γ : ativação de macrófagos; indução da produção de anticorpos opsonizantes por células B; estímulo para a diferenciação de células TH1; e ativação da expressão dos complexos principais de histocompatibilidade.....7
- Figura 6 - Desenho esquemático mostrando produtos do estímulo celular pelo interferon- γ (IFN- γ) por vias independentes e dependentes da Stat1.....8

- Figura 7 - Desenho esquemático mostrando ligação do receptor de IFN- γ na superfície celular, ativação da via de sinalização JAK-STAT, ligação e ativação do receptor JAK, acoplamento e fosforilação do fator STAT1 e posterior translocação desse fator para o núcleo onde estimula transcrição dos genes regulados por esse interferon, produzindo GBP1.....10
- Figura 8 - Desenho esquemático mostrando as formas ativa e inativa das GTPases.....11
- Figura 9 - Desenho esquemático mostrando formas ativa e inativa da GTPase Ras, sua atuação como comutador molecular na sinalização intracelular e efeitos no ciclo celular (anti-apoptose, ativação do myc e ativação de quinase dependente de ciclina-CDK) por meio de cascatas de ativação (PI3K, MEK e Raf).....12
- Figura 10 - Desenho esquemático mostrando ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.....14
- Figura 11 - Desenho esquemático mostrando porção de glicosilfosfatidilinositol (GPI) da mucina de forma tripomastigota ativando a via de sinalização dependente de TLR2, que conduz à síntese de citocinas pró inflamatórias, responsáveis pela modulação da resposta imune inata do hospedeiro contra o parasita.....16
- Figura 12 - Desenho esquemático mostrando que na presença do antígeno devido à infecção pelo *T. cruzi* ocorre ativação de linfócitos T e B, responsáveis pela imunidade celular e humoral respectivamente.....17

- Figura 13 - Gráfico mostrando intervalo de confiança de 95% da faixa etária (anos) em pacientes com megaesôfago chagásico (ME) e esôfago normal (EN).....41
- Figura 14 - Gráfico mostrando intervalo de confiança de 95% da faixa etária (anos) em pacientes com megacólon chagásico (MC) e cólon normal (CN).....42
- Figura 15 - Expressão da proteína APC em 10 a 50% do epitélio com predomínio em ápice, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-APC, A:100X e B:400X) (Paciente nº16, 69 anos, sexo masculino).....47
- Figura 16 - Expressão da proteína c-Myc em mais de 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-c-Myc, A:100X e B:400X) (Paciente nº12, 83 anos, sexo masculino).....48
- Figura 17 - Expressão da proteína c-Myc em mais de 50% do epitélio com predomínio em ápice, marcação citoplasmática da mucosa do cólon normal (seta branca) (Anticorpo c-Myc, A:100X e B:400X) (Paciente nº 38, 42 anos, sexo feminino).....49
- Figura 18 - Expressão da proteína c-Myc em mais de 50% do epitélio com predomínio em ápice, marcação citoplasmática da mucosa do cólon normal (seta branca) (Anticorpo c-Myc, A:100X e B:400X) (Paciente nº 38, 42 anos, sexo feminino).....50

- Figura 19 - Expressão da proteína GBP-2 em 10 a 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de esôfago normal (seta branca) (Anticorpo anti-GBP-2, A:100X e B:400X) (Paciente nº22, 46 anos, sexo masculino).....50
- Figura 20 - Expressão da proteína GBP-2 em menos de 10% do epitélio, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-GBP-2, 100 e 400X) (Paciente nº 19, 76 anos, sexo feminino).....51
- Figura 21 - Expressão da proteína IFN- γ em 10 a 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-IFN- γ , 400X) (Paciente nº14, 70 anos, sexo feminino).....52
- Figura 22 - Expressão da proteína IFN- γ em menos de 10% do epitélio, marcação citoplasmática da mucosa do megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-IFN- γ , A:100X e B:400X) (Paciente nº19, 76 anos, sexo feminino).....52
- Figura 23 - Ausência de expressão da proteína IFN- γ no epitélio de cólon normal (Anticorpo anti-IFN- γ , 100 e 400X) (Paciente nº41, 46 anos, sexo feminino).....53
- Figura 24 - Ausência da expressão da proteína IFN- γ na mucosa do megaesôfago chagásico (Anticorpo anti-IFN- γ , 100 e 400X) (Paciente nº 68, 46 anos, sexo masculino).....54

Figura 25 - Expressão da proteína *T. cruzi* em mais de 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de megaesôfago chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-*T. cruzi*, A:100X e B:400X) (Paciente nº10, 64 anos, sexo feminino).....55

Figura 26 - Ausência de expressão da proteína *T. cruzi* na mucosa do megaesôfago chagásico (Anticorpo anti-*T. cruzi*, A:100X e B:400X) (Paciente nº9, 74 anos, sexo feminino).....56

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Tabela 1 - Estatística descritiva da faixa etária (anos) de pacientes com megaesôfago chagásico (ME), megacólon chagásico (MC), esôfago normal (EN) e cólon normal (CN).....40
- Tabela 2 - Comparação da média de idade (anos) entre pacientes com megaesôfago chagásico (ME) e esôfago normal (EN).....41
- Tabela 3 - Comparação da média de idade (anos) entre pacientes com megacólon chagásico (MC) e cólon normal (CN).....42
- Tabela 4 - Distribuição da frequência de expressão da proteína APC em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.....44
- Tabela 5 - Distribuição da frequência de expressão da proteína c-Myc em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.....44
- Tabela 6 - Distribuição da frequência de expressão da proteína GBP-2 em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.....45
- Tabela 7 - Distribuição da frequência de expressão da proteína IFN- γ em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.....45

Tabela 8 - Distribuição da frequência de expressão da proteína IFN- γ em todos os órgãos estudados considerando negativos casos com ausência de expressão dessa proteína.....	46
Tabela 9 - Distribuição da frequência de expressão da proteína <i>T.cruzi</i> em todos os órgãos estudados considerando negativos casos com ausência de expressão dessa proteína.....	46
Quadro 1 - Especificidade, fabricante, diluição, clone, tipo e marcação dos anticorpos primários utilizados neste estudo.....	29
Quadro 2 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio esofágico de pacientes com megaesôfago chagásico com os anticorpos anti-APC, anti-c-Myc, anti-GBP-2, anti-IFN- γ e anti- <i>T. cruzi</i>	33
Quadro 3 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio cólico de pacientes com megacólon chagásico.....	35
Quadro 4 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio esofágico de pacientes com esôfago normal.....	37
Quadro 5 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio cólico de pacientes com cólon normal.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC	<i>Adenomatous poliposis coli</i>
APCs	células profissionais apresentadoras de antígenos
CEC	carcinoma espinocelular
c-fos	proto-oncogene
CCR	câncer do cólon e reto
CDK	cyclin-dependent kinases
CD4	linfócito T CD4
CD8	linfócito T CD8
c-Myc	proto-oncogene
CN	cólon normal
COX-2	ciclooxigenase do tipo 2
DAB	diaminobenzidina líquida
DC	célula dendrítica
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
EN	esôfago normal
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FasL	ligante de Fas
GAF	fator gama ativado
GAP	proteína de ativação de GTPase
GAS	gamma activating sequence

GBPs	proteínas ligadoras de guanilato
GBP-1	proteína ligadora de guanilato-1
GBP-2	proteína ligadora de guanilato-2
GDP	difosfato de guanosina
GEF	fator de troca de nucleotídeos de guanina
GMP	monofosfato de guanosina
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GTP	trifosfato de guanosina
G1	gap 1
G2	gap 2
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IL	interleucina
IFN- γ	interferon gama
IRF1	interferon regulatory factor-1
JAK	Janus kinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
M	mitose
MAPK	mitogen activated protein kinases
MC	megacólon chagásico
ME	megaesôfago chagásico
Megas	megaesôfago chagásico e megacólon chagásico
MHC	complexo de histocompatibilidade
mm	milímetro

MMP-7	matriz metaloproteinase 7
N	negativo
NK	células natural <i>killer</i>
NO	óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico-sintase
<i>P</i>	nível de significância
P	positivo
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
p62	proteína 62
p53	proteína 53
p21	proteína 21
S	síntese
Smad	signal transducers and transcriptional modulators
Stat	signal transducers and activador of transcription
T CD8	linfócito T CD8
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- β	transforming growth factor beta
Th1	linfócito T helper 1
Th2	linfócito T helper 2
TLR	toll-like receptor
TNF- α	fator de necrose tumoral
Wnt	via de sinalização

RESUMO

Introdução: Megaesôfago chagásico (ME) está associado a maior ocorrência do câncer de esôfago enquanto no megacólon chagásico (MC) adenomas e adenocarcinomas são raros. Alteração nas concentrações de algumas proteínas pode estar associada tanto à carcinogênese esofágica e colorretal como ao megacólon e megaesôfago chagásicos. **Objetivo:** estudar a associação entre forma digestiva da doença de Chagas e carcinogênese, considerando-se a influência das proteínas c-Myc, GBP-2, APC, IFN- γ e *T. cruzi*. **Material e Método:** Foram selecionados blocos de parafina contendo fragmentos de mucosa anteriormente diagnosticados como; (1) esôfago normal (n=16); (2) megaesôfago chagásico (n=10); (3) cólon normal (n=10) e (4) megacólon chagásico (n=10). Esses tecidos foram analisados por meio de técnica imunoistoquímica utilizando os anticorpos c-Myc, GBP-2, APC, IFN- γ e *T. cruzi*. **Resultados:** O resultado da expressão da proteína GBP-2 mostrou maior positividade no ME (100%) quando comparado com MC (40%) ($P = 0,011$). Comparando ME com esôfago normal houve diferença significativa ($P = 0,001$), tendo 100% de positividade para GBP-2 no megaesôfago e 31,3% no esôfago normal. Na análise da expressão do IFN- γ no MC e cólon normal verificou-se maior positividade no MC (90%) em relação ao cólon normal (30%), sendo a diferença significativa ($P = 0,02$). A expressão da proteína IFN- γ apresentou maior positividade no MC (90%) em relação ao ME (40%). **Conclusões:** A maior frequência de expressão das proteínas GBP-2 no megaesôfago chagásico e IFN- γ no megacólon chagásico explicam, respectivamente, o aumento da incidência de carcinoma espinocelular em

portadores de megaesôfago chagásico e o efeito protetor do megacólon chagásico contra o adenocarcinoma colorretal.

ABSTRACT

Introduction: Chagasic megaesophagus (ME) is associated with a higher occurrence of esophagus cancer, while adenomas and adenocarcinomas are rare in the Chagasic Megacolon (MC). Concentration alterations in some proteins may be associated either with esophagic and colorectal carcinogenesis or with chagasic megacolon and megaesophagus. **Objective:** Study the association between digestive Chagas disease and carcinogenesis, considering the influence of c-Myc, GBP-2, APC, IFN- γ and *T.cruzi* proteins. **Material and Method:** Blocks of paraffin wax containing fragments of mucous membrane early diagnosed as 1 – normal esophagus (n=16); 2 – chagasic megaesophagus (n=10); 3 – normal colon (n=10) and 4 – chagasic megacolon (n=10) were selected. These tissues were analysed by means of immunohistochemical technique using c-Myc, GBP-2, APC, IFN- γ and *T.cruzi* antibodies. **Results:** The result of the GBP-2 protein expression showed higher positivity in ME (100%) when compared to MC (40%) ($p = 0.011$). Comparing ME with normal esophagus there was significant difference ($p = 0.001$), having 100% of positivity for GBP-2 in megaesophagus and 31.3% in normal esophagus. In the analysis of the IFN- γ expression in MC and normal colon a higher positivity was observed in MC (90%) in relation to normal colon (30%) being the difference significant ($p = 0.02$). As for the expression of IFN- γ protein, a higher positivity was observed in MC (90%) in relation to ME (40%). **Conclusions:** A higher frequency of expression of GBP-2 protein in chagasic megaesophagus and IFN- γ in chagasic megacolon explains, respectively, the increase of espinocellular carcinoma incidence in patients with chagasic

megaesophagus and the protector effect of the chagasic megacolon against the colorectal adenocarcinoma.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Câncer Colorretal

O câncer do cólon e reto (CCR) é considerado a terceira causa de câncer e também de morte por essa doença nos Estados Unidos.⁽¹⁾ Nesse país, em 2014 estima-se 71.830 casos novos em homens e 65.000 em mulheres.⁽¹⁾ No Brasil, excluindo-se câncer de pele não melanoma, a neoplasia colorretal ocupa o terceiro lugar em incidência nos homens com 15.070 casos novos estimados para 2014 e segundo lugar entre as mulheres com 17.530 casos para esse mesmo período.⁽²⁾

Dados epidemiológicos indicam que o CCR desenvolve-se a partir de adenomas.^(3,4) Trata-se de fenômeno progressivo no qual uma célula sofre modificações que tornam seu crescimento cada vez mais anormal. Essas alterações são provocadas por mutações nos genes que regulam a multiplicação celular. Desses, APC, Smad2/4 e p53 são genes supressores tumorais, e o KRAS proto-oncogene (Figura 1). A carcinogênese colorretal, também pode ocorrer por instabilidade de microssatélites, pela deficiência nos genes de reparo do DNA.⁽³⁾

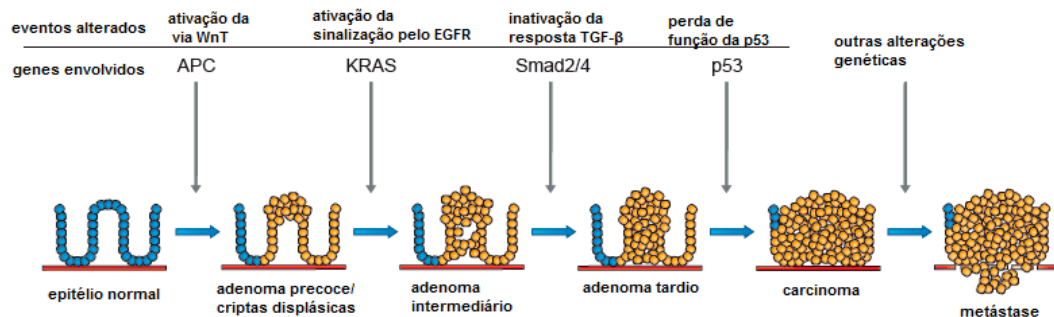


Figura 1 - Desenho esquemático mostrando eventos e genes envolvidos no desenvolvimento do câncer colorretal. Modificado de http://syscol-project.eu/wp-content/uploads/2011/11/ab_stor.gif

Proto-oncogene é um gene de proliferação normal, enquanto oncogenes são proto-oncogenes que sofreram mutações e se tornaram capazes de codificar proteínas que induzam o câncer.⁽⁵⁾ Genes supressores de tumor inibem a progressão do ciclo celular quando ocorre dano ao DNA da célula.^(6,7)

Aspectos histológicos observados na estrutura de pólipos adenomatosos intestinais sugerem que a formação desses pólipos é decorrente do aumento da produção de novas células na cripta e redução da morte celular epitelial.⁽⁸⁾ Essas atividades celulares são controladas pela ação das proteínas beta-catenina, survivina e *Adenomatous poliposis coli* (APC) que podem atuar inibindo ou favorecendo a apoptose.^(9,10)

Alterações da proteína APC são consideradas gatilho para o surgimento de distúrbios proliferativos na mucosa cólica. Mutações dessa proteína estão presentes em cerca de 80% dos adenomas em fase inicial, sendo essa mutação considerada como a alteração mais precoce na carcinogênese colorretal.^(11,12) APC, em condições normais, inibe a divisão celular.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Por meio de técnica imunoistoquímica, Smith *et al.*⁽¹³⁾, analisando segmentos de cólon normal, constataram predomínio da expressão dessa proteína na parte alta da cripta, onde ocorre apoptose e não há atividade mitótica.

A redução dos níveis celulares da APC está associada à elevação da concentração nuclear da beta-catenina, o que estimula a divisão celular.^(9,15,16) A beta-catenina pode ser encontrada na membrana celular, citoplasma e núcleo. Esse estímulo proliferativo é consequência da ação positiva da beta-catenina para expressão nuclear de outras proteínas fundamentais na divisão

celular como ciclina D1, gastrina, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), matriz metaloproteinase-7 (MMP-7) e c-Myc.⁽¹⁷⁾

O ciclo celular é uma série ordenada de eventos que culminam na divisão celular, com duração em média, nas células de mamíferos, de 18 a 24 horas. Essa divisão é controlada pela regulação de dois eventos: a duplicação do DNA e a mitose.^(10,18) Para a progressão do ciclo celular são necessárias enzimas quinases dependentes de ciclina, conhecidas como CDK (**cyclin-dependent kinases**) que controlam esse ciclo nas transições de fases, tanto de G1 (intervalo entre mitose e duplicação do DNA) para S (síntese, é quando ocorre a duplicação do DNA) como de G2 (síntese de proteínas para fase seguinte) para M (mitose) (Figura 2).^(5,19) Esses pontos de controle têm função de verificar alterações celulares e gerar respostas para os reparos necessários, protegendo o organismo da proliferação não programada e do câncer.⁽⁵⁾

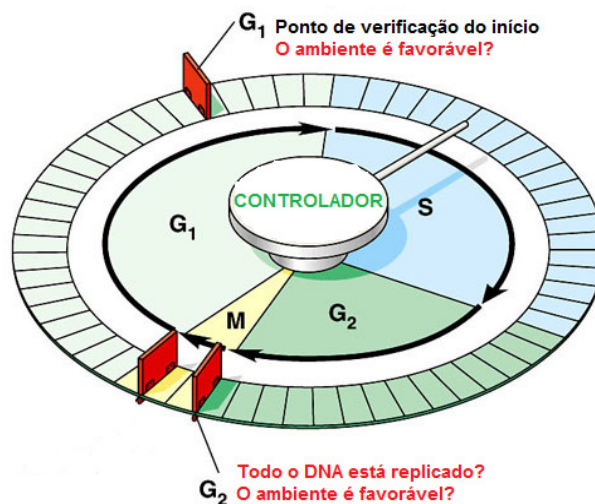


Figura 2 - Desenho esquemático mostrando dois pontos onde ocorre controle do ciclo celular (G1-S e G2-M). Modificado de <http://ashie97.weebly.com/reassessments.html>.

O controle do ciclo celular envolve fatores extracelulares estimulantes e inibitórios como fatores de crescimento e irradiação, respectivamente. Ocorre interação entre fatores extracelulares e controladores internos da proliferação celular que incluem receptores de membrana e vias de sinalização intracelulares que agem sobre proteínas nucleares para o controle desse ciclo (Figura 4).⁽²¹⁾

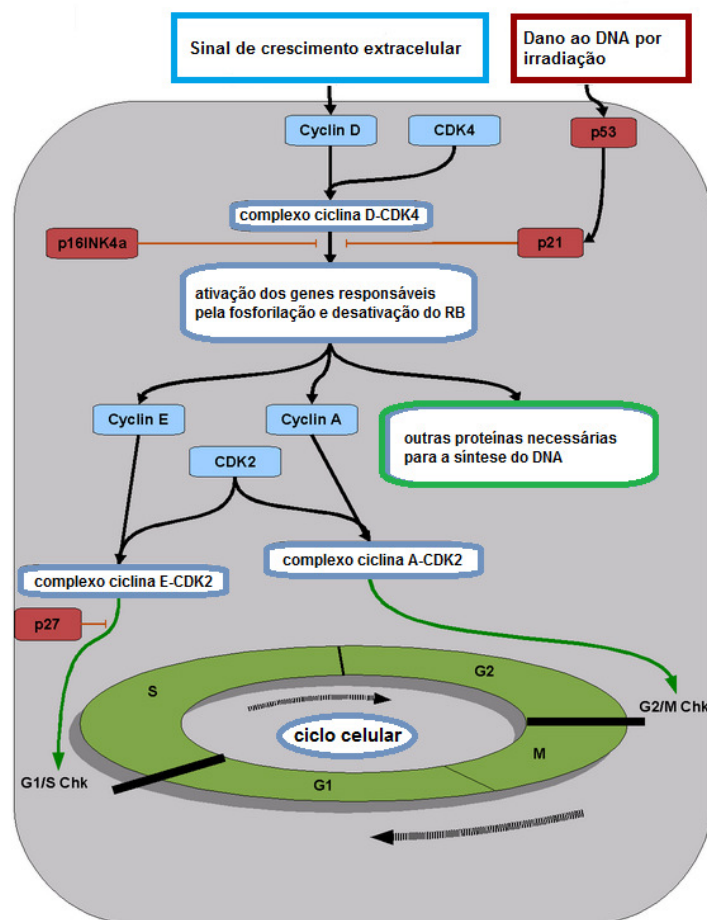


Figura 4 - Desenho esquemático mostrando fatores extracelulares e controladores internos da proliferação celular que atuam inibindo (dano ao DNA, p53, p21, p16 e p27) ou estimulando (sinais de crescimento extracelular, ciclinas e CDKs) a progressão do ciclo. (CDK: Quinase dependente de ciclina; G1/S ChK: ponto de checagem G1/S; G2/M ChK: ponto de checagem G2/M). Modificado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/0/06/Regulation_of_cell_cycle.png

Para proliferação e diferenciação celular, o oncogene c-Myc codifica a fosfoproteína p62 (proteína c-Myc).^(22,23) No CCR, essa proteína ativa o complexo ciclina-CDK e normalmente atua no núcleo como um sinal para proliferação celular; quantidades excessivas da p62 induzem proliferação celular não controlada.⁽²²⁻²⁴⁾

Células, nas quais a expressão do c-Myc é impedida, não se dividirão, mesmo na presença de fatores de crescimento; por outro lado, quando a expressão dessa proteína é acionada, as células se dividirão apesar da ausência desses fatores.⁽²⁵⁾

A expressão da proteína c-Myc pode ser inibida pelo interferon- γ (IFN- γ) via tradutor de sinal e ativador de transcrição Stat 1 (*signal transducers and activator of transcription*).⁽²⁶⁻²⁹⁾

1.1.1 – Interferon- γ

IFN- γ ou interferon tipo II é uma citocina fundamental para resposta imune inata e adaptativa contra infecções bacterianas e virais intracelulares e para o controle do câncer.⁽³⁰⁾ Diversas células secretam o IFN- γ , como linfócitos T (CD4+ e CD8+), células *natural killer* (NK), células B e células profissionais apresentadoras de antígenos (APCs) (monócitos, macrófagos e células dendríticas).⁽³⁰⁾ A produção do IFN- γ é controlada por citocinas secretadas por APCs, principalmente interleucinas IL-12 e IL-18.⁽³¹⁾ Essa produção é inibida por IL-4, IL-10, fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e glicocorticoides.⁽³¹⁾ O IFN- γ , quando produzido por APCs de monócitos, macrófagos e células dendríticas, atua localmente, sendo

importante na auto-ativação celular e ativação de células vizinhas.⁽³⁰⁾

Diversas atividades celulares são coordenadas por meio do IFN- γ (Figura 5) tais como: 1- estimulação de macrófagos, induzindo ações antimicrobianas e anti-tumorais; 2- indução da produção de anticorpos opsonizantes por células B, que facilitam a fagocitose; 3- crescimento, maturação e diferenciação de vários tipos de células, inclusive estímulo para a diferenciação das células T CD4⁺ virgens ao subtipo TH1; e 4- processamento e apresentação de antígenos através da ativação da expressão dos complexos principais de histocompatibilidade (MHC I e MHC II).⁽³²⁾

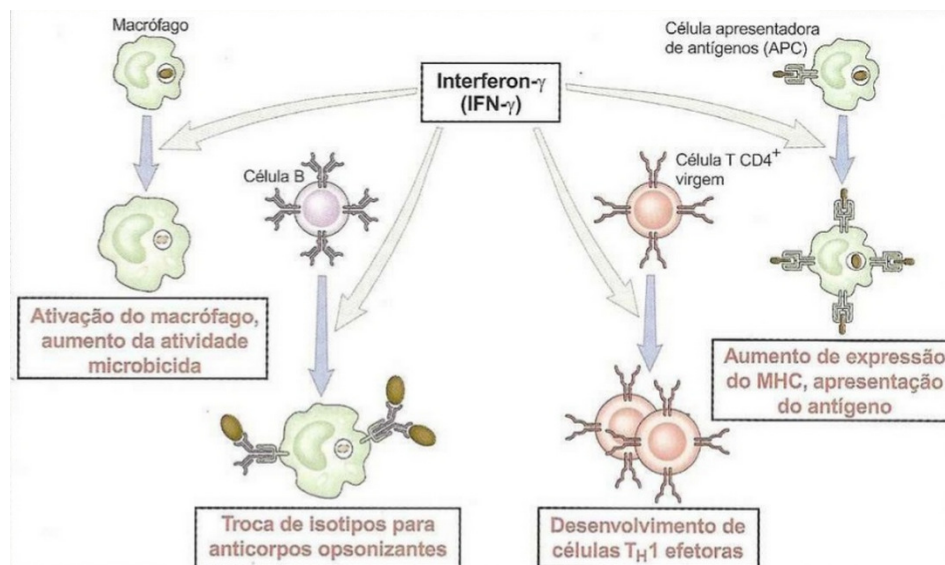


Figura 5 - Desenho esquemático mostrando atividades celulares coordenadas por meio do IFN- γ : ativação de macrófagos; indução da produção de anticorpos opsonizantes por células B; estímulo para a diferenciação de células TH1; e ativação da expressão dos complexos principais de histocompatibilidade. Retirado de <http://www.studyblue.com/notes/n/im1-07-08-t-cells/deck/1073514>)

O IFN- γ ativa ou não o tradutor de sinal e ativador de transcrição Stat1, podendo desencadear sinais proliferativos ou anti-proliferativos por meio de vias independentes e dependentes da Stat1, respectivamente (Figura 6). A deficiência da Stat 1 altera a atividade biológica do IFN- γ , que por sua vez inibe a proliferação em células com resposta Stat1 através da indução do fator inibidor do complexo ciclina-CDK (p21) e estimula o c-Myc e c-Jun (membro da proteína quinase ativadora de mitose) em células sem resposta Stat1.^(33,34) No CCR, a expressão de Stat 1 está diminuída e de Stat 3 aumentada.⁽²⁹⁾

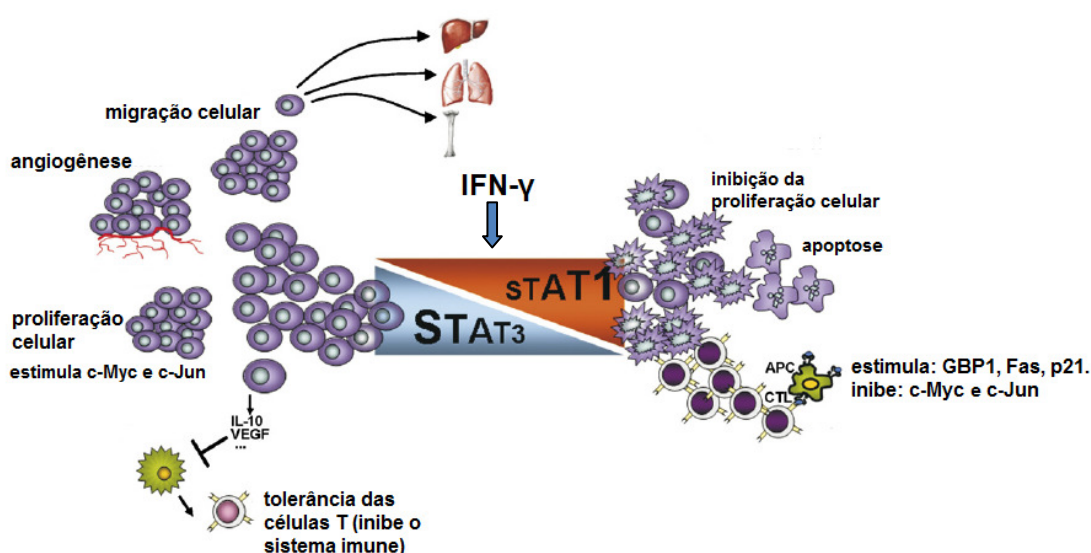


Figura 6 - Desenho esquemático mostrando produtos do estímulo celular pelo interferon- γ (IFN- γ) por vias independentes e dependentes da Stat1. (Modificado de Regis *et al.*⁽³⁵⁾)

O estímulo do IFN- γ dependente da Stat1 promove a apoptose de células de carcinoma colorretal por induzir a expressão de receptores de morte celular Fas (proteína transmembrana, expressa em linfócitos T, cuja ligação com o seu receptor induz apoptose), e ligando Fas (FasL).^(36,37) O aumento da

capacidade do IFN- γ para induzir apoptose no CCR está associado à deficiência do p21.⁽³⁸⁾ Porém, para inibição da proliferação celular no adenocarcinoma colorretal e carcinoma de células escamosas (CEC), esse interferon induz o p21.^(38,39,40,41,42)

A ligação do IFN- γ com seu receptor ativa a via JAK-STAT que modula a transcrição de vários genes e funciona como mediador de diversas respostas biológicas. A fosforilação da Stat1 dá origem ao fator gama ativado (GAF), que transloca para o núcleo, liga-se ao GAS (*Gamma Activating Sequence*) e aumenta a ativação e transcrição gênica através do recrutamento de vários coativadores; entre esses, o fator de transcrição IRF1 (*interferon regulatory factor-1*) que estimula a transcrição de genes de resposta secundária, inclusive do gene da proteína ligadora de guanilato tipo 1 (GBP1) (Figura 7).⁽³⁴⁾ Portanto, a ativação do GBP1, em resposta ao IFN- γ , requer a proteína STAT1 e resulta em redução da proliferação celular por diminuir a angiogênese.⁽⁴³⁾

A ativação das proteínas ligadoras de guanilato (GBPs) por meio do IFN- γ pode ocorrer por STAT1 com resposta imediata do estímulo e ou por meio do receptor de síntese e transcrição IRF1 com uma resposta tardia, sendo que na resposta imediata há indução de apoptose de células cancerosas, bloqueio da progressão no ciclo celular e resposta imune adequada contra o tumor; já na resposta tardia ocorre indução do gene da proteína ligadora de guanilato tipo 2 (GBP2), que estimula a proliferação celular.⁽⁴⁴⁾

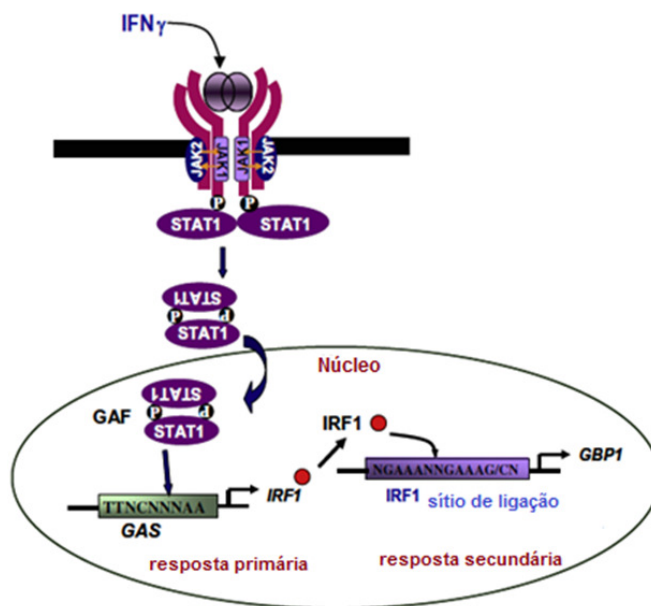


Figura 7 - Desenho esquemático mostrando ligação do receptor de IFN- γ na superfície celular, ativação da via de sinalização JAK-STAT, ligação e ativação do receptor JAK, acoplamento e fosforilação do fator STAT1 e posterior translocação desse fator para o núcleo onde estimula transcrição dos genes regulados por esse interferon, produzindo GBP1. (Modificado de Saha et al.⁽³⁴⁾)

1.1.2 – Proteínas ligadoras de guanilato (GBPs)

As GBPs são induzidas por interferons tipos I (α, β) e principalmente II (γ),⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ e também por interleucinas e TNF- α .^(43,48-51)

Pertencentes à família das GTPases, as GBPs possuem esse nome por sua capacidade de ligação e clivagem de nucleotídeos de guanina.⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾ Essas GTPases conseguem se ligar e hidrolisar trifosfato de guanosina (GTP) em difosfato de guanosina (GDP) e monofosfato de guanosina (GMP).^(51,55,56) A proteína GBP1 humana é encontrada predominantemente em células endoteliais de vasos sanguíneos.⁽⁴⁹⁾

A atividade das GTPases depende de sua forma, pois quando ligadas ao GTP são ativas, e inativas quando ligadas ao GDP ou GMP.⁽⁵⁷⁾ O nível de atividade varia entre as diferentes GTPases, e pode ser modulado por outros fatores celulares, como proteínas de ativação de GTPase (GAPs) que conduzem as proteínas a um estado desligado e os fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), que ativam as GTPases por promoverem a troca do GDP pelo GTP (Figura 8).^(57,58)

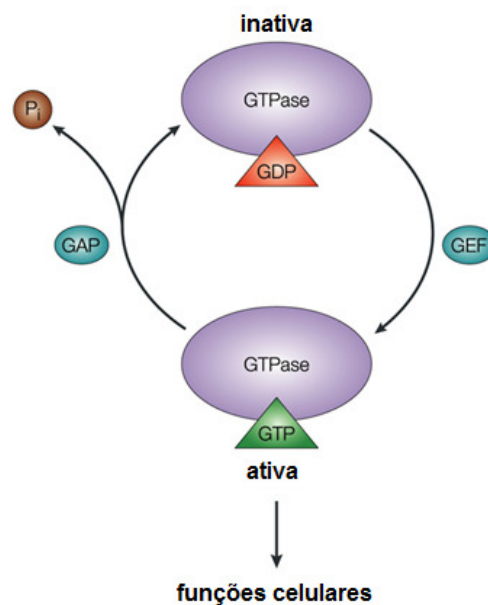


Figura 8 - Desenho esquemático mostrando as formas ativa e inativa das GTPases (Modificado de Taylor *et al.*⁽⁵⁸⁾).

As principais funções das GTPases são ativação de receptores de superfície celular e sinalização intracelular quando atuam como comutadores moleculares, pois quando recebem um sinal, elas passam da conformação inativa para a ativa, até que outro processo as desligue (Figura 9).^(57,59)

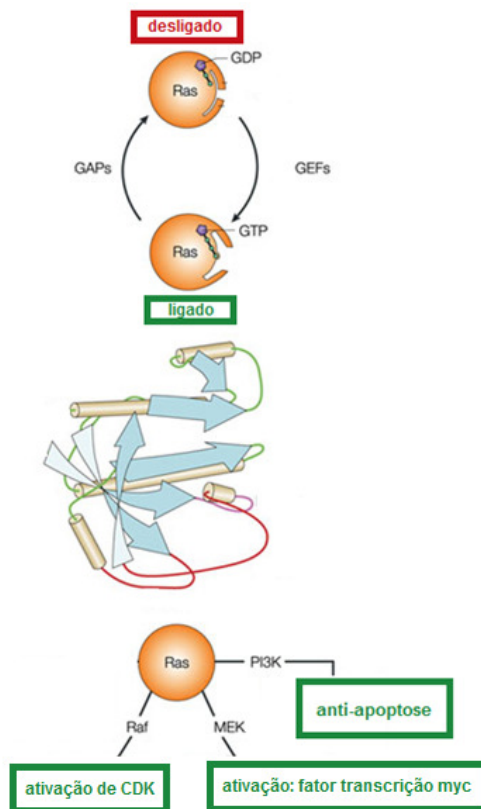


Figura 9 - Desenho esquemático mostrando formas ativa e inativa da GTPase Ras, sua atuação como comutador molecular na sinalização intracelular e efeitos no ciclo celular (anti-apoptose, ativação do myc e ativação de quinase dependente de ciclina-CDK) por meio de cascatas de ativação (PI3K, MEK e Raf). (Modificado de Kinbara *et al.*⁽⁵⁹⁾).

A afinidade de GBP-1 e GBP-2 humanas por GDP e GMP é variável.⁽⁶⁰⁾ A hidrólise do GTP catalisada por GBP1 humana gera principalmente GMP,^(51,61) enquanto a hidrólise do GTP catalisada por GBP-2 produz predominantemente GDP, embora também sejam produzidos baixos níveis de GMP.⁽⁶²⁾

A GBP-1 e GBP-2 possuem efeitos opostos na proliferação

celular.^(51,63,64) GBP1 inibe a proliferação e migração de células endoteliais em resposta a citocinas inflamatórias (IL-1 β , fator de necrose tumoral (TNF- α) e IFN- γ).^(48,65) Alguns autores constataram que o aumento da expressão de GBP1 em pacientes com carcinoma colorretal estava associado à redução do risco relativo de morte.^(43,66) Em contrapartida, foi demonstrado que GBP-2 é capaz de induzir a proliferação celular e a formação de tumores.^(63,64)

No CCR, a proteína ligadora de guanilato-1 (GBP-1) atua como supressora tumoral e a perda da expressão dessa proteína pode indicar evasão tumoral da resposta imune pelo IFN- γ , uma vez que a GBP-1 é induzida por essa citocina.^(43,67) Em pacientes com CEC esofágico, a proteína ligadora de guanilato-2 (GBP-2), induzida pelo interferon está associada ao CEC desse órgão.⁽⁶⁴⁾

1.2- Doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*, apresenta elevada prevalência e significativa morbidade na América Latina, atingindo cerca de 12 milhões de pessoas.⁽⁶⁸⁻⁷³⁾ A migração dos países endêmicos da América Latina para países não endêmicos na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania é responsável pela internacionalização da doença de Chagas.^(73,74) No Brasil, ocorre desde o Maranhão ao Rio Grande do Sul, acometendo de 2 a 3 milhões de indivíduos.⁽⁷²⁾

O *T. cruzi* pode ser transmitido por vetores, transfusão sanguínea, transmissão oral de alimentos contaminados, placenta ou canal do parto, acidentes de laboratório, gestão de animais infectados, transplantes de órgãos

e transmissão sexual.⁽⁷⁵⁾ Atualmente, a forma de transmissão oral é a mais frequente no humano.⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾ Em 2005, no município de Navegantes (SC) a transmissão do *T. cruzi* por meio da ingestão de caldo de cana contaminado por esse parasito resultou em surto agudo da doença de Chagas, sendo confirmados 24 casos e 3 óbitos.⁽⁷⁸⁾

A transmissão da infecção chagásica pode ser por meio de vetores triatomíneos com liberação das formas tripomastigotas metacíclicas junto com fezes e urina do triatomídeo; essas formas metacíclicas invadem células hospedeiras no sítio de inoculação, difundindo-se pelas vias sanguínea e linfática, infectando outras células, transformando-se em amastigotas intracelulares que por sua vez se transformam em tripomastigotas, divisão binária.⁽⁷⁹⁾ Com o rompimento dessas células, essas formas tripomastigotas entram nas correntes sanguínea e linfática, tornando possível a ingestão dessas pelo vetor, no qual serão convertidas em epimastigotas e posteriormente se diferenciarão em tripomastigotas metacíclicas, completando o ciclo (Figura 10).

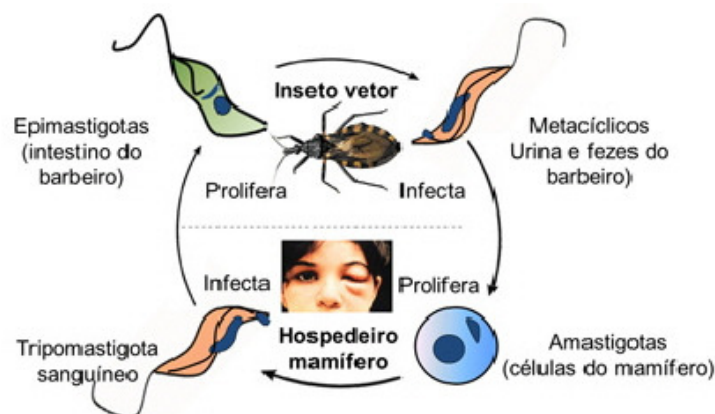


Figura 10 - Desenho esquemático mostrando ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (Retirado de <http://www.ecb.epm.br/~sschenkman/>).

O protozoário penetra ativamente nas células do hospedeiro, onde se multiplica, distendendo e rompendo as células parasitadas, liberando diversos mediadores da inflamação.⁽⁸⁰⁾ Essa primeira resposta do hospedeiro pode se tornar extensa, dependendo da intensidade do parasitismo.

A infecção pelo *T. cruzi* ativa mecanismos do sistema imune relacionados às imunidades inata e adquirida. A mucina é a grande responsável pela ativação da resposta inata, via ativação dos receptores do tipo *toll* 2 (TLR2). Na resposta humoral, anticorpos líticos atuam contra epítomos de alfa-galactose, expressos na superfície das formas tripomastigotas.⁽⁸¹⁾

Pouco se sabia como e quais moléculas dos parasitos seriam responsáveis pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Foi demonstrado que a porção de glicosilfosfatidilinositol (GPI) da mucina de formas tripomastigotas, mas não aquelas de epimastigotas ou metacíclicas são ativas na indução de IL-12, TNF- α e óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos incubados previamente com IFN- γ recombinante.⁽⁸²⁾ A família de receptores do tipo Toll (TLR) sinalizam a síntese de citocinas por meio de uma cascata de eventos envolvendo quinases e proteínas adaptadoras, levando a translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo (Figura 11).⁽⁸¹⁾

Ropert *et al.*⁽⁸³⁾ demonstraram que a síntese de citocinas proinflamatórias induzida por GPI-mucinas envolve a ativação de uma cascata de sinalização intracelular, composta por várias quinases (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK; ERK-1/ERK-2, SKK-1/MKK-4 e a SAPK-2/p38).

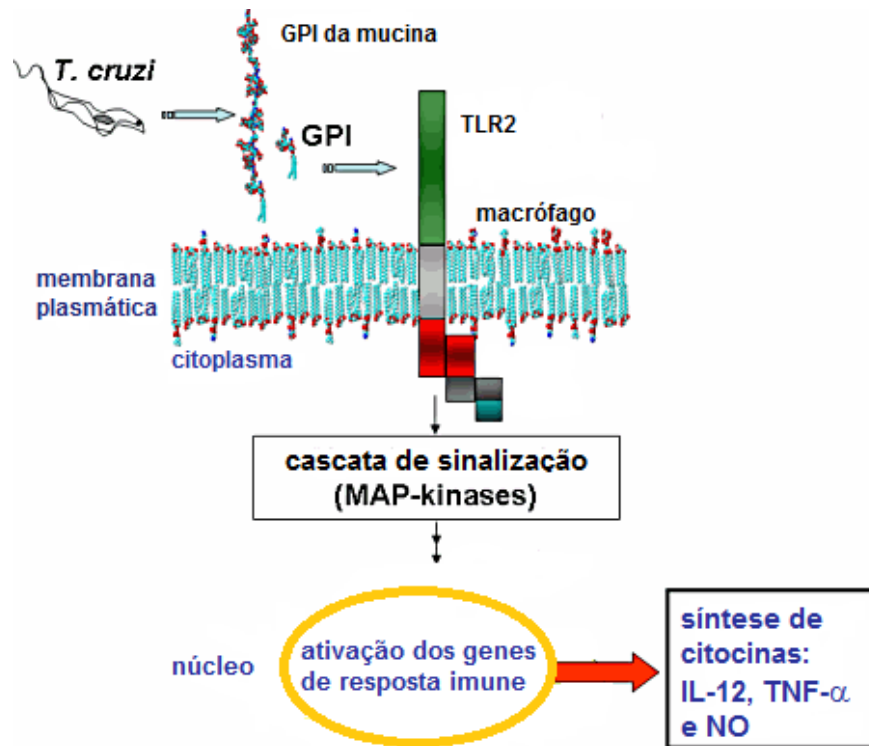


Figura 11 - Desenho esquemático mostrando porção de glicosilfosfatidilinositol (GPI) da mucina de forma tripomastigota ativando a via de sinalização dependente de TLR2, que conduz à síntese de citocinas pró inflamatórias, responsáveis pela modulação da resposta imune inata do hospedeiro contra o parasito. Modificado de <http://faculty.utep.edu/Default.aspx?tabid=23553>

Na fase inicial da infecção experimental observa-se uma ativação inespecífica de macrófagos, células dendríticas (DCs) e células *natural killer* (NK), seguida de uma ativação policlonal de linfócitos T e B, além de uma hipergamaglobulemia.⁽⁸⁴⁾ Essas ativações estão relacionadas com a produção de IFN- γ e IL-12 pelas células NK, macrófagos, e DCs; IFN- γ e IL-12 atuam no controle da replicação intracelular do parasito através da indução da síntese de óxido nítrico (NO) produzido pelo macrófago.⁽⁸⁵⁾ Consequentemente, o parasito

passa a ser continuamente combatido, tendo sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro.^(86,87)

Soong & Tarleton descreveram o efeito supressor da infecção causada pelo *T. cruzi* por meio da redução dos níveis de interleucina 2 (IL-2) e dos proto-oncogenes c-Myc e c-fos em baço de ratos, durante a fase aguda dessa infecção.⁽⁸⁸⁾ Nessa fase, também ocorre produção de IL-10, pelos macrófagos e linfócitos do tipo Th2, que inibe a produção de IL-12 e IFN- γ pelos macrófagos.⁽⁸⁵⁾

A imunidade na doença de Chagas depende da presença do parasito no hospedeiro, pois promove ativação de macrófagos e células NK (imunidade celular), ativando linfócitos T e B, resultando na produção de imunoglobulinas (imunidade humoral) (Figura 12).⁽⁸⁶⁾

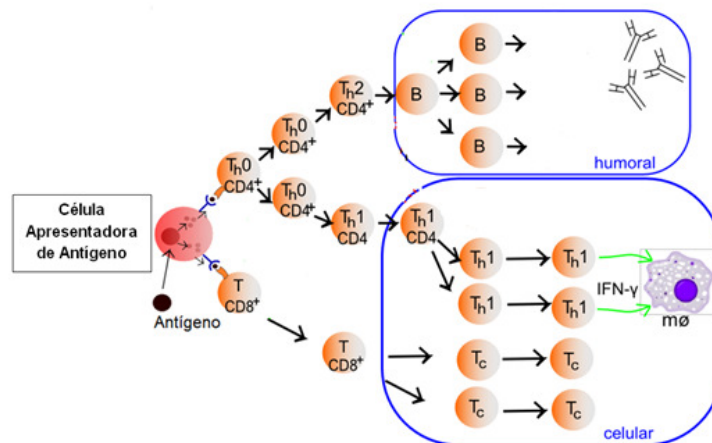


Figura 12 - Desenho esquemático mostrando que na presença do antígeno devido à infecção pelo *T. cruzi* ocorre ativação de linfócitos T e B, responsáveis pela imunidade celular e humoral respectivamente. Modificado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d6/Lymphocyte_activation-es.png

A atividade de macrófagos na resposta à infecção é fundamental, pois é uma das principais células-alvo do parasito e exerce resistência à infecção por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e componentes microbicidas (óxido nítrico).^(85,89,90) Em associação ao TNF- α , o IFN- γ induz a produção de óxido nítrico por meio da ativação da enzima óxido nítrico-sintase (NOS) em macrófagos com atividade tripanomicida.⁽⁹¹⁾ O aumento de IFN- γ e TNF- α e a maior gravidade da cardiomiopatia chagásica estão associados a menor produção de IL-17 causada pela deficiência dos linfócitos Th17 em portadores da doença de Chagas.⁽⁹²⁾

As células NK são importantes no controle da infecção por ser fonte de IFN- γ na fase aguda da infecção pelo parasito. O IFN- γ produzido aumenta a síntese de IL-12 por macrófagos, promovendo ativação de células NK e diferenciação de células Th1 (linfócitos T auxiliares do tipo 1) específicas para o parasito, assim como inibição da síntese de citocinas por linfócitos Th2.⁽⁸⁹⁾ Portanto, células NK atuam na imunidade inata contra o *T. cruzi*, limitando o crescimento parasitário e promovendo o desenvolvimento da imunidade adquirida.^(93,94)

Investigando a resposta imune celular contra a infecção por *T. cruzi*, alguns autores demonstraram que a resistência a essa infecção caracteriza-se por uma resposta do tipo Th1 mais precoce e de maior amplitude, sendo que a evolução para forma crônica caracteriza-se por diminuição na atividade Th1 e aumento na atividade Th2.^(95,96) De acordo com Mosmann *et al.*⁽⁹⁷⁾ existem dois tipos de linfócitos T funcionalmente distintos conforme as citocinas produzidas: (1) linfócitos Th1 produtores de IFN-gama e IL-2, e (2) linfócitos Th2

produtores de IL-4 e IL-5. Segundo esses autores, IFN- γ é a citocina responsável pelo controle do parasitismo na fase aguda e também por mantê-lo em níveis muito baixos na fase crônica, sendo que sua expressão no sangue pode não representar sua real concentração no tecido inflamado.⁽⁹⁷⁾

Gomes *et al.*⁽⁹⁸⁾ verificaram produção elevada de IFN- γ em 83% de indivíduos com cardiomiopatia chagásica e em 59% daqueles com forma indeterminada.⁽⁹⁸⁾ Além disso, outros autores mostraram correlação positiva entre concentração elevada de IFN- γ e gravidade dessa doença cardíaca.⁽⁹⁹⁾ Em chagásicos crônicos, a produção persistente de IFN- γ e diminuição da IL-10 são associadas com progressão da fibrose cardíaca.⁽¹⁰⁰⁾

Marinho *et al.*⁽¹⁰¹⁾, utilizando animais deficientes em IFN- γ infectados pelo *T. cruzi*, observaram aumento da parasitemia, parasitismo tecidual e mortalidade, demonstrando a importância do IFN- γ na imunidade contra *T. cruzi*, uma vez que essa citocina induz vários mecanismos imuno-protetores, incluindo: (1) ativação de macrófagos mediadores da atividade tripanomicida, (2) indução de expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II e de *Toll-like receptors* (TLRs), (3) polarização de linfócitos T CD4+ e (4) produção de quimiocinas. Os linfócitos T apenas reconhecem esses antígenos associados a complexos de histocompatibilidade (MHC) nas superfícies celulares.⁽⁵⁾

Na fase crônica da doença de Chagas, os linfócitos T CD8+ parecem ser mais importantes e estão associados a citólise e fibrose tecidual.⁽¹⁰⁰⁾ Esses linfócitos secretam IFN- γ e liberam serglicinas, perforinas e granzimas, sendo essas últimas, proteases com propriedade de clivar as caspases e promoverem

a morte apoptótica da célula.^(32,102) O IFN- γ pode causar morte celular inativando proteínas e vias de síntese ou promovendo a expressão das moléculas Fas e Fas-L.⁽¹⁰³⁾

A história natural da doença de Chagas compreende as fases aguda e crônica, que podem ser sintomáticas ou assintomáticas.⁽⁶⁸⁾ Na fase aguda, o quadro clínico é de infecção generalizada e gravidade variável, sendo na maioria dos casos assintomática.^(79,90)

A maioria dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, apresentando ou não fase aguda evidente, evolui para fase crônica assintomática, caracterizada por equilíbrio parasito-hospedeiro, sem manifestações clínicas, denominado forma indeterminada, podendo permanecer assintomática por vários anos ou durante toda a vida.^(90,104)

A persistência indefinida do parasito no hospedeiro produz atividade prolongada do sistema imune, culminando no aparecimento de lesões teciduais características da fase crônica da doença de Chagas, cuja evolução está relacionada com a permanência desses parasitos em órgãos-alvo, desencadeando resposta imune específica que resulta em processo inflamatório acentuado. Essa fase é subdividida em forma indeterminada, cardíaca, digestiva, nervosa, mista e de exacerbação aguda.^(79,105)

Em tecidos cardíaco e esofágico de pacientes com cardiopatia e ou esôfagopatia chagásica, o DNA de *T. cruzi* têm sido detectado por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).⁽¹⁰⁶⁻¹¹⁰⁾ O DNA desse parasito pode também ser encontrado no cólon de pacientes com megacólon chagásico, sendo mais frequente no segmento entre reto e sigmoide.⁽¹⁰⁹⁾

Côbo *et al.*⁽¹¹¹⁾, investigando por meio de técnica imunoistoquímica segmentos de megacólon e megaesôfago, constataram que a frequência do *T. cruzi* no megaesôfago foi 20% e no megacólon 4%.

A forma digestiva mais frequente da doença de Chagas é o megaesôfago, seguida do megacólon. Essas manifestações se iniciam como incoordenação motora, devido ao comprometimento do sistema nervoso autônomo. A destruição neuronal observada no megaesôfago e megacólon possui correlação positiva com a intensidade do processo inflamatório e evolução da doença.^(109,111-113) Estudos epidemiológicos em áreas endêmicas do Brasil demonstraram que 7 a 11% dos pacientes crônicos possuem a forma digestiva da doença.^(114,115)

Na avaliação microscópica do megacólon chagásico observa-se infiltrado inflamatório crônico linfoplasmocitário junto aos plexos nervosos mioentérico (de Auerbach) e submucoso (de Meissner), associado à redução ou desaparecimento dos neurônios.⁽¹¹³⁾ Segundo Koberle para que exista megaesôfago é necessário redução de cerca de 85% no número de neurônios nesse órgão, enquanto no megacólon a perda neuronal deve ser no mínimo 50%.⁽¹¹⁶⁾

A avaliação histológica da submucosa desses órgãos revela edema, espessamento e aumento da concentração de colágeno; na mucosa nota-se inflamação crônica.^(113,117)

1.3- Carcinogênese e Doença de Chagas

Doentes portadores de megaesôfago chagásico apresentam maior

propensão ao desenvolvimento do câncer esofágico em relação à população geral, variando os índices de 3,9 a 10%.⁽¹¹⁸⁻¹¹⁹⁾ Isso provavelmente ocorre devido à dilatação do órgão e, conseqüentemente, estase alimentar que leva a esofagite e ou contato prolongado de carcinógenos com a mucosa.⁽¹²⁰⁾

Pacientes com megacólon apresentam dilatação cólica e estase fecal que favorecem o surgimento de neoplasia nesse segmento.⁽¹²¹⁾ Porém, diversas pesquisas constataram associação negativa entre megacólon chagásico e adenocarcinoma colorretal.⁽¹²²⁻¹²⁵⁾ Garcia *et al.*⁽¹²⁶⁾, estudando 894 casos de megacólon (95% chagásicos), constataram hiperplasia de mucosa (54,8%), úlceras (12%), inflamação crônica (28,3%) e atrofia da mucosa (2,6%); pólipos colorretais foram raros (0,4%).

Do ponto de vista histológico, as principais diferenças entre esôfago e cólon estão na mucosa, o epitélio esofágico é pavimentoso pluriestratificado enquanto o epitélio colorretal é colunar simples.⁽¹²⁷⁾ Os cânceres mais frequentes nesses órgãos são carcinoma espinocelular (CEC) no esôfago e adenocarcinoma no cólon.^(128,129)

Vespucio *et al.*⁽¹³⁰⁾, analisando ratos após indução da desnervação e carcinogênese colorretal com cloreto de benzalcônio e 1,2-dimetilhidrazina respectivamente, constataram diminuição da proliferação epitelial, da taxa de divisão celular e concentração de beta-catenina nas células da crípta, sendo o acúmulo nuclear dessa proteína relacionado à carcinogênese colorretal.

Escalante *et al.*⁽¹³¹⁾, estudando ratos após indução da carcinogênese colorretal por 1,2-dimetilhidrazina (DMH), constataram que a infecção crônica pelo *T. cruzi* assim como uso de nimesulida aumentaram a expressão das

metalotioneínas que exercem efeito protetor durante dano ao ácido desoxiribonucléico (DNA), provavelmente reduzindo a incidência desse câncer.

Kallnikova *et al.*⁽¹³²⁾ descrevem a propriedade anti-câncer do *T. cruzi* constatada em sarcomas, principalmente em cepas mais invasivas e em casos de alta parasitemia. Foi constatado tropismo do parasito pelas células tumorais quando comparado com outros tecidos, exceto o cardíaco. Para esses autores o mecanismo anti-câncer do *T. cruzi* ocorre com a penetração desse em células malignas do hospedeiro, alterando o metabolismo respiratório nas mitocôndrias.⁽¹³³⁾

Proteases do *T. cruzi* (cisteína-, serino-, melalo- e treonino-) apresentam funções de invasão celular e escape do parasito do sistema imune.⁽¹³³⁻¹³⁷⁾ A concentração elevada desse parasito na forma amastigota está correlacionada com a atividade da cisteína protease, envolvida na diferenciação celular, apresentando, portanto atividade anti-câncer.⁽¹³⁸⁻¹⁴⁵⁾

Alguns autores observaram que no meio de cultura, o *T. cruzi* libera vesículas contendo fragmentos de membrana plasmática.⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁸⁾ Essas vesículas podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (NO) em macrófagos e ativar a resposta imune.⁽¹⁴⁷⁾ Em estudo *in vivo*, Chaput *et al.*⁽¹⁴⁹⁾ verificaram que exosomos isolados de células dendríticas contêm moléculas de MHC classe I e peptídeos processados com capacidade de gerar resposta anti-tumor em linfócitos T CD8+ citotóxicos.

Diversos autores observaram que a atividade imunomoduladora do *T. cruzi* pode ser considerada efeito protetor contra o câncer.⁽¹⁵⁰⁻¹⁵⁴⁾ O parasito apresenta reação cruzada com componentes de tecidos normais de

vertebrados, tendo também antígenos em comum com o plasmocitoma humano⁽¹⁵⁵⁾ e células malignas do colo uterino.⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾

Cabral⁽¹⁵⁹⁾ propõe que em células cancerosas infectadas pelo *T. cruzi* ocorra multiplicação deste e, posteriormente, quebra da membrana celular e migração desse parasito para o espaço extracelular, onde ocorre sua morte. Segundo o autor, os resíduos desse protozoário junto com fragmentos de células neoplásicas funcionariam como antígenos tumorais, desencadeando assim formação de anticorpos.

1.4- Justificativa

Considerando que:

1- megaesôfago chagásico está associado a maior ocorrência do câncer de esôfago e que no megacólon chagásico adenomas e adenocarcinomas são raros;

2- alteração nas concentrações de algumas proteínas pode estar associada tanto à carcinogênese esofágica e colorretal como ao megacólon e megaesôfago chagásicos;

3- na literatura não foram encontrados trabalhos sobre o efeito protetor do megacólon chagásico na carcinogênese colorretal que explicassem a inexistência desse efeito no megaesôfago, justifica-se o presente estudo, pois do ponto de vista clínico, a identificação de proteínas associadas à carcinogênese e aos “megas” de etiologia chagásica poderá ser útil no desenvolvimento de drogas para a prevenção e ou tratamento do câncer colorretal. Além disso, a avaliação imunistoquímica poderá ser útil na melhor

compreensão da carcinogênese esofágica e colorretal.

1.5- Objetivo

Estudar a associação entre forma digestiva da doença de Chagas e carcinogênese, considerando-se a influência das proteínas c-Myc, GBP-2, APC, IFN- γ e *T. cruzi*.

2- MATERIAL E MÉTODO

2.1- Material

Foram analisadas amostras de tecidos esofágicos e intestinais de pacientes com mucosa histologicamente normal e nos portadores de megaesôfago e megacólon chagásicos (megas). Megaesôfago e megacólon foram caracterizados quando havia dilatação acompanhada ou não de alongamento do órgão, não provocadas por obstrução mecânica. O material foi obtido no arquivo do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP.

Como critérios de inclusão foram considerados a conservação dos blocos de parafina e, em casos de megas, positividade de pelo menos duas das três reações no sangue dos pacientes: ELISA, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta para *T. cruzi*. Como critérios de exclusão foram considerados má conservação dos blocos, arquivo incompleto e dúvidas diagnósticas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Anexo 1).

2.2- Método

2.2.1- Avaliação histopatológica

Foram selecionados blocos de parafina contendo fragmentos de tecido esofágico e intestinal anteriormente diagnosticados como: 1- segmentos de esôfago normal (n=20); 2- segmentos de megaesôfago chagásico (n=12); 3- segmentos de cólon normal (n=15) e 4- segmentos de megacólon chagásico

(n=13). Foram obtidos dos blocos de parafina cortes histológicos com 4 µm de espessura, montados em lâminas histológicas tratadas com silano (4%) e coradas com hematoxilina e eosina para reavaliação histopatológica.

Após essa reavaliação, foram excluídas amostras que não eram concordantes com o diagnóstico anterior ou aquelas em que o bloco de parafina não apresentava bom estado de conservação, resultando num total de 46 amostras distribuídas da seguinte forma: 1- segmentos de esôfago normal (n=16); 2- segmentos de megaesôfago chagásico (n=10); 3- segmentos de cólon normal (n=10) e 4- segmentos de megacólon chagásico (n=10).

2.2.1- Avaliação imunoistoquímica

2.2.1.1- Técnica imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica trata da detecção de uma proteína específica em corte histológico por meio de reação antígeno-anticorpo que resulta na marcação dessa proteína.⁽¹⁶⁰⁾ Os anticorpos utilizados podem ser monoclonais (especificidade alta e sensibilidade moderada evitando reações cruzadas) ou policlonais (sensibilidade alta e especificidade variável).⁽¹⁶⁰⁾

As peças incluídas em parafina foram processadas e analisadas por meio de técnica imunoistoquímica através do método da estreptavidina-biotina-peroxidase, utilizando os anticorpos primários anti-c-Myc, anti-GBP-2, anti-APC, anti-IFN-γ e anti-*T. cruzi* (Quadro 1) que consiste em nove etapas, descritas a seguir:

1- Desparafinização e hidratação das amostras cortadas em lâminas de microscopia previamente silanizadas: Secções de 4 µm de espessura foram

obtidas com o auxílio de micrótomo (Leica, RM 2125 RT, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com 10% de poli-L-lisina (Sigma, Estados Unidos) e levados a estufa a 60 °C por 1 hora. Em seguida, esses cortes foram desparafinizados por incubação em xileno 2 vezes durante 10 minutos cada vez, seguido da re-hidratação por meio de 5 banhos em etanol a 100% e 96%. Após isso, foram lavados uma vez em água destilada e uma vez em PBS (tampão de lavagem que contém cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico);

2- Recuperação antigênica: Depois de reidratadas, as amostras foram submetidas a um processo de recuperação antigênica, no qual mudanças de pressão, temperatura e pH quebraram a maioria das ligações cruzadas;

3- Bloqueio da peroxidase endógena: Após a recuperação dos sítios antigênicos, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3%. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,6 após 20 minutos de incubação;

4- Incubação de anticorpo primário: Os cortes foram incubados por 1 hora com os anticorpos primários diluídos em solução diluente (Dako, EUA), seguido de três lavagens em PBS;

5- Incubação do anticorpo secundário biotinilado: Após incubação com anticorpo primário, os cortes foram incubados com o sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako LSAB2 System, Peroxidase, EUA);

6- Incubação de estreptavidina-biotina-peroxidase: Após a incubação das amostras com anticorpos, foi aplicada a solução de estreptavidina-biotina-peroxidase, um complexo protéico que se liga fortemente as moléculas de

biotina associadas ao anticorpo secundário;

7- Incubação ou adição de substrato DAB: Após 30 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em uma solução com diaminobenzidina líquida (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, EUA). Assim, o cromógeno (DAB) foi aplicado e reagiu com a peroxidase associada a estreptavidina, emitindo coloração;

8- Contra-coloração: Após lavagem em PBS por 3 vezes, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos para que as estruturas não marcadas possam também ser vistas ao microscópio;

9- Desidratação e clarificação das amostras com montagem das lâminas: Após contra-coloração, as lâminas foram lavadas em 3 banhos de água morna, seguido de desidratação em concentrações crescentes de etanol (50%, 96% e puro) por 5 banhos em cada diluição. Em seguida, foi retirado álcool em bateria de xilol de concentração crescente. Concluindo, os cortes foram cobertos com lamínulas para conservação da amostra.

Quadro 1 - Especificidade, fabricante, diluição, clone, tipo e marcação dos anticorpos primários utilizados neste estudo.

Especificidade	Fabricante	Diluição	Clone	Tipo	Marcação
c-Myc	Imuny	1:500	-	policlonal	citoplasmática
GBP-2	Imuny	1:200	-	policlonal	citoplasmática
APC	Imuny	1:150	-	policlonal	citoplasmática
IFN- γ	Imuny	1:100	A2B7	monoclonal	citoplasmática
<i>T. cruzi</i>	Laboratório de pesquisa	1:100	39	monoclonal	citoplasmática

2.2.1.2- Análise imunoistoquímica

A análise da imuno-expressão das proteínas nos órgãos estudados foi feita por meio de microscopia de luz. Foi testada imunorreatividade das proteínas por meio dos anticorpos anti-c-Myc, anti-GBP-2, anti-APC, anti-IFN- γ e anti-*T. cruzi* em fragmentos de mucosa de: 1-megaesôfago, 2- esôfago normal, 3- megacólon e 4- cólon normal.

Na avaliação da expressão dessas proteínas, foram considerados 4 campos de maior aumento. Para análise da localização da expressão proteica no epitélio de cada órgão estudado considerou-se predomínio no ápice, base ou em forma difusa, exceto para proteína *T. cruzi*. A partir de adaptação das metodologias descritas por Franchi *et al.*⁽¹⁶¹⁾ e Iwamoto *et al.*⁽¹⁶²⁾, foi realizada análise imunoistoquímica semi-quantitativa por dois observadores, com

subsequente classificação em: negativo (< 10% de estruturas marcadas), positivo + (10 a 50% de estruturas marcadas) e positivo ++ (> 50% de estruturas marcadas). Para as proteínas IFN- γ e *T. cruzi* foram também considerados positivos os valores diferentes de 0 e negativos os demais, não sendo analisada a localização da expressão dessas proteínas.

2.3- Análise Estatística

Foram utilizados cálculos de estatística descritiva para variáveis contínuas (média, mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo) e frequência relativa e absoluta para variáveis categóricas. A diferença de idade entre os grupos com megacólon e cólon normal ou megaesôfago e esôfago normal foi comparada por meio do teste t de Student. Foi verificada associação da expressão de proteínas entre esôfago normal, cólon normal, megacólon chagásico e megaesôfago chagásico utilizando-se testes exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. A análise dos dados foi feita com o pacote estatístico PASW (IBM-SPSS, Chicago, Illinois, EUA) *for Windows* versão 18.

3- RESULTADOS

Os resultados serão apresentados considerando-se dados demográficos (sexo e idade) e análise imunoistoquímica em fragmentos de tecidos esofágico e cólico de 46 pacientes distribuídos em quatro grupos: 1- segmentos de megaesôfago chagásico (n=10); 2- segmentos de megacólon chagásico (n=10); 3- segmentos de esôfago normal (n=16) e 4- segmentos de cólon normal (n=10) (Apêndice 1).

Em todos os segmentos foram utilizados os seguintes anticorpos; anti-c-Myc, anti-GBP-2, anti-APC, anti-IFN- γ e anti-*T. cruzi*, totalizando 230 lâminas (Quadros 2 a 5).

3.1- Análise Geral

Os resultados para cada grupo de segmentos encontram-se nas Quadros 2 a 5. A estatística descritiva para faixa etária está expressa na Tabela 1.

3.1.1- Megaesôfago chagásico

Em pacientes com megaesôfago chagásico, o sexo masculino representou 60% e a idade variou de 48 a 77 anos ($66,1 \pm 8,2$ anos).

Analisando o resultado da análise imunoistoquímica do epitélio esofágico, observa-se que pacientes com megaesôfago chagásico (n = 10) apresentaram 90% de positividade para o anticorpo anti-APC, sendo que em

77,7% dos casos positivos a porcentagem de estruturas marcadas foi 10 a 50%.

Com relação à expressão do anti-c-Myc, todos os pacientes foram positivos, sendo que em 80% dos casos, esta ocorreu de forma difusa com mais de 50% de estruturas marcadas na amostra.

Utilizando o anticorpo anti-GBP-2 constatou-se 100% de positividade, tendo em 70% dos casos mais de 50% de estruturas marcadas e o restante entre 10 e 50%. Quanto à localização da expressão, em 80% a forma foi difusa e 20% no ápice.

A análise do anticorpo anti-IFN- γ mostrou apenas 30% de positividade considerando-se positivo aqueles casos com expressão maior que 10%. Quando todos os valores maiores que zero foram considerados positivos, verificou-se 40% de positividade.

O resultado da expressão proteica obtida por meio do anticorpo anti *T. cruzi* mostrou positividade em 50% dos casos. O Quadro 2 sintetiza os resultados da análise de todos os anticorpos no megaesôfago.

Quadro 2 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio esofágico de pacientes com megaesôfago chagásico com os anticorpos anti-APC, anti-c-Myc, anti-GBP-2, anti-IFN- γ e anti-*T. cruzi*.

N	Idade	Sexo	APC	c-Myc	GBP-2	IFN- γ	IFN- γ	<i>T. cruzi</i>
1	64	M	2	7	7	1	N	P
2	68	M	4	7	4	1	N	N
3	77	F	1	7	4	1	N	P
4	62	M	7	7	4	1	N	P
5	48	F	4	6	6	1	P	N
6	62	M	2	7	7	1	N	N
7	73	M	7	6	7	4	P	P
8	69	M	4	7	7	1	N	N
9	74	F	2	7	7	4	P	N
10	64	F	2	7	6	4	P	P

1 - negativo < 10%

2- positivo 10 a 50% base

3- positivo 10 a 50% ápice

4- positivo 10 a 50% difuso

5- positivo > 50% base

6- positivo > 50% ápice

7- positivo > 50% difuso

interferon: todos positivos são difusos

P-positivo

N-negativo

M- masculino

F- feminino

3.1.2- Megacólon chagásico

Dos 10 pacientes com megacólon chagásico, 40% são do sexo masculino e 60% do feminino. A idade variou de 42 a 90 anos ($68,0 \pm 13,8$ anos).

Analisando o resultado da análise imunoistoquímica do epitélio cólico, observa-se que pacientes com megacólon chagásico ($n = 10$) apresentaram 50% de positividade para o anticorpo anti-APC, sendo que em 60% desses, o predomínio da expressão dessa proteína foi observado no ápice.

Com relação ao anticorpo anti-c-Myc, todos os pacientes foram positivos, sendo que em apenas 10% dos casos a expressão predominou no ápice do epitélio.

Utilizando o anticorpo anti-GBP-2 constatou-se 60% de negatividade, sendo que na metade dos casos positivos a expressão dessa proteína foi observada entre 10 e 50% do tecido analisado.

A análise do anticorpo anti-IFN- γ mostrou apenas 10% de positividade considerando-se positivo aqueles casos com expressão maior que 10%. Quando todos os valores diferentes de 0 foram considerados positivos, verificou-se 90% de positividade.

O resultado da expressão proteica obtida por meio do anticorpo anti *T. cruzi* foi negativo em todos os casos. Os dados estão resumidos no Quadro 3.

Quadro 3 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio cólico de pacientes com megacólon chagásico.

N	Idade	Sexo	APC	C-Myc	GBP-2	IFN- γ	IFN- γ	<i>T.cruzi</i>
11	71	F	2	7	2	1	N	N
12	83	M	3	7	7	1	P	N
13	42	M	1	7	5	1	P	N
14	70	F	1	3	1	4	P	N
15	54	F	1	7	1	1	P	N
16	69	M	3	7	4	1	P	N
17	90	F	3	7	1	1	P	N
18	64	F	1	7	1	1	P	N
19	76	F	4	4	1	1	P	N
20	61	M	1	7	1	1	P	N

1 - negativo < 10%

2- positivo 10 a 50% base

3- positivo 10 a 50% ápice

4- positivo 10 a 50% difuso

5- positivo > 50% base

6- positivo > 50% ápice

7- positivo > 50% difuso

interferon: todos positivos são difusos

P-positivo

N-negativo

M- masculino

F- feminino

3.1.3- Esôfago normal

Dos 16 pacientes com esôfago normal, 81,2% são do sexo masculino e 18,8% do feminino. A idade variou de 14 a 59 anos ($39,7 \pm 13,2$ anos).

Analisando o resultado da análise imunoistoquímica do epitélio esofágico, observa-se que pacientes com esôfago normal ($n = 16$) apresentaram 87,5% de positividade para o anticorpo anti-APC, sendo que em 50% dos casos positivos a expressão ocorreu na base, o restante ocorreu de forma difusa em cada amostra analisada.

Com relação ao anticorpo anti-C-Myc, todos os pacientes foram positivos em mais de 50% do epitélio, sendo que em 56,3% dos casos o predomínio da expressão ocorreu de forma difusa e o restante predominou no ápice.

Utilizando o anticorpo anti-GBP-2 constatou-se 31,3% de positividade, sendo que em 60% desses casos, observou-se positividade entre 10 e 50%. Quanto à localização da expressão, em 80% a forma foi difusa e 20% no ápice.

A análise do anticorpo anti-IFN- γ mostrou apenas 43,8% de positividade considerando-se positivo aqueles casos com expressão maior que 10%. Quando todos os valores diferentes de 0 foram considerados positivos, verificou-se 62,5% de positividade.

O resultado da expressão proteica obtida por meio do anticorpo anti *T. cruzi* mostrou positividade em 12,5% dos casos. Os dados encontram-se no Quadro 4.

Quadro 4 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio esofágico de pacientes com esôfago normal.

N	Idade	Sexo	APC	C-Myc	GBP-2	IFN- γ	IFN- γ	<i>T.cruzi</i>
21	46	F	7	6	7	1	P	N
22	46	M	7	6	4	1	P	N
23	54	F	2	7	1	4	P	N
24	14	F	2	7	4	4	P	P
25	59	F	7	7	1	1	P	N
26	33	F	7	7	1	7	P	N
27	48	F	2	6	1	1	N	N
28	38	F	4	7	1	1	N	N
29	19	M	2	7	1	7	P	N
30	45	F	1	7	7	1	N	N
31	47	F	2	7	1	1	N	N
32	59	F	1	6	1	1	N	N
33	35	F	7	6	3	4	P	N
34	30	F	4	6	1	1	N	N
35	34	F	2	7	1	4	P	P
36	28	M	2	6	1	7	P	N

1 - negativo < 10%

2- positivo 10 a 50% base

3- positivo 10 a 50% ápice

4- positivo 10 a 50% difuso

5- positivo > 50% base

6- positivo > 50% ápice

7- positivo > 50% difuso

interferon: todos positivos são difusos

P-positivo

N-negativo

M- masculino

F- feminino

3.1.4- Cólon normal

Dos 10 pacientes com cólon normal, 100% são do sexo feminino. A idade variou de 25 a 50 anos ($43,0 \pm 7,7$ anos).

Analisando o resultado da análise imunoistoquímica do epitélio cólico, observa-se que pacientes com cólon normal ($n = 10$) apresentaram 20% de positividade para o anticorpo anti-APC, sendo que em 50% desses, o predomínio da expressão dessa proteína foi observado no ápice e restante de forma difusa.

Com relação ao anticorpo anti-c-Myc, todos os pacientes foram positivos, sendo que em 70% a expressão ocorreu em mais de 50% do epitélio. Quanto à localização no epitélio, a expressão dessa proteína predominou no ápice em 50% dos casos.

Utilizando o anticorpo anti-GBP-2 constatou-se 100% de negatividade.

A análise do anticorpo anti-IFN- γ mostrou apenas 20% de positividade considerando-se positivo aqueles casos com expressão maior que 10%. Quando todos os valores diferentes de 0 foram considerados positivos, verificou-se 30% de positividade.

O resultado da expressão proteica obtida por meio do anticorpo anti *T. cruzi* foi negativo em todos os casos. Os dados estão expressos no Quadro 5.

Quadro 5 - Resultado da análise imunoistoquímica de epitélio cólico de pacientes com cólon normal.

N	Idade	Sexo	APC	C-Myc	GBP-2	IFN- γ	IFN- γ	<i>T.cruzi</i>
37	36	F	1	6	1	1	N	N
38	42	F	7	6	1	4	P	N
39	41	F	1	3	1	1	P	N
40	45	F	1	7	1	7	P	N
41	46	F	1	3	1	1	N	N
42	25	F	3	7	1	1	N	N
43	50	F	1	3	1	1	N	N
44	50	F	1	7	1	1	N	N
45	47	F	1	7	1	1	N	N
46	48	F	1	7	1	1	N	N

1 - negativo < 10%

2- positivo 10 a 50% base

3- positivo 10 a 50% ápice

4- positivo 10 a 50% difuso

5- positivo > 50% base

6- positivo > 50% ápice

7- positivo > 50% difuso

interferon: todos positivos são difusos

P-positivo

N-negativo

M-masculino

F- feminino

A média de idade dos pacientes com megaesôfago chagásico, megacólon chagásico, esôfago normal e cólon normal variou de 39,7 (esôfago normal) a 68 anos (megacólon chagásico) (Tabela 1).

Tabela 1 - Estatística descritiva da faixa etária (anos) de pacientes com megaesôfago chagásico (ME), megacólon chagásico (MC), esôfago normal (EN) e cólon normal (CN).

Órgão	Média	DP	Mediana	Min	Max
ME	66,1	8,2	66,0	48	77
MC	68,0	13,8	69,5	42	90
EN	39,7	13,2	41,5	14	59
CN	43,0	7,7	45,5	25	50

DP = desvio padrão; Min = mínimo; Max = máximo

3.2- Análise de Associação

3.2.1- Faixa etária x órgãos

Com relação à faixa etária de pacientes com megaesôfago chagásico e esôfago normal (Figura 13), houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$), tendo os portadores de megaesôfago chagásico maior idade (Tabela 2).

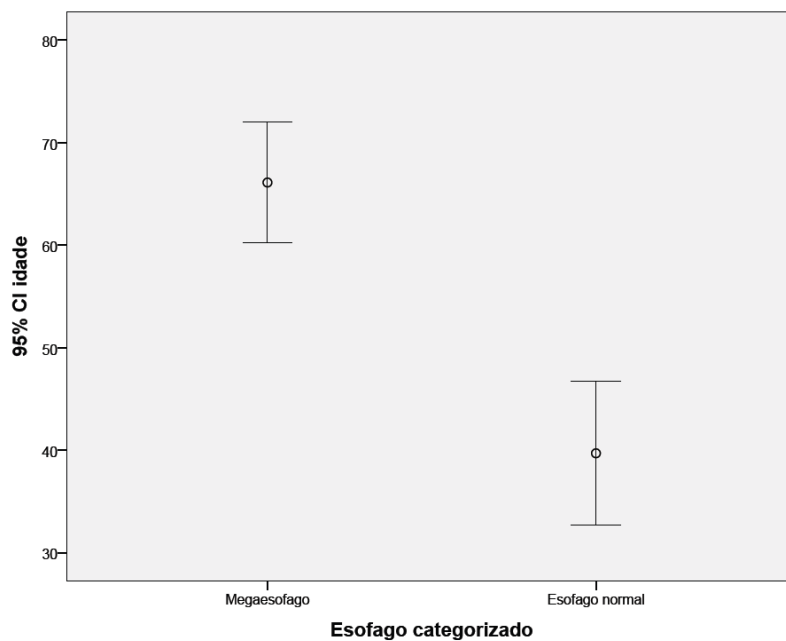


Figura 13 - Gráfico mostrando intervalo de confiança de 95% da faixa etária (anos) em pacientes com megaesôfago chagásico (ME) e esôfago normal (EN).

Tabela 2 - Comparação da média de idade (anos) entre pacientes com megaesôfago chagásico (ME) e esôfago normal (EN).

Órgão	Média	DP	<i>P</i>
ME	66,1	8,2	< 0,001
EN	39,7	13,2	

DP = desvio padrão; teste t de Student

Quanto à faixa etária de pacientes com megacólon chagásico e cólon normal (Figura 14), houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$), tendo os portadores de megacólon chagásico maior idade.

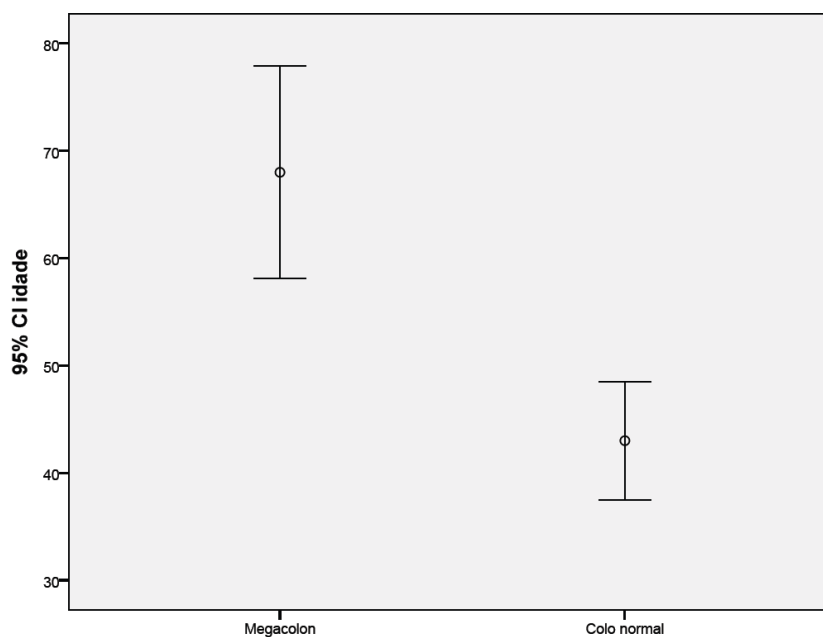


Figura 14 - Gráfico mostrando intervalo de confiança de 95% da faixa etária (anos) em pacientes com megacólon chagásico (MC) e cólon normal (CN).

Tabela 3 - Comparação da média de idade (anos) entre pacientes com megacólon chagásico (MC) e cólon normal (CN).

Órgão	Média	DP	<i>P</i>
MC	68,0	13,8	< 0,001
CN	43,0	7,7	

DP = desvio padrão; teste t de Student

3.2.2- Proteínas x órgãos x localização da expressão proteica no epitélio

Considerando todos os órgãos estudados, constatou-se positividade da expressão das proteínas APC, c-Myc, GBP-2, IFN- γ e *T.cruzi* em, respectivamente, 65,2%, 100%, 41,3%, 56,52% e 15,22% desses. As Tabelas 4 a 9 sintetizam esses resultados.

Houve positividade da expressão da proteína APC em 90%, 87,5%, 50%, e 20% dos casos de megaesôfago chagásico (ME), esôfago normal (EN), megacólon chagásico (MC) e cólon normal (CN) respectivamente (Tabela 4). Na proteína c-Myc todos os casos foram positivos (Tabela 5). Ocorreu positividade da proteína GBP-2 em 100%, 31,2%, 40%, e 0% dos casos de ME, EN, MC e CN, respectivamente (Tabela 6). Constatou-se expressão do IFN- γ , em 40%, 62,5%, 90%, e 30% dos casos de ME, EN, MC e CN, respectivamente (Tabela 7). A proteína *T.cruzi* foi positiva em 50% e 12,5%, dos casos de ME e EN, respectivamente, e foi negativa nas amostras de MC e CN (Tabela 8).

Observou-se que para a proteína GBP-2 a porcentagem de estruturas marcadas superior a 50% ocorreu em 70%, 12,5%, 20% e 0% dos casos de ME, EN, MC e CN respectivamente.

Quanto à localização, em 30,4% das amostras positivas para APC, 65,2% para c-Myc e 30,4% para GBP-2 a expressão predominou na forma difusa. Considerando os casos de MC e CN que apresentaram positividade para APC, houve predomínio da expressão no ápice em 60% e 50% desses, respectivamente.

Tabela 4 - Distribuição da frequência de expressão da proteína APC em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.

Órgão	N < 10%	P 10-50% base	P 10-50% ápice	P 10-50% difuso	P>50% base	P>50% ápice	P>50% difuso
ME	1 (10)	4 (40)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	2 (20)
EN	2 (12,5)	7 (43,8)	0 (0)	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	5 (31,2)
MC	5 (50)	1 (10)	3 (30)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CN	8 (80)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)

ME = megaesôfago chagásico; EN = esôfago normal; MC = megacólon chagásico; CN = colón normal; N = negatividade; P = positividade
valores entre parênteses correspondem à porcentagem

Tabela 5 - Distribuição da frequência de expressão da proteína c-Myc em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.

Órgão	N < 10%	P10-50% base	P10-50% ápice	P10-50% difuso	P>50% base	P>50% ápice	P>50% difuso
ME	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	8 (80)
EN	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (43,8)	9 (56,2)
MC	0 (0)	0 (0)	1 (10)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	8 (80)
CN	0 (0)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	5 (50)

ME = megaesôfago chagásico; EN = esôfago normal; MC = megacólon chagásico; CN = colón normal; N = negatividade; P = positividade
valores entre parênteses correspondem à porcentagem

Tabela 6 - Distribuição da frequência de expressão da proteína GBP-2 em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.

Órgão	N < 10%	P10-50% base	P10-50% ápice	P10-50% difuso	P>50% base	P>50% ápice	P>50% difuso
ME	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	2 (20)	5 (50)
EN	11 (68,8)	0 (0)	1 (6,2)	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	2 (12,5)
MC	6 (60)	1 (10)	0 (0)	1 (10)	1 (10)	0 (0)	1 (10)
CN	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

ME = megaesôfago chagásico; EN = esôfago normal; MC = megacólon chagásico; CN = colón normal; N = negatividade; P = positividade
valores entre parênteses correspondem à porcentagem

Tabela 7 - Distribuição da frequência de expressão da proteína IFN- γ em todos os órgãos estudados conforme sua localização no epitélio e porcentagem de estruturas marcadas.

Órgão	N < 10%	P10-50% base	P10-50% ápice	P10-50% difuso	P>50% base	P>50% ápice	P>50% difuso
ME	7 (70)	0 (0)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
EN	9 (56,2)	0 (0)	0 (0)	4 (25)	0 (0)	0 (0)	3 (18,8)
MC	9 (90)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CN	8 (80)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1 (10)

ME = megaesôfago chagásico; EN = esôfago normal; MC = megacólon chagásico; CN = colón normal; N = negatividade; P = positividade
valores entre parênteses correspondem à porcentagem

Tabela 8 - Distribuição da frequência de expressão da proteína IFN- γ em todos os órgãos estudados considerando negativos casos com ausência de expressão dessa proteína.

Órgão	N	P
ME	6 (60)	4 (40)
EN	6 (37,5)	10 (62,5)
MC	1 (10)	9 (90)
CN	7 (70)	3 (30)

ME = megaesôfago chagásico; EN = esôfago normal;
 MC = megacólon chagásico; CN = colón normal;
 N = negativo; P = positivo
 valores entre parênteses correspondem à porcentagem

Tabela 9 - Distribuição da frequência de expressão da proteína *T.cruzi* em todos os órgãos estudados considerando negativos casos com ausência de expressão dessa proteína.

Órgão	N	P
ME	5 (50)	5 (50)
EN	14 (87,5)	2 (12,5)
MC	10 (100)	0 (0)
CN	10 (100)	0 (0)

ME = megaesôfago chagásico; EN = esôfago normal;
 MC = megacólon chagásico; CN = colón normal;
 N = negativo; P = positivo
 valores entre parênteses correspondem à porcentagem

Analisando a expressão da proteína APC no megacólon chagásico (Figura 15) e cólon normal, constatou-se maior positividade no megacólon chagásico (50%) em relação ao cólon normal (20%). Porém, não houve diferença significativa ($P = 0,35$).

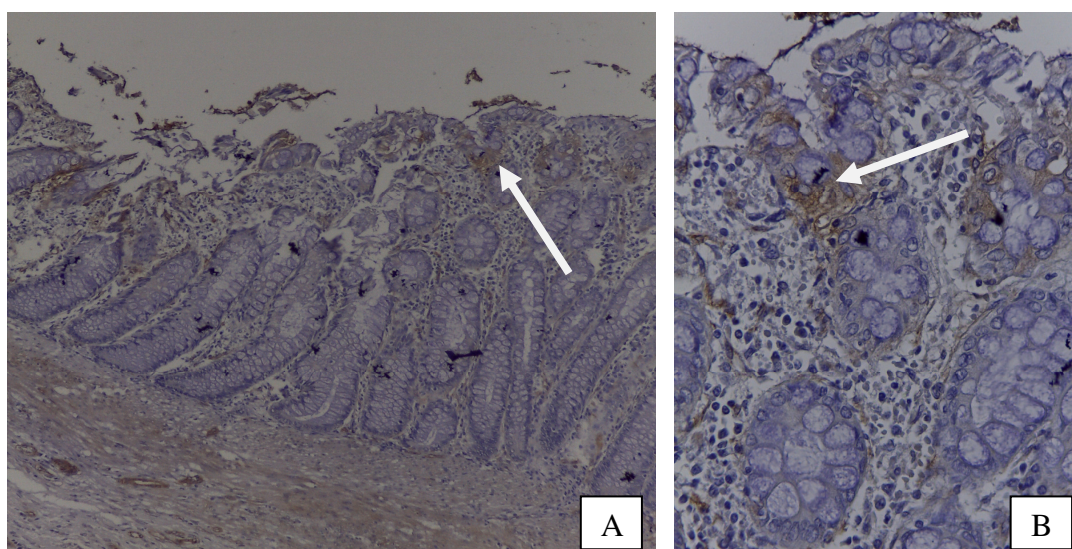


Figura 15 - Expressão da proteína APC em 10 a 50% do epitélio com predomínio em ápice, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-APC, A:100X e B:400X) (Paciente n°16, 69 anos, sexo masculino).

A expressão da proteína c-Myc em todos os órgãos estudados apresentou 100% de positividade. Entre megacólon chagásico e cólon normal (Figuras 16 e 17) não houve diferença significativa na proporção de positividade da expressão dessa proteína ($P = 1,00$). Quanto à localização no epitélio, houve predomínio no ápice em 10% dos megacólons chagásicos e em 50% dos cólons normais ($P = 0,141$).

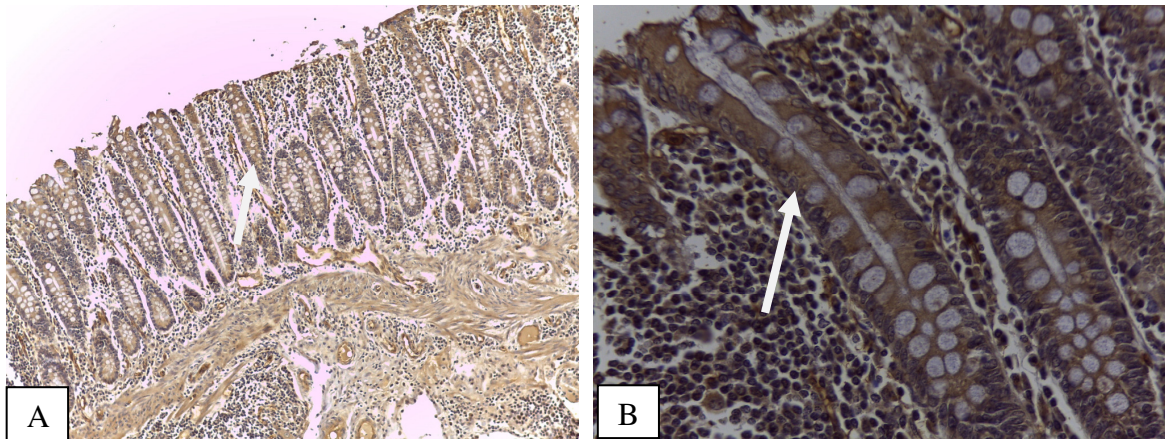


Figura 16 - Expressão da proteína c-Myc em mais de 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-c-Myc, A:100X e B:400X) (Paciente nº12, 83 anos, sexo masculino).

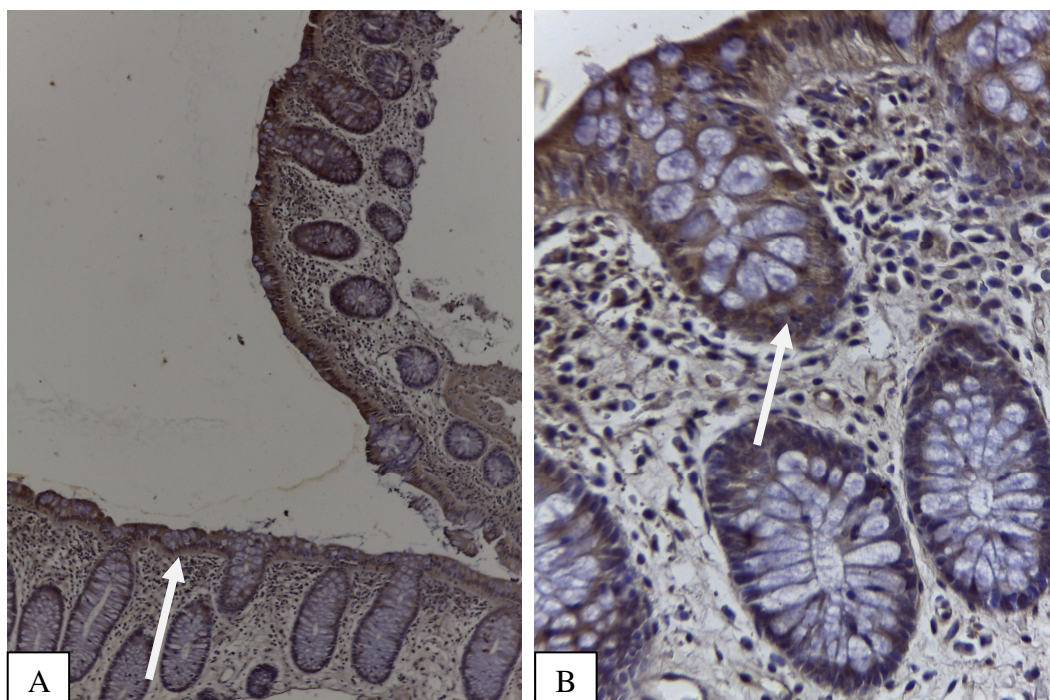


Figura 17 - Expressão da proteína c-Myc em mais de 50% do epitélio com predomínio em ápice, marcação citoplasmática da mucosa do cólon normal (seta branca) (Anticorpo c-Myc, A:100X e B:400X) (Paciente n° 38, 42 anos, sexo feminino).

O resultado da expressão da proteína GBP-2 mostrou estatisticamente maior positividade no megacólon chagásico (100%) quando comparado com megacólon chagásico (40%) ($P = 0,011$). Comparando megacólon chagásico com esôfago normal (Figuras 18 e 19) houve diferença significativa ($P = 0,001$), tendo 100% de positividade no megacólon e 31,2% no esôfago normal. A diferença na expressão dessa proteína no megacólon chagásico (Figura 20) e cólon normal não foi significativa ($P = 0,087$), havendo tendência para maior positividade no megacólon (40%) em relação ao cólon normal (0,0%).

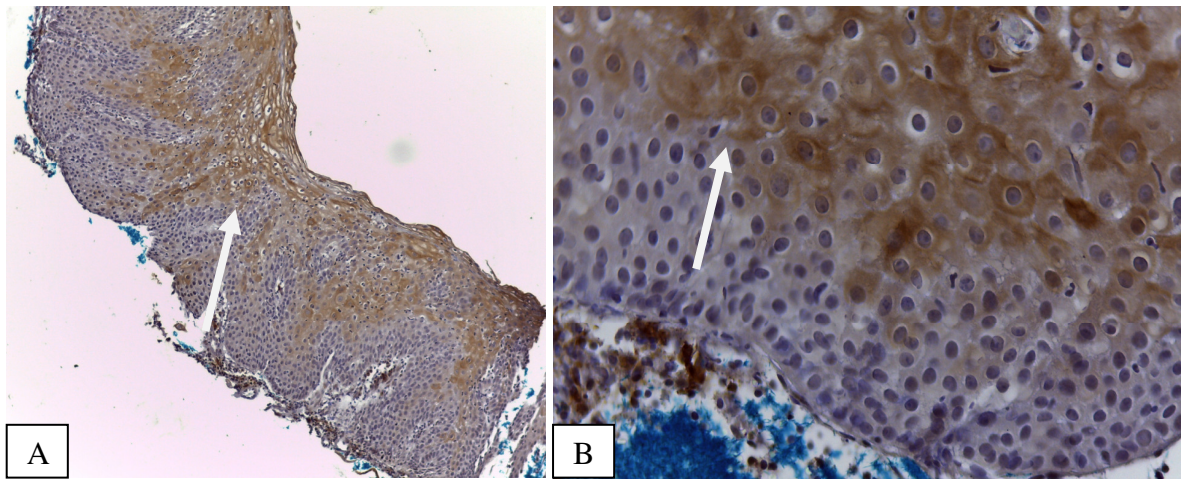


Figura 18 - Expressão da proteína GBP-2 em mais de 50% do epitélio com predomínio em ápice, marcação citoplasmática da mucosa do megaesôfago chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-GBP-2, A:100X e B:400X) (Paciente n°19, 76 anos, sexo feminino).

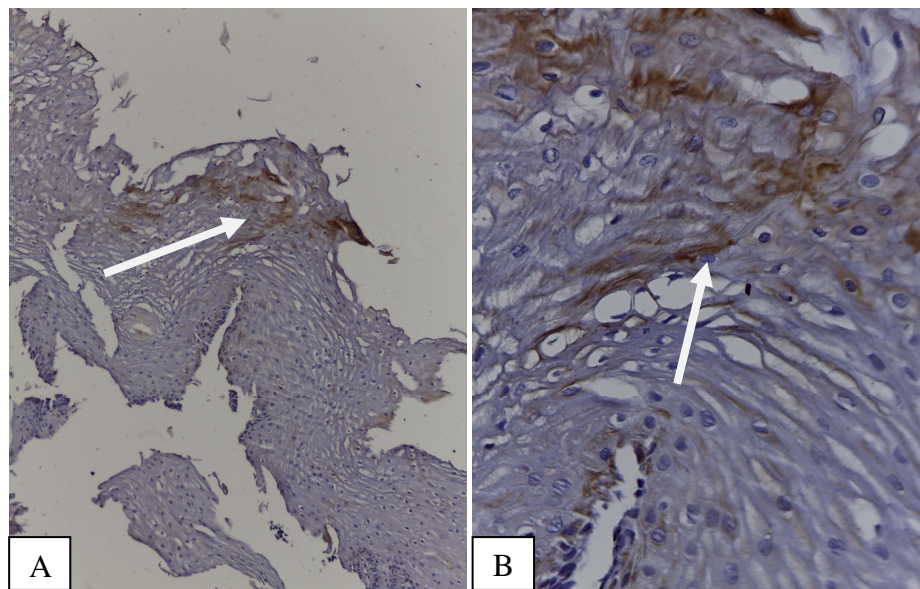


Figura 19 - Expressão da proteína GBP-2 em 10 a 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de esôfago normal (seta branca) (Anticorpo anti-GBP-2, A:100X e B:400X) (Paciente n°22, 46 anos, sexo masculino).

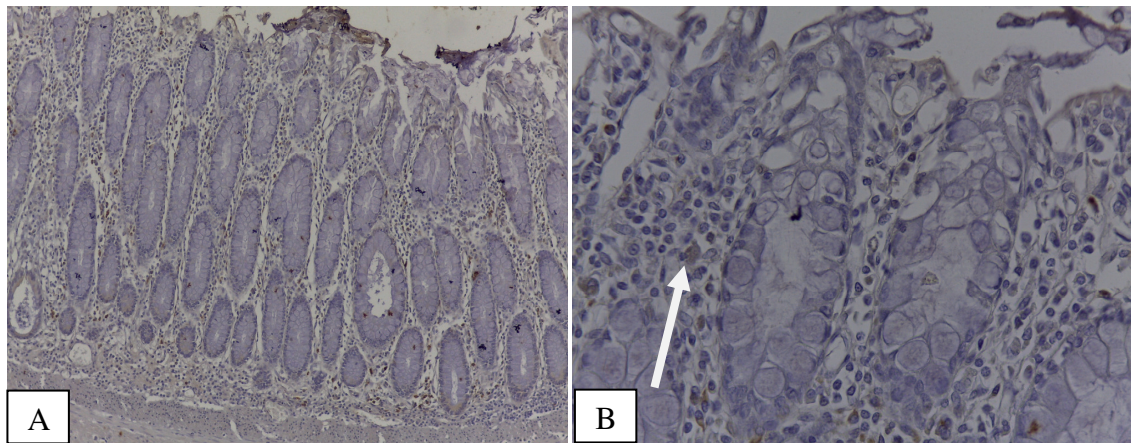


Figura 20 - Expressão da proteína GBP-2 em menos de 10% do epitélio, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-GBP-2, A:100 e B:400X) (Paciente n° 19, 76 anos, sexo feminino).

A análise da expressão do IFN- γ no megacólon chagásico (Figuras 21 e 22) e cólon normal (Figura 23) considerando-se positivo aqueles casos com expressão maior que 10% mostrou maior positividade no cólon normal (20%) quando comparado ao megacólon chagásico (10%). Quando todos os valores maiores que zero foram considerados positivos, verificou-se maior positividade no megacólon chagásico (90%) em relação ao cólon normal (30%), sendo a diferença significativa ($P = 0,02$).

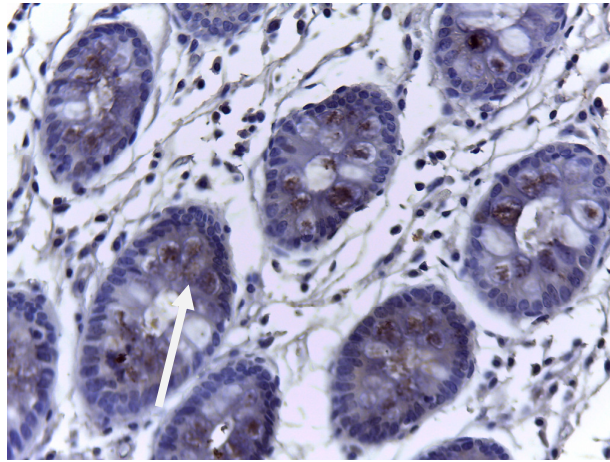


Figura 21 - Expressão da proteína IFN- γ em 10 a 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-IFN- γ , 400X) (Paciente n°14, 70 anos, sexo feminino).

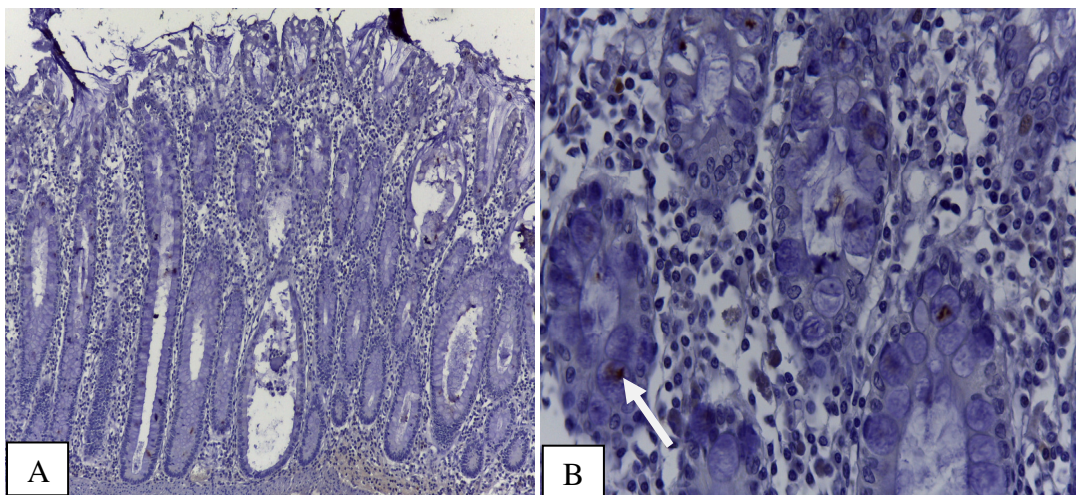


Figura 22 - Expressão da proteína IFN- γ em menos de 10% do epitélio, marcação citoplasmática da mucosa do megacólon chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-IFN- γ , A:100X e B:400X) (Paciente n°19, 76 anos, sexo feminino).

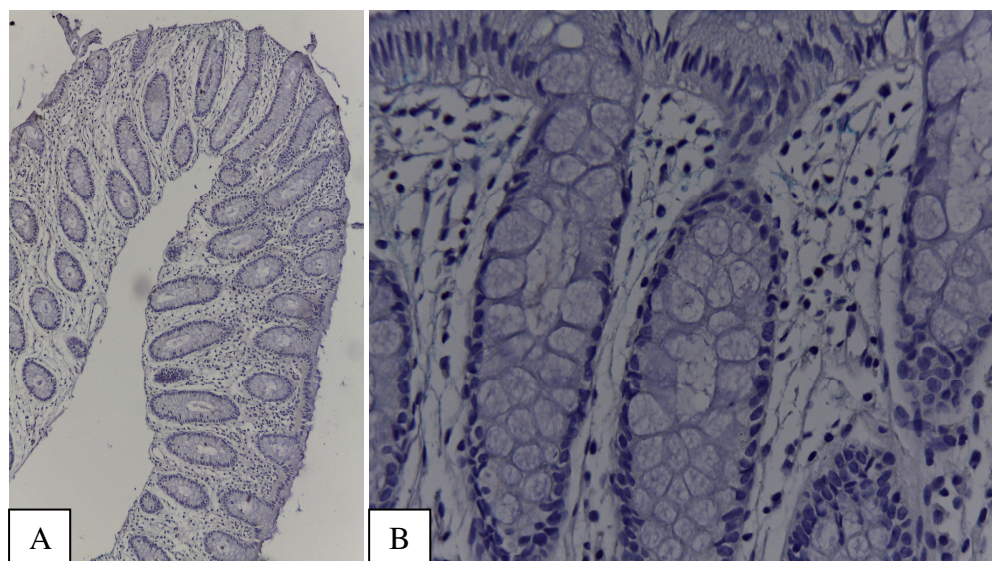


Figura 23 - Ausência de expressão da proteína IFN- γ no epitélio de cólon normal (Anticorpo anti-IFN- γ , A:100 e B:400X) (Paciente nº41, 46 anos, sexo feminino).

A expressão da proteína IFN- γ no megaesôfago chagásico e megacólon chagásico considerando-se positivos todos os valores maiores que zero, apresentou maior positividade no megacólon (90%) em relação ao megaesôfago (40%), havendo tendência para diferença significativa ($P = 0,057$).

Na comparação entre megaesôfago chagásico e esôfago normal como podemos observar na Figura 24, considerando-se positivos todos os valores maiores que zero, não houve diferença significativa na expressão da proteína IFN- γ ($P = 0,422$), havendo maior positividade no esôfago normal (62,5%) em relação ao megaesôfago (40%).

Comparando a expressão da proteína IFN- γ entre megacólon-megaesôfago e cólon normal-esôfago normal considerando-se positivos todos

os valores diferentes de 0, não houve diferença significativa ($P = 0,377$), tendo 65% de positividade no megacólon-megaesôfago e 50% no cólon-normal-esôfago normal.

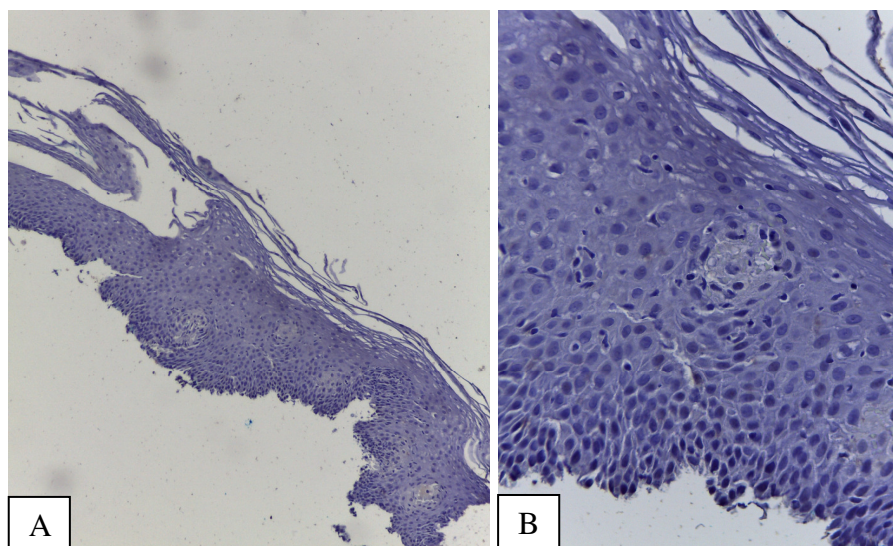


Figura 24 - Ausência da expressão da proteína IFN- γ na mucosa do megaesôfago chagásico (Anticorpo anti-IFN- γ , A:100 e B:400X) (Paciente n° 68, 46 anos, sexo masculino).

A expressão da proteína *T. cruzi* apresentou 100% de negatividade no megacólon chagásico e cólon normal. Na comparação entre megaesôfago chagásico e esôfago normal, a positividade foi maior no megaesôfago (50%) em relação ao esôfago normal (12,5%), havendo tendência para diferença significativa ($P = 0,069$). Entre megaesôfago chagásico (Figuras 25 e 26) e megacólon chagásico a positividade foi estatisticamente maior no megaesôfago (50%) quando comparado ao megacólon (0,0%) ($P = 0,033$).

Comparando a expressão da proteína *T. cruzi* entre megacólon-megaesôfago e cólon normal-esôfago normal, a positividade no megacólon-megaesôfago foi 25% e no cólon-normal-esôfago normal 7,7%, não havendo diferença significativa ($P = 0,213$).

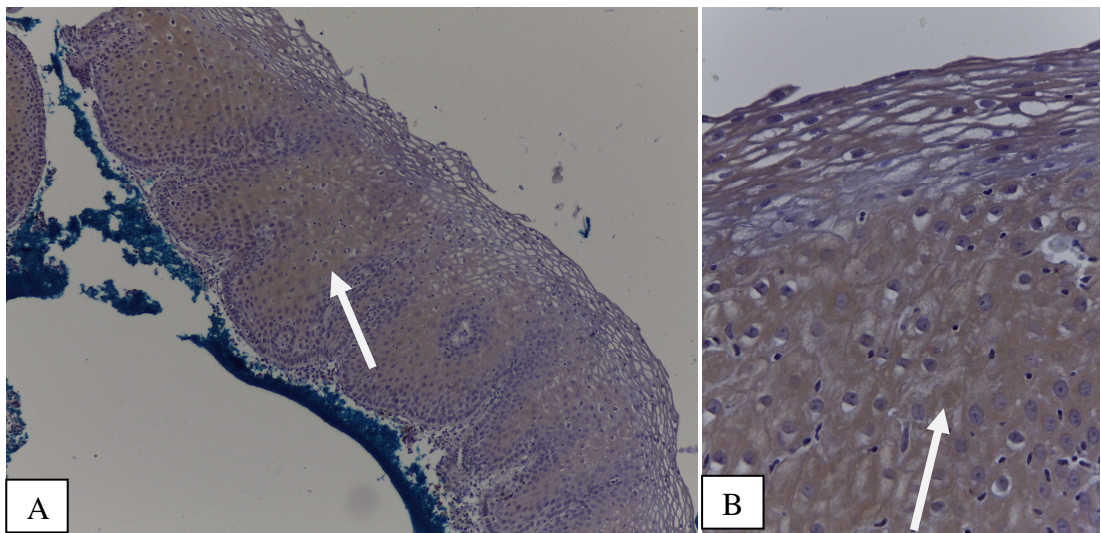


Figura 25 - Expressão da proteína *T. cruzi* em mais de 50% do epitélio na forma difusa, marcação citoplasmática da mucosa de megaesôfago chagásico (seta branca) (Anticorpo anti-*T. cruzi*, A:100X e B:400X) (Paciente n°10, 64 anos, sexo feminino).

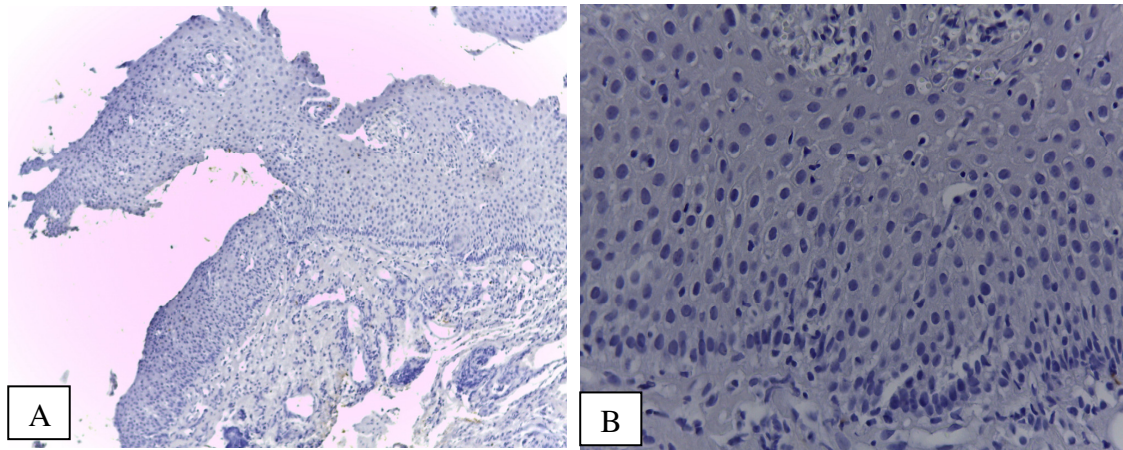


Figura 26 - Ausência de expressão da proteína *T. cruzi* na mucosa do megaesôfago chagásico (Anticorpo anti-*T. cruzi*, A:100X e B:400X) (Paciente n°9, 74 anos, sexo feminino).

3.2.3- Associação entre expressão de proteínas

c-Myc e IFN- γ

Analisando todos os órgãos estudados ($n = 46$), houve 100% de positividade para proteína c-Myc e 28,3% para IFN- γ , considerando-se positivos todos os valores maiores que zero para essa proteína.

A expressão da proteína c-Myc de 10-50% ocorreu em 10,9% dos casos, sendo que a positividade do IFN- γ ocorreu em 20% desses. Quando a expressão de c-Myc considerada foi $> 50\%$, isso representou 89,1% dos casos, o IFN- γ foi positivo em 29,3% desses. Não houve associação significativa entre intensidade da expressão do c-Myc e a positividade do IFN- γ ($P = 1,000$).

c-Myc e APC

No cólon normal houve 100% de positividade para proteína c-Myc e 20%

para APC. No megacólon chagásico a positividade foi 100% para c-Myc e 50% para APC.

GBP-2 e IFN- γ

Considerando todos os órgãos analisados (n = 46), houve 41,3% de positividade para proteína GBP-2 e 28,3% para *IFN- γ* , considerando-se positivos todos os valores diferentes de 0 para essa proteína.

De todos os casos GBP-2 positivos, apenas 28,3% deles apresentam *IFN- γ* positivos. De todos os casos *IFN- γ* positivos, apenas 38,5% deles apresentam GBP-2 positivos.

4- DISCUSSÃO

Houve associação significativa entre a maior frequência de expressão da proteína GBP2 no megaesôfago chagásico quando comparado ao megacólon chagásico e esôfago normal. Segmentos de megacólon chagásico de indivíduos mais idosos apresentaram maior frequência da expressão da proteína APC em relação a segmentos de cólon normal de indivíduos mais jovens. Houve associação significativa entre a maior frequência de expressão da proteína IFN- γ no megacólon chagásico comparado ao cólon normal e megaesôfago. A proteína *T. cruzi* apresentou maior frequência de expressão no megaesôfago chagásico do que no megacólon chagásico. A maior frequência de expressão das proteínas GBP2 no megaesôfago chagásico e IFN- γ no megacólon chagásico pode explicar o aumento da incidência de carcinoma espinocelular em portadores de megaesôfago chagásico considerando o efeito protetor do megacólon chagásico contra o adenocarcinoma colorretal.

A proteína c-Myc em quantidades excessivas induz proliferação celular não controlada favorecendo o surgimento do câncer.^(22,24) A expressão dessa proteína em todos os órgãos estudados apresentou 100% de positividade. É importante ressaltar que houve predomínio da proporção de positividade imunohistoquímica > 50% em todos os casos de megaesôfago e em 80% dos casos de megacólon. Quanto à localização dessa expressão, nos megas a forma difusa foi constatada em 80% dos casos enquanto no esôfago e cólon normais em 56,2% e 50%, respectivamente. Não ocorreu expressão de c-Myc

na base do epitélio dos órgãos analisados, o que também foi constatado em cólons normais por Jones *et al.*⁽¹⁶³⁾. O predomínio de c-Myc em pacientes com megaesôfago chagásico sugere seu envolvimento no mecanismo que explique a maior ocorrência de câncer nesse órgão,⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾ considerando a ocorrência rara dessa doença no megacólon.⁽¹²⁶⁾

No megaesôfago a expressão da proteína c-Myc apresentou 100% de positividade enquanto a proteína *T. cruzi* mostrou positividade em 50% dos casos, não ocorrendo inibição do c-Myc pelo *T. cruzi*. Esperava-se menor expressão da proteína c-Myc nos casos de positividade para o *T. cruzi*, pois na literatura constata-se redução dos níveis de c-Myc em ratos infectados pelo *T. cruzi*.⁽⁸⁸⁾

Analisando todos os órgãos estudados (n = 46), houve 100% de positividade para proteína c-Myc e 28,3% para *IFN-γ*. Não ocorreu associação entre essas proteínas. Porém, segundo alguns autores a proteína c-Myc pode ser inibida pelo *IFN-γ*.^(26,27)

A proteína GBP-2 foi positiva em 40% dos pacientes com megacólon chagásico, 31,3% dos pacientes com esôfago normal e 100% dos portadores de megaesôfago chagásico.

Doentes portadores de megaesôfago chagásico apresentam maior propensão ao desenvolvimento do câncer esofágico em relação à população geral, variando os índices de 3,9 a 10%.⁽¹¹⁸⁻¹¹⁹⁾ Isso provavelmente ocorre devido à dilatação do órgão e, conseqüentemente, estase alimentar que leva a esofagite e ou contato prolongado de carcinógenos com a mucosa.⁽¹²⁰⁾ Foi demonstrado que GBP-2 é capaz de induzir a formação de tumores em

camundongos.⁽⁶³⁾ Em pacientes com CEC esofágico, essa proteína é considerada um marcador tumoral.⁽⁶⁴⁾

A expressão da GBP-2 em 100% dos portadores megaesôfago chagásico e a menor ocorrência dessa proteína nos indivíduos com megacólon chagásico e esôfago normal pode explicar o aumento da incidência de câncer em portadores de megaesôfago chagásico considerando o efeito protetor do megacólon chagásico contra o câncer colorretal.

Apesar da ausência de significância estatística ($P = 0,087$) entre a expressão de GBP-2 no megacólon chagásico e cólon normal, houve tendência para maior positividade no megacólon (40%) em relação ao cólon normal (0,0%). Esse achado pode ser explicado pelo fato das GBPs serem induzidas por interferons tipos I (α, β) e principalmente II (γ).⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ Embora a GBP-2 esteja envolvida na proliferação celular, na literatura não foram encontrados trabalhos mostrando associação entre essa proteína e câncer colorretal.

Analisando todos os órgãos estudados ($n = 46$), houve 41,3% de positividade para proteína GBP-2 e 28,3% para *IFN- γ* . Esse resultado pode ser devido ao fato das GBPs não serem induzidas somente por *IFN- γ* , mas também por interferons tipos I (α, β),⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ interleucinas e fator de necrose tumoral (*TNF- α*).⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾

A idade avançada é fator de risco para desenvolvimento de câncer colorretal.⁽¹⁶⁴⁾ A redução dos níveis celulares da proteína APC está associada à elevação da concentração nuclear da beta-catenina, o que estimula a divisão celular, favorecendo o aparecimento de câncer.⁽¹⁵⁾

Em nosso trabalho, a proteína APC foi positiva em 20% dos pacientes

com cólon normal (média de idade = 43,0 anos) e em 50% dos portadores de megacólon chagásico (média de idade = 68,0 anos), porém essa diferença não foi significativa.

Embora indivíduos mais idosos tenham maior risco para o câncer colorretal, neste estudo apresentaram maior frequência da expressão da proteína APC em relação aos mais jovens. Esse resultado sugere que a proteína APC poderia ser responsável pelo efeito protetor do megacólon chagásico contra o câncer colorretal.

Com relação à expressão da proteína *IFN-γ*, quando na análise foram considerados casos positivos apenas aqueles com marcação superior a 10% de estruturas marcadas, a quantidade de casos positivos foi baixa, provavelmente devido a menor sensibilidade desse anticorpo monoclonal.⁽¹⁶⁰⁾ Por essa razão, foram considerados positivos também os casos com expressão dessa proteína maior que 0 e menor que 10% de estruturas marcadas.

A análise da expressão do *IFN-γ* mostrou maior positividade no megacólon chagásico (90%) em relação ao cólon normal (30%). Na literatura não foram encontradas pesquisas sobre aumento da concentração de *IFN-γ* em megacólon chagásico, porém alguns autores verificaram produção elevada dessa proteína em 83% de indivíduos com cardiomiopatia chagásica.⁽⁹⁸⁾

Avaliando a expressão da proteína *IFN-γ* verificou-se maior positividade no megacólon chagásico (90%) em relação ao megaesôfago chagásico (40%). Estudos comparativos sobre expressão do *IFN-γ* entre esses órgãos não foram encontrados. Entretanto, esse resultado pode indicar que o efeito protetor do megacólon chagásico contra o câncer colorretal esteja associado à maior

concentração dessa proteína nesse segmento.

Na comparação da expressão de IFN- γ entre megaesôfago chagásico e esôfago normal houve maior positividade no esôfago normal (62,5%) em relação ao megaesôfago (40%). Esse resultado sugere que a não ocorrência da maior expressão de IFN- γ no megaesôfago chagásico pode explicar a ausência de efeito protetor nesse mega contra o câncer.

A expressão da proteína *T. cruzi* apresentou 100% de negatividade no megacólon chagásico e cólon normal. Na comparação entre megaesôfago chagásico e esôfago normal, a positividade foi maior no megaesôfago (50%) em relação ao esôfago normal (12,5%). Entre megaesôfago chagásico e megacólon chagásico a positividade foi maior no megaesôfago (50%) quando comparado ao megacólon (0,0%).

No megaesôfago chagásico o IFN- γ apresentou menor positividade quando comparado ao megacólon chagásico. No entanto, a proteína *T. cruzi* apresentou maior positividade no megaesôfago do que no megacólon. Isso provavelmente se deve ao fato que na fase crônica da doença de Chagas o IFN- γ é responsável por manter o parasitismo em níveis muito baixos.⁽⁹⁷⁾ Esses achados são concordantes com os obtidos por Côbo *et al.*⁽¹¹¹⁾, que investigando por meio de técnica imunoistoquímica segmentos de megacólon e megaesôfago, encontraram o *T. cruzi* em 20% dos casos de megaesôfago e em 4% dos casos de megacólon. A positividade do *T. cruzi* em 12,5% dos esôfagos normais pode ser explicada pela capacidade do parasita em apresentar reação cruzada com componentes de tecidos normais de vertebrados.⁽¹⁵⁵⁾

5- CONCLUSÕES

A maior frequência de expressão das proteínas GBP-2 no megaesôfago chagásico e IFN- γ no megacólon chagásico explica, respectivamente, o aumento da incidência de carcinoma espinocelular em portadores de megaesôfago chagásico e o efeito protetor do megacólon chagásico contra o adenocarcinoma colorretal.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Siegel R, DeSantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *Cancer J Clin* 2014;64:104-17.
- 2- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2014. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>
- 3- Winawer SJ. Natural history of colorectal cancer. *Am J Med* 1999;106:3S-6S.
- 4- Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma–carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol* 2003;200:183–94.
- 5- Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia molecular*. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu; 2010.
- 6- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002;347:1593-603.
- 7- Drake LE, Macleod KF. Tumour suppressor gene function in carcinoma-associated fibroblasts: from tumour cells via EMT and back again? *J Pathol* 2014;232:283-88.
- 8- Tajra JBM, Malafaia O, Czezczko NG, Santos EAA, Ribas CAPM, Wagaa-Gasser AM, et al. Estudo da expressão citofotométrica do marcador tumoral Caspase-3 no adenocarcinoma de cólon. *ABCD arq bras cir dig* 2007;20:250-53.
- 9- Pinho MSL. Célula tronco tumoral: novo conceito em carcinogênese colorretal. *Rev bras colo-proctol* 2009;29:120-4.

- 10- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
- 11- Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/ β -Catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer* 1998;58:1130-4.
- 12- Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2011; 6: 479-507.
- 13- Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hills DE, Markowitz S, Willson JKV, et al. The APC gene product in normal and tumor cells. *Medical Sciences* 1993;90:2846-50.
- 14- White RL. Colon cancer. Molecular biology of the APC protein. *Pathol Biol* 1997;45:240-4.
- 15- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 1997;275:1788-90.
- 16- Fearon ER & Wicha MS. KRAS and cancer stem cells in APC-mutant colorectal cancer. *J Nat Cancer Inst* 2014;106:444.
- 17- Wong NACS, Pignatelli M. Beta-catenin: a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002;160:389-401.
- 18- Alberts B, Bray D, Lewis J. *Biologia molecular da célula*. 3^a ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
- 19- Dehay C, Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:438-50.
- 20- Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*. 2008;9:115-28.

- 21- Junqueira LC & Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
- 22- Lam KY. Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2000;33:71-90.
- 23- Pérez MO, Peña CMM. Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *latreia* 2011;24:389-401.
- 24- Parham P. *O sistema imune*. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.
- 25- Loke SL, Neckers LM, Schwab G, Jaffe ES. c-myc protein in normal tissues: Effects of fixation on its apparent subcellular distribution. *Am J Pathol* 1988;131:29-37.
- 26- Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res* 1994;74:525-36.
- 27- Vairo G, Vadiveloo PK, Royston AK, Rockman SP, Rock CO, Jackowski S, et al. Deregulated c-myc expression overrides INF gamma-induced macrophage growth arrest. *Oncogene* 1995;10:1969-76.
- 28- Ramana CV, Grammatikakis N, Stark GR. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1 dependent and independent pathways. *EMBO J* 2000;19:263-72.
- 29- Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Front Biosci* 2008;13:2888-99.
- 30- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89.

- 31- Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007;96:41-101.
- 32- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
- 33- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell Jr JE. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon α and interferon γ . *Cell Biology* 1996;93:7673-78.
- 34- Saha B, Prasanna SJ, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon- γ . *Cytokine* 2010;50:1-14.
- 35- Regis G, Pensa S, Boselli D, Novelli F, Poli V. Ups and downs: The STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2008;19:351-59.
- 36- Pensa S, Regis G, Boselli D, Novelli F, Poli V. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: two sides of the same coin ? In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6568/>.
- 37- Ferreira CS, Maganhin CC, Simões RS, Girão MJBC, Baracat EC, Soares-Jr JM. Melatonina: modulador de morte celular. *Rev. Assoc. Med. Bras* 2010;56:715-18.
- 38- Hobeika AC, Etienne W, Torres BA, Johnson HM, Subramaniam PS. IFN-gamma induction of p21 (WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1351-61.

- 39- Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 1996;272:719-22.
- 40- Kominsky S, Johnson HM, Bryan G, Tanabe T, Hobeika AC, Subramaniam PS, et al. INF inhibition of cell growth in glioblastomas correlates with increased levels of the cyclin dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1. *Oncogene* 1998;17:2973-9.
- 41- Xi S, Dyer KF, Kimak M, Zhang Q, Gooding WE, Chaillet JR, et al. Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:181-9.
- 42- Shiozaki A, Nakashima S, Ichikawa D, Fujiwara H, Konishi H, Komatsu S, et al. Prognostic significance of p21 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2013;33:4329-35.
- 43- Britzen-Laurent N, Lipnik K, Ocker M, Naschberger E, Schellerer DS, Croner RS et al. GBP-1 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2013;34:153-62.
- 44- Briken V, Ruffner H, Schultz U, Shwarz A, REIS LFL, Strehlow I, et al. Interferon Regulatory Factor 1 Is Required for Mouse Gbp Gene Activation by Gamma Interferon. *Molecular And Cellular Biology* 1995;15:975-82.
- 45- Boehm U, Guethlein L, Klamp T, Ozbek K, Schaub A, Futterer A, et al. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 1998;161:6715-23.

- 46- Anderson SL, Carton JM, Lou J, Xing L, Rubin BY. Interferon induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 1999;256: 8-14.
- 47- Carter CC, Gorbacheva VY, Vestal DJ. Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch Virol* 2005;150:1213-20.
- 48- Guenzi E, Topolt K, Cornali E, Lubeseder-Martellato C, Jorg A, Matzen K, et al. The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J* 2001;20:5568-77.
- 49- Lubeseder-Martellato C, Guenzi E, Jorg A, Topolt K, Naschberger E, Kremmer E, et al. Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am J Pathol* 2002;161:1749-59.
- 50- Nguyen TT, Hu Y, Widney DP, Mar RA, Smith JB. Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:899-909.
- 51- Capaldo CT, Beeman N, Hilgarth RS, Nava P, Louis NA, Naschberger E, et al. IFN- γ and TNF- α -induced GBP-1 inhibits epithelial cell proliferation through suppression of β -catenin/TCF signaling. *Mucosal Immunol.* 2012;5:681-90.
- 52- Gupta SL, Rubin BY, Holmes SL. Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4817-21.

- 53- Cheng YS, Colonna RJ, Yin FH. Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem* 1983;258:7746-50.
- 54- Cheng YS, Becker-Manley MF, Chow TP, Horan DC. Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J Biol Chem* 1985;260:15834-9.
- 55- Cheng YS, Patterson CE, Staeheli P. Interferon-induced guanylate binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol* 1991;11:4717-25.
- 56- Neun R, Richter MF, Staeheli P, Schwemmle M. GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett* 1996a;390: 69-72.
- 57- Alberts B et al. *Biologia molecular da célula*. 5° ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 58- Taylor GA, Feng CG, Sher A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004;4:100-9.
- 59- Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou F, Ginsberg MH. Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003;4:767-78.
- 60- Vestal DJ. The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:435-43.
- 61- Schwemmle M, Staeheli P. The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem* 1994;269:11299-305.

- 62- Neun R, Richter MF, Staeheli P, Schwemmle M. GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. FEBS Lett 1996b;390: 69-72.
- 63- Gorbacheva VY; Lindner D, Sen GC, Vestal DJ. The interferon (IFN)-induced GTPase, GBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. J Biol Chem 2002;277:6080-7.
- 64- Guimarães DP, Oliveira IM, Paiva GR, Souza DM, Barnas C, Olmedo, DB, et al. Interferon-inducible guanylate binding protein (GBP)-2: a novel p53-regulated tumor marker in esophageal squamous cell carcinomas. Int J Cancer 2009;124:272-9.
- 65- Guenzi E, Topolt K, Lubeseder-Martellato C, Jorg A, Naschberger E, Benelli R, et al. The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. EMBO J 2003;22:3772-82.
- 66- Naschberger E, Bauer M, Sturzl M. Human guanylate binding protein-1 (hGBP-1) characterizes and establishes a non-angiogenic endothelial cell activation phenotype in inflammatory diseases. Adv Enzyme Regul 2005;45:215-27.
- 67- Lipnik K, Naschberger E, Hohenadl C. Interferon γ -Induced human guanylate binding protein 1 inhibits mammary tumor growth in mice. Mol Med 2010;16:177-87.
- 68- WHO. World Health Organization. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO Technical Report Series, 2002, 109p.

- 69- Madalosso G, Pellini ACG, Vasconcelos MJ, Ribeiro AF, Weissmann L, Oliveira Filho GS, et al. Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2004;46:199-202.
- 70- Ferreira MS, Lopes ER, Chapadeiro E, Dias JCP, Ostemayer AL. Doença de Chagas. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. *Tratado de infectologia*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005; p.1195-233.
- 71- Correa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulon M, Kenji Nihei O, Gruebler Y, Bozza M, et al. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J Neuroimmunol* 2006;173:12-22.
- 72- Siqueira-Batista R. Epidemiologia e ecologia. In: Siqueira-Batista R, Gomes AP, Corrêa AD, Geller M, editores. *Moléstia de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007; p. 147-68.
- 73- Coura JR, DIAS JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009;104:31-40.
- 74- Schmunis GA. Epidemiologia da doença de Chagas em países não endêmicos: o papel da migração internacional. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:75-85.
- 75- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:113-22.
- 76- Cortez C, Martins RM, Alves RM, Silva RC, Bilches LC, et al. Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from Y strain. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1804.

- 77- Cortez C, Yoshida N, Bahia D, Sobreira TJ. Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. PLoS One 2012;7:e42153.
- 78- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Plantando saúde: resolução estabelece normas de higiene para alimentos e bebidas à base de vegetais. *Rev Saúde Pública* 2005;39:861-3.
- 79- Neves DP. *Parasitologia humana*. São Paulo: Atheneu; 2011.
- 80- Alves MJM, Mortara RA. Um século de pesquisas: o que aprendemos sobre a interação de *Trypanosoma cruzi* com células do hospedeiro? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(supl 1):76-88.
- 81- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *The Journal of Immunology* 2000;164:5998–6004.
- 82- Almeida IC, Gazzinelli RT. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* 2001;70:467-77.
- 83- Ropert C, Almeida IC, Closel M, Travassos LR, Fergusson MA, Cohen P et al. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;166:3423-31.

- 84- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:103–10.
- 85- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James L, Sher A. The microbicidal activity of interferon-g-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol* 1992;22:2501-6.
- 86- Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol* 2003;19:447-51.
- 87- Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C. Differential Use of TLR2 and TLR9 in the Regulation of Immune Responses during the Infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 2013;8:e63100.
- 88- Soong L, Tarleton RL. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2, c- Myc, and c-fos gene expression. *J Immunol* 1992;149:2095-102.
- 89- Aliberti JC , Cardoso MA , Martins GA , Gazzinelli RT , Vieira LQ , Silva JS, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2001;158:1433-40.
- 90- Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2013;19:34.

- 91- Muñoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1992;22:301-7.
- 92- Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1630.
- 93- Scott P, Trinchieri G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 1995;7:34.
- 94- da Silveira AB, Lemos EM, Adad, S.J.; Correa-Oliveira, R.; Furness, J.B.; Reis, D.A. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum. Pathol* 2007;38:1256-64.
- 95- Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 1996;26:102-9.
- 96- Kumar S, Tarleton RL. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 2001;166:4596-603.
- 97- Mosmann TR, Cherwinski H, de Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.

- 98- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 2003;71:1185-93.
- 99- Rocha Rodrigues DB, Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira VPA, Tostes Jr S, et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:361730.
- 100- Machado FS, Tyler KM, Brant F, Esper L, Teixeira MM, Tanowitz HB. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Front Biosci* 2012;1:1743-58.
- 101- Marinho CRF, Nuñez Apaza LN, Bortoluci KR, Bombeiro AL, Bucci DZ, Grisotto MG, et al. INF-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scand J Immunol* 2007;66:297-308.
- 102- Martin D, Tarleton, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Imunol Rev* 2004;201:304-17.
- 103- Guillermo LV, Silva EM, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Pereira WF, Yagita H, et al. The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol* 2007;81:942-51.
- 104- Ribeiro ALP, Costa RMO. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31:301-14.

- 105- Lopes ER, Prata A, Chapadeiro E, Tafuri WL, Rocha A. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Doença de Chagas In: Brasileiro Filho G. Bogliolo-Patologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 1320-37.
- 106- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:348-57.
- 107- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 1996;149:2153-9.
- 108- Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129:53-9.
- 109- da Silveira ABM, Arantes RME, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 2005;131:627-34.
- 110- Manoel-Caetano F da S, Carareto CM, Borim AA, Miyazaki K, Silva AE. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and oesophageal mucosa from chronic chagasic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:1102-7.
- 111- Côbo EC, Silveira TP, Micheletti AMR, Crema E, Adad SJ. Research on *Trypanosoma cruzi* and analysis of inflammatory infiltrate in esophagus and colon from chronic chagasic patients with and without mega. *J Trop Med* 2012;232646.

- 112- Adad SJ, Andrade DC, Lopes ER, Chapadeiro E. Pathological anatomy of chagasic megaesophagus. *Rev Inst Med trop S Paulo* 1991;33:443-50.
- 113- Adad SJ, Cançado CG, Etchebehere RM, Teixeira VPA, Gomes UA, Chapadeiro E, et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch* 2001;438:254-8.
- 114- Brener, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1987;82:205-13.
- 115- Brener ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma Cruzi e doença de Chagas*. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000,431p.
- 116- Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968;6:63-116.
- 117- Corbett CE, Ribeiro Jr U, Prianti MG, Habr-Gama A, Okumura M, Gama-Rodrigues J. Cell mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum* 2001;44:993-8.
- 118- Brandalise NA, Andreollo NA, Leonardi LS, Callejas Neto F. Carcinoma associado a megaesôfago chagásico. *Rev Col Bras Cir* 1985;12:196-9.
- 119- Rocha A, Almeida HO, Esper FE, Moraes DM, Santos EP, Teixeira VPA. Associação entre megaesôfago e carcinoma de esôfago. *Rev Soc Bras Med Trop* 1983;16:94-97.
- 120- Livstone EM, Skinner DB. Tumors of the esophagus. In: Berr JE, editor. *Bockus gastroenterology*. 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders; 1985. p. 814-40.

- 121- Guérin A, Mody R, Fok B, Lasch KL, Zhou Z, Wu EQ, *et al.* Risk of developing colorectal cancer and benign colorectal neoplasm in patients with chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40:83-92.
- 122- Meneses ACO, Lopes MAB, Rocha A, Fatureto MC, Lopes GP, Lopes ER, *et al.* Megacolon e câncer: câncer de intestino grosso em chagásicos com megacólon. *Arq Gastroenterol* 1989;26:13-6.
- 123- Gullo CE, Estofolete CF, Gil CD, Christiano AB, Netinho JG. Formas digestivas da doença de Chagas e carcinogênese: um estudo de associação. *Rev Col Bras Cir* 2012;39:146-50.
- 124- Oliveira EC, Leite MSB, Ostermayer AL, Almeida AC, Moreira H. Chagasic megacolon associated with colon cancer. *Am J Trop Med Hyg* 1998;56:596-8.
- 125- Adad SJ, Etchebehere RM, Araujo JR, Madureira AB, Lima VJF, Silva AA *et al.* Association of chagasic megacolon and cancer of the colon: case report and review of literature. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35:63-8.
- 126- Garcia SB, Aranha AL, Garcia FRB, Basile FV, Pinto APM, Oliveira EC, *et al.* A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? *Rev Inst Med trop S Paulo* 2003;45:291-3.
- 127- Ham A, Cormack DH. *Histologia*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
- 128- Kollarova H, Machova L, Horakova D, Janoutova G, Janout V. Epidemiology of esophageal cancer – an overview article. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2007;151:17–28.

- 129- Walsh JME, Terdiman JP. Colorectal Cancer Screening. JAMA 2003;289:1288-96.
- 130- Vespucio MVO, Turatti A, Modiano P, Oliveira EC, Chicote SEM, Pinto AMP, et al. Intrinsic denervation of the colon is associated with a decrease of some colonic preneoplastic markers in rats treated with a chemical carcinogen. Braz J Med Biol Res 2008;41:311-7.
- 131- Escalante RB, Oliveira ÊC, Cunha FQ, Vespucio MVO, Ribeiro-Silva A, Aprilli A et al. Trypanosoma cruzi infection and/or administration of the nonsteroidal anti-inflammatory nimesulide increase the number of colonic crypts overexpressing metallothioneins in rat colon carcinogenesis. Braz J Med Biol Res 2006;39:895-9.
- 132- Kallinikova VD, Matekin PV, Ogloblina TA, Leïkina MI, Kononenko AF, Sokolova NM, et al. Anticancer properties of parasite flagellate protozoan Trypanosoma cruzi Chagas, 1909. Izv Akad Nauk Ser Biol 2001;3:299-311.
- 133- Itow S, Camargo PE. Proteolytic activities in cell extract of Trypanosoma cruzi. J Protozool 1977;24:591-5.
- 134- Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM. Proteolytic activity on endogenous substrates in cell-free extracts of Trypanosoma cruzi. Experimentia 1982;38:1335-7.
- 135- Jurka M, Cavazzana JM, Carvalho MS. Proteolytic activities in cell extracts of Trypanosoma tids isolated from plants and phytophagous bugs. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990;85:158.

- 136- Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quím Nova* 2009;32:2444-57.
- 137- Scharfstein J. Trypanosoma cruzi Cysteine Proteases, Acting at the Interface Between the Vascular and Immune Systems, Influence Pathogenic Outcome in Experimental Chagas Disease. *The Open Parasitology Journal* 2010;4:60-71.
- 138- Sauto-Padron T, Campetella OE, Cazzulo JJ, De Souza W. Cysteine-proteinase in Trypanosoma cruzi: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci* 1990;96:485-90.
- 139- Cazzulo JJ, Cazzulo F, Maria C. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1990;1037:186-91.
- 140- Cazzulo JJ, Labriola C, Parussini F, Duschak VG, Martinez J, Franke de Cazzulo BM. Cystein proteinases in Trypanosoma cruzi and other Trypanosomatid parasites. *Acta Chim Slov* 1995;42:409-18.
- 141- Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. *Biol Chem* 1997;378:1-10.
- 142- Murta ACM, Persechini PM, de Souto-Padron T, de Souza W, Scharfstein J, et al. Structural and functional identification of Gp 57/51 Antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasit* 1990;43:27-38.
- 143- Arnholdt ACV, Scharfstein Y. Immunogenicity of Trypanosoma cruzi cysteine proteinase. *Res Immunol* 1991;142:146-51.

- 144- Tomas AM, Miles MA, Kelly YM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur. J. Biochem* 1997;244:596-603.
- 145- Gruppi A, Cerban FM, Vottero-Cima E. Exoantigens from *Trypanosoma Cruzi* contain cruzipain. *Acta Tropica* 1997;63:141-9.
- 146- Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, Souza W, Alves MJ, Zingales B, et al. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol* 1991;72:43-53.
- 147- Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, Souza W, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect* 2009;11:29-39.
- 148- Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJ, Colli W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect* 2012;14:1465-74.
- 149- Chaput N, Scharz NE, Andre F, Zitvogel L. Exosomes for immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:215-21.
- 150- Van Voorhis WC. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation. *J Immunol* 1992;148:239-48.
- 151- Piuvezam MR, Russo DM, Queimaduras Jr, Skeiky YA, Grabstein, Reed SG . Characterization of response of normal human T-cells to *Trypanosoma cruzi* antigens. *J Immunol* 1993;150:916-24.

- 152- Vandekerckhove F, Darji A, Rivera MT, Carlier Y, Vray B, Billiau A, et al. Modulation of T-Cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection: analysis in different lymphoid compartment. *Parasite Immunol* 1994;16:77-85.
- 153- Kierszenbaum F, Lopez HM, Szein MB. Inhibition of specific immune responses by a protein produced by *Trypanosoma cruzi* in the course of Chagas disease. *Immunology* 1994;81:462-7.
- 154- Gomes NA, Previato JO, Zingales B, Mendonça-Previato L, Dosreis GA. Down-regulation of *Trypanosoma cruzi* lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositol-phospholipids from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1996;156:628-35.
- 155- Hernandez-Munian C, Alcina A, Fresno M. A *Trypanosoma cruzi* specific monoclonal antibody cross reactive. *Biol Bull* 2001;28:244-55.
- 156- Levin MI, Molecular mimicry and Chagas' heart disease: high anti-R-13 auto antibody levels are markers of severe Chagas heart complaint. *Res Immunol* 1991;142:157-9.
- 157- Junqueira C, Santos LI, Galvão-Filho B, Teixeira SM, Rodrigues FG, Da Rocha WD, et al. *Trypanosoma cruzi* as an effective cancer antigen delivery vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:19695-700
- 158- Junqueira C, Guerrero AT, Galvão-Filho B, Andrade WA, Salgado AP, Cunha TM, et al. *Trypanosoma cruzi* adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine. *PLoS One*. 2012;7:e36245.
- 159- Cabral HR. The tumoricidal effect of *Trypanosoma cruzi*: its intracellular cycle and the immune response of the host. *Med Hypotheses* 2000;54:1-6.

- 160- Leong TY, Cooper K, Leong AS. Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol* 2010;17:404-18.
- 161- Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of head and neck. *Cancer* 2002;95:1902-10.
- 162- Iwamoto M, Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH. Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* 2000;21:1935-40.
- 163- Jones DJ, Ghosh AK, Moore M, Schofield PF. A critical appraisal of the immunohistochemical detection of the c-Myc oncogene product in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1987;56:779-83.
- 164- American Cancer Society. Colorectal cancer. 2014; <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-risk-factors>.

APÊNDICE 1 - Dados imunoistoquímicos obtidos de fragmentos de biópsias.

N	Idade	Sexo	Órgão	APC	C-myc	GBP2	Interfer	Interfer	<i>T. cruzi</i>
1	64	M	Megaeso	2	7	7	1	N	P
2	68	M	Megaeso	4	7	4	1	N	N
3	77	F	Megaeso	1	7	4	1	N	P
4	62	M	Megaeso	7	7	4	1	N	P
5	48	F	Megaeso	4	6	6	1	P	N
6	62	M	Megaeso	2	7	7	1	N	N
7	73	M	Megaeso	7	6	7	4	P	P
8	69	M	Megaeso	4	7	7	1	N	N
9	74	F	Megaeso	2	7	7	4	P	N
10	64	F	Megaeso	2	7	6	4	P	P
11	71	F	Megacólon	2	7	2	1	N	N
12	83	M	Megacólon	3	7	7	1	P	N
13	42	M	Megacólon	1	7	5	1	P	N
14	70	F	Megacólon	1	3	1	4	P	N
15	54	F	Megacólon	1	7	1	1	P	N
16	69	M	Megacólon	3	7	4	1	P	N
17	90	F	Megacólon	3	7	1	1	P	N
18	64	F	Megacólon	1	7	1	1	P	N
19	76	F	Megacólon	4	4	1	1	P	N
20	61	M	Megacólon	1	7	1	1	P	N
21	46	F	Esôfago normal	7	6	7	1	P	N
22	46	M	Esôfago normal	7	6	4	1	P	N
23	54	F	Esôfago normal	2	7	1	4	P	N
24	14	F	Esôfago normal	2	7	4	4	P	P
25	59	F	Esôfago normal	7	7	1	1	P	N
26	33	F	Esôfago normal	7	7	1	7	P	N
27	48	F	Esôfago normal	2	6	1	1	N	N
28	38	F	Esôfago normal	4	7	1	1	N	N
29	19	M	Esôfago normal	2	7	1	7	P	N
30	45	F	Esôfago normal	1	7	7	1	N	N
31	47	F	Esôfago normal	2	7	1	1	N	N
32	59	F	Esôfago normal	1	6	1	1	N	N
33	35	F	Esôfago normal	7	6	3	4	P	N
34	30	F	Esôfago normal	4	6	1	1	N	N
35	34	F	Esôfago normal	2	7	1	4	P	P
36	28	M	Esôfago normal	2	6	1	7	P	N
37	36	F	Colo normal	1	6	1	1	N	N
38	42	F	Colo normal	7	6	1	4	P	N
39	41	F	Colo normal	1	3	1	1	P	N
40	45	F	Colo normal	1	7	1	7	P	N
41	46	F	Colo normal	1	3	1	1	N	N
42	25	F	Colo normal	3	7	1	1	N	N
43	50	F	Colo normal	1	3	1	1	N	N
44	50	F	Colo normal	1	7	1	1	N	N
45	47	F	Colo normal	1	7	1	1	N	N
46	48	F	Colo normal	1	7	1	1	N	N

1 - negativo < 10%

2- positivo 10 a 50% base

3- positivo 10 a 50% ápice

4- positivo 10 a 50% difuso

5- positivo > 50% base

6- positivo > 50% ápice

7- positivo > 50% difuso

interferon: todos positivos são difusos

P-positivo

N-negativo

ANEXO 1

Parecer n.º 329/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP nº 4096/2009 sob a responsabilidade de **Marcelo Maia Caixeta de Melo**, com o título "Efeito protetor do megacólon chagásico na carcinogênese colorretal" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse com a seguinte recomendação: Incluir o uso de códigos como forma de proteção da confidencialidade.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 10 de agosto de 2009.

Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP