

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA**

Arthur Henrique da Costa Cardoso

**Padronização de Método Molecular para Avaliação da Diversidade Genética de  
*Histoplasma capsulatum* em Isolados do Centro-Oeste Brasileiro em Pacientes  
HIV/AIDS.**

**Goiânia  
2022**

Arthur Henrique da Costa Cardoso

**Padronização de Método Molecular para Avaliação da Diversidade Genética de *Histoplasma capsulatum* em Isolados do Centro-Oeste Brasileiro em Pacientes HIV/AIDS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Ciências Médicas e da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Médico.

Orientadora:  
Profa. Dra. Renata B. A. Soares

**Goiânia  
2022**

Arthur Henrique da Costa Cardoso

**Padronização de Método Molecular para Avaliação da Diversidade Genética de *Histoplasma capsulatum* em Isolados do Centro-Oeste Brasileiro em Pacientes HIV/AIDS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Ciências Médicas e da Vida da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Médico.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Renata Soares de Ascenço Soares, Presidente

---

Prof<sup>a</sup> MsC. Cássia Silva Miranda Godoy, Membro Interno

---

Dr. Taiguara Fraga Guimarães, Membro Externo

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que são devotos e acreditam na ciência e na medicina baseada em evidências como guias para as decisões que devam orientar a humanidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, em especial aos meus pais e minha irmã por todo o apoio durante minha jornada até aqui. Agradeço a todos os meus mestres que tive durante a minha vida que me ensinaram os meios para que fosse possível trilhar meu caminho em direção aos meus sonhos. Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Renata Soares de Ascenço Soares, que me confiou esse trabalho para que nós pudéssemos contribuir com o cenário científico nacional. Agradeço a toda equipe da Unimontes pela colaboração nesse projeto. Por fim, agradeço ao amor, à compaixão, à fraternidade e à amizade, todas as qualidades que fazem o ser humano buscar um futuro melhor.

## ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Sometimes it is the people no one can imagine anything of who do the things no one can imagine.”

Alan Turing

## RESUMO

O *Histoplasma capsulatum* trata-se de um fungo termodimórfico com distribuição geográfica global e alta diversidade genética. Causador da histoplasmose, doença essa que é de grande relevância para a população que vive com HIV/AIDS, posto que é a maior causa de morbimortalidade desses pacientes no continente americano. O presente estudo tem por objetivo elucidar por meio da padronização de método molecular a avaliação da diversidade genética e da presença de material genético pertencente ao fungo *H. capsulatum* através da extração de DNA das amostras de sangue periférico. Foram incluídos 14 pacientes randomicamente a partir de um projeto maior registrado no [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) NCT04059770. O procedimento de extração de DNA das amostras desse estudo foi realizado conforme procedimento de Guha et al., 2016. A quantificação e a pureza dos ácidos nucleicos extraídos das amostras de sangue foram mensuradas com o auxílio de um Espectrômetro de pedestal. Todas as etapas foram confirmadas por eletroforese em agarose 1%. Para obtenção por PCR de fragmentos de DNA das amostras de aproximadamente 1000 pares de bases, as sequências de oligonucleotídeos 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' e 5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3', denominadas OligoITS1F e OligoLR3, descritas por Raja et al., 2017. Com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método de PCR da região universal fúngica, os amplicons de PCR de 1000pb foram submetidos novamente a PCR. Porém, para se afirmar de que se trata do fungo *H. capsulatum* faz-se necessário a confirmação por sequenciamento de DNA. A análise das sequências por comparação às sequências depositadas no banco de dados do GeneBank nos fornece a homologia para validação dos resultados com as amostras clínicas. Mais interessante e oportuno, ao se discutir a diversidade de possíveis manifestações da histoplasmose não é possível que se negligencie um papel em que a diversidade genética do fungo pode exercer sobre a clínica apresentada. Sabe-se que no Brasil, circulam nove grupos genéticos de *Histoplasma capsulatum* conhecidos: LAm A, LAm B, LAm C, LAm D, LAm E, RJ, L, BrHC1 e BrHC3. A diversidade genética apresentada pelo patógeno não apenas possibilita prováveis manifestações clínicas diferentes, mas também dupla infecção por fungos de genótipos diferentes em um mesmo hospedeiro. Esta etapa do nosso trabalho ainda está em andamento.

## ABSTRACT

*Histoplasma capsulatum* is a dimorphic fungus with global geographic distribution and high genetic diversity. Etiological agent of histoplasmosis, a disease that is of great relevance for the population living with HIV/AIDS, since it is the biggest cause of morbidity and mortality of those patients in the American continent. The present study aims to elucidate, through the standardization of molecular method, the evaluation of genetic diversity and the presence of genetic material belonging to the fungus *H. capsulatum* through the extraction of DNA from peripheral blood samples. We enrolled 14 patients randomly from a larger project registered at [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) NCT04059770. The DNA extraction procedure from the samples of this study was performed according to the procedure of Guha et al., 2016. The quantification and purity of the nucleic acids extracted from the blood samples were measured with the aid of a pedestal spectrometer. All steps were confirmed by electrophoresis in 1% agarose. To obtain DNA fragments from the samples of approximately 1000 base pairs by PCR, the oligonucleotide sequences 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' and 5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3', named OligoITS1F and OligoLR3, described by Raja et al., 2017. In order to improve the sensitivity of the fungal universal region PCR method, the 1000bp PCR amplicons were resubmitted to PCR. However, to confirm that it is the fungus *H. capsulatum*, confirmation by DNA sequencing is necessary. The analysis of the sequences by comparison with the sequences deposited in the GeneBank database provides us with the homology for validating the results with the clinical samples. More interesting and opportune, when discussing the diversity of possible manifestations of histoplasmosis, it is not possible to neglect a role that the genetic diversity of the fungus can play in the presented clinic. It is known that in Brazil, nine known genetic groups of *Histoplasma capsulatum* circulate: LAm A, LAm B, LAm C, LAm D, LAm E, RJ, L, BrHC1 and BrHC3. The genetic diversity presented by the pathogen not only makes possible different clinical manifestations, but also double infection by fungi of different genotypes in the same host. This stage of our work is still in progress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Ilustração</b>	<b>Pág</b>
<b>Gráfico 1</b>	<b>19</b>
<b>Gráfico 2</b>	<b>20</b>
<b>Gráfico 3</b>	<b>20</b>
<b>Gráfico 4</b>	<b>21</b>
<b>Mapa 1</b>	<b>21</b>
<b>Gráfico 5</b>	<b>22</b>
<b>Figura 1</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3</b>	<b>25</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>15</b>
	3.1 Amostra e Aspectos Éticos da Pesquisa .....	15
	3.2 Procedimentos.....	16
	3.2.1 Coleta, Armazenamento das Amostras, Extração e Quantificação de Ácidos Nucléicos .....	16
	3.2.2 PCR da Região Universal Fúngica e gene Beta actina (marcador endógeno DNA humano)	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>
	<b>Apêndice I</b> .....	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Descrito pela primeira vez em 1906 por Samuel T. Darling [1], o *Histoplasma capsulatum* trata-se de um fungo com ciclo de vida termodimórfico dividido em duas fases: micelial e leveduriforme [2]. A fase micelial, responsável pela infecção do hospedeiro humano quando inalada, habita ambientes que possuam altas concentrações de nitrogênio e fósforo, bem como umidade do ar superior a 60% e pouca luz [2]. Dessa maneira, hospedeiros, mesmo que imunocompetentes, estão sob risco de infecção caso estejam desempenhando funções ou exercendo atividades como: mineração, limpeza de construções urbanas contaminadas, demolição de construções, manejo de solo com alta concentração de guanos de morcego ou excretas de pássaros e espeleologia [3].

O *Histoplasma capsulatum* adquire sua forma parasitária quando é internalizado por macrófagos alveolares e sua apresentação previamente microconídia dá lugar à morfologia leveduriforme de broto único [3]. Adiante, o curso natural da doença está absolutamente ligado à imunocompetência do hospedeiro bem como do diagnóstico e manejo da infecção em tempo hábil [3].

Mais comumente, a infecção leva a um quadro que pode variar de assintomático a leve, manifestando uma pneumonia auto-resolvida [3]. Todavia, o manejo inadequado, bem como a incompetência imunológica podem evoluir para casos crônico pulmonar progressivo, cutâneo, infecção sistêmica ou forma aguda fulminante [1].

Pacientes imunossuprimidos estão em grande risco para a disseminação da doença, em especial aqueles vivendo com HIV/AIDS. Como consequência, a histoplasmose disseminada passou a ser classificada como doença definidora de AIDS desde 1987 [4]. Um olhar atento à atualidade revela que a histoplasmose disseminada é a maior causa de morbidade e mortalidade no continente americano. Ainda assim, a frequência de casos de Histoplasmose disseminada no Brasil é incerta, posto que o país carece de estudos que abranjam o território nacional por completo, revelando banco de dados limitados à regiões específicas [4].

O diagnóstico laboratorial de histoplasmose não é apenas demorado, com culturas demorando até 4 semanas para crescer, mas, também, negligenciado. Dentre os ensaios laboratoriais disponíveis temos: cultura, microscopia, histopatologia, detecção de anticorpo, detecção de antígeno e ensaios moleculares [4].

O *Histoplasma capsulatum* é um patógeno com alta diversidade genética [2], fato que pode ser a razão das diferentes manifestações clínicas durante o curso da infecção [1]. O fluxo gênico entre os Histoplasmas pode dar lugar à novas cepas com fenótipos relevantes para a clínica, sejam eles: mecanismos de evasão para o sistema imune do hospedeiro, nível de virulência e tropismo para célula hospedeira [3] [2].

Dessa forma, a análise genética das cepas de *Histoplasma* é essencial para que seja possível investigar não somente a dinâmica local da doença, como também surtos, resistência à drogas e patogenicidade [3]. Atualmente, circulam no Brasil nove grupos genéticos diversos: LAm A, LAm B, LAm C, LAm D, LAm E, RJ, L, BrHC1 e BrHC3 [1].

A análise do genótipo de *H. capsulatum* pode ser feita lançando mão de ensaios moleculares para que seja possível o agrupamento de acordo com suas semelhanças genéticas [5]. É importante que se destaque a análise do sequenciamento Multi-Locus quando se discute sobre *H. capsulatum*, uma vez que marcadores moleculares foram úteis em identificar espécies que eram ocultas quando levados em consideração critérios morfológicos e/ou biológicos [5].

É possível afirmar que foram obtidos em vários estudos resultados com alta especificidade e alta sensibilidade para ensaios moleculares baseados em PCR [6]. Esses testes têm como objetivo a identificação de genes, identificação de região ITS, identificação de rRNA ou que identifique os antígenos M e H [6].

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo elucidar, através da padronização de método molecular, a avaliação da diversidade genética de *Histoplasma capsulatum* em isolados do Centro-Oeste brasileiro em pacientes HIV/AIDS sob uso de AmBisome admitidos no Hospital Estadual de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad (HDT) em Goiânia, Goiás, Brasil.

Obter por meio desses métodos a confirmação da presença de material genético pertencente ao fungo *Histoplasma capsulatum* nas amostras analisadas.

Futuramente, esse estudo pretende contribuir para o banco de informações, hoje escassas, no que se refere às variantes do fungo *H. capsulatum* circulantes no território nacional com destaque para a região Centro-Oeste.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Amostra e Aspectos Éticos da Pesquisa

Esse trabalho de conclusão de curso é um subprojeto do estudo intitulado “Avaliação da nefrotoxicidade da anfotericina lipossomal em 3 regimes de administração para tratamento de histoplasmosse disseminada (HD) em pacientes com AIDS”. Em alinhamento aos objetivos deste estudo foi aprovada a emenda. No. 3, versão registrada na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) CAAE: 26086619.1.1001.0034 sob o parecer de aprovação no. 4.556.040 (apêndice 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa).

Uma coorte prospectiva e de caráter exploratório, aninhado a um estudo prospectivo experimental de fase II, multicêntrico, aberto, para análise de nefrotoxicidade de terapias de indução para histoplasmosse disseminada em HIV/AIDS, seguido de terapia oral com Itraconazol. O estudo referido já se encontra aprovado no CEP das instituições participantes sob o CAAE: 09015419.2.2005.034. O referido estudo foi registrado no ClinicalTrials.gov sob o número identificador NCT04059770.

Foram incluídos pacientes adultos (>18 anos), internados no Hospital Estadual de Doenças Tropicais Dr Anuar Auad infectados pelo HIV (AIDS) diagnosticados com histoplasmosse disseminada, por meio de (i) antígeno positivo de Histoplasma na urina (teste de anticorpo monoclonal IMMY®); (ii) confirmação por métodos micológicos clássicos (microscopia, cultura ou histopatologia); ou amostras de biópsia. Foram incluídos pacientes independentemente do uso de terapia com antirretrovirais (TARV).

Uma vez que inexitem estudos semelhantes nesta população, a amostra foi delimitada por pacientes que preencherem os critérios de inclusão e exclusão e randomizados um dos braços relacionados à prescrição de Anfotericina lipossomal (amostra de conveniência).

Para a realização da pesquisa foram coletadas amostras de sangue periférico de 47 pacientes (após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). O estudo está sendo desenvolvido em um hospital de referência no tratamento de doenças infecciosas (Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad -

HDT), em Goiânia, Goiás. O período estabelecido para coleta foi de fevereiro de 2020 a abril de 2022. Nesta etapa de padronização utilizamos somente 14 amostras.

## 3.2 Procedimentos

### 3.2.1 Coleta, Armazenamento das Amostras, Extração e Quantificação de Ácidos Nucléicos

Foram coletadas amostras de sangue total (5ml) de 47 diferentes pacientes diagnosticados com histoplasmosse e AIDS, conforme procedimento padrão do HDT para coleta de sangue. As amostras foram armazenadas em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e posteriormente armazenadas em freezer a -20°C. Por conveniência, na sequência de inclusão do nosso centro, foram selecionadas 14 amostras para padronização do método de extração de DNA e PCR da região universal fúngica, confirmatória da presença de fungo e DNA humano nas amostras de sangue periférico.

As amostras deste estudo foram acondicionadas em gelo seco e transportadas em caixa de isopor para o Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS) do Hospital Universitário Clemente Faria (HUCF) da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) onde foram armazenadas em freezer a -80°C e posteriormente submetidas ao procedimento de extração de DNA.

O procedimento de extração de DNA das amostras desse estudo foi realizado em Cabine de Segurança Classe II- A1 no LPCS do HUCF. A extração de DNA de sangue total das amostras foi realizada conforme Guha *et al.*, 2016 [7] com modificações. Para tal 200 µl de amostra de sangue foram diretamente lisadas com tampão de extração (*DNA extraction buffer*) seguindo os demais passos conforme procedimento de Guha *et al.*, 2016 [7].

A quantificação e a pureza dos ácidos nucleicos extraídos das amostras de sangue foram mensuradas com o auxílio de um Espectrômetro NanoDrop™ ND-2000c (*Thermo Scientific, Inc, USA*). A contaminação por proteínas foi mensurada pela razão de absorvância de 260/290nm. Foram produzidas curvas típicas e os DNAs mensurados a 260nm, onde o valor 1 de absorvância equivale a 50µg/ml de DNA fita dupla puro. Todas as amostras de DNA foram ajustadas para uso em reação de PCR a 50ng/µl. A quantidade e integridade dos ácidos nucleicos também foram avaliadas pelo método de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Brometo

de etídeo visualizados por luz UV e fotodocumentados em fotodocumentador L-Pix Touch Locus (Locus, Brasil).

### 3.2.2 PCR da Região Universal Fúngica e gene Beta actina (marcador endógeno DNA humano)

As amostras de ácidos nucléicos extraídas no LPCS foram enviadas ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Microbiologia da Unimontes para realização da PCR. Foi utilizado como controle positivo DNA de *Candida albicans* ATCC 10231. Como controle negativo foi utilizado água ultrapurificada (ausência de DNA).

Para obtenção por PCR de fragmentos de DNA das amostras de aproximadamente 1000 pares de bases, as sequências de oligonucleotídios 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' e 5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3', denominadas OligoITS1F e OligoLR3, descritas por Raja *et al.*, 2017 [8] foram selecionadas. Os fragmentos de 1000pb obtidos com os oligonucleotídeos selecionados para o estudo compreendem parte da região gênica universal fúngica 18S rDNA, 5,8S rDNA, 28S rDNA, ITS1 e ITS2 (Leite *et al.*, 2020) [9].

As condições químicas da PCR foram realizadas com a utilização de kit contendo 2x *Go Taq Green Master Mix* (PROMEGA, USA), MgCl<sub>2</sub> (3.0mM), 10 µM de cada primer e 50ng de DNA de *H. capsulatum* em volume final de reação de 50µl. Como controles positivos foram utilizados 50ng de DNA do fungo e leveduras supracitadas. A reação de PCR foi realizada em um termociclador modelo Veriti *Applied Biosystems* (ThermoFisher Scientific, USA). As condições de amplificação seguiram os seguintes parâmetros: um ciclo inicial de desnaturação a 98°C durante 30 segundos seguido de 30 ciclos de desnaturação 98°C por 10 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,8% corados com brometo de etídeo e fotodocumentados em fotodocumentador L-Pix Touch Locus (Locus, Brasil).

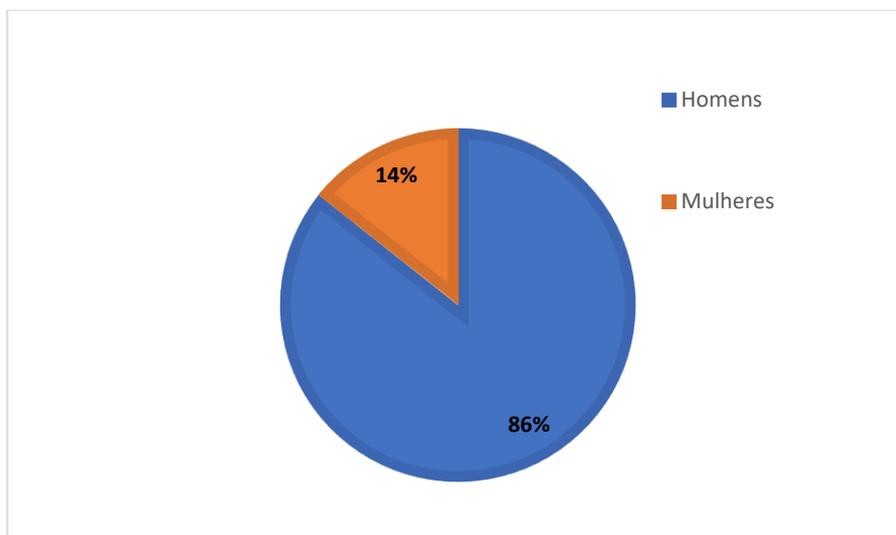
Com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método de PCR da região universal fúngica, os amplicons de PCR de 1000pb foram submetidos novamente a PCR. Para tal 5 µl dos fragmentos de PCR foram utilizados como DNA molde para a nova PCR. As condições químicas e térmicas utilizadas foram às mesmas supracitadas. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,8% corados

com brometo de etídeo e fotodocumentados em fotodocumentador L-Pix Touch Loccus (Loccus, Brasil).

Como controle da extração de DNA humano (endógeno) foi utilizado primer para amplificação de um fragmento de aproximadamente 250pb corresponde ao gene Beta-actina citoplasmático humano descrito por Bem-Ezra et al., 1991 [10]. Como controle positivo foi utilizado amostra de DNA de sangue humano mantido no laboratório de Ensino e Pesquisa em Microbiologia. Como controle negativo foi utilizado água ultrapurificada (ausência de DNA). As condições químicas da PCR para amplificação do gene Beta-actina foram às mesmas utilizadas para amplificação da região universal fúngica com exceção dos primers. Os primers e condições térmicas da PCR foram realizados conforme descrito por Bem-Ezra et al., 1991[10].

## 4 RESULTADOS

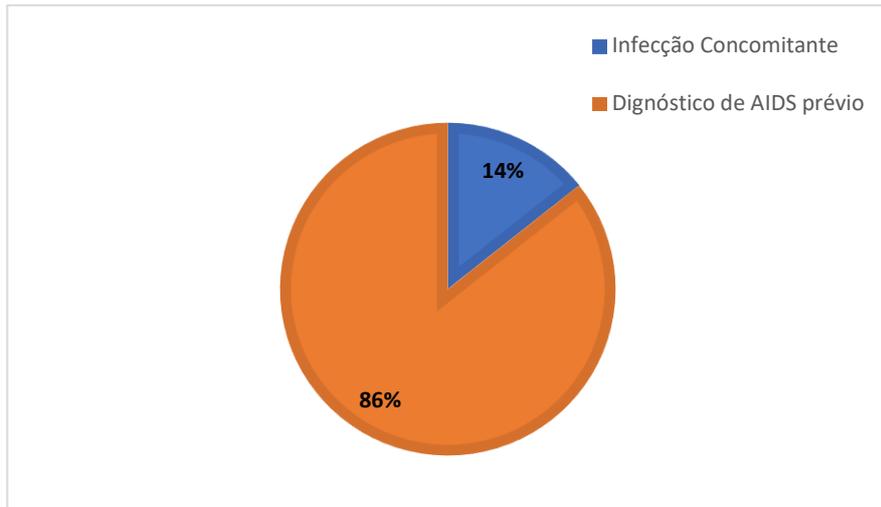
Durante o período de 20.02.2020 a 05.12.2020 , 14 pacientes foram incluídos no estudo. Todos preenchendo os critérios de inclusão e TCLE assinados. Entre os pacientes selecionados, 85,71% (12) eram do sexo masculino e 14,28% (02) do sexo feminino, com uma proporção de 6 homens para 1 mulher, conforme demonstrado no Gráfico 1. No diagnóstico de histoplasmose, a antigenúria foi utilizada em todos os pacientes em função da randomização prevista para a intervenção com L-AmB. Portanto, todas as amostras possuíam conformação por ELISA da presença da galactmanana de *H. capsulatum* na urina dos pacientes selecionados.



**Gráfico 1** – Distribuição dos pacientes por sexo.

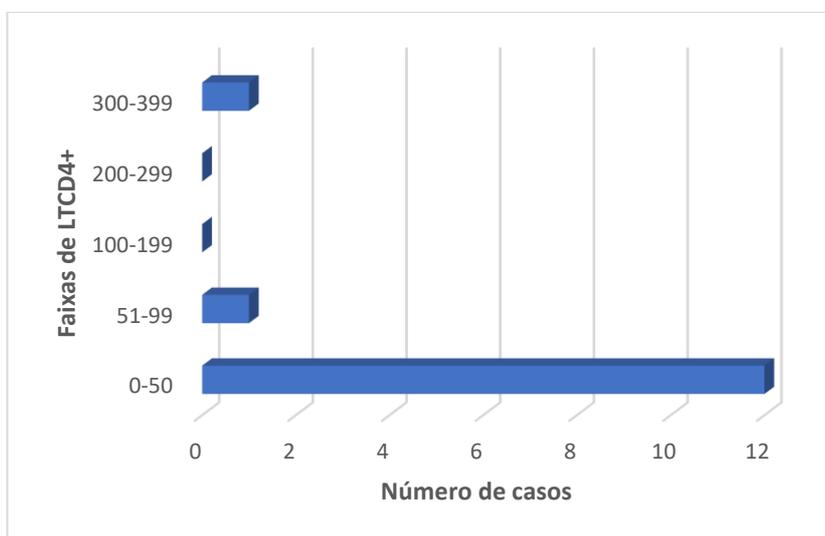
A idade no diagnóstico foi  $44,21 \pm 13,92$  anos, mínimo de 23 anos e máximo de 73 anos. Durante o estudo, os grupos etários afetados pela histoplasmose.

A AIDS se fazia presente em todos os pacientes por perfazer critério de inclusão, no entanto, em relação ao diagnóstico da histoplasmose disseminada, 14 pacientes da amostra, 14,28% (02 casos) foram diagnosticados com AIDS durante a abordagem de Histoplasmose (quadro de abertura de AIDS) enquanto 85,71% (12 casos) eram pacientes com diagnóstico prévio de AIDS (**Gráfico 2**).



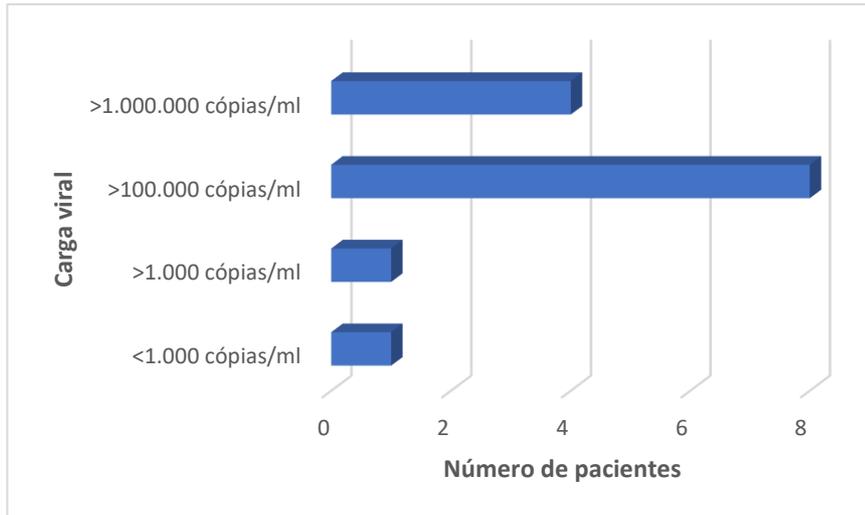
**Gráfico 2** – Distribuição dos pacientes conforme diagnóstico de HIV.

A contagem de células CD4 estava disponível para todos os 14 pacientes do estudo (**Gráfico 3**). A maioria desses pacientes (n= 12, 85,71%) apresentou contagem absoluta de CD4 < 50 células/mm<sup>3</sup>. Apenas um paciente (7,14%) apresentou contagem absoluta de CD4 entre 51-99 células/mm<sup>3</sup> e outro acima de 300 células/mm<sup>3</sup>.



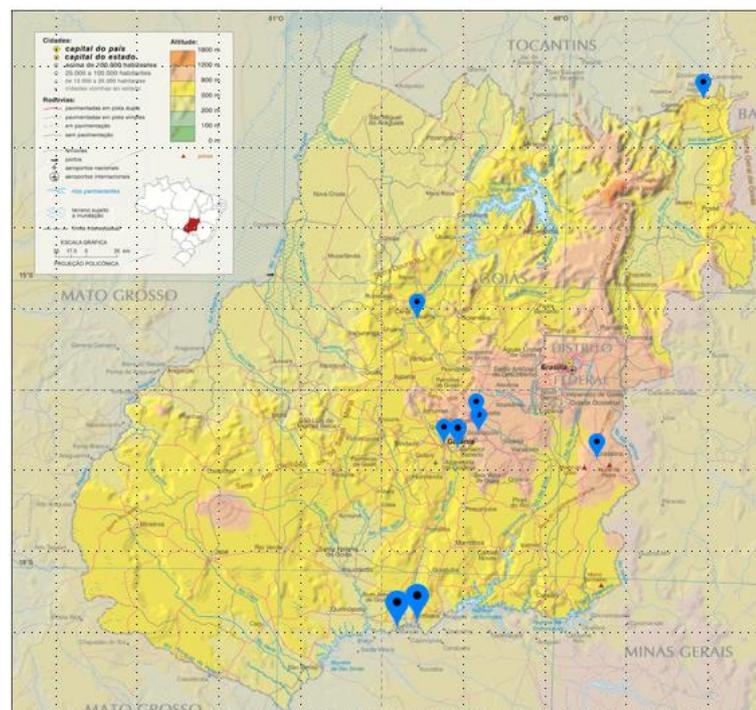
**Gráfico 3** – Distribuição da contagem de LTCD4+ dentre os pacientes.

A contagem da carga viral do HIV estava disponível para os 14 pacientes. A maioria desses pacientes (n=08, 57,14%) tinha carga viral do HIV acima de 100.000 cópias/mL e 04 (28,57%) tinham contagens acima de 1.000.000 cópias/mL (**Gráfico 4**).



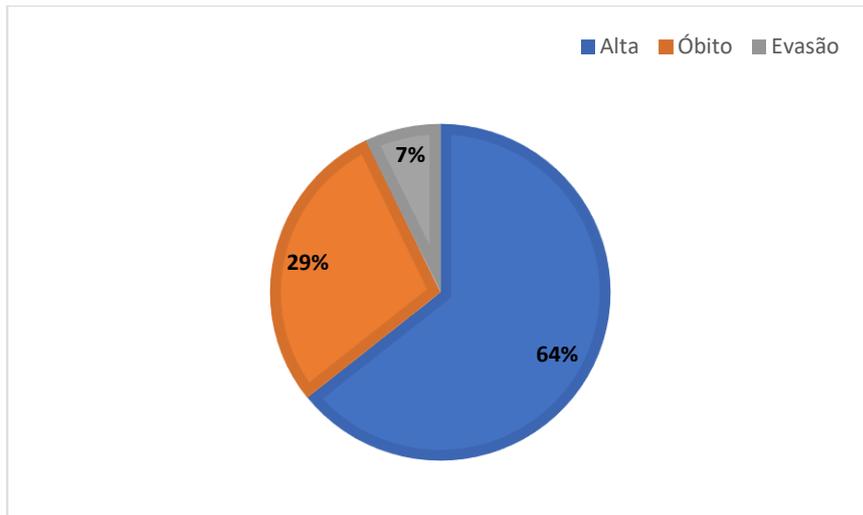
**Gráfico 4** – Distribuição da contagem da carga viral dentre os pacientes.

Nesta pequena amostra de pacientes incluídos por sorteio foi verificado a larga distribuição da procedência no Estado de Goiás, sendo 05 de Goiânia, 02 de Senador Canedo, e um de cada município a seguir, Itumbiara, Monte Alegre, Goianópolis, Cristalina, Carmo do Rio Verde, Cachoeira Dourada e Anápolis. (**Mapa 1**).



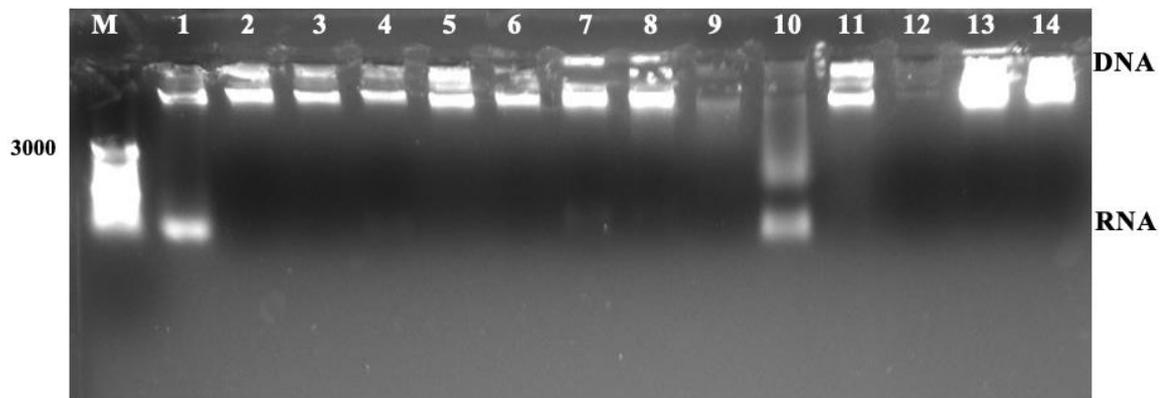
**Mapa 1** – Procedência dos pacientes no Estado de Goiás.

Em relação ao desfecho, 28,4% (4 óbitos em 14 casos) pacientes faleceram com média de idade de  $53,25 \pm 19,46$  anos na morte, com um mínimo de 30 anos e um máximo de 73 anos, conforme **Gráfico 5**. Os pacientes que evoluíram para alta, 64,30%, incluíram casos de alta por melhora clínica. A sobrevida observada em um paciente com aids anterior (67 dias) foi maior que a da AIDS concomitante (26 dias).



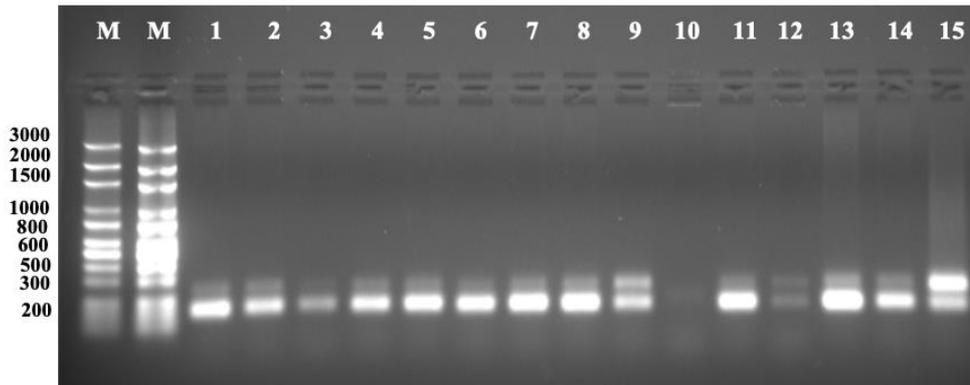
**Gráfico 5** – Distribuição do desfecho dos pacientes do estudo.

A seguir, na Figura 1 apresentamos a extração de ácidos nucleicos total a partir de sangue periférico dos pacientes selecionados. O gel de eletroforese demonstra a presença de DNA humano e fúngico superposto. Nesta etapa é possível somente avaliar a eficácia do método de extração. Presença de DNA em todas as canaletas, que posteriormente foram quantificados para subseqüentes reações de PCR.



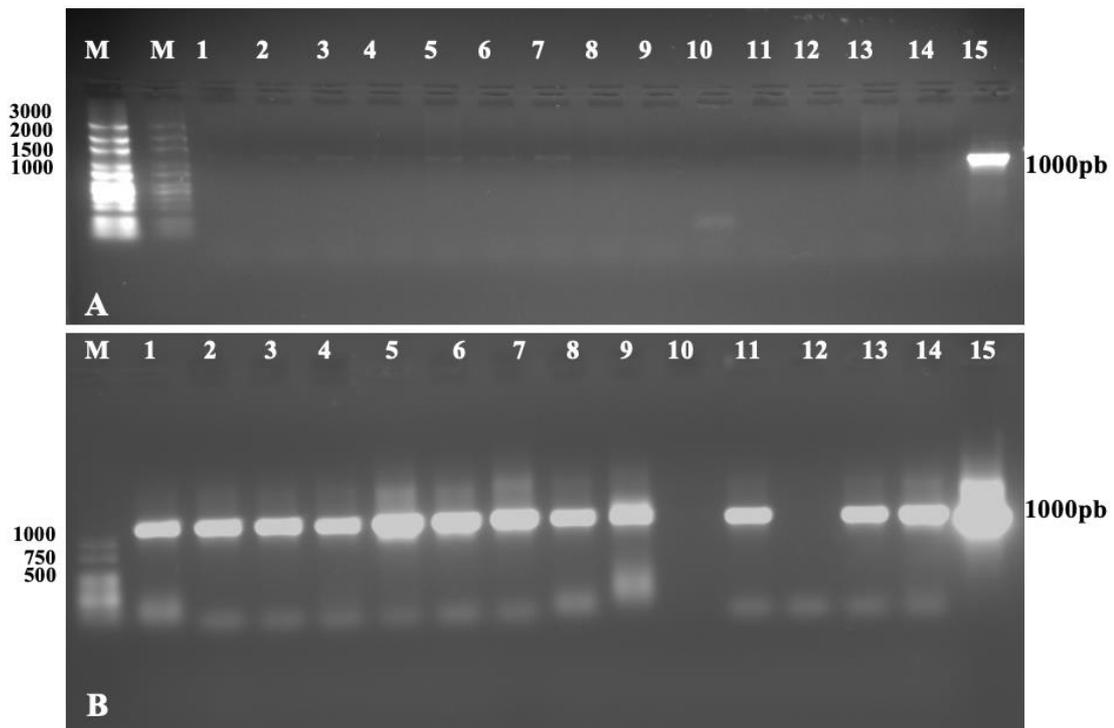
**Figura 1.** Análise da extração de ácidos nucleicos de amostras de sangue de pacientes HIV co-infectados com *Histoplasma capsulatum*. M: Marcador de Massa Molecular Mid-range (Cellco Biotecnologia). Poço 1 a 14: amostras de DNA de sangue dos pacientes codificados 04, 06,08,09,12,13,16,26,35,36,37,41,42,10. Eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

Na Figura 2 mostramos a amplificação por PCR utilizando iniciador humano endógeno do gene beta-actina com 250pb. As amostras dos pacientes HIVAids coinfetados com *H. capsulatum* estão nas canaletas de 1 a 14. Canaleta 15 foi utilizado controle positivo do gene de beta actina.



**Figura 2.** PCR do gene endógeno humano Beta actina. **Painel A:** Amplificação por PCR do fragmento de aproximadamente 250pb (DNA *Homo sapiens*) de amostras de DNA extraídas de sangue de pacientes HIV co-infetados com *Histoplasma capsulatum*. **M:** Marcador de Massa Molecular *Mid-range* – 10 e 5µl aplicados nos dois diferentes poços (Cellco Biotecnologia). Poço 1 a 14: Resultado da reação de PCR com amostras de DNA de sangue dos pacientes codificados 04,06,08,09,12,13,16,26,35,36,37,41,42,10. Poço 15: Controle positivo (região gênica Beta actina de aproximadamente 250pb amplificada de DNA de *Homo sapiens*). Eletroforese em gel de agarose a 1,8%.

Na **Figura 3** apresentamos a reação de PCR utilizado iniciadores da região universal fúngica que possui 1000pb. **No painel A** foi utilizado DNA extraído conforme apresentado na Figura 1. O rendimento da amplificação compreende uma banda fina ao longo das 14 amostras compatível com 1000pb conforme o controle positivo da canaleta 15 (*C. albicans* ATCC 10231). No painel B utilizamos 2 $\mu$ l da reação do painel A com os mesmos iniciadores da região universal fúngica para aumentar o rendimento da amplificação por PCR. Pacientes 36 e 41 apresentaram baixo rendimento na extração e amplificação por PCR.



**Figura 2.** PCR da região universal fúngica. **Painel A:** Amplificação por PCR do fragmento de aproximadamente 1000pb de amostras de DNA extraídas de sangue de pacientes HIV co-infectados com *Histoplasma capsulatum*. **M:** Marcador de Massa Molecular *Mid-range* – 10 e 5 $\mu$ l aplicados nos dois diferentes poços (Cellco Biotecnologia). Poço 1 a 14: Resultado da reação de PCR com amostras de DNA de sangue dos pacientes codificados 04,06,08,09,12,13,16,26,35,36,37,41,42,10. Poço 15: Controle positivo (região universal fúngica de 1000pb amplificada de DNA de *Candida albicans* ATCC 10231). **Painel B:** Amplificação dos produtos de PCR identificados no painel A em uma nova reação de PCR para detecção da região universal fúngica. **M:** Marcador de Massa Molecular 50pb (Ludwig Biotecnologia). Poço 1 a 14: Resultado da reação de PCR com amostras de DNA de sangue dos pacientes codificados 04,06,08,09,12,13,16,26,35,36,37,41,42,10. Poço 15: Controle positivo (região universal fúngica de 1000pb amplificada de DNA de *Candida albicans* ATCC 10231). Eletroforese em gel de agarose a 1,8%.

## 5 DISCUSSÃO

A Histoplasmose trata-se de uma infecção adquirida de forma primária, sem relatos de casos de transmissão pessoa-pessoa e raros casos em que foi adquirida após transplante de órgãos [11]. Os sinais e sintomas da doença estão diretamente relacionados com a competência do sistema imune do hospedeiro, o que torna pacientes imunossuprimidos em maior risco [11]. Todavia, outros fatores também são determinantes para a severidade da infecção como a virulência da cepa pela qual o hospedeiro se infectou e o inóculo inalado [11].

Dentre as apresentações clínicas sintomáticas da doença temos: doença pulmonar aguda, disseminada e histoplasmose pulmonar crônica[11]. Histoplasmose é a doença oportunista mais comum dentre aqueles que vivem com HIV/AIDS, a mortalidade chega a 30% dos infectados com risco aumentado para a população que não está sob uso regular da terapia antirretroviral (TARV) [1]. Vale ainda destacar que as manifestações pulmonares da doença são comumente diagnosticadas de forma errônea como tuberculose [1].

É importante destacar que o Brasil vive uma epidemia de histoplasmose com aproximadamente 1.000.000 de casos, ainda assim o país carece de estudos que compreendam o panorama nacional que contem com dados de prevalência ou da frequência dos casos de histoplasmose disseminada [4]. Em uma visão mais abrangente, a histoplasmose figura-se no continente americano como a principal causa de morbimortalidade dentre as pessoas vivendo com HIV/AIDS [4].

Analisando os resultados obtidos por esse estudo, observa-se um predomínio pelo sítio de afecção pulmonar, contudo, a infecção de pele e pulmões bem como pulmões e SNC também são presentes, estando, portanto, de acordo com a literatura. Vale a pena ressaltar que toda os pacientes recrutados para esse estudo contaram com a confirmação diagnóstica de histoplasmose por antígeno e posterior cultura positiva para *Histoplasma capsulatum* nas amostras.

Dentre os pacientes selecionados, observa-se uma proporção de 6 homens para cada mulher e uma média de idade ao diagnóstico de aproximadamente 44 anos com um desvio padrão de 13,9 anos. Todos os selecionados contam com ao menos uma forma de confirmação laboratorial da infecção por *Histoplasma capsulatum*.

A amostra conta com pacientes tanto em infecção HIV/AIDS – histoplasmose concomitante, quanto com pacientes com diagnóstico pregresso de

AIDS correspondendo por 14,28% (2) e 85,71 (12) respectivamente. Ao se analisar as cargas virais dos pacientes encontra-se uma média de 1066764 cópias/mL e um desvio padrão de aproximadamente 2067493.

Observando o desfecho do quadro clínico, 64,30% (9) obtiveram alta, 28,40% (4) evoluíram a óbito e 7,14% (1) evadiram ao tratamento. Observando os indicadores de óbito, a idade média daqueles que tiveram esse desfecho é de 53,25 anos com um desvio padrão de 19,46 anos.

O tratamento em tempo hábil do paciente acometido por esta infecção fúngica invasiva está intrinsecamente relacionada a melhores prognósticos [3], o que dá à antigenúria um papel especial no diagnóstico da doença, posto que é mais rápido quando comparado com a cultura do fungo em sangue periférico. É interessante dar destaque ao paciente 10HDT ao se observar seu número de cópias de LT CD4+ de 361 cel/mm<sup>3</sup> e como método laboratorial de diagnóstico apenas a antigenúria no momento da randomização, o que pode ser um indicativo de que o paciente ainda não contava com a infecção disseminada, indicando uma possível detecção precoce da infecção.

Nessa etapa do nosso trabalho padronizamos a extração de ácidos nucleicos a partir de sangue periférico dos pacientes acometidos de HIV/AIDS e *H. capsulatum* sem que o patógeno fosse isolado em meio de cultura apropriado. Trata-se de uma etapa operador depende com tempo para realização menor do que a cultura para fungos. Em média com 6 horas de trabalho teríamos o resultado do PCR para a região universal fúngica compreendendo extração e eletroforese confirmatória para as duas etapas. Porém, para se afirmar de que se trata do fungo *H. capsulatum* faz-se necessário a confirmação por sequenciamento de DNA. A análise das sequências por comparação às sequências depositadas no banco de dados do GeneBank nos fornece a homologia para validação dos resultados com as amostras clínicas.

Mais interessante e oportuno, ao se discutir a diversidade de possíveis manifestações da histoplasose não é possível que se negligencie um papel em que a diversidade genética do fungo pode exercer sobre a clínica apresentada [2]. Sabe-se que no Brasil, circulam nove grupos genéticos de *Histoplasma capsulatum* conhecidos: LAm A, LAm B, LAm C, LAm D, LAm E, RJ, L, BrHC1 e BrHC3 [1]. A diversidade genética apresentada pelo patógeno não apenas possibilita prováveis manifestações clínicas diferentes, mas também dupla infecção por fungos de

genótipos diferentes em um mesmo hospedeiro [3]. Esta etapa do nosso trabalho ainda está em andamento.

Assume-se que no território da América Latina o *Histoplasma capsulatum* tenha se espalhado durante os períodos Pliocênio ao Micênio, dadas as características climáticas do planeta na época [12]. A variedade genética do histoplasma em regiões tropicais pode ser atribuída a um processo de refúgio glacial, situação em que regiões de climas temperados se tornavam inviáveis ao fungo pelo frio extremo enquanto regiões tropicais se mostravam propícias para seu desenvolvimento [12].

## 6 CONCLUSÃO

Após a apreciação dos dados trazidos por esse presente estudo, é possível compreender a repercussão que a histoplasmosose traz para aqueles que vivem com HIV/AIDS. Ainda que seja uma doença já conhecida e correlacionada com a AIDS, observa-se uma negligência quanto a obtenção de informações que cubram todo o território nacional.

Não apenas trágica, a histoplasmosose se mostra como uma infecção multifacetada, haja vista que não se limita apenas a um quadro de evolução, mas a múltiplos possíveis sítios de afecção o que torna sua identificação e tratamento em tempo hábil nesses pacientes imunocomprometidos ainda mais complexa.

Padronização de método molecular eficaz para o diagnóstico, porém de alto custo e operador dependente.

É nítido a necessidade do estudo genético bem como a catalogação das cepas fúngicas em circulação no território nacional, uma vez que dessa forma é possível trazer aos pacientes um tratamento mais assertivo e preciso.

## REFERÊNCIAS

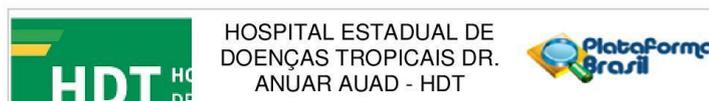
- [1] Rodrigues AM, Beale MA, Hagen F, Fisher MC, Terra PPD, de Hoog S, et al. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. *Stud Mycol* 2020;97. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.02.001>.
- [2] Damasceno LS, Teixeira M de M, Barker BM, Almeida MA, Muniz M de M, Pizzini CV, et al. Novel clinical and dual infection by *Histoplasma capsulatum* genotypes in HIV patients from Northeastern, Brazil. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48111-6>.
- [3] Almeida-Silva F, Teixeira M de M, Matute DR, Ferreira M de F, Barker BM, Almeida-Paes R, et al. Genomic diversity analysis reveals a strong population structure in *histoplasma capsulatum* lama (*Histoplasma suramericanum*). *J Fungi* 2021;7. <https://doi.org/10.3390/jof7100865>.
- [4] Falci DiR, Monteiro AA, Braz Caurio CF, Magalhães TCO, Xavier MO, Basso RP, et al. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living with HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and *Histoplasma* Urine Antigen Detection. *Open Forum Infect Dis* 2019;6. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz073>.
- [5] Vite-Garín T, Estrada-Bárceñas DA, Cifuentes J, Taylor ML. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: An overview. *Rev Iberoam Micol* 2014;31. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.013>.
- [6] Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, et al. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:62–7. <https://doi.org/10.1128/CVI.00332-09>.
- [7] Guha P, Das A, Dutta S, Chaudhuri TK. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *J Clin Lab Anal* 2018;32:1–7. <https://doi.org/10.1002/jcla.22181>.
- [8] Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod* 2017;80:756–70. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>.
- [9] Leite LN, Lelis FJN, de Sousa Xavier MA, dos Santos J, Cardoso L, Barbosa FS, et al.

- Molecular identification and characterization of filamentous fungi and yeasts isolated in a pharmaceutical industry environment. *J Appl Pharm Sci* 2020;10:27–36. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.10704>.
- [10] Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991;39:351–4. <https://doi.org/10.1177/39.3.1704393>.
- [11] Mittal J, Ponce MG, Gendlina I, Nosanchuk JD. *Histoplasma capsulatum*: Mechanisms for pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 422, Springer Verlag; 2019, p. 157–91. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_114](https://doi.org/10.1007/82_2018_114).
- [12] Kasuga T, White TJ, Koenig G, Mcewen J, Restrepo A, Castañeda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 2003;12:3383–401. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x>.

## Apêndice I

Apreciação do CEP/HDT

## APÊNDICE 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da nefrotoxicidade da anfotericina lipossomal em 3 regimes de administração para tratamento de histoplasmose disseminada (HD) em pacientes com AIDS

**Pesquisador:** MARILIA RODOVALHO GUIMARAES SUGURI

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 26086619.1.1001.0034

**Instituição Proponente:** Hospital Dr. Anuar Auad / HDT

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.556.040

**Apresentação do Projeto:**

Apresentação de emenda para apreciação do CEP do projeto intitulado: Avaliação da nefrotoxicidade da anfotericina lipossomal em 3 regimes de administração para tratamento de histoplasmose disseminada (HD) em pacientes com AIDS.

A emenda se dá pela justificativa de inclusão de novos pesquisadores e inclusão de objetivos secundários adicionais após a pesquisadora Renata de Bastos Ascenço Soares ter sido submetida a proposta de pós-doutorado vinculada ao Programa de Pós-Graduação na Universidade de Montes Claros: Biotecnologia.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivos adicionais da emenda:

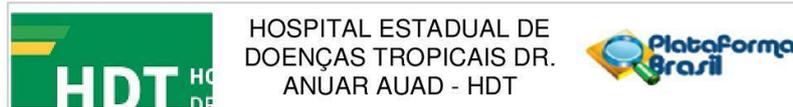
OBJETIVO GERAL

- Reconhecer descritores moleculares para predição de modelos multiparamétricos de nefrotoxicidade em pacientes HIV/Aids co-infectados com Histoplasma capsulatum tratados com Anfotericina B lipossomal.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS ADICIONAIS

- Determinar os parâmetros laboratoriais (bioquímicos e imunológicos – 35 análises por indivíduo) de pacientes HIV/Aids co-infectados com Histoplasma capsulatum tratados em 03 regimes com

**Endereço:** Av. Contorno 3556  
**Bairro:** Jardim Bela Vista **CEP:** 74.853-120  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3201-3621 **Fax:** (62)3201-3620 **E-mail:** cep.hdt@sgsaude.org



Continuação do Parecer: 4.556.040

- Anfotericina B lipossomal; (em andamento pela Dra Marília Rodovalho);
- Obter e quantificar ácidos nucleicos em método automatizado de pacientes HIV/Aids co-infectados com Histoplasma capsulatum tratados em 03 regimes com Anfotericina B lipossomal; (em andamento – amostras armazenadas em biorrepositório);
  - Obter os amplicons por RT-PCR das variantes genéticas preditivas SNPs do gene APOL1 de pacientes HIV/Aids co-infectados com Histoplasma capsulatum tratados em 03 regimes com Anfotericina B lipossomal;
  - Verificar a presença do fungo Histoplasma capsulatum por meio de reconhecimento de regiões intergênicas universais de fungos e leveduras (ITS1 e ITS2) utilizando PCR em sangue periférico de pacientes com antigenúria positiva e/ou métodos clássicos;
  - Verificar a diversidade genética entre e dentre os isolados de H. capsulatum por meio da técnica de RFLP;
  - Realizar a análise multivariada exploratória do tipo PCA - Principal Component Analysis para seleção de variáveis descritoras (SNPs do gene APOL1 e biomarcadores séricos de avaliação de alterações de função renal);
  - Realizar a análise multivariada exploratória do tipo HCA - Analysis of Hierarchical Clusters para agrupamento das variáveis descritoras em categorias - ativos (SNPs – variante com modificação na proteína) e inativos (wild type)
  - Propor por intermédio do método classificatório SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy), dois modelos multiparamétricos (SNPs e biomarcadores bioquímicos) de distribuição das categorias -ativos (SNPs – variante com modificação na proteína) e inativos (wild type) e correlaciona-las com a variáveis descritoras selecionadas (SNPs do gene APOL1 e biomarcadores séricos de avaliação de alterações de função renal);

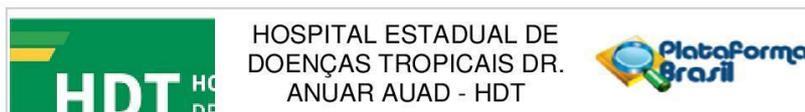
#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O tamanho da amostra de pacientes será a mesma a ser incluída pela Dra Marília Rodovalho por meio de TCLE já aprovado, que prevê o armazenamento e o uso futuro das amostras. As amostras de sangue de 12 pacientes já se encontram armazenadas em temperatura adequada no HDT como biorrepositório do projeto. Riscos descritos no projeto original.

#### **Produção Técnica:**

- Divulgação dos Resultados em eventos específicos tanto da área médica (nefrologia e

Endereço: Av. Contorno 3556  
 Bairro: Jardim Bela Vista CEP: 74.853-120  
 UF: GO Município: GOIANIA  
 Telefone: (62)3201-3621 Fax: (62)3201-3620 E-mail: cep.hdt@isgsaude.org



Continuação do Parecer: 4.556.040

infectologia) quanto da Biotecnologia aplicada à saúde.

- 01 Artigo publicado em periódico indexado especializado qualis A1.

Formação de Recursos Humanos:

- Inclusão de 02 estudantes de Iniciação Científica no estudo
- Formação nível de pós doutorado em área de Biotecnologia Industrial

Contribuições Científicas:

- Primeiro estudo a selecionar os biomarcadores séricos (dentre 35 variáveis experimentais determinadas serão selecionadas 02 ou 03 variáveis descritoras por intermédio da modelagem molecular), em prever as alterações de função renal associada a administração de L-AmB.

Primeiro estudo que avaliará a predição da nefrotoxicidade em diferentes regimes de administração de L-AmB utilizando os biomarcadores genéticos (dentre 33 variáveis de SNPs do gene APOL1 determinadas experimentalmente serão selecionadas 02 ou 03 variáveis descritoras por intermédio da modelagem molecular).

Primeiro estudo a correlacionar os biomarcadores genéticos (dentre 33 variáveis de SNPs do gene APOL1 determinadas experimentalmente serão selecionadas 02 ou 03 variáveis descritoras por intermédio da modelagem molecular) e laboratoriais (dentre 35 variáveis experimentais determinadas serão selecionadas 02 ou 03 variáveis descritoras por intermédio da modelagem molecular) em população HIV/AIDS diagnosticada com Histoplasmosse disseminada em mundo real.

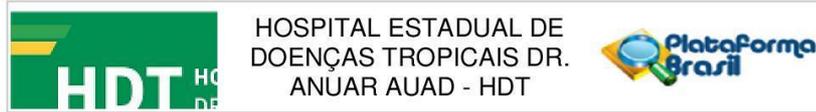
#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Período de desenvolvimento desta etapa da Emenda: Período de 01/03/2021 até 31/03/2022.

O tamanho da amostra de pacientes será a mesma a ser incluída pela Dra Marília Rodovalho por meio de TCLE já aprovado, que prevê o armazenamento e o uso futuro das amostras. As amostras de sangue de 12 pacientes já se encontram armazenadas em temperatura adequada no HDT como biorrepositório do projeto.

**Endereço:** Av. Contorno 3556  
**Bairro:** Jardim Bela Vista **CEP:** 74.853-120  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3201-3621 **Fax:** (62)3201-3620 **E-mail:** cep.hdt@isgsaude.org

Página 03 de 06



Continuação do Parecer: 4.556.040

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

1) Emenda ao Projeto

2) Currículo Lattes novos pesquisadores:

Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier- UNIMONTES

Mauro Aparecido de Sousa Xavier - UNIMONTES

Elytania Veiga Menezes- UNIMONTES

André Luiz Sena Guimarães- UNIMONTES

Luiz Frederico Motta - IFNMG

**Recomendações:**

Emenda sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

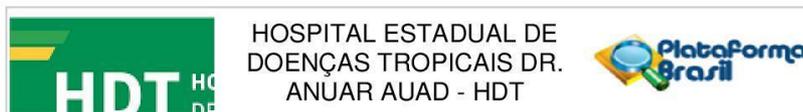
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Emenda aprovada.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_167310_4_E2.pdf	28/11/2020 18:34:04		Aceito
Outros	CVL_Elytania.pdf	28/11/2020 18:22:40	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Outros	CVL_LuizFredericoMotta.pdf	28/11/2020 18:22:22	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Outros	CVL_AndreSena.pdf	28/11/2020 18:21:58	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Outros	CVL_MauroXavier.pdf	28/11/2020 18:21:38	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Outros	CVL_AlessandraRejane.pdf	28/11/2020	MARILIA	Aceito

**Endereço:** Av. Contorno 3556  
**Bairro:** Jardim Bela Vista **CEP:** 74.853-120  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3201-3621 **Fax:** (62)3201-3620 **E-mail:** cep.hdt@isgsaude.org



Continuação do Parecer: 4.556.040

Outros	CVL_AlessandraRejane.pdf	18:21:01	RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Brochura Pesquisa	EMENDA2_RENATA_POSDOC.pdf	28/11/2020 18:12:58	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoPesquisadoresUnimontes.pdf	28/11/2020 18:11:42	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Unimontes.pdf	28/11/2020 18:10:21	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia_amb_renal.pdf	23/09/2020 12:10:54	Monica Baumgardt Bay	Aceito
Declaração de Pesquisadores	C_L_MARILIA.pdf	22/11/2019 17:00:58	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	C_L_RENATA_DE_BASTOS.pdf	22/11/2019 17:00:46	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	C_L_DIEGO_FALCI.pdf	22/11/2019 17:00:28	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	C_L_CASSIA_GODOY.pdf	22/11/2019 17:00:15	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	C_L_CASSIA_CAURIO.pdf	22/11/2019 17:00:02	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	C_L_ALESSANDRO_PASQUALOTTO.pdf	22/11/2019 16:59:46	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	hiv_histo_rim.pdf	22/11/2019 16:21:37	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HIV_HISTO_RIM.pdf	22/11/2019 16:20:01	MARILIA RODOVALHO GUIMARAES SUGURI	Aceito
Outros	DEAMLRABIOMARKERS.JPG	22/11/2019 14:44:43	Renata de Bastos Ascenço Soares	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	doc15040920191122172654.pdf	22/11/2019 14:38:39	Renata de Bastos Ascenço Soares	Aceito
Folha de Rosto	doc15031820191120215036.pdf	20/11/2019 19:01:39	Renata de Bastos Ascenço Soares	Aceito

Endereço: Av. Contorno 3556  
 Bairro: Jardim Bela Vista CEP: 74.853-120  
 UF: GO Município: GOIANIA  
 Telefone: (62)3201-3621 Fax: (62)3201-3620 E-mail: cep.hdt@sgsaude.org

Página 05 de 06



Continuação do Parecer: 4.556.040

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

GOIANIA, 24 de Fevereiro de 2021

---

**Assinado por:**  
**Patricia Moreira de Araújo Lisbôa**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Contorno 3556  
**Bairro:** Jardim Bela Vista  
**UF:** GO      **Município:** GOIANIA      **CEP:** 74.853-120  
**Telefone:** (62)3201-3621      **Fax:** (62)3201-3620      **E-mail:** cep.hdt@isgsaude.org

Página 06 de 06