ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E A SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA

MÁRCIA MARIA NOYA RABELO

PREDITORES E CONSEQUÊNCIAS DA FIBROSE MIOCÁRDICA NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

TESE DE DOUTORADO

SALVADOR – BA
2018

MÁRCIA MARIA NOYA RABELO

PREDITORES E CONSEQUÊNCIAS DA FIBROSE MIOCÁRDICA NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Orientador: Luís Cláudio Lemos Correia

Salvador - BA
2018

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

R114 Rabelo, Márcia Maria Noya
Preditores e consequências da fibrose miocárdica na doença de chagas crônica. / Márcia Maria Noya Rabelo. – 2017.
110f.: il. color. ; 30cm.
Orientador: Luís Cláudio Lemos Correia

Doutora em Medicina e Saúde Humana 2017.

Inclui bibliografia

1. Doença de Chagas. Fibrose. 2.Galectina – 3. 3.Polimorfismo da Galectina-3. 4. Ressonância magnética cardíaca.

I. Título.

CDU: 612.7

MÁRCIA MARIA NOYA RABELO

"PREDITORES E CONSEQUÊNCIAS DA FIBROSE MIOCÁRDICA NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA"

Tese apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 20 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Ana Verena Almeida Mendes
Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Prof. Drª. Ana Marice Teixeira Ladeia
Doutora em Medicina e Saúde
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Prof. Dr. Armênio Costa Guimarães
Livre-docência
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos
Doutor em Clínica Médica
Livre-docência
Hospital São Rafael

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana Passos
Doutor em Medicina e Saúde
Universidade Federal da Bahia – UFBA

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – EBMSP

Hospital São Rafael – HSR

Centro de Biotecnologia e Terapia Celular - CBTC

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Milena B P Soares, Bruno Solano e Ricardo Ribeiro dos Santos, pela colaboração no campo das ideias e apoio nas dosagens das citocinas, biomarcadores e estudo do polimorfismo da Galectina-3.

As Dr[as.] Ticiana Larroca e Carolina The Macedo, médicas cardiologistas do Hospital São Rafael e do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, pelo apoio no acompanhamento ambulatorial, na coleta de dados e, principalmente, pelo constante estimulo e parceria no decorrer dos anos.

Ao Drs. Jorge Andion Torreão, Moises Imbassahay G. Moreira, Alessandra Caldas pelo apoio na realização, aquisição e interpretação das imagens cardíacas.

À Agnaluce Moreira e Luciana Estrella, coordenadoras do laboratório do Hospital São Rafael, pelo apoio nas diversas dosagens bioquímicas.

As Dr[as.] Luciana Nascimento e Tatiana Rocha, médicas arritmologistas do Hospital São Rafael, pelo apoio na realização e interpretação do sistema Holter 24h.

Aos Dr[s.] Fabio Almeida e Alan Montgomery, médicos cardiologistas do Hospital São Rafael, pelo apoio na realização e interpretação do teste ergométrico.

A Dra. Liliana Ronzoni, diretora médica do Hospital São Rafael, pelo apoio constante durante esses anos e exemplo de condução ética em frente a uma grande Instituição.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Claudio Lemos Correia, o meu reconhecimento pela oportunidade de compartilhar e realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria, serenidade, inibindo a vaidade em prol da simplicidade e eficiência e, principalmente, por sua capacidade impar de estimulo a nos tornar pessoas melhores.

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

Albert Einstein

“A vida não é medida pela quantidade de vezes que respiramos, mas pelos momentos que nos tiram a respiração”

George Carlin

RESUMO

Fundamento: estudos sugerem o papel da fibrose miocárdica como substrato para o desenvolvimento e progressão da disfunção ventricular, arritmia e morte em portadores da doença de Chagas. No entanto, poucos dados são disponíveis quanto ao padrões e patogênese desta variável a fim de oferecer possibilidades de prevenção e desenvolvimento de terapias corretivas. **Objetivos:** (1) avaliar a acurácia da medida plasmática da Galectina-3 na determinação da fibrose miocárdica; (2) descrever a frequência dos polimorfismos dos genes *CLDN-1, LGALS3, SOCS3, IL-28B, CCL5* nas diferentes formas clínicas da doença; (3) descrever a frequência e extensão da fibrose miocárdica avaliada por ressonância magnética cardíaca em pacientes da foram indeterminada e (4) testar a hipótese de que a analise da função ventricular com o uso da técnica de *Speckle Tracking Strain* é capaz de predizer fibrose em indivíduos com doença de Chagas. **Metodologia:** estudo observacional, de corte transversal, incluindo pacientes consecutivamente admitidos no ambulatório de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Hospital São Rafael, no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2013, com doença de Chagas confirmada por 02 testes sorológicos positivos. Todos os indivíduos realizaram exames bioquímicos, eletrocardiograma de 12 derivações, raio X tórax, Holter 24h, teste ergométrico, ecocardiograma com doppler, ressonância magnética cardíaca (RMC) além de mensuração plasmática de galtecina-3, NT-ProBNP e citocinas. **Resultados:** foram avaliados 61 indivíduos portadores da doença de Chagas, 56% sexo feminino, 58± 9 anos, sendo 17 indivíduos na forma indeterminada, 16 na forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo e 28 na forma cardíaca com disfunção do ventrículo esquerdo. Realce tardio foi identificado em 37 pacientes (64%) à ressonância magnética cardíaca, com percentual de área acometida por fibrose de 9,4% (IIQ:2,4-18,4). Em relação ao *Objetivo 1* (n=61): não foi observado associação entre a concentração sérica de Galectina-3 e a extensão de fibrose miocárdica evidenciada à RMC nas diferentes formas clínicas da doença. Assim como, foi documentado no *Objetivo 2* (n=55) que o polimorfismo do LGALS3 também não é capaz de predizer fibrose nas diferentes apresentações fenotípicas na doença. Seguindo adiante, quanto ao *Objetivo 3* (n=61) foi demonstrado que a presença de fibrose na forma indeterminada tem frequência e extensão semelhante à forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo; e no *Objetivo 4* (n=58) que o uso da técnica de *Speckle Tracking Strain* não tem valor incremental à fração de ejeção convencional para a predição de fibrose miocárdica em portadores da doença de Chagas. **Conclusões:** em pacientes com doença de Chagas não há relação direta entre o grau de fibrose e o nível sérico da Galectina-3, negando um papel preditor dessa molécula em relação a fibrose miocárdica, assim como, a alteração polimórfica do gene da Gal-3 não prediz fibrose nas diferentes apresentações fenotípicas da doença. Além disso, as formas indeterminada e cardíaca sem disfunção assemelham-se entre si quanto ao percentual de acometimento por fibrose avaliado pela RMC, não havendo valor incremental do uso da técnica de *Speckle Tracking Strain* à fração de ejeção convencional para avaliação de fibrose subclínica.

Palavras-chaves: Doença de Chagas. Fibrose. Galectina – 3. Polimorfismo da Galectina-3. Ressonância magnética cardíaca.

ABSTRACT

Background: Previous studies suggest the role of myocardial fibrosis as a substrate for the development and progression of ventricular dysfunction, arrhythmia and death in patients with Chagas' disease. However, few data are available regarding the patterns and pathogenesis of this variable in order to offer possibilities for prevention and development of corrective therapies. **Objectives:** (1) to evaluate the accuracy of the plasma Galectin-3 measurement in the determination of myocardial fibrosis; (2) to describe the frequency of *CLDN-1, LGALS3, SOCS3, IL-28B, CCL5* of gene polymorphisms in the different clinical forms of the disease; (3) to describe the frequency and extent of myocardial fibrosis assessed by cardiac magnetic resonance imaging in patients with the indeterminate form, and (4) to test the hypothesis that ventricular function analysis using the Speckle Tracking Strain technique is able to predict fibrosis in individuals with Chagas' disease. **Methodology:** cross-sectional observational study, including patients consecutively admitted to the Chagas Outpatient Clinic and Heart Failure of the São Rafael Hospital, from January 2012 to December 2013, with Chagas disease confirmed by 02 positive serological tests. All subjects underwent biochemical exams, 12-lead electrocardiogram, chest x-ray, 24-hr Holter, exercise test, doppler echocardiogram, cardiac magnetic resonance imaging, and plasmatic measurement of Galectin-3, NT-ProBNP and cytokines. **Results:** 61 subjects with Chagas' disease, 56% of the participants were women, mean age was 58± 9 years, distributed as follow: 17 individuals in indeterminate form, 16 in cardiac form without left ventricular dysfunction and 28 in cardiac form with left ventricular dysfunction. Late enhancement was identified in 37 patients (64%) with cardiac magnetic resonance imaging, with a percentage of fibrosis area of 9.4% (IIQ: 2.4-18.4). In relation to *Objective 1* (n=61): no association was observed between the serum concentration of Galectin-3 and the extent of myocardial fibrosis evidenced to cardiac magnetic resonance in the different clinical forms of the disease. As well as, we documented in *Objective 2* (n=55) that the LGALS3 polymorphism is also not able to predict fibrosis in the different phenotypic presentations in the disease. Following on, *Objective 3* (n=61) showed that the presence of fibrosis in the indeterminate form has a frequency and extension similar to the cardiac form without left ventricular dysfunction; and in *Objective 4* (n=58) that the use of the Speckle Tracking Strain technique has no incremental value to the conventional ejection fraction for the prediction of myocardial fibrosis in patients with Chagas' disease. **Conclusions:** In patients with Chagas' disease there is no direct relationship between the degree of fibrosis and the serum level of Galectin-3, denying a predictive role of this molecule in relation to myocardial fibrosis, as well as the polymorphic alteration of the Gal-3 gene does not predict fibrosis in the different phenotypic presentations of the disease. In addition, the indeterminate and cardiac forms without dysfunction resemble each other regarding the percentage of fibrosis involvement evaluated by the cardiac magnetic resonance, and there is no incremental value of the use of the Speckle Tracking Strain technique to evaluate subclinical fibrosis.

Keywords: Chagas disease. Fibrosis. Galectin-3. Galectin-3 polymorphism. Cardiac magnetic resonance imaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do T. cruzi. 19
Figura 2 - Galectina-3**.** Estrutura da proteína LGALS3. Baseado na renderização PyMOL DP PDB 1^{A}3K.MOL.....24
Figura 3 - População do estudo. Cdi= cardiodesfibrilador implantável. MP= marcapasso 39
Figura 4 - Escore de Rassi nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfismos dos genes estudados (LGALS3, SOCS3, IL-28B, CLDN-1 e CCL5) 37
Tabela 2 - Características demográficas e clínicas 40
Tabela 3 - Características clínicas de acordo com a presença de taquicardia ventricular ao Holter 24h 42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDi	Cardiodesfibrilador implantável
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFN-γ	Interferon gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-3	Interleucina 3
GAL-3	Galectina-3
G-CSF	Fator de crescimento de colônia de granulócitos
LAMC1	Subunidade gama 1 da laminina
LAMP1	Proteína 1 associada à membrana de lisossomos
LAMP2	Proteína 2 associada à membrana de lisossomos
LGALS3	Lectina, ligante de galactosídeo, solúvel 3
M1	Macrófago tipo 1 ou classicamente ativado
M2	Macrófago tipo 1 ou alternativamente ativado
MP	Marcapasso
mRNA	RNA mensageiro
NT-proBNP	Peptídeo natriurético tipo pro-B N-terminal
NYHA	*New York Heart Association*
RMC	Ressonância Magnética Cardíaca
RNA	Ácido ribonucleico
Smad3	Membro 3 da família SMAD
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
α-SMA	Actina α de músculo liso
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Fator de crescimento de transformação β
THBS1	Trombospondina 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1 Doença de Chagas 16
2.1.1 A Importância do Problema 16
2.1.2 Transmissão 18
2.1.3 Fase aguda 20
2.1.4 Fase crônica 21
2.1.5 Forma indeterminada 22
2.2 Fibrose na doença de Chagas 22
2.3 Galectina-3 24
2.3.1 Galectina-3 e Insuficiência Cardíaca 26
2.3.2 Galectina-3 na doença de Chagas 27
2.3.3 Polimorfismo da Galectina-3 29
2.4 Ressonância Magnética Cardíaca 30
3 OBJETIVOS 33
3.1 Objetivo Geral 33
3.2 Objetivos Específicos 33
4 MÉTODOS 34
4.1 Desenho do estudo 34
4.2 Local do estudo 34
4.3 Seleção da amostra 34
4.3.1 População acessível 34
4.3.2 População alvo 34
4.4 Critérios de inclusão e exclusão 35
4.5 Formas da doença de Chagas 35
4.6 Dados Clínicos e Laboratoriais 35
4.7 Mensuração Galectina-3, NT-ProBNP e citocinas 36
4.8 Genotipagem dos polimorfismos 36
4.9 Ressonância Magnética Cardíaca 38
5 RESULTADOS 39
6 PUBLICAÇÕES 43
6.1 Artigo 1 - Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy. 44
6.2 Artigo2 - Avaliação do Polimorfismo da Galectina-3 em Indivíduos com Doença de Chagas. 51
6.3 Artigo 3 - Presença e Extensão da Fibrose Miocárdica na Forma Indeterminada da Doença de Chagas: Estudo de Ressonância Magnética. 58
6.4 Artigo 4 – Assesment of Speckle Tracking Strain Predictive Value for Myocardial Fibrosis in Subjects with Chagas Disease. 76
7 DISCUSSÃO 82
8 DESCRIÇÃO DA EXPERIÊNCIA CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO 87

9 PERSPECTIVAS FUTURAS 89
10 CONCLUSÕES 91
REFERÊNCIAS 92
ANEXOS 102

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ainda é um problema concreto e impactante na América Latina, sob múltiplos aspectos vinculado às questões da iniquidade social e ao processo de globalização. A enfermidade, a despeito de dificuldades financeiras e políticas, tem sido controlada, restando um horizonte necessário à consolidação do controle, vigilância e cuidado adequado aos indivíduos já infectados. Trata-se de um problema específico, sem envolvimento ou interesses dos mercados globais de importância, sempre exigindo ação perspícua do Estado, como provedor responsável pela saúde de todos os cidadãos. Além das ações profiláticas governamentais específicas, modelos matemáticos pontuais tem indicado que a simples elevação dos padrões sociais é capaz de controlar a transmissão da doença a médio/longo prazo[1]. A persistência das iniquidades e o avanço da globalização constituem entraves e desafios a serem superados por aqueles protagonistas responsáveis, em sua maioria pertencentes aos quadros técnicos e à comunidade científica dos países endêmicos.

Embora a informação disponível seja muito pontual, e os dados obtidos nos diferentes países dificilmente possam ser comparados, fica evidente o tremendo custo econômico da doença, reconhecendo que a população que padece da mesma é habitualmente de baixo nível socioeconômico. Do ponto de vista geral, a grande maioria dos casos encontra-se nos estágios evolutivos iniciais, atualmente descrito como forma indeterminada da doença. A cardiopatia chagásica crônica é a principal manifestação mórbida da doença e, até hoje, apesar de mais de 100 anos de sua descoberta, ainda desconhecemos os mecanismos patogênicos responsáveis pela sua evolução[2].

Do ponto de vista anatomopatológico, a julgar-se pelo que se conhece dos poucos dados obtidos de necropsia e estudos experimentais, há focos inflamatórios no miocárdio e vísceras ocas do tubo digestivo na quase totalidade dos casos[3,4]. Assim como, não temos dúvidas, de que um dos aspectos mais chamativos da fase crônica da doença de Chagas é a fibrose, que se inicia lenta e progressivamente, sendo considerada como o principal fator responsável pela progressiva perda da atividade contrátil do miocárdio[5].

A importância do conhecimento fisiopatológico da substituição do tecido por fibrose parece ser cada vez mais relevante para uma variedade de doenças distintas. Os fibroblastos cardíacos compreendem um tipo de célula essencial no coração e responsáveis pela homeostase da matriz

extracelular, no entanto, após o estabelecimento de uma lesão miocárdica essas células se transformam em um fenótipo de miofibroblasto contribuindo para a fibrose cardíaca[6]. Essa remodelação envolve alterações patológicas que incluem dilatação da câmara, hipertrofia dos cardiomiócitos, apoptose, arritmias e, em última análise, a progressão para insuficiência cardíaca[7]. Apesar da importância crítica da fibrose nas doenças cardiovasculares, nossa compreensão limitada dessa população de células impede o desenvolvimento de terapias potenciais que efetivamente evitem ou reduzam a progressão da doença[8]. É bastante claro que uma melhor compreensão dos mecanismos intrincados subjacentes a sinalização fibrótica será fundamental para alcançar novos avanços terapêuticos.

Existe também a necessidade de encontramos novos biomarcadores que possam refletir os mecanismos fisiopatológicos da fibrose miocárdica, a fim de apoiar a estratificação de risco e uso de recursos mais dispendiosos para aqueles que efetivamente irão se beneficiar. Dados atuais sugerem que galectina-3 representa uma ligação entre inflamação e fibrose, uma vez que os níveis circulantes encontravam-se elevados em várias condições de fibrose[9–11]. Nosso grupo conduziu estudo experimental em camundongos infectados pelo *T. cruzi* tendo demonstrado produção de galectina-3 em diferentes populações celulares e seu papel na promoção da inflamação cardíaca, assim como, o seu bloqueio farmacológico resultou em redução da inflamação, fibrose e produção dos principais mediadores inflamatórios[12]. Por não termos atualmente disponível um marcador suficientemente preciso para quantificar a fibrose miocárdica, buscamos avaliar o nível sérico da galectina-3 e fibrose miocárdica, nas diferentes formas da doença de Chagas, utilizando a ressonância magnética cardíaca como método padrão-ouro para quantificar o percentual de área do miocárdio afetada por fibrose.

Sabemos também que o gene da galectina-3 é polimórfico em humanos. Estudos prévios relataram variantes genéticas em dois sítios de polimorfismos de nucleotídeo único do gene da galectina-3 (rs4644 e rs4652)[13]. Este polimorfismo tem sido associado a respostas inflamatórias erráticas e imprevisíveis. Descrevemos, em outro artigo desta tese, se o polimorfismo genético da galectina-3 pode ser fator determinante ao desenvolvimento de formas clínicas mais graves da doença de Chagas.

Dando seguimento a nossa investigação tendo fibrose como papel principal avaliamos o percentual de área do miocárdio acometida por fibrose nas diferentes formas clínicas da doença. Estudos anteriores validaram a quantificação de fibrose miocárdica com o uso da ressonância

na população portadora de doença de Chagas[14–16]. No entanto, são poucos os dados disponíveis quanto ao grau de fibrose apresentada nas diversas formas clínicas de apresentação da doença, o que guardaria relação com o potencial desta variável na predição de evolução para a forma cardíaca. Em um dos artigos desta tese descrevemos a frequência e extensão da fibrose miocárdica avaliada por ressonância cardíaca em pacientes da forma indeterminada.

Por fim, sabemos da correlação negativa entre fração de ejeção do ventrículo esquerdo e fibrose miocárdica e correlação direta com os índices de volume sistólico e diastólico final indicando que a ecocardiografia, com o uso da técnica de *speckle tracking* uma vez que fornece avaliação da deformação miocárdica e torsão ventricular esquerda, possa vir a se tornar um método a ser utilizado na avaliação indireta de acometimento do miocárdio por fibrose[17]. Portanto, levantamos a hipótese de que o *strain* longitudinal tem valor aditivo a fração de ejeção na predição da fibrose miocárdica em indivíduos com doença de Chagas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Chagas

2.1.1 A Importância do Problema

A doença de Chagas foi descoberta em 1908, no Brasil, pelo pesquisador Carlos Chagas, que descreveu no artigo clássico publicado em 1909, não somente a forma clínica característica da doença, mas também o seu agente causador, o principal mecanismo de transmissão e a inoculação transcutânea do parasito por excrementos de insetos hematófagos infectados[18]. O agente causador da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi (T. cruzi)*, assim designado em homenagem à Oswaldo Cruz[19].

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é uma doença enzoótica, que pode levar à doença humana quando os insetos, vetores triatomíneos, passam ao ciclo doméstico, adaptando-se às habitações dos humanos[20]. Acredita-se que o parasito que causa a doença de Chagas esteja presente no continente americano há vários milênios, sendo o ciclo silvestre bem mais antigo que o doméstico. A pesquisa de ácido desoxirribonucléico (DNA, *desoxyribonucleic acid*) do *T. cruzi*, com a reação de polimerase em cadeia em fragmentos de tecidos humanos, obtidos de múmias de 09 mil anos a.C., descobertas no deserto de Atacama, região sul do Peru e norte do Chile, mostrou-se positiva em 40% das amostras analisadas[21]. Estudos de paleoepidemiologia mostram que houve uma evolução do parasito a partir de ancestrais comuns com tripanossomos australianos, existentes antes da separação dos continentes há cerca de 230 milhões de anos. Apenas à título de curiosidade, suscitou-se que Charles Darwin contraiu a doença durante sua expedição pela América do Sul[22].

A doença de Chagas tem ampla distribuição na América Central e Latina. A real prevalência da doença não é completamente conhecida, já que os estudos epidemiológicos realizados em todos os países atingidos nem sempre são exatos. Esses estudos, realizados entre 1980 a 1985, estimaram uma prevalência de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas, com taxa de infecção anual de 300.000, taxa de mortalidade anual > 50.000 pessoas/ano, 100 milhões de pessoas sob risco de adquirir a doença e, aproximadamente 2 milhões de infectados no Brasil[23]. A infecção é endêmica nos seguintes países: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Uruguai, Paraguai, Peru e

Venezuela[23,24]. Entretanto, estas estimativas de prevalência são em grande parte baseadas em resultados de testes de bancos de sangue. Entre 1960 à 1989 a prevalência de sangue contaminado em algumas cidades da América do Sul variou de 1,7% em São Paulo a 53% em Santa Cruz, Bolívia[25]. Felizmente, as estratégias de controle vetorial reduziram a transmissão da doença em vários países da América Latina e, portanto, sua incidência foi reduzida em mais de 65% no ano de 2000[23].

Inicialmente, constituindo-se apenas uma doença de zonas rurais de países endêmicos, a doença se espalhou para as cidades com a migração urbana. A imigração também levou a doença de Chagas para regiões não endêmicas e países desenvolvidos, notadamente Austrália, Canadá, Estados Unidos e Europa[26,27]. De fato, a maioria dos cerca de 100 mil infectados nos Estados Unidos adquiriram a doença enquanto residiam em regiões endêmicas, embora vetores e animais infectados pelo *T. cruzi* sejam encontrados em muitas regiões, e raros casos de transmissão autóctone tenham sido documentados[28]. Em 2006, nos Estados Unidos, foi iniciado um programa de triagem nos bancos de sangue para a doença de Chagas que detectou mais de 500 doações infectadas pelo *T. cruzi*, ajudando, assim, a prevenir a transmissão por via sanguínea e aumentando o temor pela doença[29]. Nas regiões não endêmicas a transfusão de sangue, transplante de órgãos e a transmissão vertical são as vias de transmissão mais frequentes pelo *T. cruzi*[20]. Casos de transmissão oral têm sido reportados em estados brasileiros, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Amazonas. Supõe-se que, quando alimentos contaminados são eventualmente consumidos, grandes quantidades de parasito são transportadas para o trato gastrointestinal e podem penetrar na barreira epitelial ativamente ou por pequenas lesões. Após incubação, de cerca de cinco dias, a miocardite aguda é observada, apresentando altas taxas de mortalidade e sintomas clínicos mais graves em indivíduos jovens. No entanto, pouco se sabe sobre a evolução desses pacientes à longo prazo, apesar de poderem desenvolver cardiomiopatia[30]. Como não existem vacinas ou agentes quimioterápicos eficientes, o controle da doença é feito pelo controle do vetor nas áreas endêmicas, com o uso de inseticidas.

No final dos anos 1980, a insistência dos cientistas latino-americanos, apoiados pela Organização Pan-Americana de Saúde, levou a implementação, financiada pelo Banco Mundial, em julho de 1991, da chamada Iniciativa do Cone Sul, um dos maiores programas de cooperação internacional para controle de uma doença transmissível. O objetivo era interromper a transmissão do *T. cruzi* pela erradicação do *Triatoma infestans*, controlar outras espécies vetoras e interromper a transmissão transfusional. No período de 1991 a 1999, países

participantes da Iniciativa do Cone Sul, como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, investiram cerca de 350 milhões de dólares no controle epidemiológico da doença, obtendo uma redução média de 94% da sua incidência. Por outro lado, cerca de US$ 1.140 milhões foram economizados por estes países em gastos médico-hospitalares e com seguridade social[31]. O Ministério da Saúde brasileiro recebeu da Organização Mundial da Saúde, em junho de 2006, o certificado de eliminação de transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*. Apesar de ser um fato extremamente importante, não significa a erradicação da doença no território nacional, o que é atestado pelas microepidemias registradas recentemente por contaminação oral.

Mesmo após 100 anos de sua descoberta, a doença de Chagas ainda é uma doença desafiadora. Muitas perguntas sobre a patogenia, características clínicas, e até mesmo o seu tratamento permanecem sem solução. No entanto, com o aumento da consciência mundial, as iniciativas para controle da disseminação, assim como o aumento das pesquisas sobre os mecanismos fisiopatológicos e terapias específicas, trouxeram progressos em nossa compreensão e na capacidade para lidar com esta complexa doença.

2.1.2 Transmissão

A maior parte dos casos de infecção em humanos ou outros vertebrados é produzida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos. O vetor da infecção é o inseto triatomíneo, também conhecido como “barbeiro”, existindo mais de 130 diferentes espécies com potencial para serem vetores do parasito. Esses insetos medem entre 4–45 mm de comprimento. Entretanto, a infecção é transmitida apenas por seis ou sete espécies, sendo a mais comum o *Triatoma infestans*. O inseto, depois de infectado, mantém-se assim por toda a vida podendo transmitir a infecção por vários anos. Além do homem, outros mamíferos podem ser infectados dessa mesma forma, servindo de reservatórios para o parasito. Existem dois ciclos de transmissão do *T. cruzi*, doméstico/peridoméstico e silvestre, sendo determinados pelo tipo de reservatório vertebrado e pelo vetor.

O parasito circula na natureza entre os homens, vetores e reservatórios sob três estágios morfológicos distintos: amastigota, epimastigota e tripomastigota. O vetor se infecta ao se alimentar de sangue contaminado com as formas tripomastigotas metacíclicas. No estômago do inseto, o parasito se transforma em epimastigota. No final do intestino e no reto, as formas

epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante do hospedeiro vertebrado. Este tripomastigota tem um flagelo, de 15-20 µm, e um grande cinetoplasto posterior que contém DNA. A infecção humana ocorre após a picada do triatomíneo, quando as formas tripomastigotas, presentes nas fezes do inseto, invadem rapidamente diferentes células do hospedeiro. Os parasitos ficam contidos em estruturas chamadas vacúolos parasitóforos, de onde escapam para o citoplasma e se diferenciam para as formas amastigotas. Por meio de divisão binária, as formas amastigotas se multiplicam e se transformam novamente em tripomastigotas pouco antes da lise celular. Ocorre então, a liberação de centenas de tripomastigotas, que invadem novas células. Depois de repetidos ciclos, o parasitismo se espalha pelo sangue e tecidos. Os macrófagos têm importante papel na resposta imune inicial ao *T. cruzi*, e também na sua disseminação, carregando o parasito para outros órgãos e tecidos[32,33]. O ciclo evolutivo encontra-se resumido na figura 1.

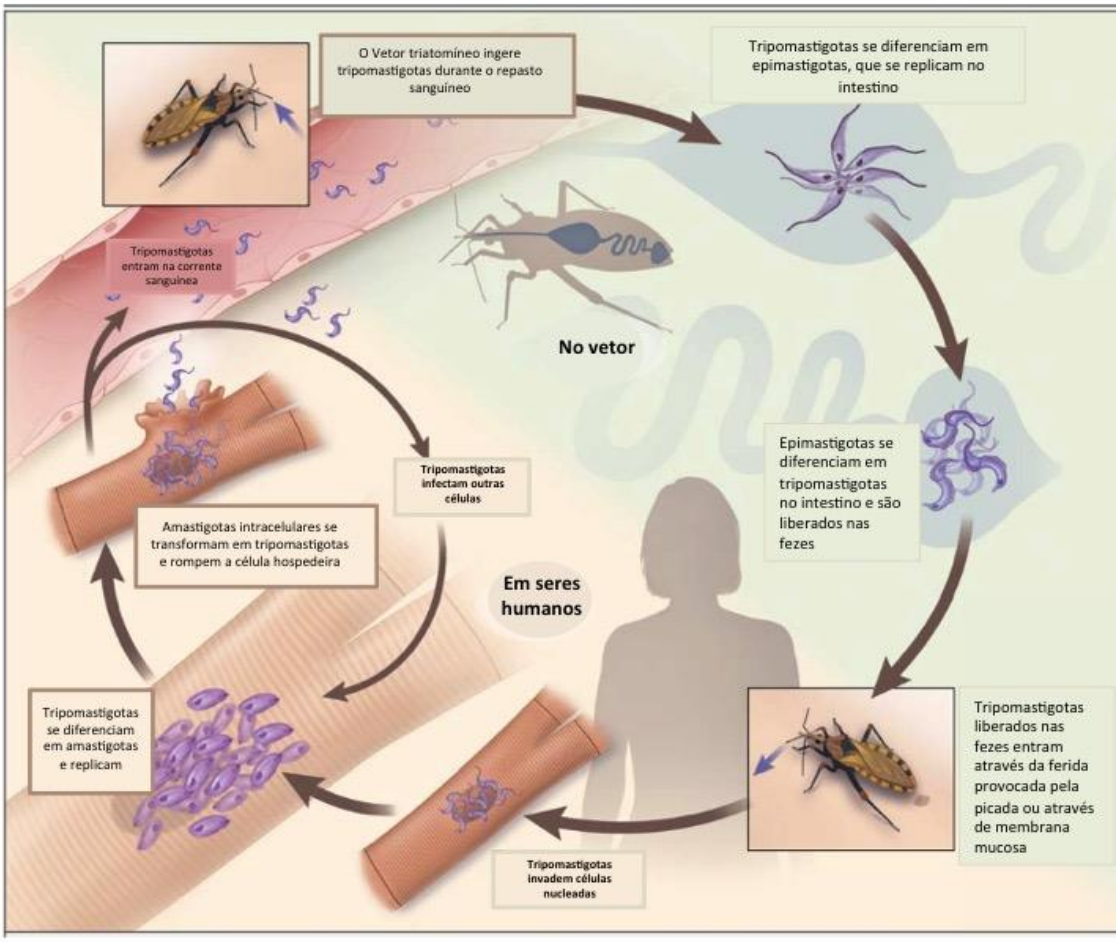


Figura 1 - Ciclo de vida do T. cruzi. O ciclo de vida é iniciado quando o vetor triatomíneo ingere tripomastigotas circulantes durante o repasto sanguíneo em mamíferos hospedeiros. As formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas, formas replicativas presentes no intestino do vetor. As formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos

infectantes, que são excretados com as fezes do vetor durante o repasto sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos entram através da ferida provocada pela picada ou através de membrana mucosa e invadem células nucleadas. No citoplasma, os tripomastigotas se diferenciam na forma amastigota, que se replica, posteriormente se transformando em tripomastigotas, que rompem a membrana da célula, sendo liberados na circulação. Os parasitas circulantes podem então invadir novas células ou infectar vetores.
Fonte: Adaptado de BERN *et al*, 2015.

As regiões endêmicas, normalmente, se localizam nas zonas rurais, onde em geral as condições socioeconômicas são mais precárias. Em razão das dificuldades econômicas, ao longo dos anos, as populações rurais vêm migrando para as zonas urbanas, diminuindo a população exposta à vetores infectados. No entanto, isso aumenta a possibilidade de transmissão da doença por transfusão de sangue, dado particularmente alarmante em bancos de sangue onde não se testa, como rotina, amostras de sangue por sorologia para doença de Chagas. A transmissão da doença também pode ocorrer por via congênita, embora em menor proporção. No Brasil o risco de infecção por essa via é menor do que 1% do total de casos infectados. Outra possibilidade é a transmissão por transplante de órgãos de indivíduos infectados, principalmente rins, coração, medula óssea e pâncreas, tanto de doadores vivos como cadavéricos[34].

2.1.3 Fase aguda

Há duas fases sucessivas na doença de Chagas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é frequentemente assintomática e dura de seis a oito semanas, ocorrendo, com maior frequência, em crianças residentes em áreas endêmicas, geralmente entre 1 e 5 anos de idade. Durante a fase aguda, ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, sendo possível detectá-lo na circulação. As formas amastigotas podem ser encontradas em células de diferentes tecidos, mais frequentemente na musculatura lisa, estriada esquelética e cardíaca e no sistema nervoso central e, mais raramente no ovário, no testículo e na tireóide. Estima-se, que esta fase seja diagnosticada em menos de 10% dos indivíduos infectados[35].

A escassez ou ausência de manifestações clínicas ocorre na maioria dos pacientes. No entanto, pode ocorrer inflamação no local de entrada do parasito, em geral próximo aos olhos, causando lesão denominada “sinal de Romaña”. Os sintomas mais frequentes são: febre, taquicardia não relacionada à febre, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, vômito, diarreia, anorexia,

edema e linfocitose. Nesta fase da infecção, ocorre miocardite aguda em mais de 90% dos casos em resposta ao intenso parasitismo, com frequentes alterações eletrocardiográficas[36].

Os resultados dos testes sorológicos para o *T. cruzi* são negativos durante as primeiras semanas, mas o parasito circulante pode ser detectado por xenodiagnóstico e/ou hemoculturas. Em geral, os sintomas desaparecem seis a oito semanas após a infecção, ou em menos tempo, se é de pronto diagnosticado, podendo, assim, ser realizado tratamento específico. A recuperação espontânea é observada em 95% dos pacientes[20,37]. Na ausência de tratamento cerca de 5% dos infectados morrem por meningoencefalite ou insuficiência cardíaca grave, que ocorre principalmente em crianças no segundo ou terceiro ano de vida[35,38,39].

O tratamento é feito com benzonidazol, sendo indicado durante a fase aguda, na infecção congênita e na infecção crônica recente, característica de crianças em idade escolar em zonas endêmicas. Há indicação de tratamento profilático nos casos de acidente laboratorial, mesmo antes da confirmação da doença por exames diagnósticos[20]. O tratamento da fase aguda promove melhora dos sintomas, desaparecimento dos parasitos circulantes após cerca de cinco dias de tratamento e, mais tardiamente, a negativação da sorologia em até 80% dos casos[37,40].

O parasitismo intenso, característico da fase aguda, é controlado pela resposta imune contra o *T. cruzi*, estabelecendo-se uma infecção crônica com baixa parasitemia. Porém, não ocorre eliminação definitiva do parasito, o que é conhecido como "imunidade não estéril"[32]. Esse dado é confirmado pela observação de que os pacientes com doença de Chagas, em uso de imunossupressores pós-transplante cardíaco ou com síndrome da imunodeficiência adquirida, apresentam exacerbação da infecção, com aumento da parasitemia, parasitismo tecidual e sinais clínicos de doença parasitária[41,42].

2.1.4 Fase crônica

A fase crônica da doença inicia-se quando a parasitemia cai a níveis indetectáveis e quando os sintomas clínicos relacionados à fase aguda desaparecem, ou seja, após 4 a 8 semanas de infecção. Na fase crônica, entre 60% a 70% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos pelo resto da vida, evoluindo na forma chamada indeterminada, laboratorial ou subclínica da doença. No entanto, entre 10 e 30 anos após a infecção aguda, os 30% a 40% restantes desenvolvem manifestações clínicas decorrentes de alterações cardíacas e/ou

digestivas. Essas ocorrências são mais frequentes em indivíduos do sexo masculino entre 20 e 45 anos de idade[32,43].

Estudos epidemiológicos mostram que a evolução da forma indeterminada para as formas cardíaca e/ou digestiva é maior nos primeiros 10 anos de infecção, desaparecendo progressivamente[38]. A cardiomiopatia chagásica, cardiomiopatia dilatada inflamatória, acomete cerca de 30% dos infectados pelo *T cruzi*; um terço destes desenvolve a doença grave, que inclui arritmias malignas, dilatação ventricular e insuficiência cardíaca[34,40,44]. Por fim, 8% a 10% dos pacientes desenvolvem a forma digestiva com gravidade variada. Nestes casos é frequente observar algum grau de acometimento do sistema nervoso autônomo, que, em geral, precede as alterações de motilidade, com consequente dilatação desses órgãos, levando ao megaesôfago e ao megacólon[20,32].

2.1.5 Forma indeterminada

O diagnóstico dos pacientes portadores da forma indeterminada baseia-se na sorologia positiva para o *T. cruzi*, ausência de sintomas, além de eletrocardiograma convencional e estudos radiológicos de tórax, esôfago e colón normais (*Reunião pesquisa aplicada em Chagas, 1985)*. Apesar do eletrocardiograma normal, exames clínicos mais sensíveis, como o eletrocardiograma de longa duração, o ecocardiograma e estudos com radioisótopos e angiografias, podem detectar pequenas alterações em diferentes órgãos quando os pacientes na forma indeterminada são comparados a indivíduos soronegativos. Outros estudos também mostraram alterações no sistema nervoso autônomo[42,45]. Além disso, cerca de 11% dos pacientes na forma indeterminada e exame radiológico de esôfago normal apresentam alguma alteração em testes manométricos com ingestão de bário. A mortalidade desses pacientes é a mesma que a da população em geral. Em virtude da ausência de sintomas, esses pacientes são normalmente identificados em bancos de sangue, quando a sorologia para o *T. cruzi* é positiva[46].

2.2 Fibrose na doença de Chagas

Apesar de decorridos 100 anos desde a descrição inicial da doença, a patogênese da cardiopatia chagásica ainda não é inteiramente compreendida[2]. Evidências de diversos estudos na literatura demonstram que diferentes fatores na fase aguda e/ou na forma indeterminada da

doença de Chagas podem contribuir de forma marcante para o desenvolvimento da doença. A cardiopatia chagásica crônica tem como substrato morfológico uma inflamação progressiva e fibrosante do miocárdio[47]. Sendo que os principais mecanismos patogênicos sugeridos são: lesão miocárdica causada pelo *T. cruzi*, pelo sistema imune, por alterações microvasculares e alterações do sistema nervoso. Vale ressaltar que nenhum dos mecanismos citados é mutualmente excludente. O aspecto histopatológico característico da cardiomiopatia dilatada é a presença de miocardite difusa com intenso parasitismo linfomononuclear, destruição de fibras cardíacas e fibrose, com escassez de ninhos de parasitas[4,33,48,49].

Estudos experimentais têm revelado a participação de colágenos dos tipos III e I, mas com uma quantidade bem aumentada de colágeno do tipo IV e da fibronectina. Segundo Gironès e Fresno[50], a cronicidade da lesão ao miocárdio decorre da ativação da resposta imune ao parasito, juntamente aos múltiplos antígenos cardíacos. Na realidade, o mimetismo molecular entre os antígenos do hospedeiro e do parasito resultaria em resposta das células efetoras T e B contra os antígenos cardíacos, levando à lesão do miocárdio. Essa agressão crônica ao coração culmina em dano progressivo às fibras miocárdicas e, consequente, formação de cicatriz fibrótica. Contudo, ainda não há evidência que defina a etiologia da miocardite crônica e insidiosa que resulta na cardiopatia crônica.

Em estudos clínicos, uma quantidade significante de fibrose tem sido observada na cardiomiopatia chagásica. Mady e *cols.* em 1999[51], avaliaram 33 pacientes chagásicos, dos quais 8 na forma indeterminada, 6 com alterações eletrocardiográficas (porém sem insuficiência cardíaca) e 19 com disfunção ventricular (classe II e III da *New York Heart Association*), submetidos a biópsia miocárdica. Os pesquisadores relataram associação direta entre a quantidade de fibrose intersticial e a magnitude da disfunção miocárdica. Concluíram, então, que o desempenho cardíaco é negativamente associado ao colágeno intersticial na cardiomiopatia de Chagas. A magnitude da disfunção está relacionada ao grau de colágeno, e esta associação parece apresentar um limiar acima do qual ocorre uma deterioração cardíaca definida.

Recentemente foi mostrado que a ressonância magnética cardíaca com o uso da técnica de realce tardio miocárdico pode detectar fibrose miocárdica em todos os três estágios distintos de evolução da doença de Chagas: desde os assintomáticos com função normal, passando pelos com cardiopatia chagásica estabelecida, até aqueles com disfunção de VE grave associada à

taquicardia ventricular documentada. Rochitte e *cols*.[14], em 51 pacientes com cardiopatia chagásica crônica, observaram fibrose em 68,6% da população estudada e em até 100% naqueles com taquicardia ventricular. A fibrose miocárdica quantificada correlacionou-se diretamente com o estágio de gravidade da doença, a classe funcional da NYHA e com o grau de disfunção regional e global do VE. Enquanto Regueiro e *cols*.[52] descrevem fibrose à RM cardíaca em 23,9% de pacientes que vivem fora da zona endêmica da doença.

2.3 Galectina-3

A galectina-3 (Gal-3) é uma lectina com capacidade de ligação a β-galactosídeos, também conhecida como Mac-2. Trata-se de uma proteína de 26-kDa codificada por um único gene, LGALS3, localizado no cromossomo 14, locus q21–q22[53]. Esta molécula é capaz de atuar tanto no ambiente intracelular quanto no ambiente extracelular, afetando diferentes processos, que incluem adesão celular, vias de sinalização, proliferação, diferenciação e apoptose[54]. As ações exercidas pela Gal-3 são pleiotrópicas, variando com o tipo celular e com a localização da molécula, isto é, no compartimento extracelular ou intracelular[54]. Dentro da célula, a Gal-3 é encontrada no citoplasma, mas também pode sofrer translocação para o núcleo, onde está envolvida na regulação da expressão gênica e *splicing* alternativo[55].

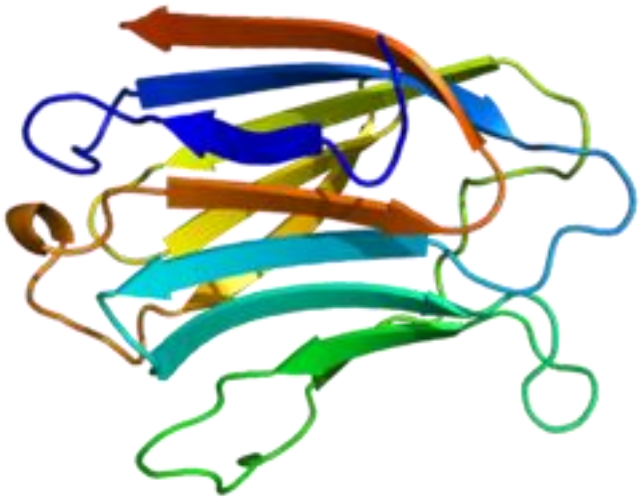


Figura 2 - Galectina-3**.** Estrutura da proteína LGALS3. Baseado na renderização PyMOL DP PDB 1^{A}3K.MOL

O papel da Gal-3 na modulação de respostas imunes é bem descrito na literatura. A Gal-3 exerce diversas funções sobre o sistema imune, agindo diretamente em diferentes tipos celulares. Ela é expressa por linfócitos T ativados[56] e está envolvida em diferentes processos nestas células. Estas ações variam de acordo com a localização (intracelular *vs.* extracelular), gerando alguns efeitos comuns, como, por exemplo, a inibição da sinalização do TCR[57], e alguns efeitos antagônicos, como, por exemplo, a indução de apoptose no meio extracelular versus efeito anti-apoptótico no meio intracelular. Alguns efeitos estão exclusivamente associados com a presença da Gal-3 no meio intracelular, como é o caso do crescimento celular, enquanto outros são exclusivamente desencadeados pela Gal-3 em meio extracelular, como ativação e migração celular[58].

A Gal-3 também é altamente expressa em populações de monócitos e macrófagos[59]. Tem sido demonstrado que macrófagos classicamente ativados, também conhecidos como macrófagos pró-inflamatórios ou M1, são a maior fonte da Gal-3 em sua forma secretada para o meio extracelular. Por outro lado, a Gal-3 também está presente em macrófagos alternativamente ativados, também conhecidos como anti-inflamatórios ou M2[60]. Além das ações em macrófagos anti-inflamatórios, Gal-3 atua em outras populações de células com conhecida ação regulatória sobre o sistema imune, como é o caso das células-tronco mesenquimais, onde parece contribuir para ações imunomoduladoras[61,62].

Além disso, foi demonstrado que a Gal-3 é expressa por fibroblastos e está envolvida no processo de fibrogênese. Isto tem sido extensamente descrito em experimentos utilizando camundongos *knockout* para Gal-3, sendo observado a redução na fibrogênese. O papel proeminente da Gal-3 no estímulo à fibrogênese foi demonstrado em diferentes órgãos, incluindo o coração, fígado, pulmão e rim[63–65].

Diante do exposto, fica claro o envolvimento de Gal-3 em processos de inflamação e reparo tecidual. Após uma lesão tecidual, ocorre a ativação de macrófagos e diferenciação M1. Estes macrófagos então secretam Gal-3, que irá agir em outras células, no compartimento extracelular, levando à ativação e proliferação de células T, ativação de neutrófilos, levando à "explosão oxidativa", além de mediar interações célula-célula e célula-matriz. Por outro lado, a Gal-3 intracelular terá um papel importante em ações anti-inflamatórias mediadas por macrófagos M2, exercendo também um papel crucial no reparo tecidual, seja estimulando a

neovascularização pela sua ação em células progenitoras endoteliais ou formação de cicatriz pelas suas ações em fibroblastos[66,67].

Em 2011, de Boer e *cols* analisaram 7.968 indivíduos visando estabelecer relação entre galectina-3 e fatores de risco cardiovascular/mortalidade na população em geral. O estudo teve um seguimento médio de cerca de 10 anos e foi o primeiro a avaliar galectina-3 na população em geral. Os pesquisadores concluíram que o nível sérico de galectina-3 se correlacionava com diversos fatores de risco cardiovascular, incluindo pressão arterial, lipídios séricos, índice de massa corpórea, função renal e NT-proBNP (P<0,0001). Após a correção para outros fatores de risco cardiovasculares conhecidos (tabagismo, pressão arterial, colesterol e diabetes), os níveis de galectina-3 foram capazes de prever independentemente a mortalidade por todas as causas (1,09; 95%IC:1,01-1,19; P=0,036), mas não foi possível diferenciar entre cardiovascular e mortalidade por câncer[11].

2.3.1 Galectina-3 e Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca é uma síndrome complexa, que envolve numerosos mecanismos fisiopatológicos. O envolvimento da Gal-3 na patogênese da insuficiência cardíaca de diferentes etiologias vem sendo demonstrado nos últimos anos, através de estudos experimentais e clínicos[68].

Apesar de ser reconhecido o papel da interação entre macrófagos e células secretoras de matriz, como miofibroblastos, em situações de inflamação crônica, os mecanismos moleculares envolvidos ainda são pouco claros. Do ponto de vista experimental, os dados indicam que a Gal-3 possui um papel importante ao estabelecer uma ligação entre ativação de macrófagos e o subsequente estímulo à fibrogênese. A Gal-3 é secretada por macrófagos ativados, para o meio extracelular, ativando outras células como, por exemplo, fibroblastos, estimulando a síntese de matriz extracelular.

Em modelo experimental de insuficiência cardíaca em ratos, a Gal-3 foi encontrada altamente expressa e secretada por macrófagos, associando-se à proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno. A infusão de Gal-3 diretamente no saco pericárdico em camundongos causou a infiltração de macrófagos e aumento da fibrose miocárdica, hipertrofia cardíaca, aumento de expressão de TGF-β e disfunção cardíaca[69].

Os níveis de Gal-3 estão aumentados em pacientes com insuficiência cardíaca agudamente descompensada, e por isso esta molécula tem sido recentemente proposta como um biomarcador. Lok e *cols.*, em 2010, avaliaram se Gal-3 tinha valor prognóstico independente em pacientes NYHA classe funcional III/IV. Tanto os níveis de NT-proBNP (577±751 *vs* 363±477 mmol/L, P = 0,01) quanto os níveis de galectina-3 (20,1±8,1 *vs* 17,5±7,4 ng/mL, P=0,01) foram significativamente maiores nos pacientes que não sobreviveram. Os pesquisadores concluíram que o valor prognóstico da galectina-3 é independente da gravidade da insuficiência cardíaca[70]. Dados obtidos de um grande banco de dados (*Framingham Heart Study*) avaliaram se níveis mais altos de galectina-3 estavam associados a um risco aumentado de insuficiência cardíaca e mortalidade por todas as causas. Em 3.353 indivíduos avaliados, níveis elevados de Gal-3 foi associado a uma maior incidência de insuficiência cardíaca na comunidade e mortalidade por todas as causas. Entretanto, a adição de Gal-3 a fatores clínicos resultou em mudanças insignificantes para a estatística C e pequena melhoria da reclassificação líquida[71]. Em outro estudo, aproximadamente 600 indivíduos admitidos com dispnéia, tiveram os níveis plasmáticos de Gal-3, NT-proBNP e apelina mensurados. Destes 209 (35%) foram diagnosticados como portadores de insuficiência cardíaca descompensada. Observaram que NT-proBNP foi superior à apelina ou galectina-3 para o diagnóstico de IC aguda na sala de emergência. Entretanto, a análise de regressão logística multivariada, um nível elevado de galectina-3 foi o melhor preditor independente de mortalidade em 60 dias[72]. Outros estudos demonstraram que níveis de Gal-3 superiores a 17,8 ng/mL se associam a maior risco de re-hospitalização em 30 dias[73]. Já Felker e *cols.*, avaliaram a associação da Gal-3 em pacientes ambulatoriais do estudo HF-ACTION. À analise univariada houve associação significativa entre níveis elevados de Gal-3 e o desfecho primário, entretanto após ajuste para NT-proBNP a associação independente entre os níveis de Gal-3 e o desfecho primário deixou de ser significativa[74].

2.3.2 Galectina-3 na doença de Chagas

O interesse pelo estudo da Gal-3 na doença de Chagas inicialmente ocorreu devido a lacunas no conhecimento da própria biologia do *T. cruzi*. Tendo em vista que o *T. cruzi* precisa circular pela matriz extracelular antes mesmo que possa penetrar na célula hospedeira, estudos foram realizados de modo a entender melhor como ocorre a interação entre o parasito e moléculas presentes no meio extracelular. Devido ao seu papel em processos de adesão celular e interação

com diversas moléculas da matriz extracelular, a Gal-3 era uma candidata importante no processo de migração do *T. cruzi*. Foi demonstrado que a Gal-3 auxilia a ligação de mucina do *T. cruzi* com laminina[75]. Posteriormente, observado que Gal-3, expressa por células musculares lisas, auxilia a entrada do *T. cruzi* na célula, processo que era aumentado após adição de Gal-3 exógena e bloqueado quando era realizado *knockdown* de Gal-3[76]. Através de análises de transcriptoma, observou-se que o *T. cruzi* altera a expressão de componentes da matriz extracelular, favorecendo a migração e entrada na célula do hospedeiro. Dentre os genes aumentados pela infecção por *T. cruzi*, está o LGALS3 (gene que codifica Gal-3), além de THBS1, LAMC1 e fibronectina[77]. A Gal-3 é também um importante componente de fagossomos e interage com duas proteínas de endossomo tardio e lisossomos: LAMP1 e LAMP2. Foi demonstrado que a Gal-3 é recrutada pelo *T. cruzi* e participa do processo de escape do vacúolo parasitóforo em macrófagos[78].

Através de análise por microarranjo de DNA, Soares e *cols.* observou que o gene LGALS3, que codifica a Gal-3, está superexpresso nos corações de camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi*[79]. Esta expressão foi modulada pela terapia com células mononucleares de medula óssea. Utilizando análise por imunofluorescência, relataram que Gal-3 é expressa principalmente por células do infiltrado inflamatório no coração de camundongos infectados. Outros dois trabalhos trouxeram dados que sugerem um papel da Gal-3 na patogênese da carmiodiopatia chagásica. Em um deles a infecção experimental por *T. cruzi* eleva a expressão gênica de colágeno tipo I (Col I), α-SMA, Gal-3, IFN-γ e IL-13 e que, em áreas de fibrose e inflamação no miocárdio, observa-se a presença de células com expressão de Col I, Gal-3 e α-SMA[80]. Mais recentemente, Pineda e *cols.* demonstrou que camundongos *knockout* para Gal-3 infectados por *T. cruzi* apresentam níveis de parasitemia elevados e que o bloqueio na expressão de citocinas e, subsequentemente, infiltrados de células inflamatórias e fibrose reduzidos no coração[81].

O envolvimento de Gal-3 na patogênese da doença de Chagas e seu papel como alvo para a intervenção terapêutica foi avaliado por Souza e *cols.*[12]. Os autores relataram alta expressão de Gal-3 em macrófagos, células T e fibroblastos dos corações de camundongos durante a infecção por *T. Cruzi*. Inicialmente realizaram estudos *in vitro* utilizando o *knockout* de Gal-3 em fibroblastos cardíacos e demonstraram que Gal-3 regula a sobrevivência celular, proliferação e síntese de colágeno tipo I. Em seguida, evidenciaram que o bloqueio in vivo de Gal-3 com N-acetil-D-lactosamina em ratos infectados com *T. cruzi* levou a uma redução

significativa da fibrose cardíaca e inflamação no coração. Além disso, observou-se uma modulação na expressão de genes pró-inflamatórios no coração. Finalmente, a análise histológica em amostras de coração humano obtidas de indivíduos com doença de Chagas submetidos a transplante cardíaco mostrou a expressão de Gal-3 em áreas de inflamação, semelhante ao modelo de rato. Estes resultados indicam que Gal-3 desempenha um papel na patogênese da doença de Chagas crônica experimental, favorecendo a inflamação e a fibrogênese. Do mesmo modo, ao demonstrar a expressão de Gal-3 em corações humanos, os autores pontuam que esta proteína poderia ser um novo alvo para o desenvolvimento de fármacos visando o tratamento da doença de Chagas.

2.3.3 Polimorfismo da Galectina-3

Polimorfismo é, por definição, uma variação fenotípica que pode ser separada em classes distintas e bem definidas. Os polimorfismos surgem como resultados de mutações no genoma. Os diferentes tipos de polimorfismos são tipicamente referidos pelo tipo de mutação que os criou. O tipo mais simples de polimorfismo resulta a partir da mutação de única base, a qual substitui um nucleotídeo por outro. Esse é denominado de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). A localização e a identificação dos SNPs é feita a partir do número do rs (do inglês, *reference* SNP). As substituições de nucleotídeos ou inserções/eliminações na codificação de sequencias de genes podem causar mudanças qualitativas nas proteínas. Nesse sentido, diversos polimorfismos nos genes que codificam proteínas têm sido associados a progressão ou gravidade de doenças, assim como, associados com a resposta ou susceptibilidades a um tratamento.

O gene da galectina-3 é polimórfico em humanos. Estudos prévios relataram variantes genéticas em dois sítios de polimorfismos de nucleotídeo único do gene da galectina-3 (rs4644 e rs4652). Sabe-se que um polimorfismo do gene LGALS3, o rs4644, influencia a susceptibilidade dessa proteína à clivagem por metaloproteinases da matriz[82]. Esse polimorfismo foi estudado em amostras de pacientes com câncer de mama e o alelo mutante A esteve associado com o aumento nos níveis de galectina e com o risco de desenvolvimento de câncer de mama em pacientes caucasianos e asiáticos[83]. Em 2012, Trompet e *cols.* demonstrou que para os polimorfismos rs4644 e rs4652 os alelos mutantes A e C, respectivamente, tiveram associação com o aumento nos níveis de galectina e a piora na função cognitiva em pacientes idosos[84]. Em um modelo murino de hipertensão grave observou-se que havia diferença na regulação de

48 genes, entre eles LGALS3, que estava cinco vezes mais expresso nos corações descompensados do que nos corações normais[67,85].

2.4 Ressonância Magnética Cardíaca

A ressonância magnética utiliza ondas de radiofreqüência para adquirir informações, não utilizando radiação ionizante. Apesar de alguns elementos poderem ser estudados através da ressonância magnética, na prática clínica utilizamos a avaliação relacionada ao hidrogênio pela sua abundância no organismo humano. Uma vez dentro do aparelho de ressonância, os núcleos dos átomos de hidrogênio se alinham em relação ao campo magnético gerado pelo magneto e apresentam movimento de precessão (como um pião) em relação a este campo. A frequência de precessão é de aproximadamente 63 MHz para um campo magnético de 1.5 Tesla. Estes núcleos podem ser estimulados por ondas de radiofrequência apenas nesta faixa de frequência, o que causa deslocamento do vetor de magnetização por um determinado ângulo de rotação. Finalizado este estímulo, o vetor de magnetização apresenta movimento de precessão ao redor do campo magnético, tendendo a voltar à posição inicia. O retorno do vetor de magnetização apresenta 2 componentes. Um deles é paralelo ao campo magnético gerado pelo magneto e retorna ao equilíbrio pela interação com moléculas ao redor, processo conhecido como relaxação T1. O outro componente tem orientação transversa ao campo magnético principal, o seu retorno é mais rápido, resultando da interação dos prótons e é denominada relaxação T2. As imagens de ressonância magnética podem ser ponderadas de forma a demonstrar a distribuição predominante de T1, T2 ou apenas a densidade de prótons dos diferentes tecidos[86].

Para realização da maioria dos exames de ressonância magnética cardíaca (RMC) e de praticamente todos os exames de angiografia por ressonância, é utilizado um contraste endovenoso baseado no gadolínio. O gadolínio é um metal raro que tem propriedades paramagnéticas, ou seja, de alterar o meio magnético ao seu redor, modificando alguns parâmetros que compõem a imagem da ressonância. Quando injetado no sangue rapidamente, facilita a identificação dos vasos a serem estudados, tornando-os mais visíveis em relação aos tecidos ao redor. Esta passagem dos contrastes baseados em gadolínio permite, por exemplo, analisar a perfusão tecidual como realizado na detecção de isquemia miocárdica. Uma das propriedades do contraste mais utilizadas para realização dos exames é sua difusão pelo sistema vascular após algum tempo e mistura ao meio extracelular exclusivamente. Essa propriedade é utilizada no caso da RMC para diferenciação de trombos (que não captam contraste) versus

massas neoplásicas (altamente vascularizadas) e, principalmente, na detecção de áreas de fibrose ou desarranjo estrutural do miocárdio que retém a substância no meio extracelular por mais tempo que o tecido normal. As técnicas de RMC atuais, especialmente os protocolos baseados na técnica do realce tardio, permitem uma precisa delimitação das áreas de necrose ou fibrose miocárdica nos pacientes com infarto prévio[86]. A técnica de realce tardio se desenvolveu a partir dos estudos pioneiros de Lima *e cols.*[87]. A técnica de realce tardio se baseia numa sequência de pulsos do tipo gradiente-eco rápida ponderada em T1, com um pré-pulso de inversão-recuperação e um tempo de inversão (TI) ajustado para anular o sinal do miocárdio normal. Portanto, nas imagens adquiridas com essa técnica, o miocárdio íntegro aparece com intensidade de sinal muito baixo (escuro). Outra característica da técnica de realce tardio é a utilização do contraste endovenoso gadolínio, que não penetra nas membranas celulares íntegras e, portanto, tem distribuição extra-celular. Nas regiões de infarto ocorre ruptura das membranas dos miócitos necróticos e, portanto, o gadolínio pode se distribuir livremente (maior volume de distribuição). Além disso, a necrose dos miócitos também causa uma alteração da cinética de distribuição do contraste, de modo que a saída do gadolínio das áreas de infarto ocorre mais lentamente (*delayed washout*). Estes dois fatores fazem com que a concentração do contraste, cerca de 10 a 20 minutos após a injeção, seja muito maior nas regiões necróticas do que no tecido miocárdico normal, tornando as áreas de infarto brancas (sinal intenso) nas imagens de realce tardio. Em resumo, ao aumentar a intensidade de sinal do infarto (utilizando o gadolínio e ponderando as imagens em T1) e diminuir a intensidade de sinal do miocárdio normal (com o pré-pulso de inversão e TI em torno de 200-300 ms), a técnica do realce tardio otimiza o contraste entre os dois tecidos (diferença de sinal de até 1080%) e permite a precisa delimitação das áreas de necrose miocárdica. No caso dos infartos antigos, a fibrose, e não a necrose, é o fenômeno patológico subjacente. Nesses casos, o maior espaço extracelular verificado no tecido fibrótico, quando comparado ao miocárdio normal, é a causa do maior volume de distribuição e da alteração da cinética do gadolínio[86]. Diversos estudos prévios já demonstraram que a RMC com técnica de realce tardio permite a delimitação precisa das áreas de necrose ou fibrose miocárdica nos pacientes com infarto prévio. Em especial, Kim *e cols.* demonstraram de forma contundente uma correlação quase perfeita entre os valores de massa infartada obtidos pela RMC e pela anatomia patológica[88].

Recentemente foi mostrado que a técnica de realce tardio miocárdico pode detectar fibrose miocárdica em todos os três estágios distintos de evolução da doença de Chagas: desde os assintomáticos com função normal, passando pelos com cardiopatia chagásica estabelecida, até

aqueles com disfunção de VE grave associada à taquicardia ventricular documentada[14]. Os segmentos inferolateral basal e apical do VE são os mais frequentemente afetados pela fibrose miocárdica, em concordância com os estudos patológicos. Portanto, o realce tardio por RMC pode detectar a fibrose miocárdica na doença de Chagas, mesmo nos estágios mais precoces da doença, quando outros métodos não podem detectar qualquer envolvimento cardíaco.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Incrementar o entendimento a respeito do processo etiológico da fibrose miocárdica na cardiopatia chagásica e as suas consequências.

3.2 Objetivos Específicos

Artigo 1

Explorar o papel da galectina-3 como determinante da extensão da fibrose miocárdica em pacientes com doença de Chagas.

Artigo 2

Explorar o papel de polimorfismos genéticos da galectina-3 como determinantes da extensão da fibrose miocárdica em pacientes com doença de Chagas.

Artigo 3

Descrever a frequência e extensão da fibrose miocárdica avaliada por ressonância magnética cardíaca em pacientes da forma indeterminada da doença de Chagas.

Artigo 4

Testar a hipótese de que a técnica ecocardiográfica de *Speckle Tracking Strain* prediz fibrose miocárdica em indivíduos com doença de Chagas.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo observacional, corte transversal.

4.2 Local do estudo

Indivíduos com doença de Chagas acompanhados no ambulatório de doença de Chagas do Hospital São Rafael, vinculado ao Sistema Único de Saúde, em centro de referência terciário em Salvador – Bahia – Brasil.

4.3 Seleção da amostra

4.3.1 População acessível

Entre Janeiro de 2012 à Dezembro de 2013, todos os indivíduos com doença de Chagas acompanhados no ambulatório, de forma consecutiva, que preenchiam os critérios de seleção, foram convidados para participar do ReChagas (Registro de doença de Chagas).

4.3.2 População alvo

Cento e sessenta e cinco indivíduos foram admitidos no ambulatório com diagnóstico de doença de Chagas, entre Janeiro de 2012 à Dezembro de 2013. Destes, 61 atenderam aos critérios de inclusão do estudo. Vide descrição da população na figura 3.

Todos os indivíduos consentiram com a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme resolução n^0. 466/12 do CNS – Conselho Nacional de Saúde. O protocolo foi realizado conforme aspectos éticos de acordo com as normas vigentes, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael e o parecer de aprovação está disponível na Plataforma Brasil (número 397.457).

4.4 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 70 anos e diagnóstico da doença de Chagas confirmado por 2 testes sorológicos positivos (hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta). Os critérios de exclusão foram: forma aguda da doença de Chagas; infarto do miocárdio prévio ou doença arterial coronariana conhecida ou presença de mais de 2 fatores de risco para aterosclerose; doença valvular primária; doença renal terminal em diálise; hepatite ativa ou cirrose; doenças hematológicas, neoplásicas ou ósseas e contraindicação para ressonância magnética.

4.5 Formas da doença de Chagas

A forma indeterminada foi definida pela presença de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na ausência de manifestações clínicas e sinais de envolvimento cardíaco caracterizado por eletrocardiograma, radiografia de tórax e ecocardiograma normais. A forma cardíaca sem disfunção ventricular foi definida por indivíduos com envolvimento cardíaco conhecido por eletrocardiograma anormal (tipicamente, bloqueio de ramo direito e hemibloqueio antero-superior esquerdo) e sem disfunção ventricular esquerda ao ecocardiograma e a forma cardíaca com disfunção ventricular foi composta por indivíduos com fração de ejeção ventricular esquerda reduzida definida por fração de ejeção do ventrículo esquerdo $\leq 40\%$.

4.6 Dados Clínicos e Laboratoriais

Todos os indivíduos realizaram exames bioquímicos, eletrocardiograma de 12 derivações, radiografia de tórax, Holter 24 horas, teste ergométrico, ecocardiograma com doppler e ressonância magnética cardíaca. Para classificação do escore de Rassi[89] foi conferida pontuação da seguinte forma: classe funcional III e IV pela NYHA (5 pontos), cardiomegalia ao raio X (5 pontos), disfunção ventricular esquerda global ou segmentar ao ecocardiograma (3 pontos), taquicardia ventricular não sustentada ao Holter 24h (3 pontos), baixa voltagem do QRS ao eletrocardiograma (2 pontos) e sexo masculino (2 pontos). Foram então classificados em 3 grupos de risco de acordo com a pontuação obtida: baixo risco (0-6 pontos), risco intermediário (7-11 pontos) e alto risco (12-20 pontos).

4.7 Mensuração Galectina-3, NT-ProBNP e citocinas

A quantificação dos níveis séricos de galectina-3 foi realizada por técnica de ELISA *sandwich* utilizando kit comercial (Ebioscience, San Diego, CA, EUA). O princípio do ensaio combina um método em sanduíche de imunoensaio com uma detecção fluorescente final (ELFA). A amostra foi transferida para o kit contendo anticorpo anti-Gal-3 marcado com fosfatase alcalina. A intensidade da fluorescência foi proporcional à concentração de antígenos presentes na amostra. As dosagens plasmáticas das citocinas foram realizadas pelo método de Elisa e Bioplex, utilizando kits específicos. O NT-ProBNP plasmático foi dosado pela técnica de imunoensaio por fluorescência, e a noradrenalina, pela técnica de radioimunoensaio. A faixa de medição para Gal-3 foi de 3,3 a 100 ng/L e a faixa de medição de NT-proBNP foi de 20-25 mil pg/mL[(90)].

4.8 Genotipagem dos polimorfismos

A metodologia empregada para genotipagem dos polimorfismos foi o PCR em tempo real. O sistema utilizado para realização dessa reação foi o TaqMan (Life Technologies, Carlsbad, USA). Estes SNPs foram amplificados usando o protocolo TaqMan Universal PCR (Life Technologies). Os genótipos foram determinados usando o software Sequence Detection Systems versão 1.3.1 (Life Technologies). As probes e os primers selecionados para os SNPs foram desenhados pela mesma empresa. O PCR em tempo real é baseado no uso de uma sonda fluorescente, com sequências específicas para cada alelo; cada sonda foi marcada com um fluoróforo diferente e hibridiza com a sequência alvo gerando sinal fluorescente proporcional à concentração dos produtos amplificados. Assim, é possível correlacionar à intensidade de sinal coletada com a quantidade de produto amplificado. Nesse sistema, a sonda hibridiza na região complementar do DNA alvo que está localizada entre os sítios de ligação dos primers. Após a amplificação é feita a discriminação alélica, onde a intensidade de cada fluoróforo, associado a um determinado alelo, é quantificada. Os diferentes genótipos emitem fluorescência correspondente a cada alelo marcado, alelo 1 com o fluoróforo VIC e o alelo 2 com o fluoróforo FAM. Se ambos os alelos apresentarem fluorescência teremos um genótipo heterozigoto.

Foram analisados onze SNPs localizados em cinco diferentes genes (LGALS3, SOCS3, IL-28B, CLDN-1, CCL5). Os polimorfismos dos genes CLDN-1, IL-28B e SOCS3 estavam localizados na região promotora do gene, o polimorfismo do gene CCL5 na região intrônica e

os do gene LGALS3 na região exônica envolvendo, estes últimos, alteração dos aminoácidos (Tabela 1). Os polimorfismos estudados do gene LGALS3, localizado no cromossomo 14, foram rs4644 e rs4652. O rs4644 envolve a substituição de uma adenina por uma citosina, resultando na troca do aminoácido prolina por histidina na proteína. O rs4652 substitui adenina por uma citosina, ocorrendo a troca de uma treonina por uma prolina. O polimorfismo do gene SOCS3 encontra-se no cromossomo 17 substituindo a alelo A pelo alelo G. Foram analisados dois SNPs para o gene IL-28B, o rs12979860 e o rs8099917, envolvendo a substituição de citosina por timina e guanina por timina, respectivamente. Os polimorfismos analisados do gene CLDN-1 foram os rs10212165, substituindo o alelo A pelo alelo G; rs3909582 alelo A pelo G; rs9865082, alelo C pelo alelo T; rs9848283, alelo A pelo G; e rs9880018 alelo A pelo G. Por fim, foi avaliado um SNP no gene CCL5 no rs2280789, envolvendo a troca de uma adenina por uma guanina.

Tabela 1 - Polimorfismos dos genes estudados (LGALS3, SOCS3, IL-28B, CLDN-1 e CCL5)

Locus	rs	Polimorfismo Alelo 1>Alelo 2	Localização	Região	Tipo de Mutação
LGALS3	4652	A>C	+292 (14q21–q22)	Exón	Não-sinônima
	4644	C>A	+191 (14q21–q22)	Exón	
SOCS3	4969170	A>G	-4874 (17q25)	Promotor	-
IL-28B	12979860	C>T	-3176 (19q13.13)	Promotor	-
	8099917	G>T	-3619 (19q13.13)	Promotor	
CLDN-1	10212165	A>G	-5414 (3q28-q29)	Promotor	-
	3909582	A>G	-24218 (3q28-q29)	Promotor	
	9865082	C>T	-7153 (3q28-q29)	Promotor	
	9848283	A>G	-2983 (3q28-q29)	Promotor	
	9880018	A>G	-15312 (3q28-q29)	Promotor	
CCL5	2280789	C>T	+1 (17q11.2-q12)	Íntron	-

Fonte: ANGELO et al., 2013; BEKKER et al., 2010; JARVIS et al., 2012 ; KALAI et al., 2013; SUGIYAMA et al., 2011; TROMPET et al., 2012.

4.9 Ressonância Magnética Cardíaca

A ressonância magnética cardíaca (RMC) foi realizada utilizando-se o sistema Sigma HDx1,5-T (General Electric;Fairfield,CT,EUA). Para avaliação da função do ventrículo esquerdo foram adquiridas imagens sincronizadas ao eletrocardiograma, em apnéia expiratória, nos planos eixo curto, eixo longo e quatro câmaras, em sequências diferentes. Os parâmetros de aquisição aplicados para a sequência dinâmica foram: tempo de repetição(TR) de 3,5ms, tempo de eco(TE) de 1,5ms, ângulo de inclinação (*flip angle*) de 60^0, largura de banda de 125 kHz, campo de visão de 35*x*35 cm, matriz de 256*x*148, resolução temporal(RT) de 35ms, espessura de corte de 8,0mm, sem intervalo entre os cortes. Imagens por técnica de realce tardio foram adquiridas a cada batimento cardíaco, 10 a 20 minutos após a administração de um contraste a base de gadolínio (0,1mmol/kg), utilizando TR de 7,2ms, TE de 3,1ms, ângulo de inclinação de 20^0, primeira fase do ciclo cardíaco, número de linhas por seguimento de 16/32, tamanho da matriz 256*x*192, espessura de corte de 8,0mm, intervalo entre os cortes de 2 mm, campo de visão de 32 a 38 cm, tempo de inversão de 150 a 300ms, largura de banda de 31,25kHz, 2 NEX (número de excitações). A técnica de realce tardio foi usada para investigar a presença de fibrose miocárdica, a qual foi estimada por um método qualitativo (visual), pela presença ou ausência de realce tardio, localização e padrão apresentados; e de modo quantitativo, em valores percentuais em relação à massa total do miocárdio.

5 RESULTADOS

Cento e sessenta e cinco indivíduos foram admitidos no ambulatório com diagnóstico de doença de Chagas, entre Janeiro de 2012 à Dezembro de 2013. Destes, 61 atenderam aos critérios de inclusão do estudo. Vide descrição da população na figura 3.

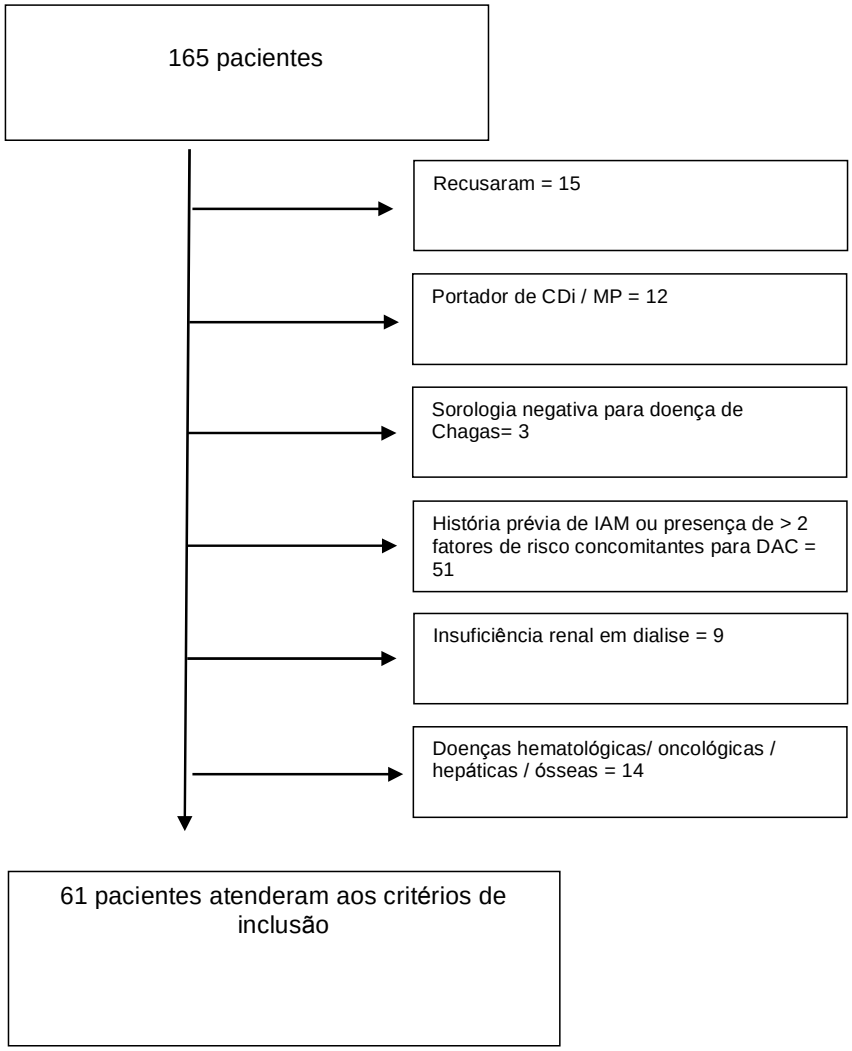


Figura 3 - População do estudo. Cdi= cardiodesfibrilador implantável. MP= marcapasso

As características demográficas, clínicas e laboratoriais estão apresentadas na Tabela 2, abaixo.

Tabela 2 - Características demográficas e clínicas

Variáveis	Sujeitos (n=61)	Forma Indeterminada (n=17)	Forma Cardíaca sem Disfunção Ventricular (n=16)	Forma Cardíaca com Disfunção Ventricular (n=28)
Caracteristicas Demográficas				
Idade (anos)	58±8	59±11	59±9	58±7
Sexo feminino, n (%)	36 (59)	12 (70)	12 (75)	12 (43)
Morava em casa de taipa, n (%)	50 (82)	15 (88)	15 (94)	20 (71)
Familiares com sorologia positiva, n (%)	39 (64)	11 (65)	14 (88)	14 (50)
Forma digestiva, n (%)	4 (6.6)	0	2 (12)	2 (7)
Índice massa corporea (kg/m^2)	25±4	26±4	27±4	26±3
Co-morbidades – n (%)				
Hipertensão arterial	44 (72)	14 (82)	12 (75)	18 (64)
Diabetes	9 (15)	4 (23)	0	5 (18)
Síncope	6 (7)	1 (6)	1 (6)	2 (7)
Tabagismo	16 (26)	3 (18)	3 (18)	10(36)
Insuficiência cardíaca congestiva NYHA III/IV	16 (26)	0	0	16 (57) *
Características laboratoriais				
Creatinina (mg/dL)	0.88 (0.7-0.99)	0.84 (0.7-0.98)	0.78 (0.6-0.91)	0.94 (0.7-1.0)
Sódio (mmoL/dL)	140±3	138±2	139±2	139±2
Hemoglobina (g/dL)	13.9±0.9	14.2±1.3	13.4±0.7	14.2±1.0
Colesterol total (mg/dL)	193±38	202±40	194±42	200±45
Proteína C reativa (mg/dL)	1.15 (0.63-4.02)	1.71 (0.35-6.54)	1.24 (0.51-4.74)	1.09 (0.73-3.62)
NT-ProBNP (pg/mL)	686 (66-816)	60.5 (34-108)	96.0 (73-181)	839.5** (189-2271)
Troponina I (ng/mL)	0.684 (0.012-0.04)	0.012 (0.012-0.012)	0.012 (0.012-0.028)	0.038 (0.019-0.06)
LVEF (%)	54±15	64±3	64±4	43±10*
METS	9±2.5	12±3	9±2	8±2

Dados expressos em média ± desvio-padrão ou percentual (%) para variáveis discretas e mediana e intervalo interquartil para variáveis contínuas com distribuição não normal; LVEF - fração de ejeção do ventrículo esquerdo; NYHA - New York Heart Association; METS - Metabolic equivalent of task. * $P < 0.001$, Fisher's exact test. ** $P < 0.001$, Kruskal-Wallis one-way analysis of variance.

Foram avaliados 61 indivíduos portadores da doença de Chagas, 56% sexo feminino, 58±9 anos, sendo 17 indivíduos na forma indeterminada, 16 na forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo e 28 na forma cardíaca com disfunção do VE. A maioria dos indivíduos (74%) estavam em classe funcional I ou II da *New York Heart Association* (NYHA) e 4 (6,6%) apresentaram envolvimento gastrintestinal concomitante. Oitenta e dois porcento (82%) procedentes da zona urbana, sendo que 50 indivíduos moravam previamente em casa de taipa

e 44 informaram contato com o triatomíneo. Relato de familiares portadores da doença de Chagas em 64%. Oito pacientes utilizaram benzonidazol com finalidade de tratamento etiológico. A prevalência de hipertensão, diabetes melitos, dislipidemia e tabagismo foi semelhante entre os 3 grupos. A mediana do escore de Rassi foi 5 (IIQ:0-11) assim distribuídos: 36 indivíduos classificados como de baixo risco (59%), 10 como de risco intermediário (16%) e 15 classificados como de alto risco (25%). Figura 4

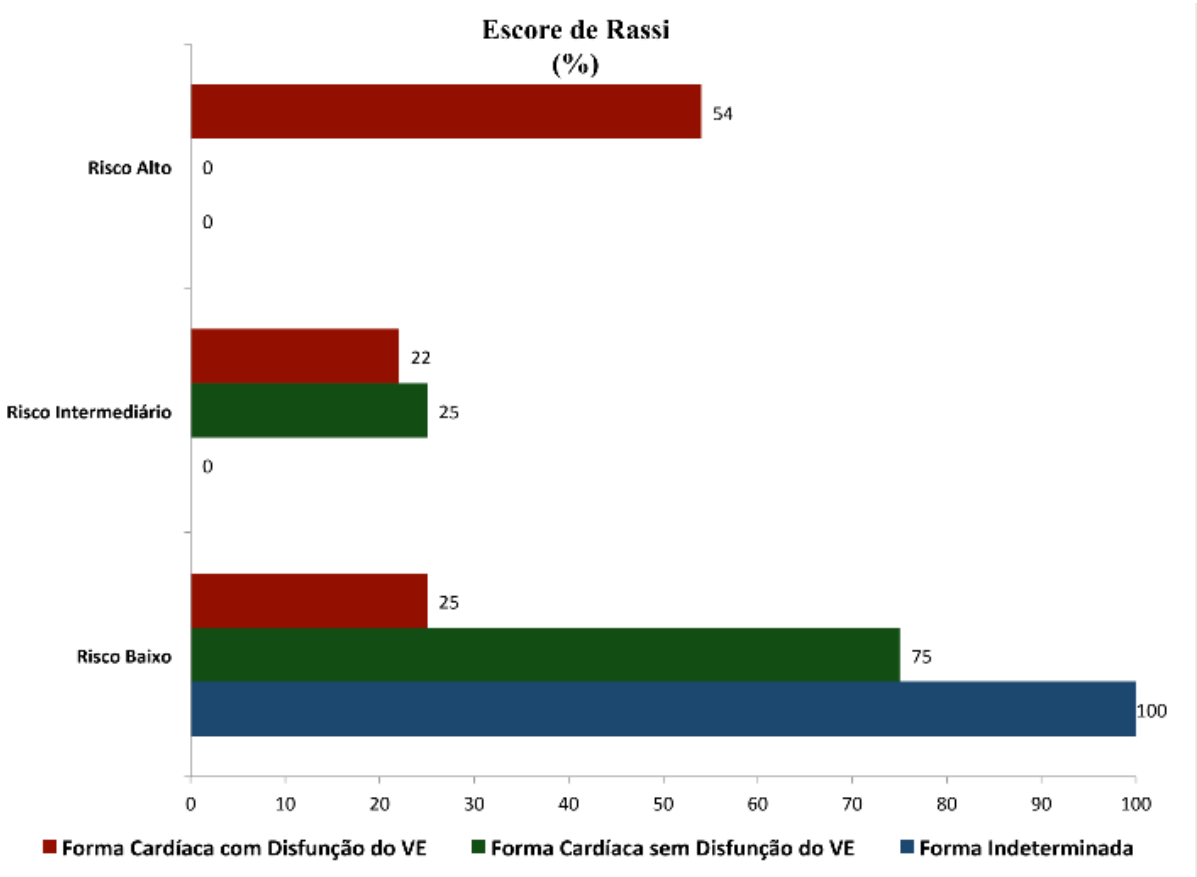


Figura 4 - Escore de Rassi nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

VE = ventrículo esquerdo

Cinquenta e nove (59) indivíduos foram avaliados quanto a presença ou não de arritmia ventricular complexa durante a realização do teste ergométrico e a monitorização eletrocardiográfica contínua com uso de Holter 24 horas. Destes, foi identificado instabilidade elétrica em 17 indivíduos (29%), assim distribuídos: ausência de arritmia ventricular nos 17 indivíduos na forma indeterminada da doença, taquicardia ventricular não sustentada em 3 (20%) indivíduos com a forma cardíaca sem disfunção ventricular esquerda e em 14 (52%) naqueles com disfunção ventricular (P= 0.001). Com a finalidade de avaliar quais variáveis poderiam estar agindo como fator confundidor foi comparado a população quanto a presença

ou não de taquicardia ventricular (tabela 3). À analise univariada foram considerados preditores de taquicardia ventricular: duração do QRS≥120mms (P=0.007), formas clínicas mais graves da doença (P<0.001), NT-ProBNP elevado (P=0.01), presença de realce tardio à ressonância magnética cardíaca (P=0.05) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo reduzida (P<0.001). Após ajuste, com uso de análise multivariada, visando identificar preditores independentes de instabilidade elétrica, apenas a fração de ejeção ventricular reduzida permaneceu como preditor de taquicardia ventricular (OR=0.916; 95% CI= 0.84-0.99; p=0.032).

Tabela 3 - Características clínicas de acordo com a presença de taquicardia ventricular ao Holter 24h

Variáveis	**Sujeitos (59)**	**Holter 24h**		**P**
		Com TV (17)	Sem TV (42)	
Sexo Feminino	36 (60%)	11	25	0,71*
Idade (anos)	58 ± 8,5	58 ± 10	58 ± 8	0,83†
Formas Clínicas				
Indeterminada	17 (27%)	0	17	
Cardíaca sem disfunção ventricular	17 (27%)	3	14	< 0,001‡
Cardíaca com disfunção ventricular	28 (46%)	14	14	
Palpitação	38 (66%)	10	28	0,56*
Síncope	3 (8%)	0	3	0,40*
Hipertensão arterial	43 (72%)	10	33	0,11*
Diabetes Mellitus	9 (14%)	4	5	0,42*
AVCi prévio	7 (11%)	1	6	0,66*
Índice de massa corpórea (kg/m^2)	25 ± 4,0	23 ± 3,6	26 ± 3,8	0,03†
Hemoglobina (g/dL)	13,9 ± 0,96	13,9 ± 0,9	13,9 ± 1	0,79†
Creatinina (mg/dL)	0,88 (0,76-0,99)	0,92 (0,83-1,0)	0,84 (0,75-0,96)	0,13†
Sódio (mmol/L)	140 ± 2,8	140 ± 2,5	140 ± 3,0	0,56†
Potássio (mmol/L)	4,5 ± 0,4	4,8 ± 0,5	4,4 ± 0,3	0,005†
Magnésio (mmol/L)	0,8 (0,77-0,89)	0,8 (0,77-0,90)	0,8 (0,76-0,89)	0,56†
Troponina I (mmol/L)	0,67 (0,01-0,04)	2,52 (0,01-0,05)	0,02 (0,01-0,03)	0,33†
NT-ProBNP (pg/mL)	686 (66-816)	1255 (186-2438)	484 (51-527)	0,01†
PCR Ultrassensível (mg/L)	3,06 (0,64-3,99)	2,04 (0,75-2,66)	3,61 (0,38-6,10)	0,28†
METs	9,2 ± 2,6	9,0 ± 1,8	9,3 ± 2,8	0,71†
Realce Tardio –RM cardíaca	37 (62%)	24 (65%)	13 (35%)	0,05*

Dados expressos em média ± devio-padrão ou percentual (%) para variáveis discretas e mediana e intervalo interquartil para variáveis contínuas com distribuição não normal; AVCi – acidente vascular encefeálico isquêmico; METS - Metabolic equivalent of task. * Chi-Square ou Fisher's exact test. † Student's t test or Mann-Whitney test. ‡One-way analysis of variance by ranks-Kruskal-Wallis test.

6 PUBLICAÇÕES

Artigo 1 - Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy.
Cardiology 2017; 136: 33-39
DOI: 10.1159/000447529

Artigo 2 - Avaliação do Polimorfismo da Galectina-3 em Indivíduos com Doença de Chagas.
Arq Bras Cardiol 2015; 1105 (5): 472-478
DOI: 10.5935/abc.20150105

Artigo 3 – Presença e Extensão da Fibrose Miocárdica na Forma Indeterminada da Doença de Chagas: Estudo de Ressonância Magnética.
Arq Bras Cardiol 2017;
DOI:

Artigo 4 – Assesment of Speckle Tracking Strain Predictive Value for Myocardial Fibrosis in Subjects with Chagas Disease.
IJC Heart & Vasculature 2015; 8: 75-80
DOI: 10.1016/j.ijcha.2015.05.007

6.1 Artigo 1 - Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy. Cardiology 2017; 136: 33-39. DOI: 10.1159/000447529

Original Research

CARDIOLOGY

Cardiology 2017;136:33–39
DOI: 10.1159/000447529

Received: February 26, 2016
Accepted after revision: June 30, 2016
Published online: August 23, 2016

Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy

Márcia Maria Noya-Rabelo[a, b] Ticiana Ferreira Larocca[a, c, d]
Carolina Thé Macêdo[a, c, d] Jorge Andion Torreão[a, b]
Bruno Solano de Freitas Souza[c, d] Juliana Fraga Vasconcelos[c, d]
Luciana Estrella Souza[e] Agnaluce Moreira Silva[e] Ricardo Ribeiro dos Santos[d]
Luís Claudio Lemos Correia[a, b] Milena Botelho Pereira Soares[c, d]

[a]Department of Cardiology, Hospital São Rafael, [b]Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, [c]Gonçalo Moniz Research Center, CPqGM-Fiocruz/BA, [d]Center for Biotechnology and Cell Therapy, and [e]Clinical Diagnostics Laboratory, Hospital São Rafael, Salvador, Brazil

Key Words
Chagas disease · Biomarkers · Galectin-3

Abstract
Objectives: Chagas cardiomyopathy has worse long-term outcomes than other cardiomyopathies. A biomarker strategy to refer subjects for noninvasive cardiac imaging may help in the early identification of cardiac damage in subjects with Chagas disease. Galectin-3 (Gal-3) is a mediator of cardiac fibrosis shown to be upregulated in animal models of decompensated heart failure. Here we assessed the correlation of Gal-3 with myocardial fibrosis in patients with Chagas disease. ***Methods:*** This study comprised 61 subjects with Chagas disease. All subjects underwent clinical assessments, Doppler echocardiography and magnetic resonance imaging. Plasmatic Gal-3 was determined by ELISA. ***Results:*** Delayed enhancement (DE) was identified in 37 of 61 subjects (64%). The total amount of myocardial fibrosis was 9.4% [interquartile interval (IQI): 2.4–18.4]. No differences were observed in Gal-3 concentration according to the presence or absence of myocardial fibrosis, with a median Gal-3 concentration of 11.7 ng/ml (IQI: 9.4–15) in subjects with DE versus 12.9 ng/ml (IQI: 9.2–14) in subjects without DE ($p = 0.18$). No correlation was found between myocardial fibrosis and Gal-3 concentration ($r = 0.098$; $p = 0.47$). ***Conclusions:*** There is no correlation between the degree of myocardial fibrosis and the concentration of Gal-3 in subjects with Chagas disease.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

The main symptomatic form of Chagas disease is a cardiomyopathy characterized by heart failure, ventricular arrhythmias, heart blocks, thromboembolic events and sudden death [1]. Previous studies demonstrated that subjects with Chagas disease cardiomyopathy have worse long-term outcomes than subjects with cardiomyopathy due to other etiologies [2]. The worst prognosis has been

The authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

KARGER

© 2016 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/crd

Márcia Maria Noya-Rabelo
Av. São Rafael, 2152
São Marcos
Salvador, BA 41253-190 (Brazil)
E-Mail marcianoya@gmail.com

Downloaded by:
University of Hong Kong
147.8.31.40 - 8/28/2018 10:05:18 AM

attributed to the continuous myocardial damage due to parasite persistence and immune-mediated mechanisms, leading to interstitial fibrosis throughout the myocardium [3]. Cost-effective strategies to identify subgroups of subjects with progressive fibrosis before the occurrence of extensive remodeling are of great interest.

There is a need to find new biomarkers that may reflect the pathophysiological mechanisms of myocardial fibrosis, in order to support the risk stratification, especially regarding subjects with Chagas disease, thus allowing the application of potentially invasive and expensive therapies to those who are most likely to benefit. To date there are no biomarkers accurate enough to predict myocardial fibrosis for detecting early cardiac involvement.

Galectin-3 (Gal-3) is a beta-galactoside-binding lectin shown to be, in experimental studies, a mediator of cardiac fibrosis [4, 5] and upregulated in animal models of decompensated heart failure, as reviewed by de Boer et al. [6]. We previously demonstrated that Gal-3 is upregulated in the hearts of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* [7]. Gal-3 may promote fibrosis through the activation of fibroblasts and macrophages, which is a hallmark of cardiac remodeling processes [8]. Current data suggest that Gal-3 secreted by activated macrophages acts on fibroblasts, establishing a link between inflammation and fibrosis [9]. In addition to the involvement in heart diseases, Gal-3 may be involved in other disease settings, such as cancer, liver disease, renal disease and various rheumatologic conditions [10–13]. Moreover, circulating Gal-3 has been found to be elevated in different human diseases associated with fibrosis [14–16]. A pathophysiological role for Gal-3 in heart failure was suggested by previous studies showing that Gal-3 infusion into murine pericardium induced adverse cardiac remodeling whereas coinfusion with a Gal-3 inhibitor counteracted these effects [4, 5].

Here we sought to examine the clinical correlation of plasma Gal-3 with myocardial fibrosis, in subjects with different forms of Chagas disease, using cardiac magnetic resonance imaging (MRI) as the gold standard method to estimate the percentage of myocardium affected by fibrosis.

Methods

Study Population

Subjects with Chagas disease were prospectively recruited between January 2012 and December 2013 in the Chagas disease outpatient clinic at Hospital São Rafael, a tertiary referral center located in Salvador, Bahia, Brazil.

Inclusion criteria were an age of 18–70 years and a diagnosis of Chagas disease confirmed by 2 positive serologic tests for antibodies against *T. cruzi* (indirect hemagglutination and indirect immunofluorescence). Exclusion criteria were: the acute form of Chagas disease, previous myocardial infarction or known coronary atherosclerotic disease (or >2 risk factors for it), primary valve disease, end-stage renal disease on dialysis, active hepatitis or cirrhosis, hematologic, neoplastic or bone diseases and contraindication to MRI.

We classified enrolled patients into 3 groups based on distinct stages of Chagas disease, according to the current Brazilian Chagas disease consensus [1], distributed as follows: (1) a group with the indeterminate form of the disease, comprising 17 asymptomatic subjects without signs of cardiac involvement characterized by normal electrocardiogram, chest X-ray and echocardiography, (2) a group with the cardiac form without ventricular dysfunction, comprising 16 consecutive subjects with known heart involvement defined as abnormal electrocardiogram (typically, right bundle-branch block with left anterior hemiblock) and without left ventricular dysfunction and (3) a group with the cardiac form with ventricular dysfunction, comprising 28 subjects with low left-ventricular ejection fraction, 16 of whom were in New York Heart Association (NYHA) class III/IV.

At the time of enrolment, all subjects underwent clinical assessments consisting of structured medical questionnaires, 12-lead electrocardiography, chest radiography, 24-hour ambulatory electrographic monitoring, exercise testing, conventional Doppler echocardiography and cardiovascular MRI.

The study complied with the Declaration of Helsinki, was approved by the Ethics Committee of the Hospital São Rafael and is registered in ClinicalTrials.gov under the identifier NCT01842854. All subjects signed a written informed consent before their inclusion in the study.

Magnetic Resonance Imaging

Cardiovascular MRI was performed using a Sigma HDx 1.5-T system (General Electric, Fairfield, Conn., USA). For assessment of the LV function, electrocardiography-gated, breath-hold, long-axis, short-axis and 4-chamber views were acquired at the same location in different sequences. Acquisition parameters used for the dynamic sequence included a repetition time (RT) of 3.5 ms, an echo time (ET) of 1.5 ms, a flip angle of 60°, a receiver bandwidth of 125 kHz, a 35 × 35 cm field of view (FOV), a matrix of 256 × 148, a temporal resolution (TR) of 35 ms and a slice thickness of 8.0 mm without gap.

Delayed enhancement (DE) images were acquired every heartbeat, 10–20 min after the administration of a gadolinium-based contrast (0.1 mmol/kg) using an RT of 7.1 ms, an ET of 3.1 ms, a flip angle of 20°, a first cardiac phase, 16/32 views per segment, a matrix size of 256 × 192, a slice thickness of 8.0 mm, a gap between slices of 2 mm, a 32 × 38 cm FOV, an inversion time of 150–300 ms, a receiver bandwidth of 31.25 kHz and 2 excitations. The myocardial DE technique was used to investigate myocardial fibrosis, which was estimated by a quantitative visual method.

Gal-3 and NT-ProBNP

Gal-3 and NT-proBNP concentrations were determined in EDTA plasma samples with the VIDAS® automated enzyme-linked fluorescent assay (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The assay principle combines a one-step immunoassay sandwich

Downloaded by:
University of Hong Kong
147.8.31.43 - 8/29/2016 10:53:16 AM

Table 1. Subjects' clinical and demographic characteristics

Variable	All subjects (n = 61)	Indeterminate form (n = 17)	Cardiac form without ventricular dysfunction (n = 16)	Cardiac form with ventricular dysfunction (n = 28)
Demographic characteristics				
Age, years	58±8	59±11	59±9	58±7
Female gender	36 (59)	12 (70)	12 (75)	12 (43)
Lived before in house of mud	50 (82)	15 (88)	15 (94)	20 (71)
Chagas-positive parents	39 (64)	11 (65)	14 (88)	14 (50)
Digestive form	4 (6.6)	0	2 (12)	2 (7)
Body mass index	25±4	26±4	27±4	26±3
Coexisting conditions				
Hypertension	44 (72)	14 (82)	12 (75)	18 (64)
Diabetes	9 (15)	4 (23)	0	5 (18)
Syncope	6 (7)	1 (6)	1 (6)	2 (7)
Current smoking	16 (26)	3 (18)	3 (18)	10 (36)
Congestive heart failure NYHA III/IV	16 (26)	0	0	16 (57)*
Laboratory characteristics				
Creatinine, mg/dl	0.88 (0.7–0.99)	0.84 (0.7–0.98)	0.78 (0.6–0.91)	0.94 (0.7–1.0)
Sodium, mmol/dl	140±3	138±2	139±2	139±2
Hemoglobin, g/dl	13.9±0.9	14.2±1.3	13.4±0.7	14.2±1.0
Total cholesterol, mg/dl	193±38	202±40	194±42	200±45
hsCRP, mg/dl	1.15 (0.63–4.02)	1.71 (0.35–6.54)	1.24 (0.51–4.74)	1.09 (0.73–3.62)
NT-proBNP, pg/ml	686 (66–816)	60.5 (34–108)	96.0 (73–181)	839.5** (189–2,271)
Troponin I, ng/ml	0.684 (0.012–0.04)	0.012 (0.012–0.012)	0.012 (0.012–0.028)	0.038 (0.019–0.06)
LVEF, %	54±15	64±3	64±4	43±10**
METS	9±2.5	12±3	9±2	8±2

Data are expressed as mean ± SD or n (%) for discrete variables and median (IQI) for continuous nonnormal variables. LVEF = LV ejection fraction; METS = metabolic equivalent of task; hsCRP = high-sensitivy C-reactive protein. * $p < 0.001$, Fisher's exact test. ** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test, one-way ANOVA.

method with a final fluorescent detection (ELFA). The samples were transferred into the wells containing anti-Gal-3 or anti-NT-proBNP antibodies conjugated with alkaline phosphatase. The intensity of the fluorescence is proportional to the concentration of antigens present in the sample. The measurement range was 3.3–100 ng/l for Gal-3 and 20–25.000 pg/ml for NT-proBNP.

Sample Size Calculation

Gal-3 concentration in patients with heart failure is described as 18.6 ± 7.8 ng/ml [17]. The sample size was calculated for the comparison of the Gal-3 concentration between 2 groups of subjects defined by the presence of myocardial fibrosis assessed by MRI. Considering that subjects with myocardial fibrosis have values close to those described in heart failure patients (18.6 ± 7.8 ng/ml), we determined that the enrolment of 64 participants would provide a power of 80% to reject the null hypothesis if subjects without myocardial fibrosis had Gal-3 values 30% lower than subjects with myocardial fibrosis, with the same standard deviation of 7.8 ng/ml for both groups, at a two-sided alpha level of 0.05.

Statistical Analysis

Categorical variables are presented as numbers and percentages and continuous variables are presented as means (SD) or median (interquartile interval, IQI). The significance of baseline differences was determined by the χ^2 test, the Fisher exact test or the unpaired t test, as appropriate. Comparisons of continuous variables among groups were performed with an analysis of variance (ANOVA) test or the Kruskal-Wallis test, depending on normality assessed by the Shapiro-Wilk test. Correlation between continuous variables was evaluated by the Pearson or Spearman coefficient, depending on normality.

Analyses were performed using SPSS v20.0 (IBM), and a two-sided p value <0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Baseline Characteristics

We evaluated 61 subjects with Chagas disease, distributed as follow: 17 in group 1 (subjects with no evidence of cardiac involvement or heart failure), 16 in group 2 (cardiac form without ventricular dysfunction or symptoms) and 28 in group 3 (cardiac form with ventricular

Downloaded by:
University of Hong Kong
147.8.31.43 - 8/29/2016 10:53:16 AM

Table 2. Myocardial fibrosis on cardiac MRI

	All subjects (n = 61)	Indeterminate form (n = 17)	Cardiac form without ventricular dysfunction (n = 16)	Cardiac form with ventricular dysfunction (n = 28)	p value
DE, n (%)	35 (57)	6 (35)	7 (44)	22 (79)	0.001*
Myocardial fibrotic area, % of LV mass (IQI)	9.4 (2.4–18.4)	4.1 (2.1–10.7)	2.3 (1.0–5.0)	15.2 (7.8–25)	0.004**

* Fisher's exact test. ** Kruskal-Wallis, one-way ANOVA.

Table 3. Myocardial fibrosis and subjects' clinical characteristics

	With fibrosis	Without fibrosis	p value
Age, years	57 ± 9.2	58 ± 7.6	0.53
Female gender	16 (43)	18 (86)	0.002*
Forms of the disease			
Indeterminate	7 (19)	10 (48)	<0.001*
Cardiac without LV dysfunction	7 (19)	9 (43)	
Cardiac with LV dysfunction	23 (62)	2 (9.5)	
Gal-3, ng/ml	11.8 (9.1–12.6)	13.7 (9.2–14.2)	0.67
NT-proBNP, pg/ml	211 (96–1087)	68 (34–346)	0.01
Troponin I, ng/ml	0.032 (0.012–0.048)	0.012 (0.012–0.013)	0.002**
hsCRP, mg/dl	1.1 (0.63–4.0)	1.1 (0.26–46.8)	0.38

Data are expressed as mean ± SD or n (%) for discrete variables and median (IQI) for continuous nonnormal variables. hsCRP = High sensitivity C-reactive protein. * Fisher's exact test. ** Mann-Whitney U test.

dysfunction, with or without symptoms). Mean age was 58 ± 8.5 years and 59% of the participants were women. The majority of subjects (73.8%) were in NYHA functional class I or II and 4 (6.6%) had concomitant gastrointestinal involvement. The prevalence of hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and current smoking was similar across the 3 groups. As expected, higher NT-proBNP values and a lower ejection fraction were observed in group 3 ($p < 0.001$). Ventricular tachycardia was detected in 20 (33%) subjects on 24-hour Holter monitoring (none from group 1, 5 from group 2 and 15 from group 3; $p = 0.001$). Clinical and demographic characteristics of the subjects are described in table 1.

Myocardial Fibrosis

DE was identified in 37 of 61 subjects (64%). The total amount of myocardial fibrosis was 9.4% (IQI: 2.4–18.4) with a progressive increase across the different forms of the disease. Myocardial fibrosis was detected in 6 of 17 subjects in the indeterminate form (median 4.1%, IQI: 2.1–10.7), 7 of 16 in the cardiac form without ventricular dysfunction (median 2.3%, IQI: 1.0–5.0) and 22 of 28 subjects in the cardiac form with ventricular dysfunction (median 15.2%, IQI: 7.8–25.0, $p = 0.001$). DE was detected more frequently in the inferolateral and apical segments of the left ventricle. Moreover, subjects with DE showed a lower ejection fraction (68 ± 13 vs. 48 ± 18%; $p < 0.001$), higher NT-proBNP values [197 pg/ml (IQI: 91–2,682) vs. 73 pg/ml (IQI: 34–190); $p = 0.01$; tables 2, 3] and ventricular tachycardia detected on Holter monitoring (43 vs. 15%; $p = 0.03$).

Assessment of Gal-3

The median concentration of Gal-3 in the study sample was 12.1 ng/ml (IQI: 9.4–14.4). No differences were observed in Gal-3 concentration according to the presence or absence of myocardial fibrosis, with a median Gal-3 concentration of 11.7 ng/ml (IQI: 9.4–15) in subjects with DE versus 12.9 ng/m (IQI: 9.2–14) in subjects without DE ($p = 0.67$; fig. 1). No correlation was found between myocardial fibrosis and Gal-3 concentration ($r = 0.098$; $p = 0.47$; fig. 2).

Downloaded by:
University of Hong Kong
147.8.31.43 - 8/29/2016 10:53:16 AM

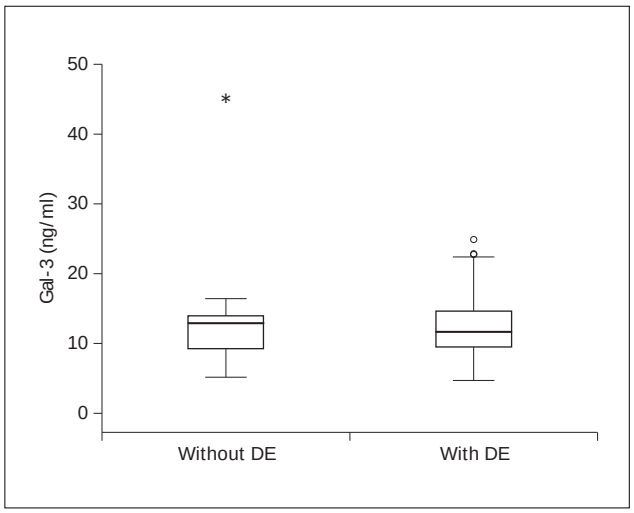


Fig. 1. Plasmatic concentration of Gal-3 assessed by ELISA in subjects with and without DE detected by MRI (Mann-Whitney U test, p = 0.67).

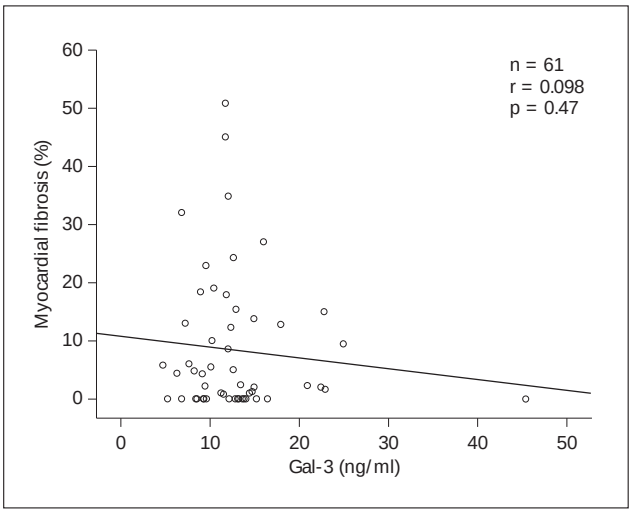


Fig. 2. Correlation between plasmatic concentration of Gal-3 and percentage of myocardial fibrosis assessed by cardiovascular MRI (Spearman's correlation, r = 0.098, p = 0.47).

Higher values of Gal-3 were found in women compared to men, with median Gal-3 concentrations of 13.4 ng/ml (IQI: 10.3–15.1) and 10.4 ng/ml (IQI: 8.9–10.1, p = 0.03), respectively. However, no differences were identified in subjects with a lower ejection fraction (p = 0.45), higher NT-proBNP values (p = 0.26), greater age (p = 0.15), higher troponin (p = 0.26) and high-sensitivity C-reactive protein values (p = 0.86). Additionally, we did not identify differences in Gal-3 concentration comparing groups of patients with different forms of Chagas disease, with a median concentration of 12.1 ng/ml (IQI: 8.8–18.3) in group 1, 12.1 ng/ml (IQI: 10.1–13.9) in group 2 and 12.0 ng/ml (IQI: 11.0–14.8) in group 3 (p = 0.90; fig. 3).

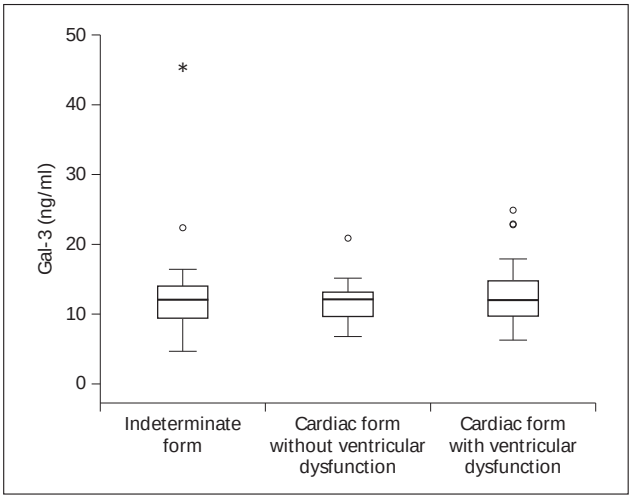


Fig. 3. Plasmatic concentration of Gal-3 assessed by ELISA in subjects with different forms of Chagas disease (Kruskal-Wallis, one-way ANOVA, p = 0.90).

Discussion

A useful biomarker must have a diagnostic or prognostic value or aid therapeutic guidance. Gal-3 has been shown to mediate fibrosis in several disease settings, including cardiac diseases. In animal models, Gal-3 mediates ventricular remodeling, and the administration of Gal-3 leads to a phenotype of progressive fibrosis and LV systolic dysfunction [4]. These observations have led to an increasing interest in Gal-3 as a potential heart failure biomarker that could reflect ongoing ventricular remodeling and progressive fibrosis.

This study provides the first evaluation of the Gal-3 role as a biomarker in a population with Chagas disease. Despite the experimental data on mice indicating a correlation between Gal-3 expression and the progression of Chagas disease [7, 18], our analysis in the clinical setting showed no direct relationship between the amount of myocardial fibrosis and the plasmatic concentration of

Downloaded by:
University of Hong Kong

Gal-3. In contrast, Lepojärvi et al. [19] demonstrated a positive correlation between myocardial fibrosis and the serum concentration of Gal-3, although their data were obtained from a different population which included subjects with coronary artery disease and preserved LV function. Likewise, in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy, Gal-3 is able to predict myocardial fibrosis as DE on cardiovascular MRI [20].

Although the median percentage of fibrosis varied across the different clinical forms of Chagas disease, the median concentration of Gal-3 was nearly identical in all 3 groups. Subjects with the cardiac form and ventricular dysfunction had a higher percentage of myocardial fibrosis than subjects without cardiac involvement, but the concentration of Gal-3 was not significantly different. Nonetheless, our data regarding the higher concentration of Gal-3 in females are in agreement with previously published data. Ho et al. [21] also demonstrated that Gal-3 concentration was significantly higher in women (median: 14.3 ng/ml) compared with men (median: 13.1 ng/ml, $p < 0.05$). Likewise, Daniels et al. [22] found that the concentration of Gal-3 was higher in women [15.3 (12.1–19.8) vs. 13.7 (10.7–17.4) ng/ml, $p < 0.0001$].

The role of circulating Gal-3 as a biomarker in heart failure of different etiologies has been supported by studies that showed that an elevated Gal-3 concentration, after adjusting for other variables, is associated with poorer outcomes in subjects with heart failure [23, 24]. However, these studies have limitations regarding their sample size or the number and type of variables included in their models for multivariate analysis. In contrast, the findings of Felker et al. [25], who included a larger cohort, showed that, after adjusting for more clinical variables (including NT-proBNP), Gal-3 was no longer able to significantly predict outcome in subjects with heart failure. Moreover, Srivatsan et al. [26], in a recent systematic review, found Gal-3 to be ineffective in the prediction of mortality when variables such as estimated glomerular filtration rate, LV ejection fraction and NT-proBNP were considered in the analysis.

There are several limitations to this study that may affect the interpretation of its results. First, it was conducted at a single tertiary and academic hospital, with a small sample size. However, there are also advantages to a single-center location, including the possibility of following all subjects closely for the duration of the study and gathering considerably detailed information on each study participant. The second limitation is that we measured Gal-3 at a single time point, which could not supply information about its importance over time. Lastly, the circulating concentration of Gal-3 may not accurately reflect the expression in the heart tissue.

Conclusion

That there is a lack of correlation between the degree of myocardial fibrosis and the plasma concentration of Gal-3, therefore refuting the hypothesis of a predictive role of this molecule as a biomarker for myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge BioMérieux for supplying VIDAS kits for the NT-proBNP and Gal-3 assessments. This work was financially supported by FAPESB.

Conflict of Interest

There were no conflicts of interest.

References

1 Andrade J, Marin-Neto J, Paola A, Vilas-Boas F, Oliveira G, Bacal F, et al; Sociedade Brasileira de Cardiologia: I. Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy (in Portuguese). Arq Bras Cardiol 2011; 97:1–48.
2 Barbosa AP, Cardinalli Neto A, Otaviano AP, Rocha BF, Bestetti RB: Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. Arq Bras Cardiol 2011; 97:517–525.
3 Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA: Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(suppl 1):152–158.
4 Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM: Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. Circulation 2004; 110:3121–3128.
5 Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, André S, Gabius HJ, Carretero OA: N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 296:H404–H412.
6 de Boer RA, Yu L, van Veldhuisen DJ: Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. Curr Heart Fail Rep 2010; 7:1–8.

7 Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR, Iacobas S, Goldenberg RC, Lisanti MP, Iacobas DA, et al: Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. Cell Cycle 2011; 10:1448–1455.
8 Sutton MG, Sharpe N: Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. Circulation 2000; 101:2981–2988.
9 Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T: Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. Am J Pathol 2008; 172: 288–298.
10 Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P: Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. Glycobiology 2014; 24:886–891.
11 de Oliveira SA, de Freitas Souza BS, Sá Barreto EP, Kaneto CM, Neto HA, Azevedo CM, Guimarães ET, de Freitas LA, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB: Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. Cytotherapy 2012; 14:339–349.
12 Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA: Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. PLoS One 2011; 6:e18683.
13 de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, Doria A: Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. Exp Biol Med (Maywood) 2015; 240: 1019–1028.
14 de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ: Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. Eur J Heart Fail 2009; 11: 811–817.
15 Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, Kawashima S, Tanabe M, Goto T, Matsuzawa Y, et al: Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. Allergol Int 2007; 56: 57–65.
16 Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Masui Y, Yamada D, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Tamaki Z, et al: Serum levels of galectin-3: possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 2012; 39: 539–544.
17 Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ: Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. Clin Res Cardiol 2010; 99: 323–328.
18 Pineda MA, Cuervo H, Fresno M, Soto M, Bonay P: Lack of galectin-3 prevents cardiac fibrosis and effective immune responses in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. J Infect Dis 2015; 212: 1160–1171.
19 Lepojärvi ES, Piira OP, Pääkkö E, Lammentausta E, Risteli J, Miettinen JA, Perkiömäki JS, Huikuri HV, Junttila MJ: Serum PINP, PIIINP, galectin-3, and ST2 as surrogates of myocardial fibrosis and echocardiographic left ventricular diastolic filling properties. Front Physiol 2015; 6:200.
20 Vergaro G, Del Franco A, Giannoni A, Prontera C, Ripoli A, Barison A, Masci PG, Aquaro GD, Cohen Solal A, Padeletti L, et al: Galectin-3 and myocardial fibrosis in nonischemic dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol 2015; 184: 96–100.
21 Ho JE, Liu C, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, Larson MG, Levy D: Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. J Am Coll Cardiol 2012; 60: 1249–1256.
22 Daniels LB, Clopton P, Laughlin GA, Maisel AS, Barrett-Connor E: Galectin-3 is independently associated with cardiovascular mortality in community-dwelling older adults without known cardiovascular disease: the Rancho Bernardo Study. Am Heart J 2014; 167: 674–682.e671.
23 Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, van Kimmenade RR, Januzzi JL: Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. Eur J Heart Fail 2010; 12: 826–832.
24 Toprak G, Yüksel H, Demirpençe Ö, Islamoglu Y, Evliyaoglu O, Mete N: Fibrosis in heart failure subtypes. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013; 17: 2302–2309.
25 Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, Shirolkar SC, Donahue M, Kitzman DW, Zannad F, et al: Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. Circ Heart Fail 2012; 5: 72–78.
26 Srivatsan V, George M, Shanmugam E: Utility of galectin-3 as a prognostic biomarker in heart failure: where do we stand? Eur J Prev Cardiol 2015; 22: 1096–1110.

Downloaded by:
University of Hong Kong
147.8.31.43 - 8/29/2016 10:53:16 AM

6.2 Artigo2 - Avaliação do Polimorfismo da Galectina-3 em Indivíduos com Doença de Chagas. **Arq Bras Cardiol 2015; 1105 (5): 472-478. DOI: 10.5935/abc.20150105**

Artigo Original

Avaliação do Polimorfismo da Galectina-3 em Indivíduos com Doença de Chagas Crônica

Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease

Gabriela da Silva Cruz[1], Ana Luiza Dias Angelo[1], Ticiana Ferreira Larocca[1,2,3], Carolina Thé Macedo[1,2,3], Márcia Noya- Rabelo[2], Luís Claudio Lemos Correia[2], Jorge Andion Torreão[2], Bruno Solano de Freitas Souza[1,3], Ricardo Ribeiro dos Santos[1,3], Milena Botelho Pereira Soares[1,3]

Centro de Biotecnologia e Terapia Celular – Hospital São Rafael[1]; Departamento de Cardiologia – Hospital São Rafael[2]; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ[3], Salvador, BA – Brasil

Resumo

Fundamento: A galectina-3, uma lectina de ligação à β-galactosidase, foi descrita como um mediador de fibrose cardíaca em estudos experimentais e um fator de risco associado com eventos cardiovasculares em indivíduos com insuficiência cardíaca. Estudos prévios avaliaram a susceptibilidade genética para doença de Chagas em humanos, incluindo polimorfismos dos genes de citocinas, demonstrando correlações entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento de cardiomiopatia na fase crônica. No entanto, a relação entre polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) e variações fenotípicas na doença de Chagas ainda não foi avaliada.

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo determinar se os polimorfismos genéticos da galectina-3 podem predispor ao desenvolvimento de formas cardíacas da doença de Chagas.

Métodos: Cinquenta e cinco indivíduos com doença de Chagas foram incluídos neste estudo observacional. A genotipagem das variantes rs4644 e rs4652 do gene da galectina-3 foi realizada por PCR (reação em cadeia de polimerase).

Resultados: Para o SNP rs4644, não houve associação entre o risco relativo para a forma cardíaca e os genótipos AA (OR = 0,79, p = 0,759), AC (OR = 4,38, p = 0,058), ou CC (OR = 0,39, p = 0,127). Similarmente, para o SNP rs4652, não foi encontrada associação entre os genótipos AA (OR = 0,64, p = 0,571), AC (OR = 2,85, p = 0,105), ou CC (OR = 0,49, p = 0,227) e a forma cardíaca da doença.

Conclusão: Nossos resultados não mostraram associação entre os diferentes genótipos para ambos SNPs do gene da galectina-3 e a forma cardíaca da doença de Chagas. (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(5):472-478)

Palavras-chave: Doença de Chagas; Galectina 3; Insuficiência Cardíaca; Polimorfismo Genético; Cardiomiopatia Chagásica.

Abstract

Background: *Galectin-3, a β-galactoside binding lectin, has been described as a mediator of cardiac fibrosis in experimental studies and as a risk factor associated with cardiovascular events in subjects with heart failure. Previous studies have evaluated the genetic susceptibility to Chagas disease in humans, including the polymorphisms of cytokine genes, demonstrating correlations between the genetic polymorphism and cardiomyopathy development in the chronic phase. However, the relationship between the galectin-3 single nucleotide polymorphism (SNP) and phenotypic variations in Chagas disease has not been evaluated.*

Objective: *The present study aimed to determine whether genetic polymorphisms of galectin-3 may predispose to the development of cardiac forms of Chagas disease.*

Methods: *Fifty-five subjects with Chagas disease were enrolled in this observational study. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used for genotyping the variants rs4644 and rs4652 of the galectin-3 gene.*

Results: *For the SNP rs4644, the relative risk for the cardiac form was not associated with the genotypes AA (OR = 0.79, p = 0.759), AC (OR = 4.38, p = 0.058), or CC (OR = 0.39, p = 0.127). Similarly, for the SNP rs4652, no association was found between the genotypes AA (OR = 0.64, p = 0.571), AC (OR = 2.85, p = 0.105), or CC (OR = 0.49, p = 0.227) and the cardiac form of the disease.*

Conclusion: *Our results showed no association between the different genotypes for both SNPs of the galectin-3 gene and the cardiac form of Chagas disease. (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(5):472-478)*

Keywords: *Chagas Disease; Galectin 3; Heart Failure; Polymorphism, Genetic; Chagas Cardiomyopathy*

Full texts in English - http://www.arquivosonline.com.br

Correspondência: Ticiana Ferreira Larocca •
Av. São Rafael, 2152. CEP 41253-190. São Marcos, Salvador, BA – Brasil
Email: ticiana@cbtc-hsr.org
Artigo recebido em 21/05/15; revisado em 01/06/15; aceito em 23/06/15

DOI: 10.5935/abc.20150105

Introdução

A Doença de Chagas (DC), causada por um parasita intracelular *Trypanosoma cruzi*, é um importante problema de saúde pública na América Latina e afeta milhões de pessoas em todo o mundo[1]. Cerca de 30% dos pacientes apresentam miocardiopatia crônica, a qual é a forma mais grave da DC, associada a um pior prognóstico entre as insuficiências cardíacas[2]. Uma vez que não existe tratamento efetivo nesse estágio da doença, é fundamental a identificação de biomarcadores que possam ser utilizados na detecção precoce de doença cardíaca e na estratificação prognóstica.

Estudos prévios avaliaram a susceptibilidade genética à DC em humanos. Polimorfismos de moléculas envolvidas no dano ao hospedeiro, induzidas pelo parasita, foram determinados em indivíduos com a doença, tais como IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α, e IFN-γ, demonstrando a associação entre polimorfismo genético e o desenvolvimento de miocardiopatia na fase crônica da DC[3-8].

Recentemente, nosso grupo demonstrou a superexpressão do gene de galectina-3 no coração de animais cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi*[9,10]. A galectina-3 é um membro da família galectina que se liga a β-galactosidases e é produzida por macrófagos e fibroblastos ativados[11]. Estudos experimentais demonstraram que a galectina-3 é um mediador de fibrose cardíaca[11,12], e está relacionada a eventos cardiovasculares e à gravidade da insuficiência cardíaca[13,14].

Estudos prévios demonstraram que variantes genéticas em dois sítios de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene da galectina-3 (rs4644 e rs4652, correspondendo a *LGALS3* +191 A>C e *LGALS3* +292 A>C, respectivamente) são capazes de alterar os níveis da proteína[15]. A galectina-3 exerce um importante papel no processo de inflamação e fibrose, e a relação entre SNPs no gene que codifica a galectina-3 e variações fenotípicas na DC não foi avaliada. Nossa hipótese era a de que SNPs no gene que codifica a galectina-3 podem influenciar o desenvolvimento de formas cardíacas da DC. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a correlação de polimorfismos genéticos da galectina-3 e a gravidade da forma cardíaca da DC.

Métodos

População do estudo

Um estudo retrospectivo observacional foi realizado entre janeiro de 2011 a dezembro de 2013. Uma amostra de conveniência de 55 indivíduos atendidos no ambulatório de doença de Chagas do Hospital São Rafael foi estudada.

Os critérios de inclusão foram: DC confirmada microbiologicamente por dois testes sorológicos (hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta), e idade entre 18 a 70 anos. Os critérios de exclusão foram: história de infarto do miocárdio ou de doença arterial coronariana, doença primária das valvas cardíacas, hemodiálise por falência renal crônica, doença hepática ativa, doenças hematológicas, neoplásicas ou ósseas, e contraindicações para realização de exame de ressonância magnética (RM). O estudo estava de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética. Todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento antes de serem incluídos no estudo. Uma história médica estruturada de todos os voluntários foi obtida, e todos se submeteram a exame físico, análise de sangue, eletrocardiograma de 12 derivações, radiografia de tórax, monitoramento (24 h) com Holter, ecocardiograma com Doppler convencional, e ressonância magnética cardíaca.

Genotipagem do polimorfismo de nucleotídeo único do gene da galectina-3

Amostras do DNA genômico foram obtidas de células mononucleares de sangue periférico. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo-se as especificações do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 ºC. A genotipagem dos SNPs rs4644 e rs4652 do gene da galectina-3 foi realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real com o sistema TaqMan® (Life Technologies, Carlsbad, USA), e os SNPs foram amplificados usando o protocolo do sistema TaqMan® Universal PCR (Life Technologies). Os genótipos de cada SNP foram determinados pelo programa *Sequence Detection System*, versão 1.3.1 (Life Technologies). Os primers e as sondas para identificação dos SNPs foram obtidos de uma mesma empresa.

Ecocardiograma com Doppler

O ecocardiograma transtorácico foi realizado utilizando-se o sistema de ultrassom digital Vivid 7 (GE Vingmed Ultrasound AS, Horten, Norway). Três ciclos cardíacos foram registrados e armazenados digitalmente para posterior análise. Medidas do ventrículo esquerdo (VE) e do ventrículo direito (VD) foram obtidas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (*American Society of Echocardiography*)[16]. A fração de ejeção do VE (FEVE) foi calculada pelo método de Simpson biplano.

Ressonância magnética cardíaca

A ressonância magnética cardíaca foi realizada utilizando-se o sistema Sigma HDx 1.5-T (General Electric; Fairfield, CT, EUA). Para avaliação da função do ventrículo esquerdo, foram adquiridas imagens sincronizadas ao eletrocardiograma, em apneia expiratória, nos planos eixo curto, eixo longo e quatro câmaras, em sequências diferentes. Os parâmetros de aquisição aplicados para a sequência dinâmica foram: tempo de repetição (TR) de 3,5 ms, tempo de eco (TE) de 1,5 ms, ângulo de inclinação (*flip angle*) de 60°, largura de banda de 125 kHz, campo de visão de 35 x 35 cm, matriz de 256 x 148, resolução temporal (RT) de 35 ms, e espessura de corte de 8,0 mm, sem intervalo entre os cortes. Imagens por técnica de realce tardio foram adquiridas a cada batimento cardíaco, 10 a 20 minutos após a administração de um contraste a base de gadolínio (0,1 mmol/kg), utilizando TR de 7,1 ms, TE de 3,1 ms,

ângulo de inclinação de 20°, primeira fase do ciclo cardíaco, número de linhas por seguimento de 16/32, tamanho da matriz 256 x 192, espessura de corte de 8,0 mm, intervalo entre os cortes de 2 mm, campo de visão de 32 a 38 cm, tempo de inversão de 150 a 300 ms, largura de banda de 31,25 kHz, 2 NEX (número de excitações). A técnica de realce tardio foi usada para investigar a presença de fibrose miocárdica, a qual foi estimada por um método visual quantitativo.

Análise estatística

Os dados categóricos foram expressos em números (porcentagens, intervalo de confiança de 95%), e os dados contínuos foram expressos como média ± DP ou mediana e intervalo interquartil. A distribuição dos genótipos dos SNPs rs4644 e rs4652 (AA, AC e CC) nos indivíduos com a forma indeterminada da DC foi comparada com a distribuição nos indivíduos com a forma cardíaca da DC usando o teste de chi-quadrado ou o teste exato de Fisher. O percentual de fibrose miocárdica foi comparado entre os grupos com os 3 genótipos diferentes utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Quando comparados separadamente os genótipos, analisando a mediana de fibrose miocárdica entre indivíduos com e sem a presence do SNP, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A associação entre a forma cardíaca da DC e cada um dos genótipos (AA, AC e CC) foi estimada pela razão de chances (*odds ratio*) e intervalo de confiança de 95%. Os casos com dados faltantes não foram incluídos na análise. As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS, versão 20.0 (IBM), e valores de p inferiores a 0,05 (teste bicaudal) foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Características clínicas e de imagem

O estudo envolveu 55 indivíduos, 42% homens, com idade média de 58 ± 9 anos. A prevalência de hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia e tabagismo foi de 71, 14, 42 e 27%, respectivamente. Os indivíduos foram distribuídos quanto às formas clínicas em: 16 (29%) com a forma indeterminada (sem evidência de envolvimento cardíaco ou insuficiência cardíaca), 16 (29%) com a forma cardíaca sem disfunção ventricular, e 23 (42%) com a forma cardíaca com disfunção ventricular. Segundo a classificação da NYHA (*New York Heart Association*), 17 indivíduos encontravam-se na classe funcional III-IV (31%). A FEVE, calculada pelo método de Simpson biplano, foi de 54 ± 15%, e a mediana do percentual de fibrose miocárdica foi de 9,4% (2,2- 17,3). Características demográficas e clínicas dos indivíduos encontram-se descritas na Tabela 1.

Genotipagem dos SNPs do gene LGALS3

A distribuição dos genótipos dos SNPs encontra-se na Tabela 2. Não houve associação significativa entre os genótipos

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos participantes

	Indivíduos (n = 55)
Sexo masculino	23 (41,8)
Idade (anos)	58 ± 9
Forma indeterminada	16 (29)
Forma cardíaca sem disfunção ventricular	16 (29)
Forma cardíaca com disfunção ventricular	23 (42)
NYHA III ou IV	17 (30,9)
Hipertensão	39 (70,9)
Diabetes	8 (14,5)
Tabagismo	15 (27,3)
Hipercolesterolemia	23 (41,8)
BRD	27 (49,1)
Hemoglobina (g/dL)	14,0 ± 0,97
Creatinina (mg/dL)	0,87 ± 0,16
FEVE (%)	53,7 ± 15,4
VSFVE (ml)	79,1 ± 65,4
VDFVE (ml)	177,3 ± 80,6
Massa do VE (g)	172,8 ± 57,3
Myocardial fibrosis (%)	9,4 (2,2-17,3)*

*Dados expressos como número (percentual) para variáveis categóricas, e como média ± DP ou mediana (intervalo interquartile) para variáveis contínuas; NYHA: New York Heart Association; BRD: Bloqueio do ramo direito do feixe de His; FEVE: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VSFVE: Volume sistólico final do ventrículo esquerdo; VDFVE: Volume diastólico final do ventrículo esquerdo; VE: Ventrículo esquerdo; *n = 40 (ressonância magnética cardíaca pela técnica do realce tardio).*

Tabela 2 – Frequência dos genótipos e dos alelos dos genes LGALS3 + 191 e LGALS3+292 em 16 indivíduos com a forma indeterminada e 39 indivíduos com a forma cardíaca da doença de Chagas

Polimorfismo do gene LGALS3	Forma indeterminada (n=16)	Forma cardíaca (n = 39)	OR (IC 95%)	Valor de p
***LGALS3* +191**				
AA	3 (19, 7-43)	6 (15, 7-30)	0,79 (0,17-3,63)	0,759
AC	2 (12, 4-36)	15 (38, 25-54)	4,38 (0,87-22,02)	0,058
CC	11 (69, 44-86)	18 (46, 32-61)	0,39 (0,11-1,33)	0,127
***LGALS3* +292**				
AA	3 (19, 7-43)	5 (13, 6-27)	0,64 (0,13-3,06)	0,571
AC	4 (25, 10-50)	19 (49, 34-64)	2,85 (0,78-10,40)	0,105
CC	9 (56, 33-77)	15 (38, 25-54)	0,49 (0,15-1,58)	0,227

Dados expressos em números (porcentagem, intervalo de confiança de 95%).

do gene LGALS3 (AA, AC, CC) dos SNPs rs4644 e rs4652 e a presença da forma cardíaca da DC. Para o SNP rs4644, o risco relativo da forma cardíaca não foi associado com o genótipo AA (OR = 0,79, IC 95% = 0,17 – 3,63, p = 0,759), AC (OR = 4,38, IC 95% = 0,87 – 22,02, p = 0,058), ou CC (OR = 0,39, IC 95% = 0,11 – 1,33, p = 0,127). Similarmente, para o SNP rs4652, o genótipo AA (OR = 0,64, IC 95% = 0,13 – 3,06, p = 0,571), AC (OR = 2,85, IC 95% = 0,78 – 10,40, p = 0,105), e CC (OR = 0,49, IC 95% = 0,15 – 1,58, p = 0,227) não se associaram com a forma cardíaca da DC.

As frequências dos genótipos do SNP rs4644 não foram estatisticamente diferentes entre os indivíduos com a forma indeterminada e aqueles com a forma cardíaca da DC [AA (19% *vs* 15%, p = 0,710), AC (12% *vs* 38%, p = 0,106) e CC (69% *vs* 46%, p = 0,149)] (Figura 1). Nos indivíduos com a forma indeterminada, o genótipo mais frequente foi o genótipo CC, com prevalência significativamente maior que os genótipos AA e AC (p = 0,011 e p = 0,003, respectivamente). Em indivíduos com a forma cardíaca, dois genótipos foram mais prevalentes, AC e CC, em

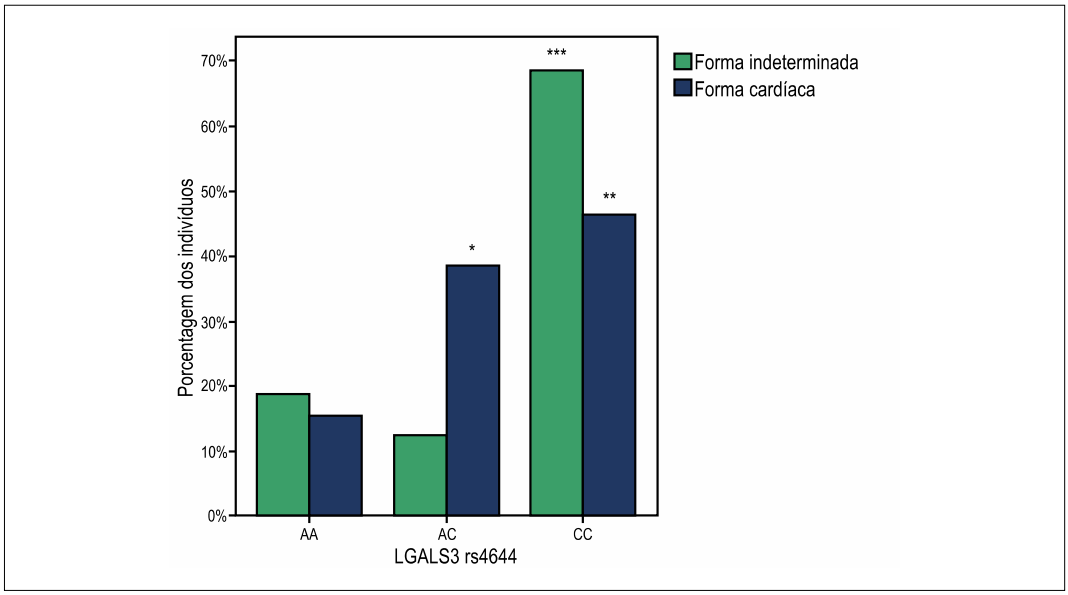


Figura 1 – *Prevalência dos genótipos AA, AC e CC do LGALS3 rs4644 na forma indeterminada e na forma cardíaca da Doença de Chagas. Os valores de p usando o teste exato de Fisher (bilateral) foram p = 0,710, p = 0,106 e p = 0,149 respectivamente. * p = 0,04 em comparação ao genótipo AA; ** p = 0,006 em comparação ao genótipo AA; *** p = 0,011 em comparação ao genótipo AA; e p = 0,003 em comparação ao genótipo AC.*

comparação ao genótipo AA, sem diferença significativa entre a prevalência de AC e CC (p = 0,647).

Resultados semelhantes foram observados para a distribuição dos genótipos para SNP rs4652 entre os grupos (Figura 2). Nos indivíduos com a forma indeterminada e naqueles com a forma cardíaca da DC, respectivamente, a prevalência do genótipo AA foi de 19% *vs* 13% (p = 0,678), de AC foi de 25% *vs* 49% (p = 0,138), e a prevalência de CC foi de 56% *vs* 38% (p = 0,249). Nos indivíduos com a forma indeterminada, não houve uma diferença significativa entre os três genótipos (AA *vs* CC, p = 0,066; AA *vs* AC, p = 1,00; e AC *vs* AA, p = 0,149). Similarmente ao SNP rs4644, nos indivíduos com a forma cardíaca, os genótipos AC e CC foram mais prevalentes quando comparados ao genótipo AA (p = 0,001 e = 0,018, respectivamente), sem diferença significativa entre a prevalência de AC e CC (p = 0,494).

Fibrose miocárdica

Não houve diferença estatisticamente significativa na mediana de fibrose miocárdica entre indivíduos com e sem a presença de qualquer um dos genótipos dos SNPs rs4644 e rs4652 (Tabela 3).

A mediana do percentual de fibrose miocárdica também não foi estatisticamente diferente entre os genótipos AA, AC e CC dos SNPs rs4644 (p = 0,508) e rs4652 (p = 0,903, Figura 3).

Discussão

O presente estudo avaliou a associação entre as variantes genéticas do gene *LGALS3*, que codifica a galectina-3, e a gravidade da doença em indivíduos com DC. Uma vez que a galectina-3 foi previamente correlacionada com fibrose, também avaliamos a associação dos três genótipos dos SNPs rs4644 e rs4652 com fibrose miocárdica.

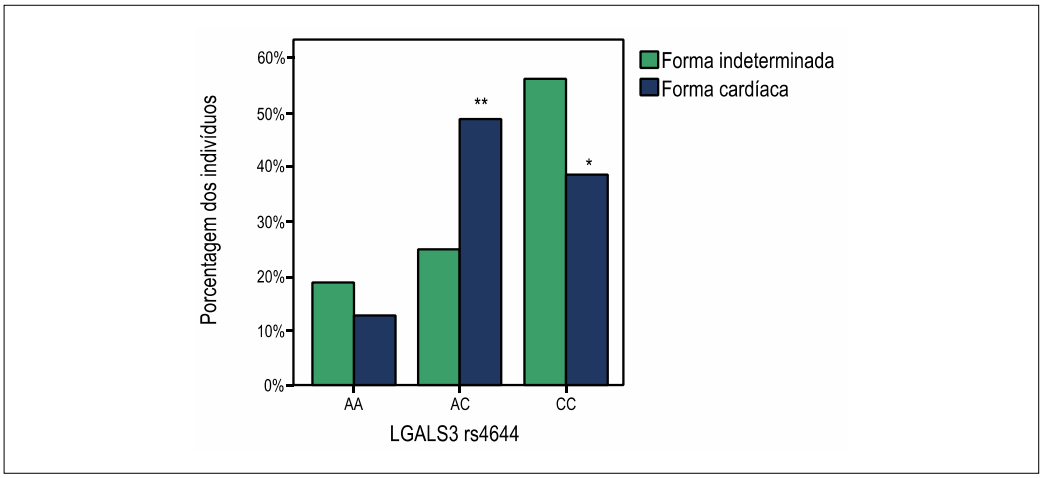


Figura 2 – *Prevalência dos genótipos AA, AC e CC do LGALS3 rs4652 na forma indeterminada e na forma cardíaca da doença de Chagas. Os valores de p usando o teste exato de Fisher (bilateral) foram p = 0,678, p = 0,138 e p = 0,249 respectivamente. * p = 0,018 em comparação ao genótipo AA. ** p = 0,001 em comparação ao genótipo AA.*

Tabela 3 – Mediana do percentual de fibrose miocárdica em indivíduos com ou sem polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) por genótipo

	Sem SNP	Com SNP	Valor de p
rs4644 AA	4,3 (0,0-14,4)	1,6 (0,0-4,7)	0,261
rs4644 AC	4,4 (0,0-9,8)	1,6 (0,0-19,2)	0,969
rs4644 CC	1,6 (0,0-15,0)	5,2 (0,2-18,5)	0,441
rs4652 AA	4,3 (0,0-14,0)	2,0 (0,3-10,6)	0,743
rs4652 AC	4,4 (0,0-10,0)	1,7 (0,0-15,1)	0,862
rs4652 CC	1,9 (0,0-14,1)	4,8 (0,0-10,0)	0,681

SNP: Polimorfismos de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism); dados expressos em mediana (intervalo interquartil); valores de p derivados do teste de Mann-Whitney.

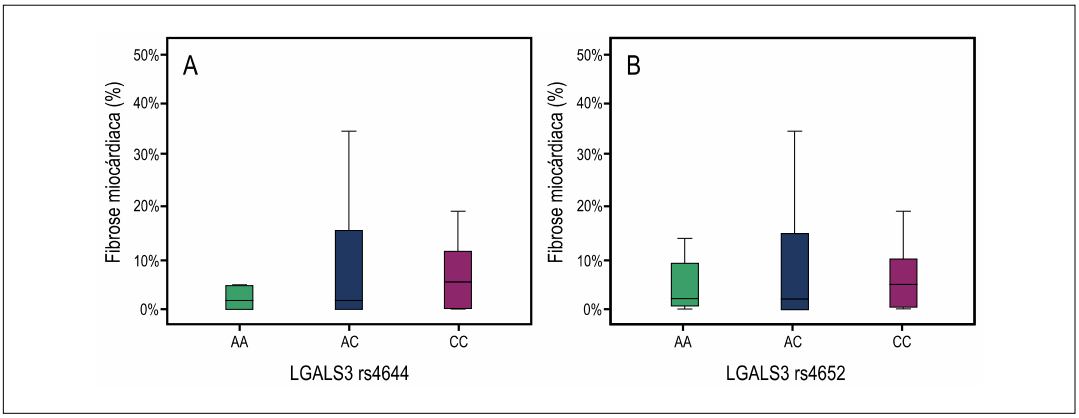


Figura 3 – *Frequência de fibrose miocárdica em indivíduos com os genótipos AA, AC e CC de rs4644 (A) e rs4652 (B) do gene LGALS3 p = 0,508 e p = 0,903, respectivamente*

Nós não encontramos diferença significativa na prevalência de qualquer dos genótipos entre os indivíduos com a forma indeterminada e a forma cardíaca da doença. Além disso, não houve diferença na mediana de fibrose miocárdica entre os indivíduos com os genótipos AA, AC e CC dos SNPs em questão.

A predisposição genética para o polimorfismo da galectina-3 já foi associada com artrite reumatoide, outra doença inflamatória. Hu e cols.[15] descreveram a associação entre essa doença reumática e o alelo *LGALS3* +292C. Apesar de termos demonstrado que a frequência de *LGALS3* +191C e *LGALS3* + 292C foi relativamente maior nos indivíduos com a forma cardíaca da DC, o genótipo CC, pelo menos para SNP rs4644, foi relativamente mais frequente entre os indivíduos com a forma indeterminada. Assim, nós não confirmamos o possível papel da presença do genótipo CC ou do genótipo AA para ambos SNPs como um fator protetor ou de risco para o desenvolvimento da forma cardíaca da DC. Similarmente, não foi observada relação entre os polimorfismos genéticos no gene que codifica a galectina-3 e a frequência de fibrose miocárdica.

Conclusão

Estudos a níveis de genes e proteínas contribuem para o entendimento sobre o papel de variantes genéticas na etiologia das doenças, bem como seu potencial papel como alvos terapêuticos, preditores de risco e marcadores prognósticos.

Os nossos resultados não conduziram a uma conclusão significativa sobre o papel do polimorfismo da galectina-3 no desenvolvimento da forma cardíaca da DC. Estudos adicionais com longo seguimento são necessários para avaliar se outras variantes genéticas desempenham um papel na inflamação e fibrose na forma indeterminada da DC, para identificar possíveis variantes associadas com a progressão da doença.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Kyan James Allahdadi pela revisão cuidadosa do artigo.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Cruz GS, Angelo ALD, Souza BSF, Santos RR, Soares MBP; Obtenção de dados: Cruz GS, Angelo ALD, Larocca TF, Macedo CT, Noya- Rabelo M, Torreão JÁ; Análise e interpretação dos dados: Cruz GS, Angelo ALD, Larocca TF, Macedo CT, Noya- Rabelo M, Correia LCL, Torreão JA, Souza BSF, Soares MBP; Análise estatística: Cruz GS, Angelo ALD, Larocca TF, Noya- Rabelo M, Correia LCL; Obtenção de financiamento: Santos RR, Soares MBP; Redação do manuscrito: Cruz GS, Larocca TF, Souza BSF; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Cruz GS, Angelo ALD, Larocca TF, Macedo CT, Noya- Rabelo M, Correia LCL, Souza BSF, Santos RR, Soares MBP.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESB.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. World Health Organization. Chagas disease: control and elimination. Geneva; 2010.
2. Silva CP, Del Carlo CH, Oliveira Junior MT, Scipioni A, Strunz-Cassaro C, Ramirez JA, et al. Why do patients with chagasic cardiomyopathy have worse outcomes than those with non-chagasic cardiomyopathy? Arq Bras Cardiol. 2008;91(6):358-62.
3. Beraún Y, Nieto A, Collado MD, González A, Martín J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. Tissue Antigens. 1998;52(1):81-3.
4. Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. J Infect Dis. 2009;199(3):451-4.
5. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Faé KC, Buck P, et al. Lack of association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. Immunol Lett. 2007;108(1):109-11.
6. Flórez O, Martín J, González CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. Parasite Immunol. 2011;33(9):506-11.
7. Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, et al. Lack of association between IL-6-174G/C gene polymorphism and Chagas disease. Tissue Antigens. 2010;76(2):131-4.
8. Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. Microbes Infect. 2007;9(9):1049-52.
9. Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR, et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. Cell Cycle. 2011;10(9):1448-55.
10. Vasconcelos JF, Souza BS, Lins TF, Garcia LM, Kaneto CM, Sampaio GP, et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. FASEB J. 2013;27(12):4691-702.
11. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. Circulation. 2004;110(19):3121-8.
12. Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(2):H404-12.
13. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, et al. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. Circ Heart Fail. 2012;5(1):72-8.
14. Fermann GJ, Lindsell CJ, Storrow AB, Hart K, Sperling M, Roll S, et al. Galectin 3 complements BNP in risk stratification in acute heart failure. Biomarkers. 2012;17(8):706-13.
15. Hu CY, Chang SK, Wu CS, Tsai WI, Hsu PN. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. Clin Rheumatol. 2011;30(9):1227-33.
16. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr. 2005;18(12):1440-63.

6.3 Artigo 3 - Presença e Extensão da Fibrose Miocárdica na Forma Indeterminada da Doença de Chagas: Estudo de Ressonância Magnética.
Arq Bras Cardiol 2017;

Presença e Extensão da Fibrose Miocárdica na Forma Indeterminada da Doença de Chagas: Estudo de Ressonância Magnética.

Autores:
Márcia Noya-Rabelo[1,3], Carolina The Macedo[1,2], Ticiana Larocca[2], Admilson Machado[3], Thaís Pacheco[3], Jorge Torreão[1], Bruno Solano[2], Milena P B Soares[2], Ricardo Ribeiro-dos-Santos[2] e Luís C L Correia[1,3].

[1]Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brasil
[2]Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Salvador, BA, Brasil
[3]Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil

Título Resumido: Presença e Extensão da Fibrose Miocárdica na Forma Indeterminada da Doença de Chagas.

E-mail aprovação para publicação na Revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Gmail Márcia Noya <marcianoya@gmail.com>

Presença e Extensão da Fibrose Miocárdica na Forma Indeterminada da Doença de Chagas: Estudo de Ressonância Magnética. - 9051

Arquivos Brasileiros de Cardiologia 9051 <abc@cardiol.br> 21 de agosto de 2017 11:52
Para: marcianoya@cardiol.br
Cc: marcianoya@gmail.com

Prezado(a) Dr(a) Marcia Maria Noya Rabelo,

Seu manuscrito “ Presence and Extension of Myocardial Fibrosis in the Undetermined Form of Chagas' Disease: Magnetic Resonance Study. ” foi aprovado pelo Conselho Editorial da Revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia e deverá ser publicado oportunamente.

Envie os seguintes formulários abaixo preenchidos e assinados para abc@cardiol.br:

Transferência de Direitos Autorais:
http://www.arquivosonline.com.br/pdf/transfer_copyright_abc_2013.pdf

Conflito de interesses:
http://www.arquivosonline.com.br/pdf/conflict_of_interest_abc_2013.pdf

Contribuição dos Autores:
http://www.arquivosonline.com.br/pdf/contribution_form_abc_2013.pdf

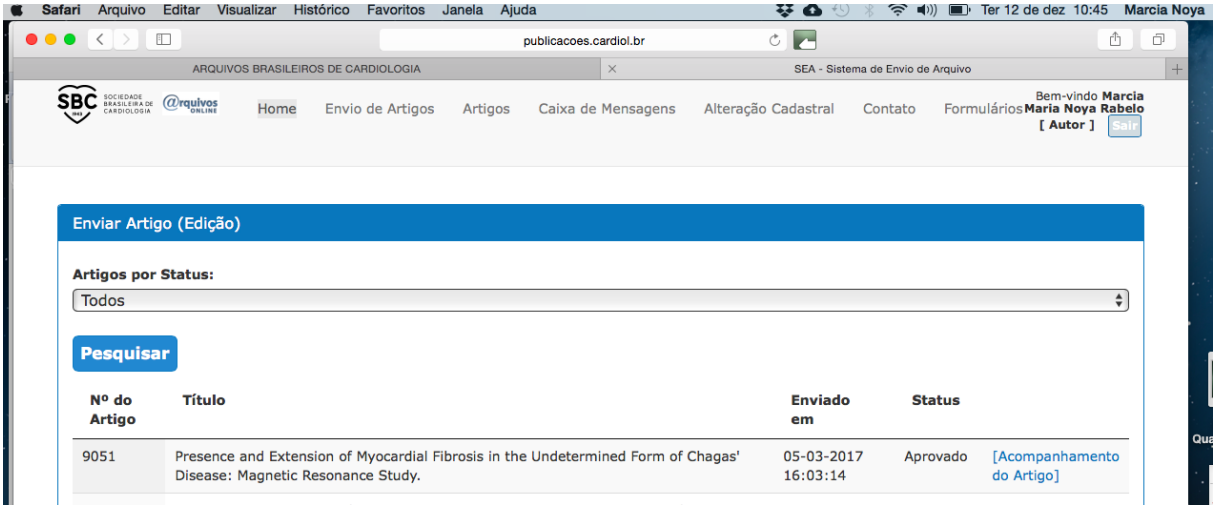
Cordialmente,

Dr. Luiz Felipe P. Moreira
Editor-chefe da Revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Para entrar na área de autores do Sistema de Envio de Artigos clique no link a seguir:

http://publicacoes.cardiol.br/sea

Print Home Page da Revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia
Acesso dia 12/dezembro/2017 às 10:45h



RESUMO

Fundamento: Dados prévios têm demonstrado que pacientes na forma indeterminada podem apresentar fibrose miocárdica à ressonância magnética(RM). No entanto, são poucas as informações disponíveis quanto ao grau de fibrose miocárdica apresentada por estes indivíduos, o que guardaria relação com o potencial desta variável na predição de evolução para forma cardíaca da doença de Chagas.
Objetivos: Descrever a frequência e extensão da fibrose miocárdica avaliada por RM em pacientes da forma indeterminada, comparando com as outras formas da doença.
Métodos: Pacientes consecutivamente admitidos tiveram história clínica colhida e submetidos a realização de exames laboratoriais e RM.
Resultados: Foram estudados 61 pacientes portadores da doença de Chagas, 58±9 anos, sendo 17 pacientes na forma indeterminada, 16 na forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo(VE) e 28 na forma com disfunção do VE. Realce tardio foi detectado em 37 pacientes(64%). Foi identificado fibrose miocárdica em 6 indivíduos na forma indeterminada(41%;95%IC=23-66), proporção semelhante a observada na forma cardíaca sem disfunção do VE(44%); P=1,0. Dentre os indivíduos com fibrose, a área total do miocárdio acometida foi de 4,1%(IIQ:2,1–10,7) na forma indeterminada *vs* 2,3%(IIQ:1-5) na forma cardíaca sem disfunção do VE(P=0,18). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos indivíduos na forma indeterminada foi semelhante aos portadores da forma cardíaca sem disfunção ventricular(P=0,09).
Conclusão: A presença de fibrose na forma indeterminada da doença de Chagas tem frequência e extensão semelhante à forma cardíaca sem disfunção, o que sugere que a primeira faz parte de um espectro de doença subclínica, ao invés da ausência de acometimento cardíaco.

Palavras-chave: Doença de Chagas; forma indeterminada; fibrose; ressonância magnética cardíaca

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é um problema endêmico em países da América Latina, de caráter potencialmente debilitante, já tendo promovido perda estimada de 750 mil anos de vida produtiva[1–5]. Reconhece-se a presença de três estágios na doença de Chagas: agudo, indeterminado e crônico[4,6]. Após a fase aguda, cerca de 2/3 dos pacientes infectados permaneceram na forma indeterminada, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas significativas. No entanto, os pacientes da forma indeterminada não ficam livre de manifestarem a doença e 1/3 progridem para algum tipo de manifestação cardíaca e/ou digestiva, sendo reclassificados como crônicos[7].

A identificação do paciente da forma indeterminada propenso a evoluir para a forma crônica serviria de base para pesquisa de estratégias preventivas e um melhor entendimento dos processos patológicos que levam a esta evolução. No entanto, não há marcadores nem modelos preditores capazes de estimar o risco de evolução para a forma crônica.

Nessa linha de raciocínio, vários pesquisadores consideram a fibrose miocárdica como um possível substrato para o desenvolvimento e a progressão da disfunção ventricular, arritmia e para a morte [3,8–10]. O processo etiopatogênico que promove a fibrose envolve uma relação multifatorial entre os aspectos relacionados ao agente etiológico e aqueles relativos ao hospedeiro [2,11–14].

O advento da ressonância magnética cardíaca (RMC), com a utilização da técnica de realce tardio, permite a identificação de fibrose miocárdica sendo considerada padrão ouro com estreita correlação anatomopatológica[15]. Há evidências de que, a RMC é capaz de fornecer imagens com alta resolução espacial e elevada acurácia na avaliação da função ventricular[16]. Dados prévios têm demonstrado que mesmo pacientes com forma indeterminada podem apresentar fibrose miocárdica quando testados por RMC[17]. No entanto, são poucos os dados disponíveis quanto ao grau de fibrose miocárdica apresentada por estes indivíduos, o que guardaria relação com o potencial desta variável na predição de evolução para forma cardíaca. O intuito deste trabalho é descrever a frequência e extensão da fibrose miocárdica avaliada por RMC

em pacientes da forma indeterminada. A fim de contextualizar esta magnitude, estes pacientes foram comparados ao grupo com forma crônica cardíaca com ou sem disfunção do ventrículo esquerdo.

MÉTODO

População do estudo

Indivíduos com doença de Chagas foram recrutados, entre Janeiro de 2012 à Dezembro de 2013, no ambulatório de doença de Chagas do Hospital São Rafael, centro de referência terciário em Salvador – Bahia - Brasil.

Os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 70 anos e diagnóstico da doença de Chagas confirmado por 2 testes sorológicos positivos (hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta). Os critérios de exclusão foram: forma aguda da doença de Chagas; infarto do miocárdio prévio ou doença aterial coronariana conhecida ou presença de 2 fatores de risco; doença valvular primária; doença renal terminal em diálise; hepatite ativa ou cirrose; doenças hematológicas, neoplásicas ou ósseas e contra-indicação para ressonância magnética.

O estudo cumpriu com a Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Rafael. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento informado antes de sua inclusão.

Formas da Doença de Chagas

A forma indeterminada foi definida pela presença de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na ausência de manifestações clínicas e sinais de envolvimento cardíaco caracterizado por eletrocardiograma, radiografia de tórax e ecocardiograma normais. A forma cardíaca sem disfunção ventricular foi definida por indivíduos com envolvimento cardíaco conhecido por eletrocardiograma anormal (tipicamente, bloqueio de ramo direito e hemibloqueio antero-superior esquerdo) e sem disfunção ventricular esquerda ao ecocardiograma e a forma cardíaca com disfunção ventricular foi composta por indivíduos com fração de ejeção ventricular esquerda reduzida.

Dados Clínicos e Laboratoriais

Todos os indivíduos realizaram exames bioquímicos, eletrocardiograma de 12 derivações, radiografia de tórax, holter 24 horas, teste ergométrico, ecocardiograma com doppler e ressonância magnética cardíaca. Para classificação do escore de Rassi foi conferida pontução da seguinte forma: classe funcional III e IV pela NYHA (5 pontos), cardiomegalia ao raio X (5 pontos), disfunção ventricular esquerda global ou segmentar ao ecocardiograma (3 pontos), taquicardia ventricular não sustentada ao Holter 24h (3 pontos), baixa voltagem do QRS ao eletrocardiograma (2 pontos) e sexo masculino (2 pontos). Foram então classificados em 3 grupos de risco de acordo com a pontuação obtida: baixo risco (0-6 pontos), risco intermediário (7-11 pontos) e alto risco (12-20 pontos)[18].

Ressonância Magnética Cardíaca

A ressonância magnética cardíaca (RMC) foi realizada utilizando-se o sistema Sigma HDx1,5-T (General Electric;Fairfield,CT,EUA). Para avaliação da função do ventrículo esquerdo foram adquiridas imagens sincronizadas ao eletrocardiograma, em apnéia expiratória, nos planos eixo curto, eixo longo e quatro câmaras, em sequências diferentes. Os parâmetros de aquisição aplicados para a sequência dinâmica foram: tempo de repetição(TR) de 3,5ms, tempo de eco(TE) de 1,5ms, ângulo de inclinação(*flip angle*) de 60^0, largura de banda de 125 kHz, campo de visão de 35*x*35 cm, matriz de 256*x*148, resolução temporal(RT) de 35ms, espessura de corte de 8,0mm, sem intervalo entre os cortes. Imagens por técnica de realce tardio foram adquiridas a cada batimento cardíaco, 10 a 20 minutos após a administração de um contraste a base de gadolínio (0,1mmol/kg), utilizando TR de 7,2ms, TE de 3,1ms, ângulo de inclinação de 20^0, primeira fase do ciclo cardíaco, número de linhas por seguimento de 16/32, tamanho da matriz 256*x*192, espessura de corte de 8,0mm, intervalo entre os cortes de 2 mm, campo de visão de 32 a 38 cm, tempo de inversão de 150 a 300ms, largura de banda de 31,25kHz, 2 NEX (número de excitações). A técnica de realce tardio foi usada para investigar a presença de fibrose miocárdica, a qual foi estimada por um método qualitativo (visual), pela presença ou ausência de realce tardio, localização e padrão apresentados; e de modo quantitativo, em valores percentuais em relação à massa total do miocárdio.

Análise Estatística

Os dados categóricos foram expressos em números (percentagens, intervalo de confiança de 95%), e os dados contínuos foram expressos como média ± desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IIQ). A comparação das variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada pelo teste t de Student e Anova (*"one-way analysis").* Foi utilizado método de Bonferroni para comparação post-hoc entre os grupos. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação de proporções. Para análise das variáveis contínuas não normais utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Regressão linear simples foi utilizada nas associações entre massa fibrótica e fração de ejeção do ventrículo esquerdo. As análises foram realizadas usando o programa SPSS, versão 20.0 (IBM), e valores de *p* inferiores a 0,05 (teste bicaudal) foi considerado estatisticamente significativo.

Como análise primária *a priori*, foi descrita frequência e extensão da fibrose miocárdica na forma indeterminada, sendo comparada as formas cardíacas sem disfunção e com disfunção. Como análises secundárias *post-hoc*, foi testada associação de fibrose com fração de ejeção e escore de Rassi, assim como parâmetros clínicos e laboratoriais foram comparados entre a forma indeterminada e cardíaca sem disfunção.

RESULTADOS

Características Clínicas

Foram avaliados 61 indivíduos portadores da doença de Chagas, 56% sexo feminino, idade média de 58±9 anos, sendo 17 indivíduos na forma indeterminada, 16 na forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo (VE) e 28 na forma cardíaca com disfunção do VE. A maioria dos indivíduos (74%) estavam em classe funcional I ou II da *New York Heart Association* (NYHA) e 4 (6,6%) apresentaram envolvimento gastrintestinal concomitante. Oitenta e dois porcento (82%) procedentes da zona urbana, sendo que 50 indivíduos moravam previamente em casa de taipa e 44 informaram contato com o triatomíneo. Relato de familiares portadores da doença de Chagas em 64%. Oito pacientes utilizaram benzonidazol com finalidade de tratamento etiológico. A prevalência de hipertensão, diabetes melitos, dislipidemia e tabagismo foi semelhante entre os 3 grupos. A mediana do escore de Rassi foi 5 (IIQ:0-11) assim distribuídos: 36 indivíduos classificados como de baixo risco (59%), 10 como de risco

intermediário (16%) e 15 classificados de alto risco (25%). Demais características clínicas e demográficas descritas na tabela 1 e figura 1.

Presença e Extensão da Fibrose Miocárdica

Realce tardio foi encontrado em 37 dos 58 indivíduos submetidos a ressonância cardíaca (64%). O percentual de área total do miocárdio acometida por fibrose foi de 9,4% (IIQ:2,4–18,4), localizada com maior frequência nos segmentos ínfero-lateral e apical do ventrículo esquerdo. Foi identificado fibrose miocárdica em 6 dos 17 indivíduos na forma indeterminada (41%; 95%IC=23-66), proporção semelhante a observada na forma cardíaca sem disfunção do VE (44% - 7 dos 16 indivíduos); P=1,0. Dentre os indivíduos com fibrose, a área total do miocárdio acometida foi de 4,1% (IIQ:2,1–10,7) na forma indeterminada *vs* 2,3% (IIQ:1-5) na forma cardíaca sem disfunção do VE (P=0,18). Naqueles com disfunção ventricular o percentual de fibrose foi maior do que nos grupos anteriores, ocorrendo em 23 dos 25 indivíduos (92%), com área acometida de 15,2 % (IIQ:7,8–25); *p*<0,001 (Figura 2).

Impacto da Fibrose Miocárdica

A fração de ejeção do VE foi significativamente mais baixa nos indivíduos com realce tardio quando comparados aos indivíduos sem realce (69±13*vs*48±19%); P<0,0001. Foi observado correlação negativa entre a extensão da fibrose e fração de ejeção (r= 0,565; P<0,001). Evidenciado uma redução progressiva da fração de ejeção, por análise de regressão linear, a cada incremento percentual da área acometida por fibrose. Esta análise demonstrou com coeficiente de regressão (b) de -0,968, o que corresponde à estimativa de redução da fração de ejeção do VE a cada aumento de 1% na área de fibrose (Figura 3).

Houve aumento progressivo do quantitativo de fibrose nas diferentes classes do escore de Rassi, quando subdivididos em baixo, intermediário e alto risco. O grupo de alto risco apresentou 13,8% (IIQ:9-19) *vs* 4,9% (IIQ:1-17) no médio risco *vs* 0% (IIQ:0-5) no baixo risco; P=0,003. Não evidenciado diferença de massa fibrótica entre as classes de baixo e intermediário (P=0,19), assim como, não houve diferença entre os riscos intermediário e alto (P=1,0).

Gravidade da Doença na Forma Indeterminada *vs* Forma Cardíaca sem Disfunção do Ventrículo Esquerdo.

A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) nos indivíduos na forma indeterminada foi de 72±8%, semelhante a FEVE nos portadores da forma cardíaca sem disfunção ventricular 67±6%; P=0,09. Não foram observado diferenças quando avaliado níveis de NT-ProBNP (125pg/mL*vs*159pg/mL; P=0,61), PCR ultrasensível (4,6mg/L*vs*2,5mg/L; P=0,40), TNF-alfa (0,9pg/mL*vs*1,2pg/mL; P=0,56), interleucinas (P=0,35), IFN-gama (2,7pg/mL*vs*3,3pg/mL; P=0,56) e METs (10*vs*9,4; P=0,66) alcançado no teste ergométrico quando comparados os portadores da forma indeterminada com aqueles da forma cardíaca sem disfunção (Tabela 2).

Todos os 17 indivíduos na forma indeterminada foram classificados como de baixo risco pelo escore de Rassi. Enquanto que dos 16 indivíduos na forma cardíaca sem disfunção 12 (75%) foram classificados como de baixo risco e 4 como de risco intermediário; P=0,04.

DISCUSSÃO

O presente trabalho evidenciou fibrose miocárdica em pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas, em frequência e extensão semelhante ao grupo classificado como forma cardíaca sem disfunção ventricular. Adicionalmente, foi demonstrado que a função ventricular e parâmetros clínicos são semelhantes entre estas duas formas.

A ressonância magnética cardíaca é utlizada a décadas com a finalidade de avaliação anatômica e funcional do coração. A sua importância deriva das características de ser não invasiva, não utilizar radiação ionizante e sua alta resolução que permite múltiplos estudos da anatomia cardíaca, função e caracterização tecidual com a técnica de realce tardio[19–21].

Estudos anteriores validaram a quantificação de fibrose miocárdica pela RMC na população portadora de doença de Chagas[22,23]. Rochitte e *cols.*, em 2005, avaliaram a RMC, com o uso da técnica de realce tardio, em 51 pacientes com cardiopatia chagásica crônica, observando fibrose em 68,6% e até 88,9% naqueles com

taquicardia ventricular[24]. Enquanto Regueiro e *cols.* descrevem fibrose em 23,9% de pacientes que vivem fora da zona endêmica da doença[25]. Nós encontramos percentual de acometimento de fibrose similar ao estudo anterior (64%) com progressivo acometimento nos pacientes com disfunção do VE (92%).

A descrição das alterações ultra-estruturais cardíacas que ocorrem na fase indeterminada da doença de Chagas foram inicialmente relatadas em indivíduos com sorologia positiva durante necropsia após morte acidental[12]. No entanto, a designação como forma indeterminada ficou prejudicada visto a impossibilidade da análise de alterações eletrocardiográficas. Utilizando modelo canino, em 1997, Andrade e *cols.*, interpretaram que a forma indeterminada da doença é caracterizada por ciclo autolimitado de alterações inflamatórias focais, com modulação e supressão de respostas imunes mediadas por células. Assim, consideraram que a forma indeterminada da doença de Chagas caracteriza-se pelo equilíbrio hospedeiro-parasita em vez de um processo de dano progressivo[26]. Já 1978, Andrade e *cols.*, relataram que as lesões de miocardite chagásica crônica não são distribuídas aleatoriamente através do sistema de condução atrioventricular, havendo claramente uma distribuição preferencial das lesões no sistema de condução[13]. Atualmente, sabemos que uma grande percentagem de pacientes na forma indeterminada tem evidências de envolvimento cardíaco na avaliação não invasiva mais detalhada[27]. Os dados desse estudo demonstram que o uso da RMC não é capaz de diferenciar a forma indeterminada da forma clínica sem disfunção do VE visto que o percentual de fibrose foi similar entre as duas formas clínicas. Neste estudo o percentual de acometimento de fibrose na forma indeterminada (41,2%) foi semelhante ao percentual na forma cardíaca sem disfunção do VE (43,8%), dado esse não relatado previamente.

Algumas limitações do estudo devem ser reconhecidas. Não foram realizados testes anatômicos visando afastar em definitivo etiologia isquêmica como causa da fibrose miocárdica. Para minimizar esta possibilidade foi realizado teste ergométrico em todos os indivíduos, além de ter como critério de exclusão a presença de fatores de risco para aterosclerose. Embora reconheça-se que para descartar definitivamente a doença arterial coronariana poderia ter sido necessária uma angiografia coronária, o valor preditivo negativo do teste de esforço, nestas circunstâncias, é muito alto. A doença arterial coronariana foi excluída sem a realização de uma angiografia

coronária para evitar a radiação e complicações decorrentes do procedimento. A biópsia endomiocárdica também não foi realizada, o que poderia ter sido interessante para avaliar a correlação entre os achados anatomopatológicos e de imagem da RMC, entretanto, foi considerado que tais dados já estão sedimentados na literatura justificando a sua não realização.

CONCLUSÃO

A presença de fibrose na forma indeterminada da doença de Chagas tem frequência e extensão semelhante à forma cardíaca sem disfunção, o que sugere que a primeira faz parte de um espectro de doença subclínica, ao invés da ausência de acometimento cardíaco. Dentro deste espectro, as formas indeterminada e cardíaca sem disfunção, assemelham-se entre si e se diferenciam significativamente da forma cardíaca com disfunção.

REFERÊNCIAS:

1. Coura JR, Dias JCP, Frasch ACC, et al. Control of Chagas disease. *World Heal. Organ. - Tech. Rep. Ser.* 2002;(905):1-99.
2. Marin-Neto JA, Rassi A. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. *Rev. española Cardiol.* 2009;62(11):1211-6.
3. Nunes MCP, Dones W, Morillo C a, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(9):767-76.
4. Longo DL, Bern C. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(5):456-466.
5. Bocchi EA, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro P. The reality of heart failure in Latin America. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(11):949-58.
6. Andrade J, Marin-Neto J, Paola A. I diretriz latino-americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arq. Bras. Cardiol.* 2011;97(2 supl. 1):1-48.
7. Le Loup G, Pialoux G, Lescure FX. Update in treatment of Chagas disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2011;24(5):428-34.
8. Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation* 1956;14(6):1035-1060.
9. Jr AR, Rassi S, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.* 2001;76(nº 1):86-96.
10. Tassi EM, Continentino MA, Nascimento EM Do, Pereira BDB, Pedrosa RC. Relationship between Fibrosis and Ventricular Arrhythmias in Chagas Heart Disease Without Ventricular Dysfunction. *Arq. Bras. Cardiol.* 2014;102(5):456-464.
11. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007;115(9):1109-23.
12. Lopes E, Chapadeiro E, Andrade Z, Almeida H, Rocha A. Anatomia

Patológica de Corações Chagásicos Assintomáticos Falecidos de Modo Violento. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1981;76(2):189-197.
13. Andrade ZA, Andrade SG, Oliveira GB, Alonso DR. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. *Am. Heart J.* 1978;95(3):316-24.
14. Mady C, Ianni BM, Arteaga E, et al. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *Am. J. Cardiol.* 1999;84(3):354-6, A9.
15. Klein C, Nekolla SG, Bengel FM, et al. Assessment of myocardial viability with contrast-enhanced magnetic resonance imaging: comparison with positron emission tomography. *Circulation* 2002;105(2):162-167.
16. Kim RJ, Wu E, Rafael A, et al. The Use of Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging to Identify Reversible Myocardial Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 2000;343(20):1445-1453.
17. Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, et al. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;46(8):1553-8.
18. Rassi A, Little WC, Xavier SS, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N. Engl. J. Med.* 2006;355(8):799-808.
19. Sechtem U, Mahrholdt H, Vogelsberg H. Cardiac magnetic resonance in myocardial disease. *Heart* 2007;93(12):1520-7.
20. Assomull RG, Prasad SK, Lyne J, et al. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006;48(10):1977-85.
21. Bogun FM, Desjardins B, Good E, et al. Delayed-enhanced magnetic resonance imaging in nonischemic cardiomyopathy: utility for identifying the ventricular arrhythmia substrate. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;53(13):1138-45.
22. Rochitte CE, Nacif MS, de Oliveira Júnior AC, et al. Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. *Artif. Organs* 2007;31(4):259-67.
23. Regueiro A, García-Álvarez A, Sitges M, et al. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. *Int. J. Cardiol.* 2013;165(1):107-12.
24. Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, et al. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;46(8):1553-8.
25. Regueiro A, García-Álvarez A, Sitges M, et al. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. *Int. J. Cardiol.* 2013;165(1):107-12.
26. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997;57(3):328-36.
27. de Oliveira Júnior W, Salazar LF, Malta J, Assi N. Critical analysis of the indeterminate form of Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.* 1986;47(4):283-8.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas

Variáveis	Sujeitos (n=61)	Forma Indeterminada (n=17)	Forma Cardíaca sem Disfunção Ventricular (n=16)	Forma Cardíaca com Disfunção Ventricular (n=28)
Caracteristicas Demográficas				
Idade (anos)	58±8	59±11	59±9	58±7
Sexo feminino, n (%)	36 (59)	12 (70)	12 (75)	12 (43)
Morava em casa de taipa, n (%)	50 (82)	15 (88)	15 (94)	20 (71)
Familiares com sorologia positiva, n (%)	39 (64)	11 (65)	14 (88)	14 (50)
Forma digestiva, n (%)	4 (6.6)	0	2 (12)	2 (7)
Índice massa corporea (kg/m²)	25±4	26±4	27±4	26±3
Co-morbidades – n (%)				
Hipertensão arterial	44 (72)	14 (82)	12 (75)	18 (64)
Diabetes	9 (15)	4 (23)	0	5 (18)
Síncope	6 (7)	1 (6)	1 (6)	2 (7)
Tabagismo	16 (26)	3 (18)	3 (18)	10 (36)
Insuficiência cardíaca congestiva NYHA III/IV	16 (26)	0	0	16 (57)*
Caracteristicas laboratoriais				
Creatinina (mg/dL)	0.88 (0.7-0.99)	0.84 (0.7-0.98)	0.78 (0.6-0.91)	0.94 (0.7-1.0)
Sódio (mmoL/dL)	140±3	138±2	139±2	139±2
Hemoglobina (g/dL)	13.9±0.9	14.2±1.3	13.4±0.7	14.2±1.0
Colesterol total (mg/dL)	193±38	202±40	194±42	200±45
Proteína C reativa (mg/dL)	1.15 (0.63-4.02)	1.71 (0.35-6.54)	1.24 (0.51-4.74)	1.09 (0.73-3.62)
NT-ProBNP (pg/mL)	686 (66-816)	60.5 (34-108)	96.0 (73-181)	839.5** (189-2271)
Troponin I (ng/mL)	0.684 (0.012-0.04)	0.012 (0.012-0.012)	0.012 (0.012-0.028)	0.038 (0.019-0.06)
LVEF (%)	54±15	64±3	64±4	43±10*
METS	9±2.5	12±3	9±2	8±2

Dados expressos em media ± devio-padrão ou percentual (%) para variáveis discretas e mediana e interval interquartil para variáveis contínuas com distribuição não normal; LVEF - fração de ejeção do ventriculo esquerdo; NYHA - New York Heart Association; METS - Metabolic equivalent of task. * P < 0.001, Fisher's exact test. ** P < 0.001, Kruskal-Wallis one-way analysis of variance.

Figura 1. Escore de Rassi nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas

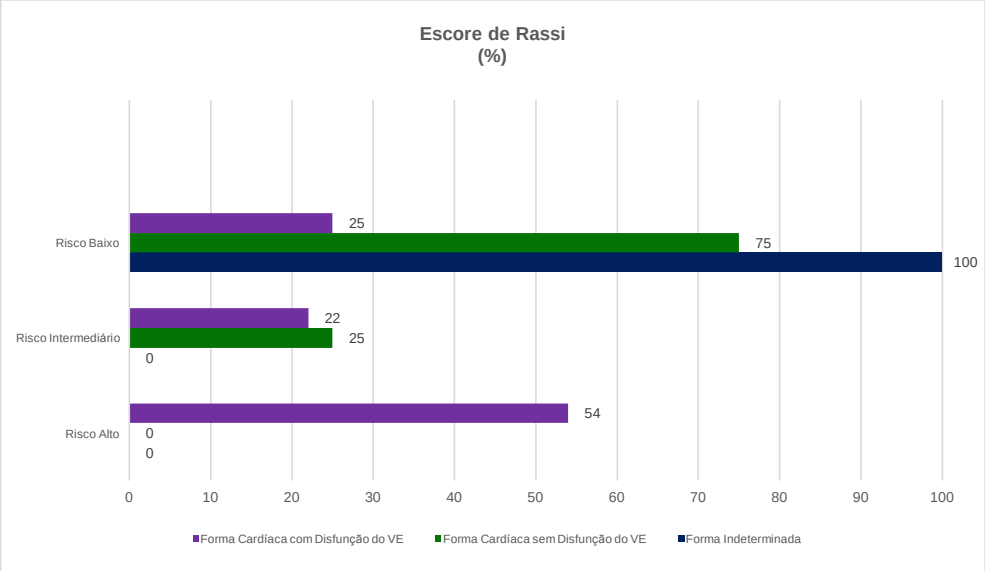
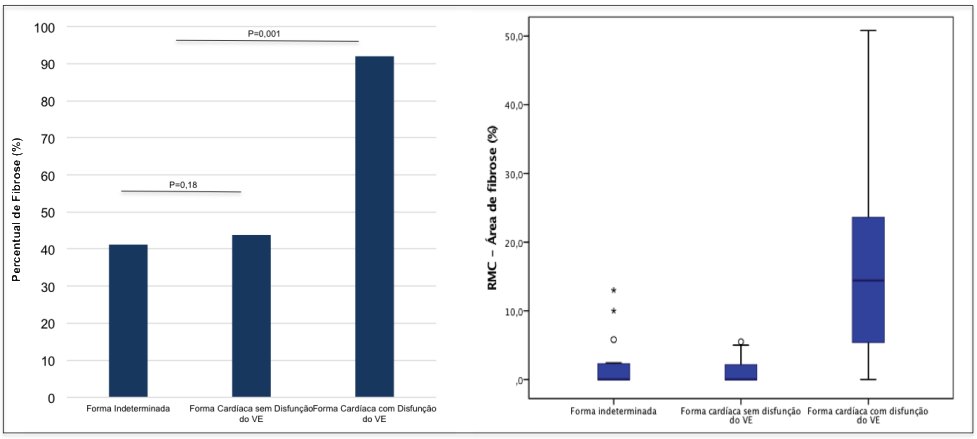


Figura 2. Fibrose miocárdica nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas



Fígura 3. Análise de Regressão Linear: influência da fibrose na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE).

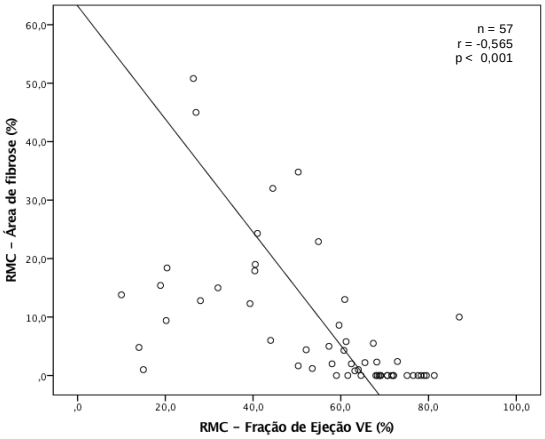


Tabela 2. Características da Forma Indeterminada *vs* Cardíaca sem Disfunção do VE.

Variáveis	Forma Indeterminada (n=17)	Forma Cardíaca sem Disfunção Ventricular (n=16)	*P*
Escore de Rassi	2 (0-2)	6 (1-8)	0,30
Área de Fibrose à RM Cardíaca (%)	4,1 (2,1-10,7)	2,3 (1-5)	0,18
Fração de Ejeção do VE (%)	72±8	67±6	0,09
Taquicardia Ventricular (%)	0	20	0,001*
METS	10±3	9,4±2	0,60
VO2 máximo	35±10	33±7	0,47
NT-ProBNP (pg/mL)	125 (34-108)	171 (73-181)	0,61
PCR ultrasensível (mg/L)	1,7 (0,35-6,5)	1,2 (0,51-4,7)	0,40
Troponina I (ng/mL)	0,012 (0,0-0,012)	0,012 (0,012-0,028)	0,31
IL-2 (pg/mL)	0,21 (0,03-0,55)	0,27 (0,03-0,96)	0,14
IL-4 (pg/mL)	0,62 (0,00-1,6)	0,37 (0,2-2,2)	0,83
IL-6 (pg/mL)	2,26 (1,39-4,35)	3,98 (2,01-6,22)	0,50
IL-10 (pg/mL)	0,44 (0,19-1,06)	0,63 (0,50-1,61)	1,47
TNF-alfa (pg/mL)	0,48 (0,14-1,15)	0,72 (0,58-2,71)	1,16
IFN-gama (pg/mL)	2,07 (1,30-4,35)	2,15 (1,69-6,73)	0,51

Dados expressos em media ± devio-padrão ou percentual (%) para variáveis discretas e mediana e interval interquartile para variáveis continuas com distribuição não normal; RM- ressonância magnética; VE - ventriculo esquerdo; METS - Metabolic equivalent of task; VO2 máximo - volume de oxigênio máximo * P = 0.001, Fisher's exact test.

6.4 Artigo 4 – Assesment of Speckle Tracking Strain Predictive Value for Myocardial Fibrosis in Subjects with Chagas Disease.
IJC Heart & Vasculature 2015; 8: 75-80. DOI: 10.1016/j.ijcha.2015.05.007

IJC Heart & Vasculature 8 (2015) 75–80

Contents lists available at ScienceDirect

IJC Heart & Vasculature

journal homepage: http://www.journals.elsevier.com/ijc-heart-and-vasculature

Assessment of speckle tracking strain predictive value for myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease

Carolina Thé Macedo [a,b,1], Ticiana Ferreira Larocca [a,b,*,1], Márcia Noya-Rabelo [a,1], Luís Claudio Lemos Correia [a,1], Moisés Imbassahy Guimarães Moreira [a,1], Alessandra Carvalho Caldas [a,1], Jorge Andion Torreão [a,1], Bruno Solano de Freitas Souza [a,b,1], Ricardo Ribeiro dos Santos [a,1], Milena Botelho Pereira Soares [a,b,1]

[a] Department of Cardiology, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil
[b] Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 March 2015
Received in revised form 7 May 2015
Accepted 9 May 2015
Available online 25 May 2015

Keywords:
Speckle tracking
Chagas disease
Longitudinal global strain

ABSTRACT

Background: One of the most challenging issues of chronic Chagas disease is to provide earlier detection of heart involvement. Two-dimensional speckle tracking (2-D ST) echocardiography, a new imaging modality with useful applications in several cardiac diseases, has been validated for subjects with myocardial infarction against cardiac magnetic resonance (CMR). Here we hypothesize that the longitudinal global strain (LGS) has an incremental value to ejection fraction for predicting myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease.
Methods: This observational study comprised 58 subjects with Chagas disease, confirmed by two positive serologic tests. All subjects underwent conventional Doppler echocardiogram plus speckle tracking strain, and cardiac magnetic resonance.
Results: The ROC curve analysis revealed that both LGS (area under the curve: 0.78, $p = 0.001$) and ejection fraction (area under the curve: 0.82, $p < 0.001$) were significant predictors of myocardial fibrosis. Regarding the percentage of fibrosis, a high correlation was observed with both ejection fraction assessed by echocardiography ($r = 0.70$, $p < 0.001$) and LGS ($r = 0.64$, $p < 0.001$). However, when adjusted through multiple linear regression, the LGS lost statistical significance as a predictor of myocardial fibrosis ($p = 0.111$).
Conclusions: LGS has no incremental value to conventional ejection fraction measurement in the prediction of myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease.
© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ireland Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

In Chagas disease, myocardial fibrosis affects not only the sinoatrial node and Purkinje fibers, but also intracardiac nervous ganglia and the contractile myocardium [1]. Myocardial fibrosis has been directly associated with cardiac alterations such as ventricular dysfunction (highly correlated with left ventricular ejection fraction [2]), and arrhythmias (risk identification for ventricular tachycardia [3]). The estimation of myocardial fibrosis in Chagas disease therefore may help in the early detection of cardiac involvement. The best noninvasive technique to evaluate myocardial fibrosis for ischemic [4–6] and non-ischemic myocardial diseases is magnetic resonance imaging (MRI), but this method is still quite expensive, not widely available and contraindicated in subjects with pacemakers.

Myocardial fibrosis has already been demonstrated to have a significant inverse correlation with left ventricular ejection fraction, and a direct correlation with end-diastolic and end-systolic volume indices [2], which indicates echocardiography as a possible method to indirectly evaluate myocardial fibrosis. One of the most challenging issues is the identification of fibrosis in subjects with normal ejection fraction. In this context, two-dimensional (2-D) speckle tracking (ST) echocardiography could be a useful approach, since it provides an assessment of myocardial deformation and left ventricular torsion [7]. Several studies have demonstrated that longitudinal myocardial velocity, strain, and strain rate are more sensitive and specific than LVEF for detecting early myocardial dysfunction [8–10]. Moreover, a previous study has shown that this new technique was also able to demonstrate myocardial involvement, which was not evident in visual analysis from subjects with the indeterminate form of Chagas disease [11].

Currently, the evaluation of Chagas disease subjects is performed by conventional echocardiography and, to a lesser extent, by CMR imaging, which is considered the gold standard method for measuring ejection fraction. Although the 2-D ST for left ventricular quantification has already been validated against cardiac magnetic resonance for subjects

* Corresponding author at: Av. São Rafael, 2152, São Marcos, Salvador, BA 41253-190, Brazil. Tel.: +55 71 32816455; fax: +55 71 32816489.
E-mail address: ticiana@cbtc-hsr.org (T.F. Larocca).
[1] This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.05.007
2352-9067/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ireland Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Table 1
Subjects' clinical and demographic characteristics.

	Subjects ($n = 58$)
Male gender	24 (41.4)
Age (years)	58 ± 9
Indeterminate form	17 (29.3)
Cardiac form without ventricular dysfunction	16 (27.6)
Cardiac form with ventricular dysfunction	25 (43.1)
NYHA III or IV	13 (22.4)
Hypertension	42 (72.4)
Diabetes	8 (13.8)
Current smoking	15 (25.9)
Hypercholesterolemia	27 (46.6)
RBBB	28 (49.1)[a]
Cardiomegaly	27 (46.6)
VT	15 (26.3)[a]
Hemoglobin (g/dl)	14.0 ± 0.98
Creatinine (mg/dl)	0.86 ± 0.17

Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation. Categorical variables are expressed as number of subjects (%). NYHA = New York Heart Association; RBBB = right bundle-branch block; VT = ventricular tachycardia.
[a] One missing data for these variables.

with myocardial infarction [12], to date the accuracy of longitudinal global strain against other echocardiographic variables, such as ejection fraction (EF), using cardiac magnetic resonance (CMR) as the reference standard, has not been evaluated in subjects with Chagas disease. Therefore we hypothesize that the longitudinal global strain has an incremental value to ejection fraction when predicting myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease. To test our hypothesis, we performed a correlation analysis between longitudinal global strain and ejection fraction, both with myocardial fibrosis, adjusting the variables through multiple linear regression.

2. Methods

2.1. Study population

We conducted a cross-sectional study, in which adult subjects with Chagas disease were invited to participate. From January 2011 to December 2013, we included 58 subjects from a convenience sample, in the Chagas disease outpatient clinics at our institution. The inclusion criteria were disease established based on microbiological confirmation by two positive serologic tests (indirect hemagglutination and indirect immunofluorescence), and age between 18 and 70 years. The exclusion criteria were: previous myocardial infarction or history of coronary artery disease; primary valve disease; dialysis treatment of terminal renal failure, chronic liver disease; hematologic, neoplastic or bone diseases; and MRI contraindications.

The study complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Hospital São Rafael. All subjects gave written informed consent before their inclusion in the study.

We obtained a structured medical history, and all subjects underwent physical examination, blood analysis, 12-lead ECG, chest X-ray, 24-h Holter monitoring, conventional Doppler echocardiogram plus speckle tracking strain, and cardiac magnetic resonance.

2.2. Doppler echocardiogram

Standard transthoracic echocardiographic examinations were recorded in all subjects using the Vivid 7 digital ultrasound system (GE Vingmed Ultrasound AS, Horten, Norway). Three cardiac cycles were stored in cine loop format for online analysis. LV and left atrial dimensions were measured according to the American Society of Echocardiography recommendations [13]. The LVEF was measured using the biplane Simpson's method. S0 systolic velocity at the lateral mitral annulus was assessed using pulsed-wave DTI. Diastolic function was evaluated by the analysis of the mitral Doppler inflow, pulsed- wave DTI at the lateral mitral annulus, and mitral propagation velocity using Color M-mode echocardiography. Mitral regurgitation (MR) was obtained using the proximal isovelocity surface area method. Right ventricular function was assessed with the S0 systolic velocity in the lateral wall. Systolic pulmonary arterial pressure was obtained from the tricuspid regurgitation flow. In subjects with adequate Doppler MR signals, dP/dt was determined noninvasively from the rate of change of MR velocity, according to the American Society of Echocardiography guidelines.

2.3. Strain measurements

Two-dimensional gray-scale images were acquired in the standard apical four-chamber, three-chamber, and two-chamber views at a frame rate of 80 frames/s. The dimensions of the computation area were an angle of 80° and at a depth of 13 cm. The left ventricle was divided into 17 segments, and each segment was analyzed individually. GLS and segmental longitudinal strain were obtained as previously described [14]. Average longitudinal strains were calculated automatically by the software. The two-dimensional strain is a non-Doppler-based method for the evaluation of systolic strain using standard 2D acquisitions. After placing three endocardial markers in an end-diastolic frame, the software automatically tracks the contour on subsequent frames. Adequate tracking can be verified in real time and corrected by adjusting the region of interest or by manually correcting the contour to ensure optimal tracking. Two-dimensional longitudinal strain was assessed in apical views. Average longitudinal strains were calculated for the 17 segments.

2.4. Magnetic resonance imaging

Cardiac magnetic resonance exams were performed on all subjects using the General Electric Sigma HDx 1.5-T system (Fairfield, CT, USA). Images were acquired and gated to the ECG during breath-hold, four-chamber, short axis and long axis of the left ventricle, in the exact

Table 2
Echocardiographic and CMR findings.

	Subjects ($n = 58$)
Echocardiogram	
LVEF (%)	54.3 ± 15.2
LVEF < 55%	23 (39.7)
LV ESV (ml)	78.4 ± 66.4
LV EDV (ml)	174.5 ± 80.1
LV mass (g)	169.4 ± 59.8
LV LGS (%)	−16.8 ± 5.6
LV LGS > −18%	29 (52.7)[a]
RV LGS (%)	−20.4 ± 6.0
E/E′ ratio	10.3 ± 5.8
Tei index	0.54 ± 0.14
Systolic tricuspid annular velocity (cm/s)	11.3 ± 2.8
Propagation velocity by Color M-Mode (cm/s)	42.1 ± 15.1
CMR	
LVEF (%)	55.8 ± 20.0
LV ESV (ml/m^2)	82.4 ± 76.4
LV EDV (ml/m^2)	161.9 ± 73.1
LV mass (g/m^2)	121.5 ± 49.6
RVEF (%)	56.6 ± 13.8
RV ESV (ml/m^2)	52.6 ± 33.2
RV EDV (ml/m^2)	112.8 ± 38.9
Fibrosis (%)	2.2 (0–12.9)
DE	37 (63.8)

Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation or median (interquartile interval) depending on normality assessed by the Shapiro–Wilk test. Categorical variables are expressed as number of subjects (%).CMR = cardiac magnetic resonance; DE = delayed enhancement; EDV = end diastolic volume; ESV = end systolic volume; LGS = longitudinal global strain; LV = left ventricular; LVEF = left ventricular ejection fraction; RV = right ventricular; RVEF = right ventricular ejection fraction.
[a] Three missing data for this variable.

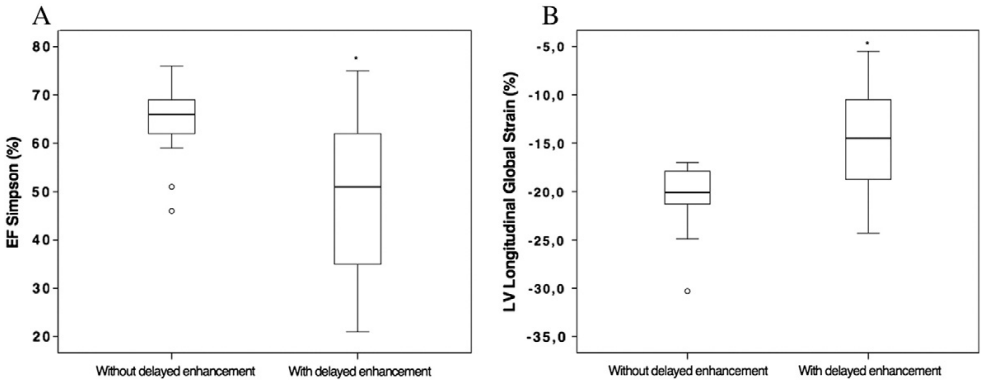


Fig. 1. Ejection fraction assessed by Simpson (A) and left longitudinal global strain (B) in subjects with and without delayed enhancement detected by cardiac magnetic resonance. $^{*}p < 0.001$.

same location in different sequences. This allows a precise comparison between cardiac function and regional myocardial structure. The parameters used in the dynamic sequences were repetition time (RT) of 3.5 ms, echo time (ET) of 1.5 ms, flip angle 60°, bandwidth of receipt of ± 125 kHz, field of view (FOV) of 35 × 35 cm, 256 × 148 matrix, temporal resolution (TR) 35 ms and 8.0 mm slice thickness, without a space between the slices. Following this acquisition, a dose of gadolinium-based contrast (0.1 mmol/kg) was injected. The myocardial delayed enhancement (MDE) technique was used to investigate myocardial fibrosis, an inversion-recovery prepared gradient-echo acquired 10 to 20 min after contrast application, with the following parameters: Repetition time (RT) 7.1 ms, echo time (ET) 3.1 ms, flip angle 20°, cardiac phase 1, views per segment 16 to 32, matrix 256 × 192, slice thickness 8 mm, gap between slices 2 mm and field of view 32 to 38 cm, inversion time 150 to 300 ms, receiver bandwidth 31.25 kHz, number of excitations 2 and acquisition every heart beat. The mass of fibrosis was estimated by a quantitative visual method.

2.5. Statistical analysis

Categorical data were presented as numbers (percentages), and continuous data were expressed as mean (SD) or median (interquartile range). Comparisons of continuous variables among groups were performed with the analysis of variance (ANOVA) test or Kruskal–Wallis, depending on normality assessed by the Shapiro–Wilk test. Chi-Square or Fisher tests were applied for proportion comparisons. Correlations between continuous variables were evaluated by Pearson or Spearman coefficients, depending on normality. Receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis was used to evaluate if the longitudinal global strain would add accuracy to the ejection fraction in the predicted fibrosis. C-Statistic (area under the curve) was presented as a unified estimate of sensitivity and specificity. To determine the ability to predict myocardial fibrosis, multiple linear regression was performed, including longitudinal global strain, left ventricular ejection fraction, E/E′ ratio, Tei index, propagation velocity by Color M-Mode,

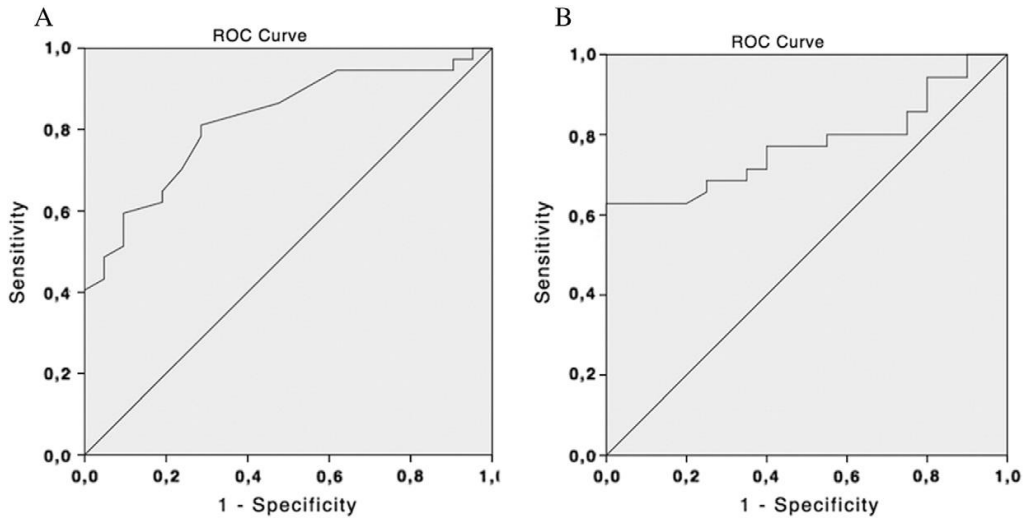


Fig. 2. Receiver-operating characteristic (ROC) curves of left ventricular ejection fraction (A) and longitudinal global strain (B) for prediction of myocardial fibrosis. The C-Statistic (area under the curve) with 95% confidence interval (95% CI) for the respective methods were: ejection fraction: 0.82 (95% CI 0.72–0.96, $p < 0.001$); and longitudinal global strain: 0.78 (95% CI 0.65–0.90, $p = 0.001$).

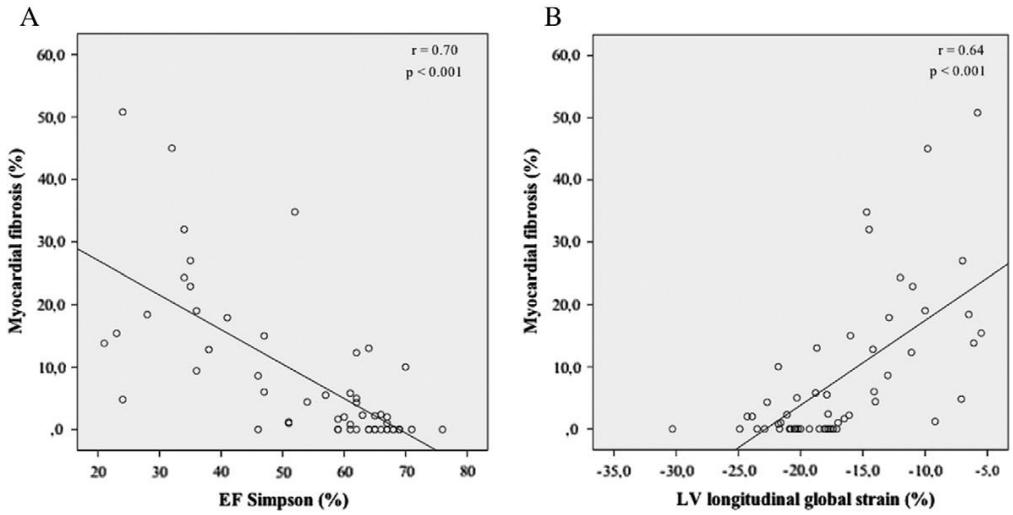


Fig. 3. Correlation between EF assessed by Simpson (A) and left longitudinal global strain (B) with myocardial fibrosis assessed by CMR (linear regression). EF = ejection fraction. CMR = cardiac magnetic resonance. $p < 0.001$ for both correlations.

and systolic tricuspid annular velocity. The multiple linear regression method used was forced entry, in which all predictors were entered simultaneously. Analyses in subgroups with normal and low ejection fraction were also accomplished. Cases with missing data were not included in the analysis. Analyses were performed using SPSS version 20.0 (IBM), and $p < 0.05$ (two-tailed) was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical and imaging characteristics

The study comprised 58 subjects, 41% were men, and the mean age was 58 ± 9. The prevalence of hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and current smoking was 72%, 14%, 47% and 26%, respectively. Regarding the clinical form of presentation, the subjects were distributed as follows: 17 (29%) with the indeterminate form (subjects with no evidence of cardiac involvement or heart failure), 16 (28%) with the cardiac form without ventricular dysfunction and 25 (43%) with the cardiac form with ventricular dysfunction. Thirteen subjects were in NYHA functional classes III–IV (22.4%) and 15 showed episodes of ventricular tachycardia (26.3%). The clinical and demographic characteristics of the subjects are described in Table 1.

The mean left ventricular ejection fraction assessed by Simpson was 54 ± 15%, and the mean left ventricular longitudinal global strain was −16.8 ± 5.5. Abnormal left ventricular ejection fraction (<55%) and abnormal longitudinal global strain (> −18%) were found in 39.7% and 52.7% of the subjects, respectively. Myocardial fibrosis was observed in 37 subjects (63.8%). Echocardiographic and CMR data are described in Table 2.

3.2. Prediction of myocardial fibrosis

The left ventricular ejection fraction (Simpson method) was elevated in subjects lacking delayed enhancement (64.5 ± 6.7%) when compared to subjects who presented delayed enhancement on CMR (48.5 ± 15.7%, $p < 0.001$; Fig. 1A). We also found a significant difference in longitudinal global strain between subjects without and with delayed enhancement, −20.3 ± 3.2% and −14.7 ± 5.6%, respectively ($p < 0.001$; Fig. 1B).

The ROC curve analysis revealed that both longitudinal global strain (area under the curve: 0.78, 95% CI 0.65 to 0.90, $p = 0.001$) and ejection fraction (area under the curve: 0.82, 95% CI 0.72 to 0.96, $p < 0.001$) were significant predictors for myocardial fibrosis (Fig. 2). For longitudinal global strain, the cutoff points of −17.0, −18.0 and −19.0 have the following sensitivity and specificity: 63% and 95%, 69% and 70%, and 77% and 60%, respectively. For the left ventricular ejection fraction, the cutoff points of 49%, 55% and 60% have the following sensitivity and specificity: 49% and 95%, 57% and 90%, and 65% and 81%, respectively.

Regarding the percentage of fibrosis, a high correlation was observed with ejection fraction assessed by echocardiography ($r = 0.70$, beta = −0.55, 95% CI: −0.70 to −0.40, $p < 0.001$; Fig. 3A) and with longitudinal global strain ($r = 0.64$, beta = 1.36, 95% CI: 0.91 to 1.82, $p < 0.001$; Fig. 3B). However, when adjusted to other variables through multiple linear regression, the longitudinal global strain lost statistical significance as a predictor of the percentage of fibrosis (beta = −0.90, 95% CI: −2.0 to 0.24, $p = 0.111$). Left ventricular ejection fraction, Tei index and E/E′ ratio were independent predictors of myocardial fibrosis ($p = 0.003$, $p = 0.023$ and $p = 0.005$, respectively). The results of the multiple linear regression analysis (standardized regression coefficients β, and the probability p) are presented in Table 3.

3.3. Subgroup analysis

Analyzing subjects with normal left ventricular ejection fraction ($n = 35$), we found a weak correlation with ejection fraction assessed by echocardiography ($r = 0.36$, beta = −0.41, 95% CI: −0.76 to

Table 3
Results of multiple linear regression analysis.

	Standardized regression coefficients β	Probability p
LV ejection fraction	−0.905	0.003
Longitudinal global strain	−0.904	0.111
E/E′ ratio	3.29	0.005
Tei index	39.49	0.023
Propagation velocity by Color M-Mode	0.110	0.369
Systolic tricuspid annular velocity	0.115	0.815

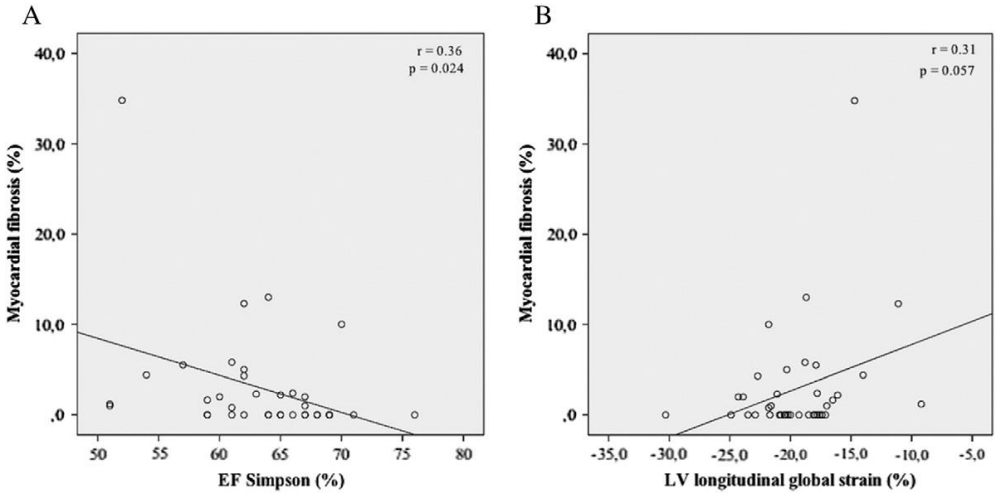


Fig. 4. Correlation between EF assessed by Simpson (A) and left longitudinal global strain (B) with myocardial fibrosis assessed by CMR (linear regression), in subjects with normal left ventricular EF. EF = ejection fraction. CMR = cardiac magnetic resonance.

−0.06, $p = 0.024$) and with longitudinal global strain ($r = 0.31$, beta = 0.51, 95% CI: −0.02 to 1.04, $p = 0.057$) with the percentage of myocardial fibrosis (Fig. 4). Considering myocardial fibrosis in subjects with low left ventricular ejection fraction ($n = 23$), a moderate correlation was observed with ejection fraction (Simpson method; $r = 0.38$, beta = −0.60, 95% CI: −1.37 to 0.17, $p = 0.116$) and a weak correlation with longitudinal global strain ($r = 0.06$, beta = −0.14, 95% CI: −1.5 to 1.2, $p = 0.82$; Fig. 5), both without statistical significance.

4. Discussion

The present study evaluated myocardial deformation and LV torsion assessed by 2-D ST echocardiography in a cohort of subjects in different forms of chronic Chagas disease, to test the hypothesis that this new parameter would add accuracy to the ejection fraction in the prediction of myocardial fibrosis. In current medical practice, ventricular contractility is evaluated based on LVEF using the Simpson biplane model by conventional echocardiography. However, this parameter lacks sensitivity to identify early contractility impairment, since longitudinal component and endocardial layers are the first affected. Moreover, ejection fraction measurement is highly dependent not only on operator experience, but also on loading, which may lead to abnormal results under unusual loading situations [15].

In this context, 2-D ST has emerged as a promising imaging modality to calculate regional tissue deformation, less subject to artifact, less dependent on endocardial visualization and independent of geometric assumptions. This method quantifies myocardial deformation through frame-by-frame tracking of a small image block of myocardial acoustic markers. Already applied to several clinical conditions, this technique has been shown to be an effective method for assessing LV function, regardless of operator experience [7,14,16]. Nahum and co-workers previously reported that longitudinal global strain by ST is superior to LVEF

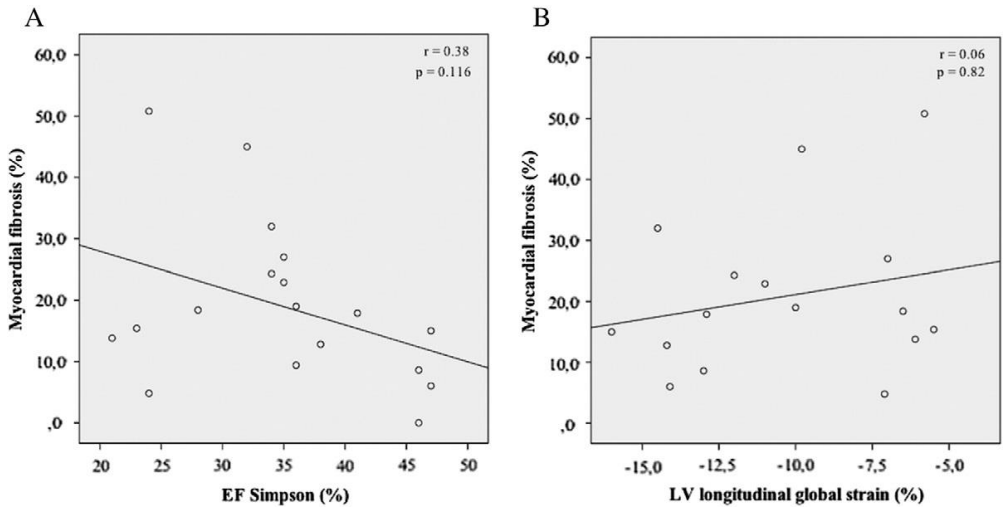


Fig. 5. Correlation between EF assessed by Simpson (A) and left longitudinal global strain (B) with myocardial fibrosis assessed by CMR (linear regression), in subjects with low left ventricular EF. EF = ejection fraction. CMR = cardiac magnetic resonance.

and other longitudinal markers in identifying subjects with poor outcome in a population with heart failure [17].

Previous studies have validated 2-D ST for LV quantification against magnetic resonance imaging, demonstrating the reliability of the method in a clinical trial [18]. Although myocardial deformation by 2-D ST had been characterized in a cohort of subjects with different forms of Chagas disease [11], the data did not include validation against left ventricular ejection fraction. Garcia-Álvarez and coworkers showed that the average value of LGS for subjects with chronic Chagas cardiomyopathy was −16.5%, whereas in our study the average was −11.0%, possibly featuring a population of greater severity.

Our study showed a high percentage of delayed enhancement in the three different forms of the disease: 41% for the indeterminate form, 47% for the cardiac form without ventricular dysfunction and 92% for subjects with ventricular dysfunction. A previous study demonstrated rates of 7.4%, 15.8% and 52.4% for these three groups of subjects, respectively [19]. Despite this difference, the overall prevalence of delayed enhancement in our population of subjects with chronic Chagas cardiomyopathy, estimated at 92%, is consistent with literature data, since global prevalence has demonstrated delayed enhancement ranging from 68.6% to 88.9% in this profile of subjects [2].

We also demonstrated a high correlation between EF assessed by Simpson and longitudinal global strain with myocardial fibrosis assessed by CMR, both with statistical significance. However, one of the issues that we wanted to address in our study was if the use of 2-D ST would have an incremental role to ejection fraction on the prediction of myocardial fibrosis, which was shown not to be true, since the longitudinal global strain became non-significant when adjusted to the ejection fraction and to other important echocardiographic variables. Unlike the longitudinal global strain, the Tei index and the E/E′ ratio were statistically significant as independent predictors of myocardial fibrosis. Since myocardial fibrosis increases the left ventricular diastolic pressure, leading to alterations in the left ventricular relaxation, these parameters may be indicative of early cardiac involvement.

One limitation of our study was that a more complex investigation to rule out coronary artery disease was not performed. However, subjects with a history of acute myocardial infarction or chronic coronary artery disease were excluded. In addition, all subjects underwent a treadmill stress test, an exam with a high negative predictive value for subjects without symptoms of ischemic heart disease, and no ischemia was demonstrated.

It is already known that the evaluation of LV function is crucial in subjects with Chagas disease, as ventricular dysfunction is an independent predictor of mortality in this group of subjects [20]. We studied the role of the longitudinal global strain as a possible method to add accuracy to ejection fraction in the prediction of myocardial fibrosis, but we did not demonstrate superiority of this new technique, leading to the conclusion that the longitudinal global strain has no incremental value to conventional ejection fraction measurement in subjects with Chagas disease. Since every new technique comes up with a great enthusiasm in its use, even before strong scientific evidence confirms its usefulness, it is crucial to develop studies testing a new method against other well-established ones, in order to have a critical view of the diagnostic exams available in clinical practice.

Funding

This work was financially supported by FAPESB: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (00003841).

Conflicts of interest

None.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Kyan James Allahdadi for a careful review of the manuscript.

References

[1] Andrade ZA, Andrade SG, Oliveira GB, Alonso DR. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. Am Heart J 1978;95(3):316–24.
[2] Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Avila LF, et al. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. J Am Coll Cardiol 2005;46(8):1553–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.067 [published Online First: Epub Date].
[3] Mello RP, Szarf G, Schvartzman PR, Nakano EM, Espinosa MM, Szejnfeld D, et al. Delayed enhancement cardiac magnetic resonance imaging can identify the risk for ventricular tachycardia in chronic Chagas' heart disease. Arq Bras Cardiol 2012;98(5):421–30.
[4] Wagner A, Mahrholdt H, Holly TA, Elliott MD, Regenfus M, Parker M, et al. Contrast-enhanced MRI and routine single photon emission computed tomography (SPECT) perfusion imaging for detection of subendocardial myocardial infarcts: an imaging study. Lancet 2003;361(9355):374–9. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12389-6 [published Online First: Epub Date].
[5] Rochitte CE, Lima JA, Bluemke DA, Reeder SB, McVeigh ER, Furuta T, et al. Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction. Circulation 1998;98(10):1006–14.
[6] McCrohon JA, Moon JC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJ, et al. Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. Circulation 2003;108(1):54–9. http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000078641.19365.4C [published Online First: Epub Date].
[7] Blessberger H, Binder T. Two dimensional speckle tracking echocardiography: clinical applications. Heart 2010;96(24):2032–40. http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2010.199885 [published Online First: Epub Date].
[8] Koyama J, Ray-Sequin PA, Falk RH. Longitudinal myocardial function assessed by tissue velocity, strain, and strain rate tissue Doppler echocardiography in patients with AL (primary) cardiac amyloidosis. Circulation 2003;107(19):2446–52. http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000068313.67758.4F [published Online First: Epub Date].
[9] Richand V, Lafitte S, Reant P, Serri K, Lafitte M, Brette S, et al. An ultrasound speckle tracking (two-dimensional strain) analysis of myocardial deformation in professional soccer players compared with healthy subjects and hypertrophic cardiomyopathy. Am J Cardiol 2007;100(1):128–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.02.063 [published Online First: Epub Date].
[10] Lafitte S, Perlant M, Reant P, Serri K, Douard H, DeMaria A, et al. Impact of impaired myocardial deformations on exercise tolerance and prognosis in patients with asymptomatic aortic stenosis. Eur J Echocardiogr 2009;10(3):414–9. http://dx.doi.org/10.1093/ejechocard/jen299 [published Online First: Epub Date].
[11] García-Álvarez A, Sitges M, Regueiro A, Poyatos S, Jesus Pinazo M, Posada E, et al. Myocardial deformation analysis in Chagas heart disease with the use of speckle tracking echocardiography. J Card Fail 2011;17(12):1028–34. http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2011.08.007 [published Online First: Epub Date].
[12] Brown J, Jenkins C, Marwick TH. Use of myocardial strain to assess global left ventricular function: a comparison with cardiac magnetic resonance and 3-dimensional echocardiography. Am Heart J 2009;157(1):102.e1–5. http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2008.08.032 [published Online First: Epub Date].
[13] Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr 2005;18(12):1440–63. http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2005.10.005 [published Online First: Epub Date].
[14] Leitman M, Lysyansky P, Sidenko S, Shir V, Peleg E, Binenbaum M, et al. Two-dimensional strain—a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. J Am Soc Echocardiogr 2004;17(10):1021–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2004.06.019 [published Online First: Epub Date].
[15] Marwick TH. Should we be evaluating the ventricle or the myocardium? Advances in tissue characterization. J Am Soc Echocardiogr 2004;17(2):168–72. http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2003.10.021 [published Online First: Epub Date].
[16] Belghitia H, Brette S, Lafitte S, Reant P, Picard F, Serri K, et al. Automated function imaging: a new operator-independent strain method for assessing left ventricular function. Arch Cardiovasc Dis 2008;101(3):163–9.
[17] Nahum J, Bensaid A, Dussault C, Macron L, Clémence D, Bouhemad B, et al. Impact of longitudinal myocardial deformation on the prognosis of chronic heart failure patients. Circ Cardiovasc Imaging 2010;3(3):249–56. http://dx.doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.109.910893 [published Online First: Epub Date].
[18] Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, et al. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. J Am Coll Cardiol 2006;47(4):789–93. http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.10.040 [published Online First: Epub Date].
[19] Regueiro A, García-Álvarez A, Sitges M, Ortiz-Pérez JT, De Caralt MT, Pinazo MJ, et al. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. Int J Cardiol 2013;165(1):107–12. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.07.089 [published Online First: Epub Date].
[20] Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. N Engl J Med 2006;355(8):799–808. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa053241355/8/799 [pii] [published Online First: Epub Date].

7 DISCUSSÃO

A doença de Chagas foi descoberta em 1908, no Brasil, pelo pesquisador Carlos Chagas, que descreveu no artigo clássico publicado em 1909, não somente a forma clínica característica da doença, mas também o seu agente causador, o principal mecanismo de transmissão e a inoculação transcutânea do parasito por excrementos de insetos hematófagos infectados[19]. É reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das principais doenças negligenciadas pelo mundo, de elevada morbimortalidade e significativo impacto econômico, representando ainda um importante problema de saúde pública no Brasil, a despeito dos avanços no controle do vetor e na garantia de qualidade das transfusões de sangue, especialmente a partir de iniciativas intergovernamentais deflagradas na década de 1990[23,91]. A doença de Chagas também não desponta como uma doença importante na literatura médica, havendo escassez de estudos clínicos com robustez metodológica. Entretanto, nas últimas décadas, um conjunto de publicações experimentais, fruto das investigações científicas motivadas pelos objetivos dessa tese, vem contribuindo no desenvolvimento do conhecimento a respeito do entendimento do processo etiológico da fibrose miocárdica na doença de Chagas.

Estudos anteriores sugeriram que os macrófagos ativados secretam galectina-3, uma molécula envolvida na patogênese da disfunção cardíaca. Galectina-3 é uma lectina de ligação de *b*-galactósideo solúvel envolvida em uma variedade de processos celulares, incluindo proliferação, migração e a apoptose[66]. A importância desta proteína na regulação da fibrose cardíaca e remodelação foi destacada pela demonstração de sua contribuição para o desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca em diferentes contextos experimentais[92]. Optamos por avaliar a galetcina-3 como potencial biomarcador visando identificação de indivíduos com maior grau de fibrose, no cenário de doença de Chagas, por suas características intrínsecas ligadas aos processos patológicos envolvidos na gênese da fibrose e pela potencialidade de inibição farmacológica com consequente inibição da inflamação[93].

A galectina-3 foi avaliada em uma série de estudos experimentais na doença de Chagas. Durante as fases aguda e crônica da doença, a mesma atua nos processos envolvidos na relação parasito-hospedeiro que incluem desde mecanismos de infecção até a regulação da resposta imune, fibrose e remodelamento cardíaco[63–65,67,75,78]. Em estudos anteriores foi avaliado, por nosso grupo, o envolvimento da galectina-3 na patogênese da doença de Chagas, reforçando a sua

participação na migração celular, proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, produção de fatores fibrogênicos e de mediadores inflamatórios, dentre outros[79,94]. Concluindo, então, que a galectina-3 tem papel importante tanto na inflamação, que causa a destruição progressiva do miocárdio, quanto na fibrose, duas características marcantes na cardiomiopatia chagásica. No entanto, em um dos artigos dessa tese, não foi observado relação entre a mensuração sérica da galectina-3 e o grau de fibrose miocárdica *in vivo* avaliado pela técnica de realce tardio à ressonância magnética cardíaca[95]. O nível sérico de galectina-3 foi similar nas diferentes formas da doença de Chagas não havendo relação com o percentual de área acometida por fibrose no miocárdio. Embora a porcentagem média de fibrose tenha variado entre as diferentes formas clínicas da doença, a concentração mediana de galectina-3 foi quase idêntica em todos os três grupos. Os indivíduos com a forma cardíaca e disfunção ventricular apresentaram maior porcentagem de fibrose miocárdica em comparação com indivíduos sem envolvimento cardíaco, mas a concentração de galectina-3 não foi significativamente diferente. Esse dado reduz o papel da galectina-3 de possível marcador biológico do processo fibrótico no miocárdico.

A galectina-3 não foi utilizada, até o momento, como marcador de fibrose e sim como marcador prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca[92,96]. O papel da galectina-3 circulante como biomarcador na insuficiência cardíaca de diferentes etiologias tem sido apoiado por estudos que mostraram que a elevação da concentração de galectina-3, após o ajuste para outras variáveis, está associada a um pior prognóstico[97,98]. No entanto, esses estudos têm limitações quanto ao tamanho amostral ou ao número e tipo de variáveis incluídas em seus modelos para análise multivariada[68]. Em contraste com os dados disponíveis, Felker e *cols.*, em uma coorte com maior tamanho amostral e com ajuste para variáveis clínicas e NT-proBNP, demonstrou que a galectina-3 não é capaz de prever desfechos em indivíduos com insuficiência cardíaca[74]. Além disso, Srivatsan e *cols.*, em uma revisão sistemática recente, considerou que a galectina-3 é ineficaz na predição da mortalidade quando foram consideradas na análise variáveis como a taxa de filtração glomerular, fração de ejeção do ventrículo esquerdo e NT-proBNP[99].

Podemos concluir então, que evidências mais atuais do uso da galectina-3 não parece ser adequado na predição prognóstica de indivíduos com insuficiência cardíaca, assim como, não deve ser considerada como marcador de fibrose miocárdica. Os estudos, que mostraram resultados favoráveis, foram pequenos e sem poder pelo tamanho amostral e não ajustados para potenciais variáveis confundidoras. Estudos que usaram coortes maiores e covariáveis mais

robustas em suas análises mostraram que a galectina-3 não conseguiu prever desfechos clínicos. Tendo em visto os dados descritos, consideramos ser necessário ensaios maiores para obtermos uma visão profunda sobre o potencial do uso da galectina-3 como biomarcador com capacidade prognóstica em pacientes com insuficiência cardíaca.

Posteriormente, exploramos o papel do polimorfismo genético da galectina-3 como determinante da extensão da fibrose miocárdica. Estudos prévios avaliaram a susceptibilidade genética à doença de Chagas em humanos. Polimorfismos de moléculas envolvidas no dano ao hospedeiro, induzidas pelo parasita, foram determinados em indivíduos com a doença, tais como IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α, e IFN-γ, demonstrando a associação entre polimorfismo genético e o desenvolvimento de cardiomiopatia na fase crônica[100–105]. Assim como, já é de conhecimento prévio a existência de variantes genéticas em dois sítios de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene da galectina-3 (rs4644 e rs4652, correspondendo a *LGALS3* +191 A>C e *LGALS3* +292 A>C, respectivamente) sendo capazes de alterar os níveis da proteína[106]. A galectina-3 exerce um importante papel no processo de inflamação e fibrose sendo que a relação entre SNPs no gene que codifica a galectina-3 e variações fenotípicas na doença de Chagas ainda não havia sido avaliada. Nossa hipótese era a de que SNPs no gene que codifica a galectina-3 poderiam influenciar o desenvolvimento de formas cardíacas mais graves da doença. Entretanto, não foi encontrada diferença na prevalência de qualquer dos genótipos nas diferentes formas da doença de Chagas. Apesar de termos demonstrado que a frequência de *LGALS3* +191C e *LGALS3* + 292C foi relativamente maior nos indivíduos com a forma cardíaca da doença, o genótipo CC, pelo menos para SNP rs4644, foi relativamente mais frequente entre os indivíduos com a forma indeterminada. Assim, não se confirmou um possível papel na presença do genótipo CC ou do genótipo AA para ambos SNPs como fator protetor ou de risco para o desenvolvimento da forma cardíaca da doença. Similarmente, não se observou relação entre os polimorfismos genéticos no gene que codifica a galectina-3 e a frequência de fibrose miocárdica, não havendo diferença na mediana de fibrose miocárdica entre os indivíduos com os genótipos AA, AC e CC dos SNPs em questão[107].

A associação entre a atividade inflamatória pronunciada, a disfunção autonômica e a atividade metabólica fazem com que haja uma fisiopatologia única que torna a cardiomiopatia chagásica diferentes de outras formas de cardiomiopatias[2]. O pior prognóstico é atribuído ao dano contínuo do miocárdio devido à persistência do parasita e mecanismos imunomediados, levando a fibrose intersticial intensa em todo o miocárdio. A identificação do paciente da forma

indeterminada propenso a evoluir para a forma crônica serviria de base para pesquisa de estratégias preventivas e um melhor entendimento dos processos patológicos que levam a esta evolução. No entanto, não há marcadores nem modelos preditores capazes de estimar o risco de evolução para a forma crônica. Estudos prévios têm demonstrado que, mesmo pacientes com forma indeterminada, podem apresentar fibrose miocárdica quando testados por ressonância magnética cardíaca. No entanto, são poucos os dados disponíveis quanto ao grau de fibrose miocárdica apresentada por estes indivíduos, o que guardaria relação com o potencial desta variável na predição de evolução para forma cardíaca. O intuito de um dos artigos que compõem esta tese foi descrever a frequência e extensão da fibrose miocárdica avaliada por ressonância magnética cardíaca em pacientes da forma indeterminada.

Dados anteriores validaram a quantificação de fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca na população portadora de doença de Chagas[15,108]. Rochitte e *cols*., em 2005, avaliou a ressonância cardíaca, com o uso da técnica de realce tardio, em 51 pacientes com cardiopatia chagásica, descrevendo fibrose em 68,6% de todos os indivíduos e em 100% naqueles com taquicardia ventricular[109]. Enquanto Regueiro e *cols*. relatou fibrose em 7,4% na forma indeterminada, 15,8% na forma cardíaca sem disfunção ventricular e 52,4% naqueles com disfunção ventricular em pacientes que vivem fora da zona endêmica da doença[16]. Foi encontrado em nosso trabalho, percentual de acometimento de fibrose similar ao estudo anterior (64%), demonstrando também progressivo acometimento nos pacientes com disfunção do VE (92%). Entretanto, somando-se aos estudos anteriores, nossos dados demonstram prevalência de realce, assim como o percentual de área acometida por fibrose, similar entre a forma indeterminada e a forma sem disfunção do VE. Neste estudo o percentual de acometimento de fibrose na forma indeterminada (41,2%) foi semelhante ao percentual na forma cardíaca sem disfunção do VE (43,8%), dado esse não relatado previamente. Concluímos, que, a presença de fibrose na forma indeterminada da doença de Chagas tem frequência e extensão semelhante à forma cardíaca sem disfunção, o que sugere que a primeira faz parte de um espectro de doença subclínica, ao invés da ausência de acometimento cardíaco. Dentro deste espectro, as formas indeterminada e cardíaca sem disfunção, assemelham-se entre si e se diferenciam significativamente da forma cardíaca com disfunção.

Por outro lado, nos últimos anos, a caracterização tecidual pela ressonância magnética cardíaca deixou de ser apenas qualitativa e passou a ser medida de forma objetiva através de mapas paramétricos dos valores de T1 e T2. Esses mapas permitiram a mensuração de áreas de edema, inflamação, cicatrizes e, sobretudo, da avaliação de alterações miocárdicas sistêmicas que

ocorrem no espaço extracelular cuja identificação não era possível até então por outras técnicas ou demais métodos de imagem. Nesse tipo de avaliação quantitativa determinado segmento do miocárdio pode ser examinado através da aquisição da mesma imagem com diferentes modulações de variáveis que permitam obter vários pontos e realizar um ajuste da curva apropriada para se obter um valor objetivo. Destacamos que uso dos mapas de T1 e T2 na investigação do infarto agudo e crônico são utilizados não só para identificação das áreas de infarto *per se*, mas também da área sob risco adjacente, edema e obstrução microvascular[110]. A utilização de mapas de T1 e T2 na prática clínica ainda está relativamente limitada em razão do processo evolutivo técnico que esses métodos veem sofrendo nos últimos anos. Não realizamos em nosso estudo mapas T1 e T2 com a finalidade de detectar acometimento mais incipiente em nossos pacientes. Entretanto, ressaltamos a semelhança do padrão de fibrose miocárdica entre as formas indeterminada e cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo

É sabido que a área acometida por fibrose no miocárdio tem uma correlação inversa com o volume diastólico final e sistólico final, o que levantou a possibilidade de utilizarmos a ecocardiografia como um possível método para avaliar indiretamente fibrose miocárdica[(109)]. O uso de uma ferramenta simples, amplamente disponível e não invasiva em detectar fibrose miocárdica em pacientes com fração de ejeção normal poderia servir de marcador prognóstico. Sabemos também, que a adição de uma nova técnica apresenta um grande entusiasmo em seu uso, mesmo antes de fortes evidências científicas confirmarem sua utilidade, tornando-se crucial desenvolver estudos testando o método contra outros bem estabelecidos, para termos uma visão crítica dos exames disponíveis na prática clínica. Neste contexto, avaliamos a ecocardiografia bidimensional com o uso da técnica de *speckle tracking*, uma nova ferramenta que fornece uma avaliação da deformação miocárdica e da torção ventricular esquerda de forma incipiente com possibilidade de detectar lesão subclínica[(111)]. Sendo assim, testamos a hipótese de que a ecocardiografia bidimensional com o uso da técnica de *speckle tracking* adicionaria precisão a fração de ejeção na predição da fibrose miocárdica. Entretanto, não demonstramos superioridade desta nova técnica, levando à conclusão de que a *strain* global longitudinal não possui valor incremental para medição de fração de ejeção convencional em indivíduos com doença de Chagas[(112)].

8 DESCRIÇÃO DA EXPERIÊNCIA CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

O último senso disponível do Ensino Superior no Brasil indica que mais de 8 milhões de pessoas se matricularam em uma instituição de ensino terciário. A procura toma uma proporção sem precedentes na história do país, e como consequência surge também uma procura maior pelos cursos de pós-graduação. Coincidente ou não com o senso disponibilizado, a minha procura pelo aprimoramento profissional e pessoal começou quase que simultaneamente ao ocorrido em nosso país.

Formada pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública em 1988, logo ingressei na residência em clínica médica/cardiologia e comecei a minha vida profissional percebendo que o que mais me fascinava era o ensino e a gestão administrativa. E assim segui em busca de crescimento pessoal e profissional passando a exercer funções ligadas as minhas áreas de interesse. Percebo hoje que cresci na era pré computador. Época na qual a busca por informações dependia de um grande esforço pessoal e da persistência em adquirir novos conhecimentos. Com o passar do tempo percebi um déficit na minha formação acadêmica. Déficit esse, resultado de uma época na qual metodologia científica era um domínio de poucos e não amplamente divulgada, sequer mencionada ou ilustrada em livros ou em nosso curso na universidade. A falta desse domínio em minha formação começou a me impulsionar para busca de novos conhecimentos. Assim, a construção de um novo diferencial caracterizado pelo desenvolvimento de habilidades em novas técnicas e tecnologias de pesquisa e no desenvolvimento do pensamento crítico passou a ser um questionamento diário.

Comecei então, a frequentar cursos disponíveis com a finalidade de aprimoramento técnico em bioestatística e metodologia científica. Logo notei que esta não era o caminho ideal. Precisava conviver com "mentes científicas", aprender a discutir o pensamento científico, rever os conceitos relacionados ao ceticismo, admiração, curiosidade e o empirismo. Por coincidência, foi inaugurado centro dedicado a pesquisa experimental na instituição na qual trabalhava. Ficou claro que a minha aproximação com o grupo foi imediata. Um universo ao qual não estava acostumada: trabalho de "bancada", experimental, até então, não fazia ideia do que iria ocorrer. Comecei a trabalhar de forma mais consistente, iniciando um novo ciclo em minha vida profissional.

Iniciei o mestrado em biotecnologia e pesquisa experimental abrindo um novo universo de conhecimento percebendo, então, que estava no caminho certo. Era esse “algo mais” que precisava e tanto procurava. Após concluir minha dissertação de mestrado, continuei com a sensação de que “faltava algo”. Assim ficou claro que o melhor caminho deveria ser construído em pesquisa clínica. Nessa época comecei a conviver mais diretamente com meu orientador. Meu retorno a “minha casa” ocorreu com a aprovação para o Programa de Doutorado em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Construímos o ambulatório em doença de Chagas no Hospital São Rafael e começamos a acompanhar nossos pacientes assim que disponibilizado o referido recurso do PPSus-Ba vinculado a esta tese.

O meu processo de crescimento se intensificou durante a formatação dessa tese e com a oportunidade de convívio com múltiplos profissionais de diferentes formações. A construção progressiva de novas habilidades e desenvolvimento de competências resultou em meu amadurecimento e crescimento pessoal e profissional. É nesse contexto que desenvolvemos e criamos no programa de residência médica, o qual coordeno, tópicos voltados para o desenvolvimento do raciocínio científico, linhas de pesquisa em insuficiência cardíaca e Chagas, estimulando a constante pesquisa clínica e analise crítica da literatura com aplicação na rotina diária. Hoje continuo com minha busca incessante pelo aprimoramento, mas tendo a certeza de que estou no caminho certo.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A patogênese da doença de Chagas ainda é uma questão de intenso debate. As principais hipóteses etiopatogênicas que foram propostas para explicar a progressão da doença incluem: disautonomia cardíaca, os distúrbios microvasculares, o dano miocárdico parasito-dependente e a lesão miocárdica mediada pelo sistema imune[2]. Entretanto, até hoje essa ainda é uma questão de intenso debate dificultando a identificação de novos alvos terapêuticos. Os motivos pelos quais alguns pacientes permanecem assintomáticos, enquanto outros desenvolvem formas graves da doença, ainda não são completamente conhecidos. No entanto, já foram descritos alguns fatores que podem influenciar este fenômeno, tais como, a cepa do parasito e o tropismo tecidual, a carga parasitária, a genética do hospedeiro, o tempo de infecção e a natureza da resposta imune com maior produção de IFN-*y* e TNF- α e menor produção de IL-10 nos indivíduos que evoluem para formas crônicas sintomática[5,36].

Visando desenvolver estratégias de regeneração do miocárdio na doença de Chagas, nosso grupo de pesquisa, vêm estudando, terapias baseadas no transplante de células-tronco e utilização de hormônios celulares. Essas novas abordagens terapêuticas têm o objetivo de melhorar os parâmetros da função ventricular, reduzir inflamação e fibrose, reduzir arritmias e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. No contexto das terapias celulares, realizamos um estudo com modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica, avaliando os efeitos do transplante com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo[113]. As células-tronco mesenquimais são células com potencial imunomodulador já bem caracterizado[114], sendo, portanto, uma população celular capaz de modular a miocardite chagásica. Apesar de termos observado uma redução significativa no número de células inflamatórias e no percentual de fibrose nos corações de camundongos tratados com células-tronco em comparação aos controles, não observamos melhora nas arritmias ou na função cardiovascular.

Outra terapia para indivíduos com cardiomiopatia chagásica crônica, incluindo pacientes com um perfil menos grave, mas ainda com disfunção de VE, está sendo testada por nossa equipe, em um ensaio clínico randomizado, cego, placebo-controlado, que visa avaliar os efeitos do G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) na melhora da dispneia e qualidade de vida.

O G-CSF é uma citocina pleitrópica que estimula a produção de neutrófilos e liberação de células tronco da medula óssea para circulação. Este fator já vêm sendo usado na prática clínica

para pacientes que cursam com leucopenia em vigência de quimioterapia e transplante de medula óssea, sendo considerada segura e com poucos efeitos colaterais sérios. Em modelos experimentais de doença cardíaca o G-CSF demonstrou efeitos benéficos como aceleração de cicatrização, prevenção de apoptose de miócitos e redução da fibrose miocárdio[115–117]. Serão incluídos 70 pacientes com diagnóstico de doença de Chagas, confirmada por duas sorologias com metodologias diferentes, com idade entre 18 e 70 anos e com disfunção ventricular esquerda em classe funcional II-IV da NYHA. Este ensaio clínico foi embasado em estudos no modelo experimental, conduzidos por nossa equipe, que demonstraram efeitos benéficos da administração de G-CSF em camundongos na fase crônica da doença de Chagas, tais como redução da inflamação e fibrose, redução dos níveis de Gal-3 e melhora da capacidade de exercícios e arritmias[(118,119)].

Continuamos a acompanhar nossa coorte de pacientes pretendendo repetir em 2018 exames de imagem, especificamente, ressonância magnética cardíaca, com o intuito de melhor caracterizar a evolução da fibrose nos portadores da doença de Chagas buscando identificar algum dado que possa adicionar ao conhecimento vigente sobre a forma de progressão da fibrose no miocárdio.

10 CONCLUSÕES

Em portadores de doença de Chagas:

1. A ausência de associação entre o polimorfismo ou valor plasmático de galectina-3 e fibrose miocárdica reduz a expectativa desta proteína como mediador do processo fibrótico miocárdico.

2. A presença de fibrose miocárdica em extensão semelhante à forma cardíaca sem disfunção, sugere a forma indeterminada como processo ativo de doença miocárdica, ao invés de uma fase plenamente latente.

3. Alterações incipientes de contratilidade miocárdica avaliadas pelo *Speckle Tracking Strain* não identificam pacientes com maior potencial para fibrose miocárdica na doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

1. Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Editora FIOCRUZ; 1997.

2. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation. 2007;115:1109–23.

3. Lopes, ER; Tafuri, WL; Capadeiro, E; Lauria Pires, L; Macedo, V; Prata, AL; Tanus R. Doença de Chagas em Cães. Estudo anatomo-patológico de animais naturalmente infectados. Rev Inst Med TropSão Paulo. 1980;22:135–143.

4. Mady C, Pereira-Barretto a. C, Ianni BM, Lopes E a., Pileggi F. Right Ventricular Endomyocardial Biopsy in Undetermined Form of Chagas' Disease. Angiology. 1984; 35:755–759.

5. Marin-Neto JA, Rassi A. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. Rev española Cardiol. 2009;62:1211–6.

6. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Burns C. Cardiac Fibrosis : The Fibroblast Awakens. 2017;118:1021–1040.

7. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: Understanding the role of transforming growth factor-β1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. Immunology. 2006;118:10–24.

8. Edgley AJ, Krum H, Kelly DJ. Targeting fibrosis for the treatment of heart failure: A role for transforming growth factor-β. Cardiovasc Ther. 2012;30:30–40.

9. Hsu DK, Dowling C a., Jeng KCG, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 1999;81:519–526.

10. De Boer R a., Voors A a., Muntendam P, Van Gilst WH, Van Veldhuisen DJ. Galectin-3: A novel mediator of heart failure development and progression. Eur J Heart Fail. 2009;11:811–817.

11. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Hillege HL, Bakker SJL, van der Harst P. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. J Intern Med. 2012;272:55–64.

12. Souza BS de F, Silva DN, Carvalho RH, Sampaio GL de A, Paredes BD, Aragão França L, Azevedo CM, Vasconcelos JF, Meira CS, Neto PC, Macambira SG, da Silva KN, Allahdadi KJ, Tavora F, de Souza Neto JD, dos Santos RR, Soares MBP. Association of Cardiac Galectin-3 Expression, Myocarditis, and Fibrosis in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. Am J Pathol. 2017;187:1134–1146.

13. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. Clin Genet. 2000;58:250–264.

14. Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Avila LF, Kalil-Filho R, Mady C, Meneghetti JC, Lima J a C, Ramires J a F. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. J Am Coll Cardiol. 2005;46:1553–8.

15. Rochitte CE, Nacif MS, de Oliveira Júnior AC, Siqueira-Batista R, Marchiori E, Uellendahl M, de Lourdes Higuchi M. Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. Artif Organs. 2007;31:259–67.

16. Regueiro A, García-Álvarez A, Sitges M, Ortiz-Pérez JT, De Caralt MT, Pinazo MJ, Posada E, Heras M, Gascón J, Sanz G. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. Int J Cardiol. 2013; 5:107–12.

17. Blessberger H, Binder T. Two dimensional speckle tracking echocardiography: clinical applications. Heart. 2010;96:2032–40.

18. Chagas C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen. n.sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159–218.

19. Malafaia G, Rodrigues ASDL. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. Centen do Descob da doença Chagas desafios e Perspect. 2010;43:483–485.

20. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2001;1:92–100.

21. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci. 2004;101:2034–2039.

22. Orrego F, Quintana C. Darwin's illness: a final diagnosis. Notes Rec R Soc Lond. 2007;61:23–9.

23. Coura JR, Dias JCP, Frasch ACC, Guhl F, Lazzari JO, Lorca M, Monroy Escobar C, Ponce C, Silveira AC, Velazquez G, Zingales B. Control of Chagas disease. World Heal Organ - Tech Rep Ser. 2002;1–99.

24. Oostburg BFJ, Anijs JE, Oehlers GP, Hiwat HO, Burke-Hermelijn SM. Case report: The first parasitologically confirmed autochthonous case of acute Chagas disease in Suriname. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97:166–167.

25. Schmunis GA. Prevention of Transfusional Trypanosoma cruzi Infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:93–101.

26. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:75–85.

27. Dobarro D, Gomez-Rubin C, Sanchez-Recalde A, Olias F, Bret-Zurita M, Cuesta-Lopez E, Robles-Marhuenda A, Fraile-Vicente JM, Paño-Pardo JR, Lopez-Sendon J. Chagas' heart disease in Europe: an emergent disease? J Cardiovasc Med. 2008;9:1263–7.

28. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff L V, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. Jama. 2007;298:2171–81.

29. Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. Curr Opin Infect Dis. 2008;21:476–482.

30. Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. Int J Cardiol. 2006;112:132–133.

31. Dias JC, Schofield CJ. The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31:373–83.

32. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiases. Lancet. 2003;362:1469–1480.

33. Andrade SG. Influence of Trypanosoma cruzi strain on the pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85:17–27.

34. Dias JCP. Globalização, iniqüidade e doença de Chagas. Cad Saude Publica. 2007;23:S13–S22.

35. Rassi A. Fase aguda da doença de Chagas. Trypanos Cruzi e Doença Chagas. 2000;2:231–245.

36. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;375:1388–1402.

37. Nunes MCP, Dones W, Morillo C a, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. J Am Coll Cardiol. 2013;62:767–76.

38. Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: A clinical, parasitological and histopathological study. Int J Cardiol. 1997;60:49–54.

39. Bestetti RB, Cardinalli-Neto A. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. Int J Cardiol. 2008;131:9–17.

40. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. Trends Parasitol. 2003;19:495–501.

41. Sartori AM, Lopes MH, Caramelli B, Duarte MI, Pinto PL, Neto V, Amato Shikanai-Yasuda M. Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas' disease in a patient with AIDS. Clin Infect Dis. 1995;21:1297–9.

42. Benatti RD, Oliveira GH, Bacal F. Heart Transplantation for Chagas Cardiomyopathy. J Hear Lung Transplant. 2017; 36(6): 597-603.

43. Andrade LO, Andrews NW. Opinion: The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol. 2005;3:819–823.

44. Nascimento CAS, Gomes VAM, Silva SK, Santos CRF, Chambela MC, Madeira FS, Holanda MT, Brasil PE a a, Sousa AS, Xavier SS, Hasslocher-Moreno AM, Cunha AB, Saraiva RM. Left atrial and left ventricular diastolic function in chronic Chagas disease. J Am Soc Echocardiogr. 2013;26:1424–33.

45. Ribeiro ALP, Campos MS, Baptista LMG, de Sousa MR. The Valsalva maneuver in Chagas disease patients without cardiopathy. Clin Auton Res. 2010;20:79–83.

46. Crema E, Oliveira RM de, Werneck AM, Cruvinel LAF, Terra Júnior JA, Silva AA. Estudo eletromanométrico do esôfago em portadores da doença de Chagas em sua forma indeterminada. Rev Col Bras Cir. 2004;31:107–111.

47. Rossi MA. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. Int J Cardiol. 1991;30:335–340.

48. Andrade SG, Grimaud JA, Stocker-guerret S, Lyon D. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with Trypanosoma cruzi. Am J Tro Med Hyg. 1989;40:252–260.

49. Andrade ZA, Andrade SG, Oliveira GB, Alonso DR. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. Am Heart J. 1978; 95:316–24.

50. Gironès N úria, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: Autoimmunity, parasite persistence, or both? Trends Parasitol. 2003;19:19–22.

51. Mady C, Ianni BM, Arteaga E, Montes GS, Caldini EG, Andrade G, Giorgi MC, Saldiva PH. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. Am J Cardiol. 1999;84:354–6, A9.

52. Regueiro A, García-Álvarez A, Sitges M, Ortiz-Pérez JT, De Caralt MT, Pinazo MJ, Posada E, Heras M, Gascón J, Sanz G. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. Int J Cardiol. 2013;165:107–12.

53. Raimond J, Zimonjic DB, Mignon C, Mattei M-G, Popescu NC, Monsigny M, Legrand A. Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human Chromosome 14 at region 14q21-22. Mamm Genome. 1997;8:706–707.

54. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. Cell Mol Biol Lett. 2004;9:305–28.

55. Lin H-M, Pestell RG, Raz A, Kim H-RC. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. Oncogene. 2002;21:8001–8010.

56. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. J Leukoc Biol. 2001;69:555–64.

57. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. Nature. 2001;409:3789–3794.

58. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. Immunol Rev. 2009;230:114–127.

59. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. Am J Pathol. 1995;147:1016–28.

60. Novak R, Dabelic S, Dumic J. Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2012;1820:1383–1390.

61. Liu GY, Xu Y, Li Y, Wang LH, Liu YJ, Zhu D. Secreted galectin-3 as a possible biomarker for the immunomodulatory potential of human umbilical cord mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2013;15:1208–1217.

62. Sioud M. New Insights into Mesenchymal Stromal Cell-Mediated T-Cell Suppression Through Galectins. Scand J Immunol. 2011;73:79–84.

63. MacKinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, Simpson AJ, Forbes SJ, Hirani N, Gauldie J, Sethi T. Regulation of transforming growth factor-β1-driven lung fibrosis by galectin-3. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185:537–546.

64. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:5060–5065.

65. Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. PLoS One. 2011;6.

66. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, Sethi T. Regulation of Alternative Macrophage Activation by Galectin-3. J Immunol. 2008;180:2650–2658.

67. Sharma UC, Pokharel S, Van Brakel TJ, Van Berlo JH, Cleutjens JPM, Schroen B, André S, Crijns HJGM, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. Circulation. 2004;110:3121–3128.

68. Coburn E, Frishman W. Comprehensive Review of the Prognostic Value of Galectin-3 in Heart Failure. Cardiol Rev. 2014;22:171–175.

69. Sharma UC, Pokharel S, Van Brakel TJ, Van Berlo JH, Cleutjens JPM, Schroen B, André S, Crijns HJGM, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. Circulation. 2004;110:3121–3128.

70. Lok DJ a, Van Der Meer P, de la Porte PWB-A, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. Clin Res Cardiol. 2010;99:323–328.

71. Ho JE, Liu C, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, Larson MG, Levy D. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. J Am Coll Cardiol. 2012;60:1249–1256.

72. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM. Utility of Amino-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide, Galectin-3, and Apelin for the Evaluation of Patients With Acute Heart Failure. J Am Coll Cardiol. 2006;48:1217–1224.

73. Frank Peacock W. How galectin-3 changes acute heart failure decision making in the emergency department. Clin Chem Lab Med. 2014;52:1409–1412.

74. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, Shirolkar SC, Donahue M. Galectin-3 in Ambulatory Patients with Heart Failure: Results from the HF-ACTION Study. Circ Hear Fail. 2013;5:72–78.

75. Moody TN, Ochieng J, Villalta F. Novel mechanism that Trypanosoma cruzi uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. FEBS Lett. 2000;470:305–308.

76. Kleshchenko YY, Moody TN, Vyacheslav a, Ochieng J, Lima MF, Villalta F, Furtak V a. Human Galectin-3 Promotes Trypanosoma cruzi Adhesion to Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells Human Galectin-3 Promotes Trypanosoma cruzi Adhesion to Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. Infect Immun. 2004;72:6717–6721.

77. Cardenas TC, Johnson C a., Pratap S, Nde PN, Furtak V, Kleshchenko YY, Lima MF, Villalta F. Regulation of the extracellular matrix interactome by Trypanosoma cruzi. Open Parasitol J. 2010;4:72–76.

78. Reignault LC, Barrias ES, Soares Medeiros LC, De Souza W, De Carvalho TMU. Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing Trypanosoma cruzi in mouse peritoneal macrophages. Parasitol Res. 2014;113:2323–2333.

79. Soares MBP, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR, Iacobas S, Goldenberg RC, Iacobas DA, Tanowitz HB, de Carvalho ACC, Spray DC. Gene Expression Changes Associated with Myocarditis and Fibrosis in Hearts of Mice with Chronic Chagasic Cardiomyopathy. J Infect Dis. 2010;202:416–426.

80. Ferrer MF, Pascuale CA, Gomez RM, Leguizamón MS. DTU I isolates of Trypanosoma cruzi induce upregulation of Galectin-3 in murine myocarditis and fibrosis. Parasitology. 2014;141:849–858.

81. Pineda MA, Cuervo H, Fresno M, Soto M, Bonay P. Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective Immune Responses in a Murine Model of Trypanosoma cruzi Infection. J Infect Dis. 2015;212:1160–1171.

82. Nangia-Makker P, Raz T, Tait L, Hogan V, Fridman R, Raz A. Galectin-3 Cleavage: A Novel Surrogate Marker for Matrix Metalloproteinase Activity in Growing Breast Cancers. Cancer Res. 2007;67:11760–11768.

83. Balan V, Nangia-Makker P, Schwartz AG, Jung YS, Tait L, Hogan V, Raz T, Wang Y, Yang ZQ, Wu GS, Guo Y, Li H, Abrams J, Couch FJ, Lingle WL, Lloyd R V., Ethier SP, Tainsky MA, Raz A. Racial Disparity in Breast Cancer and Functional Germ Line Mutation in Galectin-3 (rs4644): A Pilot Study. Cancer Res. 2008;68:10045–10050.

84. Trompet S, Jukema W, Mooijaart SP, Ford I, Stott DJ, Westendorp RGJ, de Craen AJM. Genetic variation in galectin-3 gene associates with cognitive function at old age. Neurobiol Aging. 2012;33:2232.e1-2232.e9.

85. Schroen B, Heymans S, Sharma U, Blankesteijn WM, Pokharel S, Cleutjens JPM, Porter JG, Evelo CTA, Duisters R, Van Leeuwen REW, Janssen BJA, Debets JJM, Smits JFM, Daemen MJAP, Crijns HJGM, Bornstein P, Pinto YM. Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: Increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy. Circ Res. 2004;95:515–522.

86. Rochitte CE, Masciarelli I, Pinto F, Fernandes JL, Francisco C, Filho A, Jatene A, Camargo AC de, Ribeiro JP, Antonio J, Ramires F, Oliveira SA, Augusto C, Cattani M, Jasinowodolinsk D, Lucchesi F, Rocha B, Pedroti FC, Szarf G, Monte GU, Roberto I, Andrade J, Rodrigues J, Filho P, Correia LC, Ávila LF, Hadlich M, Zapparoli M, Barbosa M, Mugnaini ML, Helena M, Siqueira A, Uellendhal MM, Abraão M, Neto R, Schwarzman PR, Dias R, Loureiro R, Filho RK, Vieira RDM. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia de ressonância e tomografia cardiovascular. Arq Bras Cardiol. 2006;87:e60–e100.

87. Lima JAC, Judd RM, Bazille A, Schulman SP, Atalar E, Zerhouni EA. Regional Heterogeneity of Human Myocardial Infarcts Demonstrated by Contrast-Enhanced MRI : Potential Mechanisms. Circulation. 1995;92:1117–1125.

88. Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen E-L, Parker MA, Simonetti O, Klocke FJ, Bonow RO, Judd RM. The Use of Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging to Identify Reversible Myocardial Dysfunction. N Engl J Med. 2000;343:1445–1453.

89. Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. N Engl J Med. 2006;355:799–808.

90. Use I. Manual_Galectin_3_ELISA. BG Med Inc, 610N Lincoln Street, Waltham, MA 02451. :1–36.

91. Hotez P, Molyneux D. Control of neglected tropical diseases. N Engl J Med. 2007;357:1018–1027.

92. De Boer RA, Voors AA, Muntendam P, Van Gilst WH, Van Veldhuisen DJ. Galectin-3: A novel mediator of heart failure development and progression. Eur J Heart Fail. 2009;11:811–817.

93. Nangia-Makker P, Nakahara S, Hogan V, Raz A. Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. J Bioenerg Biomembr. 2007;39:79–84.

94. Soares MBP, Lima RS, Souza BSF, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR, Iacobas S, Goldenberg RC, Lisanti MP, Iacobas DA, Tanowitz HB, Spray DC, De Campos Carvalho AC. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. Cell Cycle. 2011;10:1448–1455.

95. Noya-Rabelo MM, Larocca TF, MacÊdo CT, Torreão JA, De Freitas Souza BS, Vasconcelos JF, Souza LE, Silva AM, Dos Santos RR, Correia LCL, Soares MBP. Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy. Cardiol. 2016;136:33–39.

96. Lok D, Klip Ij, Lok SI, Porte PWBA de la, Badings E, van Wijngaarden J, Voors A, Boer R de, van Veldhuisen D, Meer P van der. the Incremental Prognostic Power of Novel Biomarkers in Patients With Severe Chronic Heart Failure. J Am Coll Cardiol. 2013;61:E757.

97. Shah R V., Chen-Tournoux AA, Picard MH, Van Kimmenade RRJ, Januzzi JL. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. Eur J Heart Fail. 2010;12:826–832.

98. Toprak G, Yüksel H, Demirpençe Ö, Islamoglu Y, Evliyaoglu O, Mete N. Fibrosis in heart failure subtypes. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013;17:2302–2309.

99. Srivatsan V, George M, Shanmugam E. Utility of galectin-3 as a prognostic biomarker in heart failure: where do we stand? Eur J Prev Cardiol. 2015;22:1096–1110.

100. Beraún Y, Nieto a, Collado MD, González a, Martín J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. Tissue Antigens. 1998;52:81–3.

101. Costa GC, Rocha MO da C, Moreira PR, Menezes CAS, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. J Infect Dis. 2009;199:451–454.

102. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Faé KC, Buck P, Kalil J, Goldberg AC. Lack of association of tumor necrosis factor-α polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. Immunol Lett. 2007;108:109–111.

103. Flórez O, Martín J, González CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. Parasite Immunol. 2011;33:506–511.

104. Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo Zarate CA, González A, González-Rugeles CI, Martín J. Lack of association between IL-6-174G/C gene polymorphism and Chagas disease. Tissue Antigens. 2010;76:131–134.

105. Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3′ UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. Microbes Infect. 2007;9:1049–1052.

106. Hu CY, Chang SK, Wu CS, Tsai WI, Hsu PN. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. Clin Rheumatol. 2011;30:1227–1233.

107. Cruz G da S, Angelo ALD, Larocca TF, Macedo CT, Noya-Rabelo M, Correia LCL, Torreão JA, Souza BS de F, Santos RR dos, Soares MBP. Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease. Arq Bras Cardiol. 2015;105:472–478.

108. Bocchi EA, Kalil R, Bacal F, de Lourdes Higuchi M, Meneghetti C, Magalhães A, Belotti G, Ramires J a. F. Magnetic Resonance Imaging in Chronic Chagas' Disease: Correlation with Endomyocardial Biopsy Findings and Gallium-67 Cardiac Uptake. Echocardiography. 1998;15:279–288.

109. Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Avila LF, Kalil-Filho R, Mady C, Meneghetti JC, Lima J a C, Ramires J a F. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. J Am Coll Cardiol. 2005;46:1553–8.

110. Fernandes JL. Cardiac Magnetic Resonance Imaging Perspectives - T1 and T2 Maps: Fundamentals and Clinical Utility. Arq Bras Cardiol - Imagem Cardiovasc. 2015;28:175–184.

111. Almeida ALC De, Gjesdal O, Newton N, Choi E-Y, Tura-Teixido G, Yoneyama K, Lima JAC. Speckle-tracking pela ecocardiografia bidimensional: aplicações clínicas. Rev bras ecocardiogr imagem Cardiovasc. 2013;26:38–49.

112. Macedo CT, Larocca TF, Noya-Rabelo M, Correia LCL, Moreira MIG, Caldas AC, Torreão JA, de Freitas Souza BS, dos Santos RR, Soares MBP. Assessment of speckle tracking strain predictive value for myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease. IJC Hear Vasc. 2015;8:75–80.

113. Larocca TF, Souza BS de F, Silva CA, Kaneto CM, Alcantara AC de, Azevedo CM, Castro MF, Macambira SG, Soares MBP, Ribeiro-dos-Santos R. Transplantation of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells in Experimental Chronic Chagasic Cardiopathy. Arq Bras Cardiol. 2013;460–468.

114. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji H-L, Tse H-F, Fu Q-L, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. Cell Death Dis. 2016;7:e2062.

115. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med. 2001;7:430–436.

116. Fazel S, Chen L, Weisel RD, Angoulvant D, Seneviratne C, Fazel A, Cheung P, Lam J, Fedak PWM, Yau TM, Li R-K. Cardioprotective c-kit + cells are from the bone marro and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. J Clin Invest. 2006;31:1865–1877.

117. Theiss HD, Gross L, Vallaster M, David R, Brunner S, Brenner C, Nathan P, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Vogeser M, Steinbeck G, Franz WM. Antidiabetic gliptins in combination with G-CSF enhances myocardial function and survival after acute myocardial infarction. Int J Cardiol. 2013;168:3359–3369.

118. Macambira SG, Vasconcelos JF, Costa CRS, Klein W, Lima RS, Guimaraes P, Vidal DTA, Mendez LC, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. FASEB J. 2009;23:3843–3850.

119. Vasconcelos JF, Souza BSF, Lins TFS, Garcia LMS, Kaneto CM, Sampaio GP, De Alcantara AC, Meira CS, Macambira SG, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP. Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. FASEB J. 2013;27:4691–4702.

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Aprovação pelo Comite de Ética e Pesquisa

	COMUNICAÇÃO INTERNA	Data:	29/09/10
		Nº:	67/10

De:	Comitê de Ética em Pesquisa	Para:	Dra. Milena B P Soares
Ref.	Projeto de Pesquisa Nº 41/10		Pesquisador(a) Responsável

Ref.: Projeto de pesquisa nº 41/10, intitulado "Validação da utilização da galectina-3 como biomarcador para a determinação prognostica de portadores de doença de Chagas"

Prezado (a) pesquisador (a):

Cumpre-nos cientificá-lo (a) que o estudo supracitado, que tem V.Sª como pesquisador (a) responsável, foi apreciado na 132ª reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa – Monte Tabor / Hospital São Rafael, em 29/09/2010, e considerado **aprovado**.

Reiteramos a necessidade de serem encaminhados os relatórios periódicos, a cada seis meses. Caso o projeto seja concluído antes do vencimento de novo período semestral, favor encaminhar o relatório final, o mais breve possível. Estamos à disposição para esclarecimentos, que se fizerem necessários, através dos telefones: (71) 3281-6484 e 3281-6259.

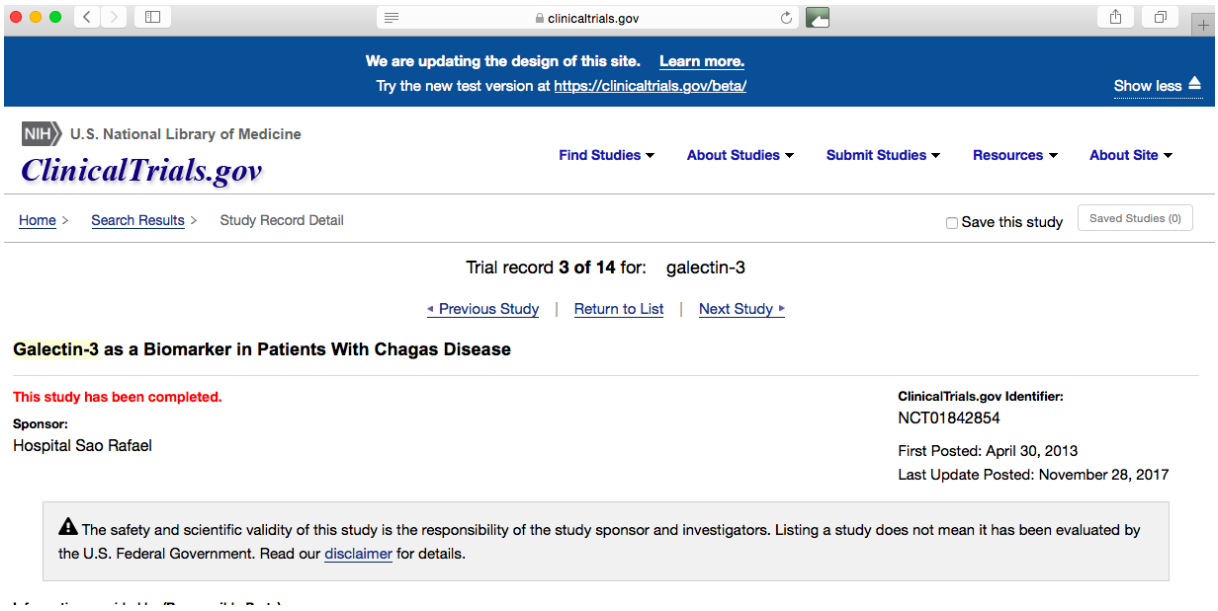
Atenciosamente,

p/ Elima

Dra. Regina Oliveira
Coordenadora do CEP / HSR

Dra. Regina Oliveira
Coordenadora do CEP

Anexo 2 - Inscrição clinicaltrials.gov



Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Validação da utilização da galectina-3 como biomarcador para a determinação prognóstica de portadores de doença de Chagas.

INFORMAÇÕES

Você está sendo convidado para participar deste estudo clínico. As informações a seguir descrevem o estudo e o seu papel como um possível participante. O seu médico irá responder a qualquer pergunta que você possa ter sobre este Termo de Consentimento Livre Esclarecido e sobre o estudo. Você só deve participar depois de ler e entender o Termo de Consentimento Livre Esclarecido e só depende de sua vontade participar ou não. Por favor, leia estas informações com cuidado e se quiser, discuta-as com outras pessoas. Se houver qualquer coisa que não esteja clara pergunte ao seu médico do estudo.

1) Qual é o objetivo do estudo?

O objetivo deste estudo é avaliar se o nível de galectina-3 está aumentado no sangue e corresponde ao grau de fibrose (cicatriz) no coração. Galectina-3 é uma substância produzida por macrófagos (células do sangue) em resposta a inflamação em diversos órgãos. Este cicatriz será medida através de exames de ultra-som do coração (ecocardiograma) e ressonância nuclear magnética.

2) Por que estou sendo convidado para participar?

Você está sendo convidado para participar porque tem o diagnóstico de doença de Chagas, com envolvimento do tecido do coração.

3) Eu tenho que participar?

A sua participação é totalmente voluntária, ou seja, só depende de sua vontade participar ou não. Se você decidir participar, você receberá este

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para guardar e será pedido que você assine e date. Se você decidir participar, você ainda estará livre para mudar de idéia ou desistir a qualquer momento e sem dar motivo. Uma decisão de sair a qualquer momento, ou de não participar, não irá afetar o padrão de atendimento que você recebe.

4) O que irá acontecer comigo se eu participar?

Depois de você ter assinado este termo de consentimento livre e esclarecido, além das visitas médicas programadas para o seu atendimento você será acompanhado pelo médico do estudo, do Serviço de Cardiologia do Hospital São Rafael e do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, no ambulatório de Chagas localizado no Hospital 2 de Julho. Seu acompanhamento constará de exame clínico e exames de sangue (testes laboratoriais). Você também irá realizar ultra-som do coração (ecocardiograma), ressonância núclear magnética do coração e teste de esforço.

Ecocardiograma é um teste sem dor que usa ondas de ultra-som para criar imagens do coração. A ecocardiografia dá ao seu médico informações sobre o tamanho e a forma do coração e como estão trabalhando suas válvulas e câmaras. O teste também pode identificar áreas do músculo cardíaco que não estão contraindo normalmente.

Ressonância magnética é um método de diagnóstico por imagem que não utiliza radiação e permite retratar imagens de alta definição do seu coração. O equipamento que realiza o exame de ressonância trabalha com campo magnético, e, por isso, algumas precauções devem ser tomadas para a realização do exame, como não utilizar jóias e maquiagem. Caso você tenha marca-passo cardíaca você não poderá realizar este exame.

O teste de esforço ou teste ergométrico é o registro da atividade elétrica do coração durante o esforço físico. Além dos achados do eletrocardiograma durante o esforço, este teste permite ainda avaliar o comportamento da pressão arterial, os sintomas percebidos pelo paciente e a sua condição física.

5)Quais são os possíveis riscos, desconfortos ou desvantagens envolvidas?
A ressonância magnética é realizada em um campo fechado e pode causar leve desconforto, com sensação de claustrofobia.

6) Quais são os possíveis benefícios ao participar?
Caso seja comprovado que o valor da galectina-3 tenha correlação com o grau de cicatriz será possível utilizar medicamentos com a intenção de retardar a dilatação do coração.

7) Contatos com informações adicionais
Se você tiver perguntas adicionais sobre os seus direitos como um participante da pesquisa, você deve dirigir-se inicialmente aos investigadores. Caso você tenha perguntas sobre o estudo ou na ocorrência de uma lesão relacionada ao estudo ou se qualquer outro problema surgir, contate Dr^{a}. Márcia Noya no tel. (71) 82079669, ou Dr^{a}. Ticiana Ferreira no tel. (71) 81397806 ou no telefone 32816455.

8) Quem revisou o estudo?
O Comitê de Ética em pesquisa do Hospital São Rafael (que é um grupo de pessoas formado para revisar a ética do estudo e garantir os direitos dos pacientes) revisou e aprovou o protocolo do estudo e a participação do seu médico e equipe da pesquisa.

9) E quanto a autorizar o uso das minhas informações médicas?
O acesso ao seu prontuário médico, bem como atos de auditoria (fiscalização) médica só poderão ocorrer se obedecerem às leis do Brasil e às regras do Conselho Federal de Medicina. As leis brasileiras lhe dão o direito de controlar o uso de suas informações médicas e o acesso a elas. Ainda assim o médico responsável pelo estudo e autoridade responsável por seus prontuários médicos devem estar de acordo com o acesso aos seus registros médicos para que o mesmo aconteça. Os pesquisadores

comprometem-se a manter sigilo sobre seus dados, entretanto, os resultados poderão ser divulgados em publicações de revistas científicas ou em congressos médicos.

_____

Assinatura do Pesquisador Responsável

Salvador, _____/_____/_____/

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.

_____

Assinatura do Participante ou Representante Legal

Impressão dactiloscópica