

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SYNDECAN-4 E DE SEU PAPEL COMO
BIOMARCADOR NA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

TICIANA FERREIRA LARocca

Salvador – Bahia

2016

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SYNDECAN-4 E DE SEU PAPEL COMO
BIOMARCADOR NA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

TICIANA FERREIRA LAROCCA

Orientadora: Prof^a Dr^a Milena Botelho Pereira Soares

Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para
obtenção de grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2016

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

**Obrigada, Leonardo, Catarina, Rafael e Alice,
por tornarem a minha vida mais feliz.**

Este trabalho dedico a vocês.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, aos meus filhos Catarina, Rafael e Alice, que pacientemente abriram mão de muitas horas ao lado de sua mãe, para que ela pudesse dedicar-se a esta pós-graduação.

Ao meu marido, Leonardo Larocca, pelo incansável apoio e incentivo, sem o qual eu certamente não teria concluído este trabalho.

Aos meus pais, Cristina e Luiz Antônio, e aos meus irmãos, Ricardo, Daniel, Luísa e Pedro, nos quais sempre encontro um porto seguro.

À Dra. Milena Botelho Pereira Soares, meu maior exemplo de pesquisadora, minha orientadora e amiga em todos os momentos, por acreditar em meu potencial e por ter me ensinado que é possível melhorar todos os dias.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, meu chefe e amigo, por seu vasto conhecimento e por ter me transmitido a sua paixão pelos estudos sobre a doença de Chagas.

À minha grande amiga, Carolina Thé Macêdo, simplesmente por existir e por fazer parte da minha vida.

Aos amigos Bruno Solano e Clarissa Souza, pelo carinho, pela amizade, pelo apoio, e por compartilharem comigo as alegrias e as dificuldades diárias de se fazer pesquisa no Brasil.

As minhas queridas coordenadoras de estudo clínico, Daniela Paixão e Milena Bezerra, pela organização, por toda a dedicação aos nossos estudos, pelo carinho com os pacientes, e por tornarem o meu trabalho muito mais prazeroso.

À equipe da Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em particular à Sra. Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, por toda a ajuda durante os anos do curso e na conclusão final deste material.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, motivo de orgulho para a população baiana, pela seriedade do seu trabalho e pelo seu compromisso com a saúde coletiva.

Por fim, aos meus pacientes, que confiaram na nossa capacidade de colaborar com o desenvolvimento da ciência, e que se entregaram de corpo e alma à realização deste trabalho.

“E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar. Não tem tempo, nem piedade, nem tem hora de chegar. Sem pedir licença, muda nossa vida, e depois convida a rir ou chorar. Nesta estrada, não nos cabe conhecer ou ver o que virá. O fim dela, ninguém sabe bem ao certo onde vai dar. Vamos todos numa linda passarela, de uma aquarela que um dia, enfim, descolorirá.”

Toquinho.

LAROCCA, Ticiania Ferreira. Avaliação da expressão de syndecan-4 e de seu papel como biomarcador na cardiomiopatia chagásica crônica. 116 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa). – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), doença de elevada morbimortalidade, associada à grave disfunção ventricular e a arritmias cardíacas, caracteriza-se histologicamente por intensa reação inflamatória multifocal, com pronunciada fibrose miocárdica. Diante da ausência de uma terapia eficaz para os pacientes com as formas mais graves da doença, torna-se crucial a descoberta de biomarcadores que possam identificar pacientes em estágios mais precoces, sob risco mais elevado para a progressão da doença. Neste contexto, surge a syndecan-4, uma glicoproteína transmembrana associada à inflamação e fibrose, cujos níveis estão aumentados em indivíduos com insuficiência cardíaca. **OBJETIVO:** Neste trabalho, avaliamos o padrão de expressão da syndecan-4 no tecido cardíaco de camundongos e de indivíduos com cardiomiopatia chagásica e a possível correlação entre a concentração sérica de syndecan-4 com grau de fibrose miocárdica e com fração de ejeção do ventrículo esquerdo em indivíduos com doença de Chagas. **MÉTODOS:** A expressão de syndecan-4 foi avaliada através da contagem de vasos positivos para esta proteína no coração de camundongos em diferentes momentos após a infecção com a cepa colombiana de *T. cruzi*, e em fragmentos de corações explantados de indivíduos com doença de Chagas, cardiomiopatia isquêmica (CMI) e cardiomiopatia dilatada idiopática (CMDI). Também foram determinados nestes tecidos o número de células inflamatórias e o percentual de fibrose miocárdica. Na segunda etapa do trabalho, foi desenvolvido um estudo clínico, no qual foram incluídos 56 indivíduos com doença de Chagas, 8 controles saudáveis e 8 pacientes com insuficiência cardíaca não-chagásica. A concentração sérica de syndecan-4 foi determinada por ELISA. **RESULTADOS:** Evidenciamos expressão de syndecan-4 principalmente nas células musculares lisas, tanto em corações de camundongos quanto em fragmentos de corações humanos. Não foi encontrada correlação entre a expressão de syndecan-4 e inflamação ou fibrose nos corações de indivíduos com CCC. Também comparamos a expressão de syndecan-4 de indivíduos com CCC, CMDI e CMI. Não foram observadas diferenças no número de vasos positivos para syndecan-4/mm² quando comparados os três grupos de indivíduos ($P = 0,466$), tendo sido observada uma diferença estatisticamente significativa no número de células inflamatórias/mm² ($P = 0,035$). No estudo clínico, não foram observadas diferenças nas concentrações de syndecan-4 de acordo com a presença ou ausência de fibrose miocárdica ($P=0,386$) ou entre as três formas de apresentação da doença de Chagas ($P = 0,918$). Do mesmo modo, não houve correlação entre fibrose miocárdica e syndecan-4 ($r = 0,08$, $P = 0,567$) ou entre fração de ejeção do ventrículo esquerdo e syndecan-4 ($r = 0,02$; $P = 0,864$). **CONCLUSÃO:** Apesar de a syndecan-4 estar expressa nos corações tanto de camundongos quanto de seres humanos com doença de Chagas, os nossos dados sugerem que, em sua forma solúvel, esta proteína não possa ser utilizada como biomarcador ou como preditor de fibrose miocárdica para este perfil de pacientes.

Palavras-chave: Chagas, Insuficiência cardíaca, Biomarcador, Patogênese, Syndecan-4.

LAROCCA, Ticiana Ferreira. Evaluation of syndecan-4 expression and its role as a biomarker in chronic chagasic cardiomyopathy. 116 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa). – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

INTRODUCTION: The hallmark of chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is the presence of a multifocal inflammatory reaction, which leads to myocardial fibrosis, often followed by ventricular dysfunction and arrhythmias. Syndecan-4 is a transmembrane glycoprotein associated with inflammation and fibrosis. Syndecan-4 levels are increased in subjects with heart failure and it has been proposed as a biomarker to predict cardiovascular events. The expression of syndecan-4 is increased in the hearts of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, suggesting a role of this protein in the pathogenesis of CCC. **OBJETIVE:** Here we aimed to evaluate the pattern of expression of syndecan-4 in heart tissue of mice and subjects with Chagas cardiomyopathy, and to correlate with the degree of inflammation and fibrosis, as well as to determine the correlation of syndecan-4 serum concentration with the degree of myocardial fibrosis and with left ventricular ejection fraction in subjects with Chagas disease. **METHODS:** We assessed the expression of syndecan-4, inflammation and fibrosis in the hearts of mice at different time points after infection with *T. cruzi* Colombian strain, and in fragments of explanted hearts from subjects with Chagas disease, ischemic cardiomyopathy (ICM) and idiopathic dilated cardiomyopathy (idDCM). The clinical study comprised 56 subjects with Chagas disease, 8 healthy controls and 8 subjects with non-Chagas heart failure, who underwent clinical and complementary assessments. Serum concentration of syndecan-4 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS:** Confocal microscopy analysis showed syndecan-4 expression mainly by smooth muscle in blood vessels of mouse heart and of fragments of explanted human hearts. No correlation between syndecan-4 expression and inflammation or fibrosis was found in the hearts from subjects with CCC. We also compared the expression of syndecan-4 of subjects with CCC, idDCM and ICM. No differences in the number of syndecan-4 positive vessels/mm² were found comparing the three subject groups (P=0.466), whereas a statistically significant difference in inflammation was seen (P=0.035). Additionally, no correlation between syndecan-4 and fibrosis or inflammatory cells was found. In the clinical study, no differences were observed in syndecan-4 concentrations according to the presence or absence of myocardial fibrosis (P=0.386) and among different forms of Chagas disease (P=0.918). Moreover, no correlation was found either between myocardial fibrosis and syndecan-4 (r=0.08; P=0.567) or between left ventricular ejection fraction and syndecan-4 (r=0.02; P=0.864). **CONCLUSION:** Although syndecan-4 is expressed in the hearts of both mice and humans with Chagas disease, our data do not suggest that this protein, in its soluble form, can be used as a biomarker or as a predictor of myocardial fibrosis for this setting of subjects.

Keywords: Chagas, Heart failure, Biomarker, Pathogenesis, Syndecan-4.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AV	Atrioventricular
BDAS	Bloqueio divisional anterossuperior
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
BRD	Bloqueio do ramo direito
BRE	Bloqueio do ramo esquerdo
CASK	Proteínaquinase serina dependente de cálcio/calmomodulina
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CD	Chagas disease
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CK-MB	Creatinoquinase-MB
CMDI	Cardiomiopatia dilatada idiopática
CMI	Cardiomiopatia isquêmica
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fração de ejeção
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
IC	Intervalo de confiança
ICM	Ischemic cardiomyopathy
idDCM	<i>Idiopathic dilated cardiomyopathy</i>

IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP-10	<i>Inducible protein-10</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MMP-2	Matrix metaloproteinase-2
MMP-9	Matrix metaloproteinase-9
MPO	Mieloperoxidase
NT-proBNP	N-terminal pro-peptídeo natriurético cerebral
NYHA	New York Heart Association
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas-BB
PDZ	Domínio protéico de cerca de 70-90 resíduos de aminoácidos, nomeado devido a uma estrutura comum encontrada em proteínas <i>PSD-95</i> , <i>Discs Large</i> , e <i>Zona Occludens</i> .
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC- α	Creatinofosfoquinase-alfa
ROC	Receiver operating characteristic
RNM	Ressonância nuclear magnética
SGL	<i>Strain</i> global longitudinal
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Src	Tirosinaquinase
TGF- β	Fator transformador do crescimento-beta
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloproteinase-1
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloproteinase-2
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

TV	Taquicardia ventricular
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VD	Ventrículo direito
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VSF	Volume sistólico final

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	DOENÇA DE CHAGAS	13
2.1.1	Considerações Gerais	13
2.1.2	Patogênese	16
2.1.3	Fase aguda	18
2.1.4	Fase crônica	19
2.1.5	Diagnóstico	22
2.1.6	Prognóstico	24
2.1.7	Tratamento	25
2.2	BIOMARCADORES	28
2.2.1	Considerações Gerais	28
2.2.2	Syndecan-4	31
3	OBJETIVOS	36
3.1	GERAL	36
3.2	ESPECÍFICOS	36
4	MANUSCRITO I	37
5	MANUSCRITO II	63
6	DISCUSSÃO	82
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é a via final comum da doença de Chagas cardíaca na forma dilatada, e é causa importante de morbimortalidade na América Latina (Dias e Coura, 1997). A terapia para esta doença não é totalmente eficaz na infecção aguda e não contribui para o controle da progressão quando já estabelecida a fase crônica. Nesta fase, o tratamento disponível consiste na terapia padrão para insuficiência cardíaca, arritmias e eventos tromboembólicos, que pouco interfere no processo inflamatório ou na carga parasitária. O transplante cardíaco, necessário em muitos casos, não é uma opção viável para a maioria dos pacientes com CCC devido à elevada demanda, além de acarretar uma série de problemas relacionados à reativação da doença de Chagas e à imunossupressão.

Tanto a resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* quanto a auto-reatividade a antígenos cardíacos têm sido apontadas como possíveis mecanismos desencadeadores do processo patológico responsável pela destruição do tecido cardíaco (SOARES, PONTES-DE-CARVALHO, *et al.*, 2001; SOARES, SILVA-MOTA, *et al.*, 2001; GIRONÈS e FRESNO, 2003). Apesar dos processos que levam ao desenvolvimento da forma crônica não estarem completamente esclarecidos, vários estudos indicam a participação de linfócitos Th1 e alta produção de IFN- γ , que promovem um processo que se assemelha a uma reação de hipersensibilidade tardia (ABEL *et al.*, 2001; SOARES, SILVA-MOTA, *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2014), já tendo sido demonstrada a associação entre progressão para formas crônicas graves e alta produção de IFN- γ em indivíduos portadores de doença de Chagas (GOMES *et al.*, 2003).

O modelo experimental de CCC em camundongos é muito utilizado para a investigação de mecanismos de patogênese da doença, e apresenta também um infiltrado inflamatório composto principalmente por células mononucleares, muitas vezes encontradas aderidas a miofibras (Rosenbaum, 1964). Assim como em humanos, observa-se, nesse modelo, a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ e o TNF- α (REIFENBERG *et al.*, 2007), assim como o aumento da sua expressão gênica nos corações de camundongos chagásicos crônicos (SOARES *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2011). A expressão de genes que codificam a galectina-3 e a syndecan-4, proteínas associadas à inflamação e fibrose, também estão aumentadas no coração de camundongos com CCC, sendo essa expressão modulada pela terapia com células de

medula óssea (SOARES *et al.*, 2011) e pelo tratamento com G-CSF (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Tanto a galectina-3 quanto a syndecan-4 têm sido apontadas como possíveis biomarcadores de doenças cardíacas (CARRASCO SÁNCHEZ, 2011; TAKAHASHI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014). Enquanto que o papel da galectina-3 na doença de Chagas têm sido bastante estudado pelo nosso grupo de pesquisas (SOARES *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2013; CRUZ *et al.*, 2015; NOYA-RABELO *et al.*, 2016) e por outros autores (PINEDA *et al.*, 2015; NOVAES *et al.*, 2016), pouco se sabe sobre a importância da syndecan-4 na CCC.

A syndecan-4 é uma proteína transmembrana que participa de diversos processos celulares, incluindo a modulação da sinalização de FGF2, a regulação da migração celular e o controle da adesão celular (TKACHENKO *et al.*, 2005). Em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica, a expressão gênica de syndecan-4 foi reduzida após tratamento dos animais com células mononucleares de medula óssea (SOARES *et al.*, 2011) e com G-CSF (VASCONCELOS *et al.*, 2013), em ambos os trabalhos tendo sido demonstrada a redução da inflamação e da fibrose miocárdica nos animais tratados. Em estudos clínicos, o aumento nos níveis de syndecan-4 tem sido associado ao infarto agudo do miocárdio (KOJIMA *et al.*, 2001) e à insuficiência cardíaca crônica (TAKAHASHI *et al.*, 2011), sugerindo que esta molécula também pode atuar como um biomarcador em doenças cardíacas.

Tendo em vista a ausência de marcadores que possam auxiliar no acompanhamento de indivíduos portadores de doença de Chagas e sua evolução para as formas graves da CCC (KEATING *et al.*, 2015), o objetivo desse trabalho foi estudar a expressão de syndecan-4 em animais e em indivíduos portadores de doença de Chagas crônica, visando determinar sua participação na patogênese da doença e sua possível utilidade como biomarcador na CCC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Considerações Gerais

A doença de Chagas foi descoberta em 1909, pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, que descreveu não apenas seu agente etiológico, mas também os seus vetores, os principais reservatórios, os mecanismos de infecção e a sua apresentação clínica na fase aguda (CHAGAS, 1909). Também conhecida como tripanossomíase americana, é desencadeada após a infecção pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à classe Kinetoplastidae, ordem Trypanosomatida, e família Trypanosomatidae.

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde, com base nos dados de 2010, existem cerca de 6 milhões de indivíduos infectados com *T. cruzi* na América Latina, dos quais 62,4% são procedentes de países do Cone Sul, sendo Argentina, Brasil e México os países de maior prevalência de infecção (WHO, 2015). A atual prevalência global da infecção por *T. cruzi* é em torno de 8 a 10 milhões de indivíduos, número ainda alarmante, porém considerado um progresso substancial no controle da doença, cuja prevalência estimada no ano de 1991 era de 18 milhões, quando começou a iniciativa do Cone Sul (RASSI e MARIN-NETO, 2010).

Nas últimas décadas, o perfil epidemiológico da doença tem mudado drasticamente devido ao processo de migração, que levou não apenas à urbanização da doença, mas também à sua expansão para áreas anteriormente não afetadas (WHO, 2010). Milhares de indivíduos infectados saíram de cidades rurais endêmicas na América Latina, e atualmente vivem nos Estados Unidos, na Espanha e em outros países não endêmicos (GASCON *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* estima que existam mais de 300 mil pessoas infectadas, com cerca de 30 a 45 mil indivíduos sendo portadores de cardiomiopatia chagásica não diagnosticada (BERN e MONTGOMERY, 2009). Nesse país, devido ao baixo índice de suspeição clínica para a doença de Chagas, muitos casos deixam de ser diagnosticados, e mulheres sob risco de transmissão congênita da doença deixam de ser triadas (STIMPERT e MONTGOMERY, 2010; Verani *et al.*, 2010).

No Brasil, uma revisão sistemática recente mostrou que a prevalência de doença de Chagas entre os estudos, no período avaliado, foi de 4,2% (95% IC: 3,1–5,7), variando de 4,4% (95% IC: 2,3–8,3) nos anos 80 a 2,4% (95% IC: 1,5–3,8) após o ano 2000. Mulheres (4,2%; 95% IC: 2,6–6,8), indivíduos com mais de 60 anos (17,7%; 95% IC: 11,4–26,5), regiões Nordeste (5,0%; 95% IC: 3,1–8,1) e Sudeste (5,0%; IC: 2,4–9,9) tiveram as prevalências mais elevadas. Estima-se que cerca de 4,6 milhões (95% IC: 2,9–7,2 milhões) estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

Além da relevância clínica e epidemiológica da doença de Chagas, deve ser também considerada a sua relevância econômica, visto que acomete indivíduos na sua fase mais produtiva, ocasiona importante limitação funcional e tem elevada mortalidade. Estudo publicado em 2013 demonstrou que os custos globais com a doença de Chagas giram em torno de 7,2 bilhões de dólares por ano. O impacto econômico da doença é semelhante ou superior ao de outras doenças proeminentes, como, por exemplo, a infecção por rotavírus, com custo anual de 2 bilhões de dólares, e o câncer cervical, com custo anual de 4,7 bilhões de dólares (LEE *et al.*, 2013).

A principal forma de transmissão dessa zoonose é a vetorial, que ocorre em 80 a 90% dos casos, sendo a doença adquirida através das fezes contaminadas de triatomíneos, insetos hematófagos popularmente conhecidos como “barbeiros” (CARCANVALLO *et al.*, 2001). Nos países do Cone Sul, os principais vetores são o *Triatoma infestans*, o *Triatoma brasiliensis*, e o *Panstrongylus megistus*.

Nos países onde a doença de Chagas não é endêmica, a via mais provável de transmissão é a transfusão sanguínea, que tem crescido devido ao grande número de imigrantes latino-americanos que fazem doações de sangue sem prévia triagem sorológica (WENDEL, 2010). A triagem sorológica para *T. cruzi* já é uma realidade na maioria dos bancos de sangue de países endêmicos da América Latina e dos Estados Unidos, reduzindo os índices de transmissão através de transfusões sanguíneas.

Com o controle do principal vetor, o *Triatoma infestans*, na América Latina, e a obrigatoriedade de triagem sorológica para a doença de Chagas em bancos de sangue, em alguns países endêmicos, incluindo o Brasil, a via oral tem se tornado a forma de transmissão mais comum da doença (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012). Essa é uma questão de suma importância, principalmente pelo aspecto de imprevisibilidade dos surtos da doença, o que dificulta as medidas de prevenção, e pelo fato de que, nestes casos, a mortalidade é mais elevada, em virtude da carga parasitária usualmente alta e da grande permeabilidade da mucosa do trato gastrointestinal (PEREIRA *et al.*, 2009; RASSI e MARIN-NETO, 2010).

Casos de transmissão oral, por ingestão de alimentos contaminados, foram descritos principalmente na região da Amazônia (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012), mas também em Santa Catarina e em alguns outros estados do Brasil (BRITO, 2008), determinando surtos da doença. Estudo publicado em 2008 descreve 7 casos de doença de Chagas aguda, na

cidade de Macaúbas – BA, com letalidade de 28,6%, provavelmente associada a ingestão de água contaminada com fezes de triatomíneos, sendo que 50% dos *Triatoma sordida* encontrados nos domicílios dos casos ou nas proximidades estavam contaminados com *T. cruzi* (DIAS *et al.*, 2008). Dois anos depois, outro trabalho descreve mais 6 casos ocorridos na Bahia, na cidade de Ibipitanga, poucos meses após o surto em Macaúbas, apontando os desfechos clínicos e as alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas encontradas nos pacientes antes e após o tratamento com benzonidazol (BASTOS *et al.*, 2010).

Outras formas de transmissão, principalmente em países não endêmicos, são o transplante de órgãos de indivíduos infectados para não infectados, sem a triagem para a doença de Chagas (WALLACE *et al.*, 2013), e acidentes de laboratório, que são cada vez menos frequentes, em virtude da disseminação de treinamentos e do estabelecimento de padrões de qualidade nos diversos serviços (RASSI e MARCONDES DE REZENDE, 2012).

2.1.2 Patogênese

Apesar de ainda não completamente esclarecidos, os principais mecanismos até o momento descritos como responsáveis pela patogênese da doença de Chagas são a disautonomia cardíaca, os distúrbios microvasculares, o dano miocárdico parasito-dependente e a lesão miocárdica mediada pelo sistema imune (MARIN-NETO *et al.*, 2007). Na fase aguda, a lesão tecidual decorre da elevada parasitemia com intenso parasitismo nos tecidos, e da pronunciada resposta imune inflamatória ao parasito. A miocardite é difusa e intensa, havendo edema intersticial, necrose dos miócitos, dilatação vascular e infiltrado de células inflamatórias, levando a uma miocardite fibrosante crônica, com progressivo desarranjo no sistema de condução cardíaco e redução da função contrátil ventricular (ROSSI, 1991).

Em meados do século passado, estudos sistemáticos foram conduzidos pelo patologista austríaco Fritz Köberle, que padronizou a técnica de contagem neuronal intramural cardíaca por microscopia, tendo descrito intensa perda neuronal em pacientes portadores da doença de Chagas (KÖBERLE, 1968). O dano ganglionar e a redução na contagem neuronal intramural foram confirmados não apenas por outros investigadores que utilizaram o mesmo método, mas também através de outras abordagens em autópsias (MOTT e HAGSTROM, 1965; OLIVEIRA, 1985). A

disfunção autonômica pode contribuir para algumas das complicações da fase crônica da doença, como, por exemplo, morte súbita, pela denervação parassimpática; desenvolvimento de áreas discinéticas nos ventrículos, pela falta do mecanismo vagal responsável pelos rápidos ajustes cronotrópicos; e vasoespasma circulatório (MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Em modelos murinos de cardiopatia chagásica, as alterações microcirculatórias incluem a ocorrência de trombos plaquetários oclusivos em artérias epicárdicas e intramurais, levando à isquemia miocárdica detectada por técnicas histoquímicas (ROSSI *et al.*, 1984; ROSSI e CAROBREZ, 1985). Cerca de 20 a 30% dos pacientes portadores de doença de Chagas apresentam dor torácica anginosa, porém sem relação com esforços e não aliviada por nitrato. Do mesmo modo que em doença arterial coronariana, muitos pacientes apresentam alterações da contratilidade segmentar, porém sem evidências angiográficas de doença obstrutiva ao nível das artérias epicárdicas (FEIT *et al.*, 1983).

Quanto à presença de dano miocárdico induzido pelo parasito, alguns trabalhos não demonstraram uma correlação entre a presença de parasitos ou de seus antígenos, na forma aguda, e o grau de inflamação no tecido cardíaco de pacientes com a cardiomiopatia chagásica crônica (BARBOSA JUNIOR e ANDRADE, 1984; JONES *et al.*, 1993), à despeito da utilização de técnicas tão sensíveis quanto PCR e imunoistoquímica (OLIVARES-VILLAGÓMEZ *et al.*, 1998; PALOMINO *et al.*, 2000).

Entretanto, alguns autores demonstraram a importância direta da continuidade do parasito no desenvolvimento da cardiopatia crônica, a partir da observação de que reinfecções e exposição contínua ao agente etiológico provocam uma piora da doença em modelos experimentais e em estudos clínicos (HIGUCHI *et al.*, 2003; KIERSZENBAUM, 2005). Um estudo prévio evidenciou que camundongos reinfectedados com a mesma cepa ou com uma cepa diferente de *T. cruzi* tiveram uma incidência maior de alterações graves ao eletrocardiograma, quando comparados aos animais que foram infectados apenas uma vez (BUSTAMANTE *et al.*, 2002).

Além disso, foi demonstrado que os tratamentos que reduzem a carga parasitária, como a terapia com benzonidazol e nifurtimox, acarretam amenização dos sinais da doença em estudos clínicos (VIOTTI *et al.*, 2006; FABBRO *et al.*, 2007) e em modelos experimentais (ANDRADE *et al.*, 1991; GARCIA *et al.*, 2005), ocorrendo o oposto quando uma terapia imunossupressora é utilizada (RASSI *et al.*, 1997), ou em situações nas quais existe um aumento da parasitemia, como, por exemplo, em pacientes imunodeficientes (RASSI *et al.*, 1997; SARTORI *et al.*, 2007).

Diante dessas evidências, atualmente parece haver um consenso de que a persistência do parasito e a resposta imune desencadeada pelo parasito desempenham um papel crucial na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica (TARLETON, 2001; MARIN-NETO *et al.*, 2007; RASSI e MARIN-NETO, 2010).

Outro mecanismo importante que contribui para a patogênese da lesão tecidual na doença de Chagas é a resposta imune inflamatória do hospedeiro, com produção de autoanticorpos (SOARES, PONTES-DE-CARVALHO, *et al.*, 2001). Já foram demonstradas evidências de papel patogênico de anticorpos IgG contra receptores adrenérgicos e muscarínicos dos cardiomiócitos (BORDA *et al.*, 1984), estando a produção de autoanticorpos contra receptores beta1 e beta2-adrenérgicos relacionados a anormalidades elétricas cardíacas primárias (CHIALE *et al.*, 1995). Também já estão bem documentados a influência de antígenos do *T. cruzi* na produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (ALMEIDA *et al.*, 2000), e o efeito do parasito na maturação das células dendríticas (VAN OVERTVELT *et al.*, 1999).

Na fase aguda, o controle da parasitemia está relacionado à produção de uma série de citocinas associadas à resposta Th1, tais como a IL-2, o IFN- γ e o TNF- α , que são estimuladoras das atividades microbidas dos macrófagos (SILVA *et al.*, 1995). Nesta fase também foram descritas alterações em componentes do sistema β -adrenérgico cardíaco de transdução de sinais, que incluem a redução da concentração plasmática de catecolaminas, a diminuição de afinidade do agonista pelo receptor β -adrenérgico cardíaco e a elevação dos níveis de AMPc nas células cardíacas (BUSTAMANTE *et al.*, 2003; LO PRESTI *et al.*, 2006).

Na fase crônica, a imunidade mediada por células T é responsável por controlar a replicação do parasito. Entretanto, a falha no controle desta resposta inflamatória, mantida pela persistência parasitária e influenciada por fatores tanto do hospedeiro quanto do *T. cruzi*, desempenha um papel fundamental na progressão da doença (MACHADO *et al.*, 2012). Assim, a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) se caracteriza predominantemente por infiltrados inflamatórios focais e disseminados, miocitólise, mionecrose e fibrose progressiva, alterações descritas desde a década de 1950 (ANDRADE e ANDRADE, 1955; ANDRADE e LOPES, 1963; KÖBERLE, 1968).

2.1.3 Fase aguda

Na grande maioria dos indivíduos, a infecção chagásica aguda não é reconhecida por ser assintomática (RASSI e MARIN-NETO, 2010). Caracteriza-se principalmente pela presença de formas tripomastigotas do parasito no sangue periférico e formas amastigotas multiplicando-se no interior das células do hospedeiro. O período de incubação, após a transmissão vetorial, é de uma a duas semanas (RASSI e MARCONDES DE REZENDE, 2012). Durante este período, ocorre um importante crescimento populacional do parasito e um intenso parasitismo no tecido cardíaco, com pico em torno do 12º dia após a contaminação (MELO *et al.*, 2003; FABRINO *et al.*, 2004).

Do ponto de vista clínico, quando esta fase se apresenta sintomática, pode haver um conjunto de sinais e sintomas de intensidade e quantidade variáveis, incluindo febre prolongada, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalias e edema subcutâneo. Quando a forma de transmissão é vetorial, existem os sinais da porta de entrada do *T. cruzi*, ou chagoma de inoculação, uma área indolor de edema com eritema local. Quando a porta de entrada é a mucosa ocular, evidencia-se o sinal de Romaña, achado clássico na doença de Chagas aguda, que consiste em edema unilateral indolor da pálpebra e dos tecidos perioculares.

A ocorrência de meningoencefalite na doença de Chagas aguda é rara, principalmente em crianças menores de 2 anos de idade (RASSI e MARIN-NETO, 2010). Menos de 5% dos pacientes apresentam morte súbita associada à falência cardíaca pós-miocardite (ZACKS *et al.*, 2005). Surto de transmissão oral, através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com fezes do vetor, parecem estar associados a incidência mais elevada de miocardite e de casos fatais da doença (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012).

Na grande maioria dos casos, as manifestações clínicas da fase aguda desaparecem em até dois meses, mesmo quando o indivíduo não recebe o tratamento com droga tripanocida. Em cerca de 5-10% dos pacientes, pode haver progressão direta para a forma clínica crônica da doença (RASSI *et al.*, 2010).

2.1.4 Fase crônica

Em 1916, Carlos Chagas dividiu os indivíduos na fase crônica em dois grandes grupos: aqueles que apresentavam a forma indeterminada, sem sinais clínicos ou anormalidades nos

testes de rotina, e aqueles com a forma determinada da doença de Chagas, com sintomas e/ou alterações nos exames comumente utilizados (CHAGAS, 1916).

Na fase crônica, cerca de 60-70% dos indivíduos infectados permanecem com a forma indeterminada da doença por toda a vida. Esta forma é definida pelos seguintes critérios: positividade para *T. cruzi* em testes sorológicos ou parasitológicos, ausência de sinais e sintomas da doença, ausência de alterações no ECG de 12 derivações e no estudo radiológico do tórax, esôfago e cólon. Esta definição foi originada a partir de um consenso de especialistas, com base nos primeiros conceitos de Carlos Chagas, no Primeiro Encontro Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, na cidade de Araxá – Brasil, no ano de 1984. O prognóstico destes indivíduos é favorável, com baixa morbidade, sendo a mortalidade semelhante à da população geral (MAGUIRE *et al.*, 1987; GONZÁLEZ *et al.*, 2012), embora estudos epidemiológicos já tenham demonstrado progressão para a forma determinada da doença em torno de 1 a 3% ao ano (DIAS, 1989; SABINO *et al.*, 2013).

Pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas podem eventualmente apresentar alterações, em geral discretas e isoladas, quando investigados com testes diagnósticos mais sensíveis para a detecção de anormalidades cardíacas e digestivas, a exemplo do ecocardiograma transtorácico, da ressonância nuclear magnética cardíaca, da biópsia endomiocárdica, dos estudos manométricos de esôfago e cólon, dentre outros (PEREIRA BARRETTO *et al.*, 1986; DANTAS *et al.*, 1999; REGUEIRO *et al.*, 2013).

A forma cardíaca da doença de Chagas ocorre em 20 a 30% dos indivíduos na fase crônica, cerca de 10 a 30 anos após a infecção inicial. Aproximadamente 10% dos pacientes evoluem com a forma digestiva ou a forma mista, com acometimento cardíaco e digestivo (RASSI e MARIN-NETO, 2010).

Os motivos pelos quais alguns pacientes permanecem assintomáticos, enquanto outros desenvolvem formas graves da doença, ainda não são completamente esclarecidos. 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- γ e TNF- α , e menor produção de IL-10, nos indivíduos que evoluem para formas crônicas sintomáticas (DUTRA e GOLLOB, 2008).

As manifestações clínicas da CCC, que variam conforme a extensão do acometimento

cardíaco, podem ser divididas em três grupos de síndromes: insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas e eventos tromboembólicos (RASSI JR *et al.*, 2009).

A insuficiência cardíaca é geralmente biventricular e se manifesta pelos sintomas clássicos de dispneia progressiva aos esforços, podendo chegar à dispneia em repouso, ortopneia, dispneia paroxística noturna, edema de membros inferiores, congestão hepática e estase de jugulares (MARIN-NETO *et al.*, 1999). Estudos prévios demonstraram que a insuficiência cardíaca causada pela doença de Chagas tem prognóstico pior do que a insuficiência cardíaca causada por outras etiologias (FREITAS *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2011).

Quanto às arritmias, os sinais mais precoces são tipicamente alterações no sistema de condução cardíaco, especialmente bloqueio de ramo direito e bloqueio divisional antero-superior esquerdo (RASSI *et al.*, 2009). O acometimento das fibras do sistema de condução pelo intenso processo inflamatório pode ser responsável por arritmias graves, incluindo bradicardias, bloqueios atrioventriculares e taquiarritmias ventriculares, podendo levar à morte súbita. Extrassístoles ventriculares isoladas, em pares, e até mesmo episódios de taquicardia ventricular (TV) não sustentada são achados frequentes em holter 24 horas e em teste ergométrico. A TV não sustentada ocorre em cerca de 40% dos pacientes com discretas alterações da contratilidade segmentar, e praticamente em todos os pacientes com disfunção ventricular (RASSI JÚNIOR *et al.*, 1995). Em algumas situações, com indicações específicas, pode ser necessário o implante de marcapasso cardíaco ou até mesmo de um cardiodesfibrilador (GIRONÈS e FRESNO, 2003; GASCÓN *et al.*, 2007).

Os eventos tromboembólicos na cardiomiopatia chagásica crônica podem ser venosos ou arteriais. O déficit sistólico ventricular esquerdo, com redução crônica do débito cardíaco, frequentemente ocasiona trombose venosa profunda e conseqüente tromboembolismo pulmonar, uma grave complicação da CCC (MARIN-NETO *et al.*, 1999; RASSI JR *et al.*, 2009). Por outro lado, o turbilhonamento de sangue nas câmaras cardíacas, decorrente de acinesia, aneurisma ou alterações da contratilidade segmentar, pode levar não apenas a acidentes vasculares cerebrais, mas também a isquemia mesentérica, de membros inferiores e de outros leitos arteriais (ROSENBAUM, 1964; OLIVEIRA *et al.*, 1981). Em áreas endêmicas, a doença de Chagas foi identificada como fator de risco independente para acidente vascular cerebral (CAROD-ARTAL *et al.*, 2005).

A morte súbita é a principal causa de morte nos pacientes com a forma cardíaca crônica da

doença de Chagas, sendo responsável por 2/3 de todas as mortes, seguida pela insuficiência cardíaca refratária (25-30%) e, por fim, pelos eventos tromboembólicos (RASSI e RASSI, 2001).

2.1.5 Diagnóstico

Na fase aguda da doença de Chagas, o diagnóstico é baseado na detecção do parasito, através do exame microscópico do sangue fresco não anticoagulado, no qual podem ser vistas formas tripomastigotas móveis. Os testes sorológicos não são úteis nesta fase, visto que exames para a detecção de IgM anti-*T. cruzi* não são amplamente disponíveis e padronizados. A reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma ferramenta diagnóstica sensível na fase aguda, e é o melhor teste para a detecção precoce da infecção em um receptor de órgão a partir de um doador infectado ou após exposição acidental ao *T. cruzi* (CHIN-HONG *et al.*, 2011).

Na fase crônica, o diagnóstico se baseia na detecção de anticorpos IgG que se ligam a antígenos no *T. cruzi*, sendo o ELISA, a imunofluorescência indireta e a hemaglutinação indireta os métodos mais utilizados. Para o diagnóstico final, é necessário que o paciente tenha positividade para pelo menos dois exames com metodologias diferentes (RASSI e MARINETO, 2010), visto que nenhum destes métodos tem sensibilidade e especificidade suficientes para que possa ser utilizado isoladamente. O xenodiagnóstico e hemocultura, técnicas também capazes de identificar o parasito, não vêm sendo utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas, em virtude da baixa sensibilidade (em torno de 50%), do longo tempo de processamento e da indisponibilidade de kits comerciais (RASSI *et al.*, 2015).

A utilização da PCR na fase crônica como ferramenta diagnóstica é questionável, porque, nesta fase, é altamente variável conforme as características da população e os métodos para o seu processamento (SCHIJMAN *et al.*, 2011). Resultados negativos de PCR não afastam a presença de infecção. Por outro lado, os ensaios quantitativos de PCR podem ser úteis para monitoramento de reativação. Um resultado positivo pode não afirmar que uma reativação ocorreu, mas carga parasitária crescente ao longo do tempo é o seu indicador mais precoce e mais sensível (DIEZ *et al.*, 2007; DUFFY *et al.*, 2009). A PCR pode também ser utilizada em casos nos quais existe discordância entre resultados de duas técnicas realizadas previamente no mesmo paciente, por ser um método mais rápido e com melhor sensibilidade que os métodos parasitológicos indiretos

(RASSI *et al.*, 2015).

Além do diagnóstico laboratorial, o paciente portador de doença de Chagas é submetido rotineiramente à avaliação clínica e complementar, com realização de eletrocardiograma de 12 derivações, radiografia de tórax, ecocardiograma transtorácico, teste ergoespirométrico e holter 24 horas, além de enema baritado, especificamente para pacientes com suspeita da forma digestiva da doença.

Ao eletrocardiograma, os achados mais sugestivos incluem bloqueio atrioventricular, bloqueio completo do ramo direito e bloqueio divisional anterossuperior do ramo esquerdo (ROSENBAUM e ALVAREZ, 1955; MOIA e ROSENBAUM, 1960). Outras alterações comuns incluem extrassístoles ventriculares, monomórficas ou polimórficas, modificações primárias de ST-T, bradicardia sinusal, fibrilação atrial, e taquicardia ventricular não sustentada. A radiografia de tórax pode evidenciar um aumento de área cardíaca e de congestão venocapilar pulmonar (GASCÓN *et al.*, 2007).

O teste ergoespirométrico vem sendo utilizado neste perfil de pacientes principalmente para a avaliação funcional, e demonstra a redução da capacidade funcional máxima, além de propensão ao desenvolvimento de arritmias ventriculares esforço-induzidas (MADY *et al.*, 2005). As arritmias podem e devem também ser avaliadas através da realização de holter 24 horas, enquanto que a função ventricular esquerda deve ser avaliada inicialmente através do ecocardiograma transtorácico (RASSI e MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Em pacientes com doença de Chagas, a aplicação do ecocardiograma transtorácico é importante tanto na fase aguda da doença, para afastar causas tratáveis de insuficiência cardíaca, como, por exemplo, o derrame pericárdico, quanto na fase crônica, para avaliar, dentre outros parâmetros, o grau da disfunção biventricular. Na CCC, podem também ser detectadas alterações segmentares da contratilidade do ventrículo esquerdo, sendo a mais comum a hipocinesia de parede ínfero-lateral, além do aumento das dimensões ventriculares e da redução da fração de ejeção, sendo estes últimos importantes fatores prognósticos de mortalidade (ACQUATELLA, 2007).

A ressonância nuclear magnética (RNM), exame caro e não amplamente disponível, é considerada o padrão ouro entre os métodos de imagem não invasivos na quantificação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Além da avaliação anatômica cardíaca, estuda também a função e a caracterização tecidual, o que anteriormente era possível apenas através de biópsia

endomiocárdica (ROCHITTE *et al.*, 2007). As alterações causadas pelo *T. cruzi* no tecido miocárdico podem resultar inicialmente em danos segmentares pequenos, não sendo detectados pelos métodos menos sensíveis. Em um estudo publicado em 2005, foi demonstrado que o grau de fibrose miocárdica diagnosticada pela RNM em pacientes chagásicos aumenta progressivamente de estágios mais leves aos mais graves da doença, além de se correlacionar inversamente com a fração de ejeção e a classe funcional pela NYHA (ROCHITTE *et al.*, 2005).

2.1.6 Prognóstico

Diversos estudos vêm sendo publicados nos últimos 20 anos acerca das variáveis que devem ser utilizadas como prognósticas em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, considerando aspectos clínicos, demográficos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos, dentre outros.

Mady e colaboradores (1994) avaliaram a sobrevida de portadores de cardiomiopatia chagásica crônica em função de idade, classe funcional da NYHA, VO₂ máximo e fração de ejeção, tendo encontrado apenas estas duas últimas variáveis como preditoras independentes de mortalidade na análise multivariada.

Um estudo publicado em 2001 avaliou, de forma evolutiva, parâmetros eletrocardiográficos e ecocardiográficos em pacientes com a forma indeterminada da doença, tendo acompanhado 160 pacientes por cerca de 98 meses, realizando ECG a cada 6 meses e ecocardiograma anualmente. A fração de ejeção permaneceu normal em todos os pacientes, porém cerca de 22% passou a ter alguma alteração eletrocardiográfica, que não conferiu pior prognóstico a longo prazo (IANNI *et al.*, 2001).

Em 2006, Anis Rassi Jr e colaboradores publicaram um trabalho que foi considerado divisor de águas na avaliação prognóstica de portadores de doença de Chagas, tendo desenvolvido e validado um escore para a determinação do risco de morte em 5 e 10 anos, de acordo com as categorias de risco baixo, intermediário ou alto. Na análise multivariada, as variáveis encontradas como preditoras independentes de mortalidade foram classe funcional III/IV da NYHA, sexo masculino, presença de cardiomegalia, presença de taquicardia ventricular não sustentada, baixa voltagem do QRS, e alterações da contratilidade global ou segmentar (RASSI

et al., 2006). No ano seguinte, o mesmo pesquisador publicou uma revisão sistemática de estudos observacionais, compilando os preditores de mortalidade, tendo identificado que a associação de disfunção ventricular ao ecocardiograma e taquicardia ventricular não sustentada aumenta 2,1 vezes o risco de morte (RASSI e RASSI, 2007).

2.1.7 Tratamento

A terapia específica disponível para a doença de Chagas consiste no uso de compostos nitroheterocíclicos (nitrofurano e nifurtimox) ou de derivado de nitroimidazol (benzonidazol), medicamentos com atividade anti-*T. cruzi*, eficazes na erradicação do parasito na fase aguda da doença (MARIN-NETO *et al.*, 1999). Nos Estados Unidos, o nifurtimox e o benzonidazol não são aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e podem ser obtidos apenas através do CDC para utilização sob protocolos de investigação.

O benzonidazol, derivado nitroimidazólico, é considerado como a primeira linha de tratamento, por ter maior evidência de eficácia, com menor incidência de efeitos colaterais, quando comparado ao nifurtimox (BERN *et al.*, 2007). Os eventos adversos mais frequentes do benzonidazol são dermatológicos, principalmente leve *rash* cutâneo, que responde rapidamente ao uso de antihistamínicos (PINAZO *et al.*, 2010). Quanto ao nifurtimox, trata-se de um nitrofurano que age inibindo a síntese do ácido pirúvico, e pode ocasionar efeitos colaterais relacionados ao trato gastrointestinal (anorexia, náuseas, vômitos) em até 70% dos pacientes, além de sintomas neurológicos, tais como irritabilidade, insônia, tremores (JACKSON *et al.*, 2010).

Tanto o benzonidazol quanto o nifurtimox já se mostraram altamente eficazes para o tratamento de indivíduos na fase aguda da doença de Chagas ou com a forma congênita, reduzindo a gravidade e a duração dos sintomas, bem como a duração da parasitemia, atingindo uma taxa de cura que pode chegar a 80% (RASSI e MARIN-NETO, 2010). Assim, existe um consenso de que todos os pacientes na fase aguda da doença devem receber o tratamento etiológico (ANDRADE *et al.*, 2011). Do mesmo modo, essa indicação se estende para crianças e adolescentes, e quando a infecção é reativada na sua fase crônica, usualmente sob condições de imunossupressão, seja ela natural ou iatrogênica (BERN *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2011).

Na década de 90, taxas de cura de aproximadamente 60%, considerando conversão para testes

sorológicos negativos 3 a 4 anos após o uso da droga, foram encontradas em dois estudos que utilizaram benzonidazol para o tratamento de crianças com infecção crônica pelo *T. cruzi* (DE ANDRADE *et al.*, 1996; SOSA ESTANI *et al.*, 1998). Estes estudos abriram os olhos da comunidade científica para a possibilidade de utilização do benzonidazol na fase crônica da doença, na qual a sua eficácia para a eliminação do parasito é bastante discutida (CANÇADO, 1999; CALDAS *et al.*, 2008).

Considerando a importância da persistência do parasito na patogênese da doença de Chagas, é natural especular que a terapia tripanocida pode modificar favoravelmente a evolução da doença em pacientes em estágio clínico não avançado. Nos Estados Unidos, existe a recomendação de tratamento etiológico em indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas (BERN *et al.*, 2007), com base em revisão sistemática e metanálise de poucos estudos randomizados em pacientes com infecção assintomática. Estes estudos apontaram para melhora da relação hospedeiro-parasito, com prova sorológica de redução nos títulos circulantes de anticorpos anti-*T. cruzi* (VILLAR *et al.*, 2002). No entanto, em 2014, o mesmo autor publicou nova revisão sistemática, avaliando 13 estudos com um total de 4229 pacientes com infecção assintomática pelo *T. cruzi*, incluindo 6 ensaios clínicos randomizados, tendo concluído que as evidências ainda são de baixa qualidade científica e que os dados são inconsistentes, a despeito da redução de desfechos relacionados ao parasito (VILLAR *et al.*, 2014).

Em 2005, Garcia e colaboradores demonstraram, em modelo experimental da doença de Chagas, um efeito benéfico do uso do benzonidazol na fase crônica por reduzir os distúrbios de condução cardíacos característicos da CCC. Baseados também em resultados de estudos longitudinais, e em ensaios clínicos não randomizados (VIOTTI *et al.*, 2006; VILLAR *et al.*, 2014), muitos especialistas em doença de Chagas vinham, nos últimos anos, indicando o tratamento com benzonidazol para indivíduos na fase crônica da doença, excluindo pacientes acima de 50 ou 55 anos, e pacientes com cardiomiopatia avançada irreversível (SOSA-ESTANI e SEGURA, 2006; GASCÓN *et al.*, 2007; VIOTTI *et al.*, 2014).

Na tentativa de esclarecer esta questão, anos mais tarde foi desenvolvido o estudo BENEFIT, um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, que avaliou os efeitos da terapia tripanocida com benzonidazol na redução de eventos cardiovasculares maiores e de morte em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica. O estudo BENEFIT, publicado em 2015, randomizou 2854 pacientes para receber benzonidazol ou placebo por até 80 dias, e acompanhou estes pacientes por uma média de 5,4 anos. Apesar de o benzonidazol ter reduzido a

detecção sérica de parasitos, não houve diferença entre os dois grupos para o desfecho primário do estudo, que foi um composto de morte, parada cardíaca ressuscitada, TV sustentada, inserção de marcapasso ou cardiodesfibrilador, transplante cardíaco, nova insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral ou outro evento tromboembólico (MORILLO *et al.*, 2015).

Assim, o tratamento atual da cardiomiopatia chagásica crônica continua sendo baseado na terapia convencional das arritmias e da insuficiência cardíaca, direcionada à atuação sobre os mecanismos neurohormonais que perpetuam e agravam a doença ao longo do tempo. As arritmias ventriculares são tratadas principalmente com amiodarona, sendo sotalol e betabloqueadores as drogas de segunda escolha. Nos casos em que a taquicardia ventricular sustentada pode ser mapeada, os pacientes podem ser tratados com ablação utilizando cateter de radiofrequência. Apesar de utilizado em alguns centros, não há evidência suficiente de benefício do cardiodesfibrilador implantável para pacientes com cardiomiopatia chagásica (RASSI, 2007).

Já foi demonstrado previamente que vários medicamentos têm a propriedade de interferir favoravelmente no curso natural da insuficiência cardíaca e aumentar a longevidade de seus portadores, como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (estudos CONSENSUS e SAVE), bloqueadores dos receptores da angiotensina (estudos Val-HeFT e CHARM), bloqueadores da aldosterona (estudos RALES e EPHEBUS) e β -bloqueadores (estudos COPERNICUS, CIBIS-II, MERIT-HF) (NOBRE e SERRANO JR, 2005). No entanto, os estudos testando as drogas para insuficiência cardíaca em portadores de doença de Chagas são escassos e com um número pequeno de pacientes. Apesar do resultado sugestivo de benefício de um estudo aberto que avaliou o transplante células mononucleares de medula óssea em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (VILAS-BOAS *et al.*, 2006), um ensaio clínico randomizado recentemente publicado, cego e controlado por placebo, não mostrou qualquer benefício em melhora de função ventricular esquerda ou de qualidade de vida no mesmo perfil de pacientes (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2012). Novas pesquisas, utilizando outras estratégias com base em terapia celular, estão em andamento, visando estabelecer tratamentos capazes de induzir regeneração do tecido cardíaco.

Procedimentos paliativos, tais como a cardiomioplastia e a ventriculectomia esquerda parcial, têm resultados insatisfatórios, sendo contraindicados. Uma opção de tratamento, que é uma realidade para pacientes com insuficiência cardíaca de outras etiologias, é a ressincronização cardíaca. Este procedimento, no entanto, beneficia primordialmente pacientes com bloqueio de ramo esquerdo, sendo mais comum na cardiomiopatia chagásica a presença de bloqueio de ramo

direito.

Alguns casos refratários à terapêutica clínica podem se beneficiar de procedimentos intervencionistas como o transplante cardíaco ortotópico, procedimento complexo e de alto custo. Embora se saiba que a sobrevida do paciente após transplante cardíaco em portadores de cardiomiopatia chagásica seja mais longa do que em pacientes com insuficiência cardíaca por outras etiologias (BOCCHI e FIORELLI, 2001), em portadores de CCC há o agravante de que o uso de imunossupressores pós-transplante pode reativar a infecção devido ao parasitismo tecidual persistente. Além do mais, ainda hoje esta técnica cirúrgica beneficia um pequeno número de indivíduos, por sua dependência de doadores compatíveis, resultando em um número de transplantes bem menor que do que a demanda.

2.2. BIOMARCADORES

2.2.1. Considerações gerais

Diversos biomarcadores vêm sendo estudados no contexto da insuficiência cardíaca. Especificamente para a doença de Chagas, torna-se ainda mais clara a importância dos biomarcadores, em virtude de se tratar de uma doença com comportamento silencioso, na grande maioria dos casos, por um longo período de tempo. Isso leva a um aumento substancial no interesse da comunidade científica em encontrar possíveis biomarcadores que possam identificar precocemente quais pacientes irão evoluir para formas graves da doença.

Os peptídeos natriuréticos, especialmente o peptídeo natriurético atrial (ANP), o peptídeo natriurético cerebral (BNP) e o peptídeo natriurético tipo C (CNP), foram previamente descritos como marcadores de disfunção sistólica e diastólica, sendo utilizados na avaliação e no monitoramento de indivíduos com insuficiência cardíaca (Richards, 2004). Estes peptídeos são sintetizados e armazenados na forma de precursores (ex. pro-BNP), liberados sob estimulação e clivados por peptidases para expor o seu fragmento N-terminal, o que gera o peptídeo biologicamente ativo. Níveis elevados de NT Pro-BNP, usualmente acima de 400-500 pg/ml, estão relacionados a um pior prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca (MADY *et al.*, 2008).

Na doença de Chagas, o ANP, o BNP e o NT pro-BNP já foram descritos como marcadores de boa acurácia na detecção de disfunção ventricular (MADY *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2009). Um estudo com 1398 pacientes, sendo 37,5% com doença de Chagas, demonstrou que o BNP é um forte preditor de mortalidade em um seguimento de 10 anos (LIMA-COSTA *et al.*, 2010). A importância dos peptídeos natriuréticos nos pacientes sintomáticos e com disfunção ventricular já está bastante estabelecida. No entanto, para pacientes com a forma indeterminada da doença, essa não é a realidade. Fernandes et al publicaram trabalho no qual a média de NT pro-BNP foi de 53,2 pg/ml em indivíduos com a forma indeterminada, 83,3 pg/ml em indivíduos com eletrocardiograma anormal, e 831 pg/ml naqueles com disfunção miocárdica. Não houve diferença com significância estatística nos níveis de NT pro-BNP entre os dois primeiros grupos e os controles, que tiveram uma média de 32 pg/ml (FERNANDES *et al.*, 2007), mostrando que o NT pro-BNP não é capaz de discriminar pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas ou com alterações de ECG, porém sem disfunção ventricular.

Recentemente, um grupo da Bolívia avaliou a presença marcadores de remodelamento da matriz extracelular em pacientes infectados por *T. cruzi* em diferentes estágios da doença e em pacientes não infectados. Entre os indivíduos infectados, aqueles com insuficiência cardíaca tiveram níveis mais elevados de BNP, NTproBNP, troponina I, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2. Entre os pacientes infectados sem insuficiência cardíaca, apenas a relação MMP-2/MMP-9 foi diferente entre os pacientes com e sem alterações ao eletrocardiograma (OKAMOTO *et al.*, 2014).

Como a cardiomiopatia chagásica se caracteriza por um intenso processo inflamatório, com predomínio de macrófagos e de linfócitos T, é de se esperar que exista também uma pronunciada produção de citocinas inflamatórias. De fato, estudos prévios já demonstraram a presença de IFN- γ , IL-6 e TNF- α em tecido cardíaco de pacientes com doença de Chagas (REIS *et al.*, 1997). Níveis séricos de TNF- α foram descritos como mais elevados em indivíduos com cardiomiopatia chagásica do que em indivíduos com a forma indeterminada da doença (ABEL *et al.*, 2001) que, por sua vez, tem níveis mais elevados de TNF- α do que indivíduos sem a doença de Chagas (FERREIRA *et al.*, 2003).

Luz e colaboradores publicaram em 2013 um trabalho no qual foram dosados citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em pacientes chagásicos, visando definir possíveis marcadores prognósticos e/ou de severidade de doença. Não foram identificadas diferenças entre os níveis de IL-1ra, IL-9, IL-17, IFN- γ , eotaxina e G-CSF entre indivíduos com doença de

Chagas crônica e indivíduos saudáveis. No entanto, os portadores de cardiomiopatia chagásica crônica apresentaram níveis mais elevados de IP-10 e níveis mais baixos de PDGF-BB (LUZ *et al.*, 2013). Apesar do PDGF ter sido associado a lesões proliferativas e fibrose em pacientes com doença de Chagas crônica (REIS *et al.*, 2000), os autores acreditam que estes baixos níveis podem ser resultado de dano celular induzido pelo *T. cruzi*, ou de depleção das células secretoras de PDGF, com aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, notadamente IP-10 (LUZ *et al.*, 2013).

Em 2015, um estudo de caso-controle avaliou um painel de citocinas e biomarcadores em 499 indivíduos doadores de sangue com sorologia positiva para *T. cruzi*, que foram categorizados em grupos com e sem cardiomiopatia chagásica crônica. Foram também avaliados 488 doadores de sangue com sorologia negativa, como controles, pareados por sexo, idade, data e local da doação de sangue. Foi observado um padrão de citocinas e biomarcadores nos indivíduos com doença cardíaca mais grave: níveis significativamente mais elevados das citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-6, IL-10 e TNF- α , e dos biomarcadores CK-MB, troponina, mioglobina, VCAM e NT-ProBNP, associado a níveis mais baixos de MPO, PAI-1 e MCP-1. No entanto, NT-ProBNP e PCR para *T. cruzi* foram os únicos testes que se mostraram marcadores independentes de estágios mais graves da doença (KEATING *et al.*, 2015).

Um dos desafios em doença de Chagas é identificar pacientes em estágios mais precoces da doença, com maior risco para o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca. Um possível caminho para a identificação desses indivíduos é a realização de ressonância magnética cardíaca, para a quantificação do percentual de fibrose miocárdica, que tem correlação com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e com a classe funcional da NYHA (ROCHITTE *et al.*, 2005), fatores prognósticos já bastante estudados para a doença de Chagas. No entanto, a ressonância magnética é um exame de custo elevado, ainda não amplamente disponível para aplicação em larga escala. Neste contexto, torna-se de fundamental importância a identificação de pacientes com fibrose miocárdica incipiente, principalmente na forma indeterminada da doença de Chagas, através de biomarcadores séricos.

Recentemente, através de análise por microarranjo de DNA, nosso grupo demonstrou que os genes da galectina-3 e da syndecan-4, proteínas multifuncionais associadas à inflamação e fibrose, estão superexpressos nos corações de camundongos chagásicos, sendo essa expressão modulada pela terapia com células de medula óssea (SOARES *et al.*, 2011).

A galectina-3, uma lectina solúvel β -galactosídea que atua em diversos processos celulares, tem sido descrita como uma molécula importante na regulação da fibrose cardíaca e do remodelamento ventricular (JOO *et al.*, 2001). Em um estudo clínico, foram demonstrados níveis aumentados de galectina-3 em pacientes com descompensação aguda de insuficiência cardíaca, motivo pelo qual esta molécula vem sendo apontada como possível novo biomarcador para esse perfil de pacientes (LOK *et al.*, 2010). Um trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo avaliou a concentração sérica de galectina-3 em pacientes com a doença de Chagas crônica, nas formas indeterminada, cardíaca sem disfunção ventricular, e cardíaca com disfunção ventricular, não tendo sido encontrada diferença estatisticamente significativa nas concentrações de galectina-3 entre os grupos. Do mesmo modo, não houve correlação entre a concentração de galectina-3 com o percentual de fibrose miocárdica ou com a fração de ejeção ventricular esquerda (NOYA-RABELO *et al.*, 2016). Nesta mesma população de pacientes, nós avaliamos a relação entre os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) rs4644 e rs4652 da galectina-3 e as variações fenotípicas na doença de Chagas, não tendo sido encontradas associações entre os diferentes genótipos para ambos os SNPs e as formas de apresentação clínica da doença (CRUZ *et al.*, 2015).

A syndecan-4, molécula de interesse no presente trabalho, será discutida detalhadamente na seção a seguir.

2.2.2 Syndecan-4

As syndecans (figura 1) compõem uma família de proteoglicanos transmembranares carreadores de heparan sulfato, com participação em diferentes processos celulares, incluindo reconhecimento, adesão, migração e sinalização (LOPES *et al.*, 2006). Proteoglicanos são moléculas compostas por um núcleo protéico ao qual cadeias de glicosaminoglicanos estão covalentemente ligadas. As syndecans se apresentam em forma dimérica e se caracterizam pela presença de domínios transmembrana e citoplasmáticos altamente conservados.

Os domínios citoplasmáticos contém duas regiões constantes, chamadas de C1 e C2, separadas por uma região variável (V), podem ser fosforilados e são conhecidos por sua capacidade de ligação a diversos ligantes intracelulares, como quinases e proteínas estruturais

(BERNFIELD *et al.*, 1992; BERNFIELD *et al.*, 1999). Os ectodomínios das syndecans podem ser clivados em locais próximos à membrana plasmática, chamados de domínios justa-membrana, formando uma molécula efetora solúvel, que pode ser dosada no soro ou no plasma (BERNFIELD *et al.*, 1999; FITZGERALD *et al.*, 2000). Especificamente para a syndecan-4, já foi descrita uma região de ligação celular no seu domínio extracelular (RAPRAEGER, 2000).

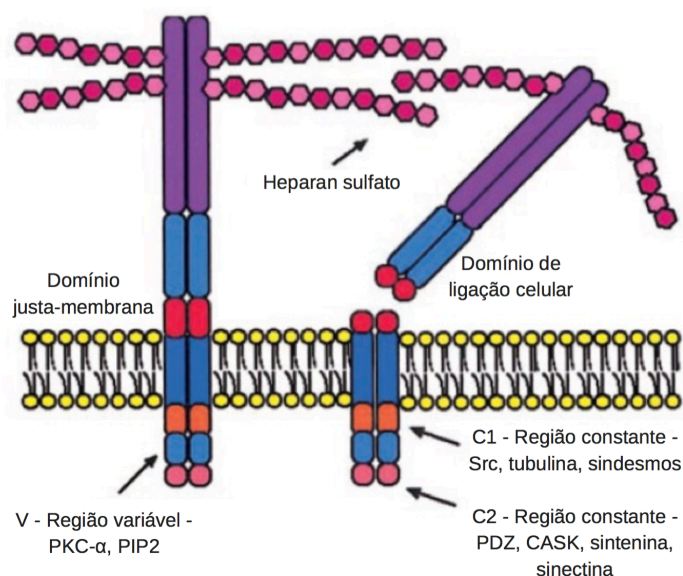


Figura 1. Estrutura dos domínios das syndecans (Götte, 2003).

Enquanto que os invertebrados têm apenas um tipo de syndecan, quatro genes que codificam syndecan (syndecan-1, -2, -3 e -4) foram identificados em vertebrados (TKACHENKO *et al.*, 2005). Cada um dos membros da família das syndecans tem um padrão distinto temporal e espacial de expressão gênica (BERNFIELD *et al.*, 1992), sendo a syndecan-4 a proteína mais amplamente expressa, estando presente em virtualmente todos os tipos celulares (COUCHMAN, 2003), principalmente nas células endoteliais, células musculares lisas e miócitos cardíacos

(NIKKARI *et al.*, 1994).

A syndecan-4, proteína mais estudada da família das syndecans, participa de processos celulares que incluem a modulação da sinalização de FGF2, a regulação da migração celular através de interação com a beta1-integrina e o controle da adesão celular via modificações do citoesqueleto (TKACHENKO *et al.*, 2005).

Já foi demonstrado que fatores de crescimento têm um papel importante na regulação da expressão gênica das syndecans. Zhang e colaboradores apontaram o TNF- α como o principal fator produzido pelos miócitos isquêmicos responsável pela indução da expressão de syndecan-4 na célula endotelial (ZHANG *et al.*, 1999). Do mesmo modo, o TGF- β aumenta a expressão de syndecan-4, reduzindo, porém, a expressão de syndecan-1 em células epiteliais (DOBRA *et al.*, 2003), enquanto que o FGF2 induz a expressão de syndecan-4 em células musculares lisas aórticas (CIZMECI-SMITH *et al.*, 1997). Além desses fatores, o estresse mecânico também já foi associado à indução da expressão de syndecan-4 em células musculares lisas durante a arteriogênese (LI e CHAIKOF, 2002).

Considerando as diversas formas de lesão tecidual, já existem evidências de aumento da expressão de syndecan-4 após lesão da parede vascular (NIKKARI *et al.*, 1994), infarto do miocárdio (LI *et al.*, 1997) e doença de Chagas (SOARES *et al.*, 2011). Em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica, a expressão gênica de syndecan-4 foi reduzida após tratamento dos animais com células mononucleares de medula óssea (SOARES *et al.*, 2011) e com G-CSF (VASCONCELOS *et al.*, 2013), em ambos os trabalhos tendo sido demonstrada a redução da inflamação e da fibrose miocárdica nos animais tratados. Em estudos clínicos, o aumento nos níveis de syndecan-4 tem sido associado ao infarto agudo do miocárdio (KOJIMA *et al.*, 2001) e à insuficiência cardíaca crônica (TAKAHASHI *et al.*, 2011), sugerindo que esta molécula também pode atuar como um biomarcador em doenças cardíacas.

Mais recentemente, a syndecan-4 vem sendo estudada como possível biomarcador para doenças cardiovasculares não apenas em pacientes com insuficiência cardíaca de diversas etiologias (BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2013; BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2016), mas também no contexto de insuficiência renal crônica dialítica, valvulopatia com fibrilação atrial e hipertensão arterial sistêmica (BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2013; BIELECKA-DABROWA, MICHALSKA-KASICZAK, *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015; JAROSZYŃSKI *et al.*, 2016).

Em 2013, Bielecka-Dabrowa e colaboradores avaliaram a importância de um painel de

biomarcadores de insuficiência cardíaca em pacientes com cardiomiopatia dilatada. Nesse trabalho, foram analisados dados clínicos, laboratoriais e ecocardiográficos de 45 pacientes com cardiomiopatia dilatada, que foram acompanhados durante 5 anos. A concentração sérica de syndecan-4 se correlacionou negativamente com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo ($r=-0.36$, $p=0.02$) e positivamente com os diâmetros sistólico ($r=0.57$, $p<0.001$) e diastólico ($r=0.64$, $p<0.001$) do ventrículo esquerdo, podendo representar um biomarcador útil para remodelamento ventricular adverso neste perfil de pacientes (BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2013).

Pouco tempo depois, o mesmo grupo publicou trabalho que teve como objetivo avaliar diferenças em biomarcadores bioquímicos e genéticos em pacientes com insuficiência cardíaca de diferentes etiologias. Foram incluídos 110 pacientes, sendo 51 com insuficiência cardíaca com FE preservada de origem hipertensiva, 32 pacientes com insuficiência cardíaca com FE reduzida de etiologia isquêmica, e 27 pacientes com insuficiência cardíaca com FE reduzida por cardiomiopatia dilatada. Na análise multivariada, apenas TGF-beta 1 ($p = 0.001$) e syndecan-4 ($p = 0.001$) foram capazes de distinguir de forma independente os pacientes de cardiomiopatia dilatada ($p = 0.001$ para ambos) e os pacientes com cardiomiopatia isquêmica ($p = 0.001$ para o TGF-beta 1 e $p = 0.023$ para a syndecan 4) dos pacientes com insuficiência cardíaca com FE preservada (BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2016).

No contexto de hipertensão arterial sistêmica, Bielecka-Dabrowa e colaboradores analisaram a capacidade preditora de alguns biomarcadores, dentre eles syndecan-4, TNF- α , galectina-3 e TGF- β , utilizando como padrão o NT-proBNP, com o objetivo de estabelecer uma abordagem baseada em um painel de biomarcadores para prever insuficiência cardíaca em indivíduos hipertensos. Foram incluídos no estudo 120 pacientes hipertensos, com ou sem insuficiência cardíaca manifesta. Os valores discriminatórios mais elevados para insuficiência cardíaca foram o do NT-proBNP (área sob a curva ROC = 0,873) e o do TGF- β (área sob a curva ROC = 0,878). Com base na análise das curvas ROC, os autores encontraram que syndecan > 2,3 ng/mL foi preditor significativo de insuficiência cardíaca, porém syndecan-4 não se enquadrava no grupo de biomarcadores de melhor desempenho, que foi composto por NT-proBNP, TGF- β , cardiotrofina-1 e cistatina-C (BIELECKA-DABROWA, GLUBA-BRZÓZKA, *et al.*, 2015).

Em indivíduos com fibrilação atrial, é conhecido que as alterações estruturais que ocorrem no átrio (o remodelamento atrial esquerdo) podem ser atribuídas a vários fatores, incluindo inflamação e estresse oxidativo (FUKUNAGA *et al.*, 2012; SMIT *et al.*, 2012). Diante de

evidências sugerindo a liberação do ectodomínio da syndecan-1 da membrana plasmática nestas condições (KLIMENT *et al.*, 2009; KLIMENT e OURY, 2011), Wu e colaboradores publicaram um trabalho avaliando o papel da syndecan-4 no processo de inflamação e estresse oxidativo em pacientes portadores de fibrilação atrial e doença valvular (WU *et al.*, 2015). Foram obtidos apêndices atriais de 65 pacientes submetidos à cirurgia para troca valvar, além de 10 apêndices atriais de corações de doadores sem doenças cardíacas, que foram utilizados como controles, tendo sido demonstrada correlação entre os níveis de ectodomínios de syndecan-4 e os marcadores de inflamação e estresse oxidativo (WU *et al.*, 2015).

Em pacientes com insuficiência renal crônica, a hipertrofia ventricular esquerda e a fibrose cardíaca já foram descritas como um componente frequente da doença renal terminal, sendo observadas em cerca de 70% dos pacientes em hemodiálise. Neste perfil de indivíduos, a hipertrofia pode ser atribuída a fatores como hipertensão, anemia, sobrecarga volêmica, fistulas arteriovenosas, dentre outros, estando fortemente associada à elevada mortalidade nos pacientes dialíticos (GLASSOCK *et al.*, 2009; DI LULLO *et al.*, 2015; PAOLETTI *et al.*, 2016).

Considerando a participação da syndecan-4 em processos relacionados à fibrose cardíaca e à hipertrofia, Jaroszyński e colaboradores publicaram, em setembro de 2016, um estudo prospectivo, que teve como objetivo avaliar a syndecan-4 como preditora de mortalidade em indivíduos portadores de insuficiência renal crônica dialítica. Nesse trabalho, que incluiu 191 pacientes, os autores demonstraram não apenas haver correlação entre a syndecan-4 e os parâmetros ecocardiográficos geométricos e a fração de ejeção, mas também definiram um ponto de corte para a syndecan-4 (21,9 ng/ml), a partir do qual houve uma clara e significativa diferença na mortalidade cardiovascular ($p < 0,001$) e na mortalidade por todas as causas ($p < 0,001$) no seguimento de 35 meses. De forma consistente, na análise multivariada, a syndecan-4 também se mostrou preditora independente de mortalidade cardiovascular (hazard ratio, 2,81, IC95% 2,28-3,02, $p < 0,001$) e de mortalidade por todas as causas (hazard ratio, 2,99, IC95% 2,34-3,11, $p < 0,001$) (JAROSZYŃSKI *et al.*, 2016).

Diante das evidências de associação da syndecan-4 com fibrose cardíaca, sendo a fibrose uma característica importante na fisiopatologia da doença de Chagas, e dos dados na literatura que reforçam a importância desta proteína como biomarcador em insuficiência cardíaca e disfunção ventricular, a hipótese de nosso trabalho é de que a syndecan-4 possa ser identificada também como um biomarcador útil para a predição de fibrose miocárdica em indivíduos com doença de Chagas, vindo a ser utilizada para a detecção de estágios mais precoces da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar o padrão de expressão de syndecan-4 e seu papel como biomarcador na cardiomiopatia chagásica crônica.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica de syndecan-4, inflamação e fibrose em tecido cardíaco de camundongos durante o curso de infecção pelo *T. cruzi*;
- Avaliar a expressão de syndecan-4 através da quantificação do número de vasos positivos para syndecan-4 em tecido cardíaco de indivíduos com doença de Chagas, cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia idiopática;
- Quantificar inflamação e fibrose em tecido cardíaco de indivíduos com doença de Chagas, cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia idiopática;
- Avaliar a correlação entre número de vasos positivos para syndecan-4 e número de células inflamatórias, e entre número de vasos positivos para syndecan-4 e percentual de fibrose miocárdica;
- Correlacionar os níveis séricos de syndecan-4 com o percentual de fibrose miocárdica mensurado pela ressonância nuclear magnética;
- Correlacionar os níveis séricos de syndecan-4 com a fração de ejeção ventricular esquerda avaliada pelo ecocardiograma transtorácico;
- Avaliar os níveis de syndecan-4 nas diferentes formas de apresentação da doença de Chagas;
- Comparar os níveis séricos de syndecan-4 entre os pacientes com doença de Chagas, pacientes com insuficiência cardíaca não chagásica e indivíduos saudáveis.

4 MANUSCRITO I

O primeiro manuscrito, intitulado “Assessment of syndecan-4 expression in the hearts of mice and human subjects with chronic Chagas cardiomyopathy”, descreve os resultados do primeiro estudo, que caracterizou e quantificou a expressão de syndecan-4 em corações de camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* e em fragmentos de corações oriundos de explantes de indivíduos portadores de doença de Chagas. De forma exploratória, também foi avaliada a expressão de syndecan-4 em tecido cardíaco de indivíduos com cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia dilatada idiopática.

Assessment of syndecan-4 expression in the hearts of mice and human subjects with chronic Chagas cardiomyopathy

Ticiania Ferreira Larocca^{1,2}, Bruno Solano de Freitas Souza^{1,2}, Carolina Thé Macêdo^{1,2}, Carine Machado Azevedo^{1,2}, Juliana Fraga Vasconcelos^{1,2}, Diogo Crispim Nascimento Portella^{1,2}, Fabio Tavora³, João David de Souza Lima³, Ricardo Ribeiro dos Santos¹, Milena Botelho Pereira Soares^{1,2*}

¹Center for Biotechnology and Cell Therapy, São Rafael Hospital, Salvador, BA, Brazil;

²Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil;

³Messejana Hospital, Fortaleza, CE, Brazil.

*Corresponding author. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil. CEP: 40296-710. Email: milena@bahia.fiocruz.br

Keywords: Syndecan-4, Chagas disease, Cardiomyopathy, biomarker.

SUMMARY

The hallmark of chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is the presence of a multifocal inflammatory reaction, which leads to myocardial fibrosis, often followed by ventricular dysfunction and arrhythmias. The expression of syndecan-4, a transmembrane protein, is increased in the hearts of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, suggesting a role of this protein in the pathogenesis of CCC. Here we aimed to evaluate the pattern of expression of syndecan-4 in heart tissue of mice and subjects with Chagas cardiomyopathy and to correlate with the degree of inflammation and fibrosis. First we evaluated the expression of syndecan-4 in the hearts of mice at different time points after infection with Colombian strain *T. cruzi*. While inflammation and fibrosis increased after the acute phase of infection, syndecan-4 expression was increased after the acute infection and was sustained during the chronic phase. Confocal microscopy analysis showed syndecan-4 expression mainly by smooth muscle in blood vessels. Confocal microscopy analysis of fragments of explanted human hearts showed a similar pattern of syndecan-4 expression. No correlation between syndecan-4 expression and inflammation or fibrosis was found in the hearts from subjects with CCC. We also compared the expression of syndecan-4 of subjects with CCC, idiopathic dilated cardiomyopathy (idDCM) and ischemic cardiomyopathy (ICM). No differences in the number of syndecan-4 positive vessels/mm² were found comparing the three subject groups (P=0.466), whereas a statistically significant difference in inflammation was seen (P=0.035). Additionally, no correlation between syndecan-4 and fibrosis or inflammatory cells was found. We conclude that there is no evidence of correlation between either the degree of myocardial fibrosis or the number of inflammatory cells and syndecan-4 expression. Additional studies are required to determine its role in Chagas disease.

INTRODUCTION

Chagas disease (CD), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, represents the third largest tropical disease burden, after malaria and schistosomiasis (1). Despite a significant reduction in the number of infected people worldwide, it represents still a major public health problem in endemic countries in Latin America, and is becoming an emerging problem in non-endemic countries, such as USA, Spain, Japan, and Australia, due to population migration (2, 3). The chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is the most severe form of clinical presentation in CD and may occur up to 20 years after infection, in approximately 20-30% of infected subjects (4, 5). The hallmark of CCC is the presence of a multifocal inflammatory reaction, which leads to myocardial fibrosis, often followed by ventricular dysfunction and arrhythmias (6-8). In this stage of the disease, the conventional therapy for CD has not shown significant benefits (9), and there is no effective treatment other than orthotopic heart transplantation.

Although the pathogenesis of CD has not been fully understood, it has been shown that the cardiac damage is related to immune responses directed to the parasites, as well as to autoreactive cells, which recognize heart antigens (10, 11). Previous studies indicate a role of Th1 lymphocytes, with a high production of IFN- γ , which has been associated with progression to severe forms of the disease subjects with severe CCC (10, 12). IFN- γ and TNF- α are overexpressed in the hearts of mice chronically infected with *T. cruzi* (13) and can activate macrophages, an important cell population in the inflammatory sites.

Our group demonstrated, through DNA microarray analysis, that several genes related to inflammation and fibrosis are upregulated in the hearts of mice with CCC (14). Among those genes, we described the upregulation of syndecan-4 gene transcription in the heart. Syndecan-4 expression was modulated after treatment with bone marrow mononuclear cells or G-CSF, two treatments that are able to reduce inflammation and fibrosis in the heart in the experimental model of *T. cruzi* chronic infection (14, 15), thus suggesting a role of this protein in the pathogenesis of Chagas disease.

Syndecan-4 is a transmembrane protein capable of carrying heparan sulfate and chondroitin sulfate chains, and it is expressed by different cell types, including endothelial cells, smooth muscle cells, and myocytes, playing a role in processes such as fibroblast growth factor signaling, regulation of cell migration and control of cell adhesion (16-18). In clinical settings, syndecan-4

concentration has been shown to be increased in subjects with heart failure, inversely correlated with left ventricular parameters (19), and also after acute myocardial infarction (20). As a possible biomarker, Takahashi and colleagues demonstrated that syndecan-4 might be useful to predict cardiovascular events, such as death and hospitalization caused by worsening of heart failure (19).

In the present study, we aimed to evaluate the pattern of expression of syndecan-4 in heart tissue of mice and subjects with Chagas disease (CD), correlating this expression with inflammation and myocardial fibrosis.

MATERIALS AND METHODS

Animal procedures

Six-to-eight weeks old female C57BL/6 mice were used for *T. cruzi* infection and as normal controls. All animals were raised and maintained at the animal facility of the Center for Biotechnology and Cell Therapy, Hospital São Rafael, in rooms with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$), and continuous air flow. Animals were housed in a 12 h light/12 h dark cycle (6 am - 6 pm) and provided with rodent diet and water *ad libitum*. Groups of 5-6 mice infected with *T. cruzi* were euthanized at different time points after infection for histological and immunohistochemical analyses. Five non-infected mice were also euthanized for comparison purposes. Animals were handled according to the NIH guidelines for animal experimentation. All procedures described had prior approval from the local institutional animal ethics committee at Hospital São Rafael (01/13).

Trypanosoma cruzi infection

Trypomastigotes of the myotropic Colombian *T. cruzi* strain were obtained from culture supernatants of infected LLC-MK2 cells, as previously described (21). Infection of C57BL/6

mice was performed by intraperitoneal injection of 1000 *T. cruzi* trypomastigotes in saline, and was confirmed through evaluation of parasitemia at different time points after infection.

Human samples

The study complied with the Declaration of Helsinki, and it was approved by the Ethics Committee of the Hospital São Rafael under the number 51025115.3.0000.0048. Sixty samples were obtained at Messejana Hospital in Fortaleza, Ceará, a specialized medical center for orthotopic heart transplantation in Brazil. Samples consisted of fragments of explanted hearts from 15 subjects with CD, confirmed by serological assay, 21 subjects with ICM, and 24 subjects with IdDCM. Heart samples from left ventricle and septum were included in paraffin, stained with H&E and Sirius Red, and used for immunostaining for detection of syndecan-4, as described below.

Morphometry

Heart sections were analyzed by light microscopy after paraffin embedding, followed by standard hematoxylin and eosin (H&E) staining. Inflammatory cells infiltrating heart tissue were counted using a digital morphometric evaluation system. Images were digitized using the slide scanner Scan Scope (Leica). Morphometric analyses were performed using the software Image Pro Plus v.7.0 (Media Cybernetics). The inflammatory cells were counted in 10 fields (400x magnification) per heart. The percentage of fibrosis was determined using Sirius red-stained heart sections and the Image Pro Plus v.7.0. Two blinded investigators performed the analyses.

Immunofluorescence analysis

Paraffin embedded tissues were deparaffinized and submitted to a heat-induced antigen retrieval step by incubation in citrate buffer (pH=6.0). Then, sections were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: goat anti-syndecan-4, diluted 1:400 (Santa Cruz

Biotechnology), mouse anti- α -smooth muscle actin (1:200, Dako) and rabbit anti-von Willebrand factor (1:100, Diagnostic Biosystem, Pleasanton, CA). Next, the sections were incubated for 1 h with secondary antibodies anti-goat IgG Alexa fluor 488-conjugated, anti-mouse IgG Alexa Fluor 568-conjugated (1:600, Molecular Probes) or anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568-conjugated (1:1000, Molecular Probes). Nuclei were counterstained with DAPI (Vector Labs). The presence of fluorescent cells was determined by observation on a FluoView 1000 confocal microscope (Olympus) and A1+ confocal microscope (Nikon). Quantifications were performed in 10 random fields captured under 400x magnification, using the Image Pro Plus v.7.0 software (Media Cybernetics).

Statistical analysis

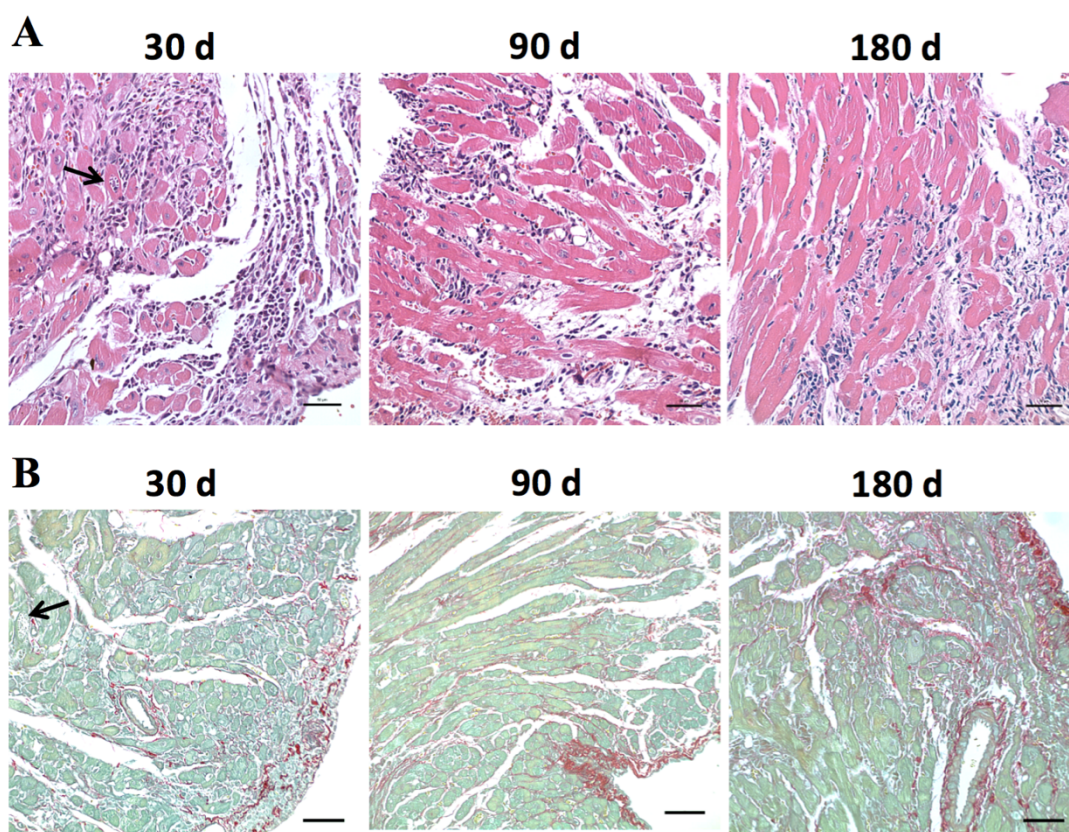
Categorical data were presented as numbers (percentages). Continuous variables were tested for normal distribution using Kolmogorov–Smirnov test and were expressed as mean \pm SEM or median (interquartile interval). Comparisons of continuous variables among groups were performed with analysis of variance (ANOVA) test, followed by Bonferroni post hoc test for multiple-comparison test, or Kruskal-Wallis, depending on normality assessed by Shapiro-Wilk test. Correlation between continuous variables was evaluated by Pearson or Spearman coefficients, depending on normality. Cases with missing data were not included in the analysis. Analyses were performed using SPSS version 20.0 (IBM) or Prism 6.0 (GraphPad Software), and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Analysis of inflammation, fibrosis and syndecan-4 expression in the hearts of mice during the course of infection with *T. cruzi*

Groups of mice infected with *T. cruzi* were euthanized at different time points after infection for

histological and immunohistochemical analyses. Heart sections of mice during the acute phase (30 days) stained with hematoxylin and eosin showed intense and diffuse inflammation composed mainly by mononuclear cells, presence of parasite nests and perivascular inflammation (Figures 1A and S1A). A marked decrease on inflammation is seen 90 days after infection, with a slow increase with time, characterized by a multifocal inflammatory infiltrate causing myocytolysis (Figures 1A and C). The presence of arterioles and veins with thickened wall due to proliferation of smooth muscle cells is frequently seen during the chronic phase (Figure S1B) The presence of diffuse interstitial fibrosis was observed in Sirius red-stained sections, and morphometric analysis showed a progressive increase with time of infection (Figures 1B and D).



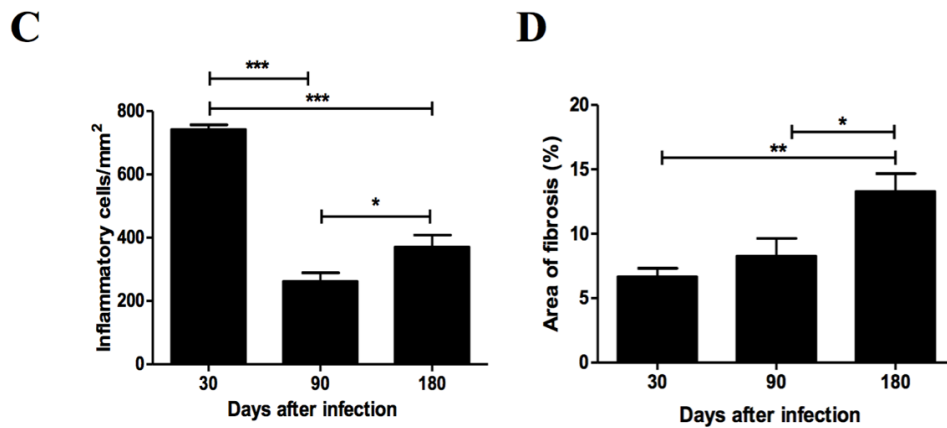


Figure 1. Histopathological analysis of mouse hearts at different time points after infection. A, Heart sections stained with H&E, showing the presence of inflammatory infiltrate at 30, 90 and 180 days after infection with *T. cruzi*. B, Heart sections stained with Sirius red, showing areas of fibrosis deposition at 30, 90 and 180 days after infection with *T. cruzi*. Arrows indicate the presence of parasite nests in the acute phase (30 days of infection). C and D, Quantification of inflammation and fibrosis by morphometric analysis in the hearts of infected mice. Data represent the mean \pm SEM of 5-6 mice/group. * P<0.05; ** P<0.01; *** P< 0.001. Calibration bars = 50 μ M.

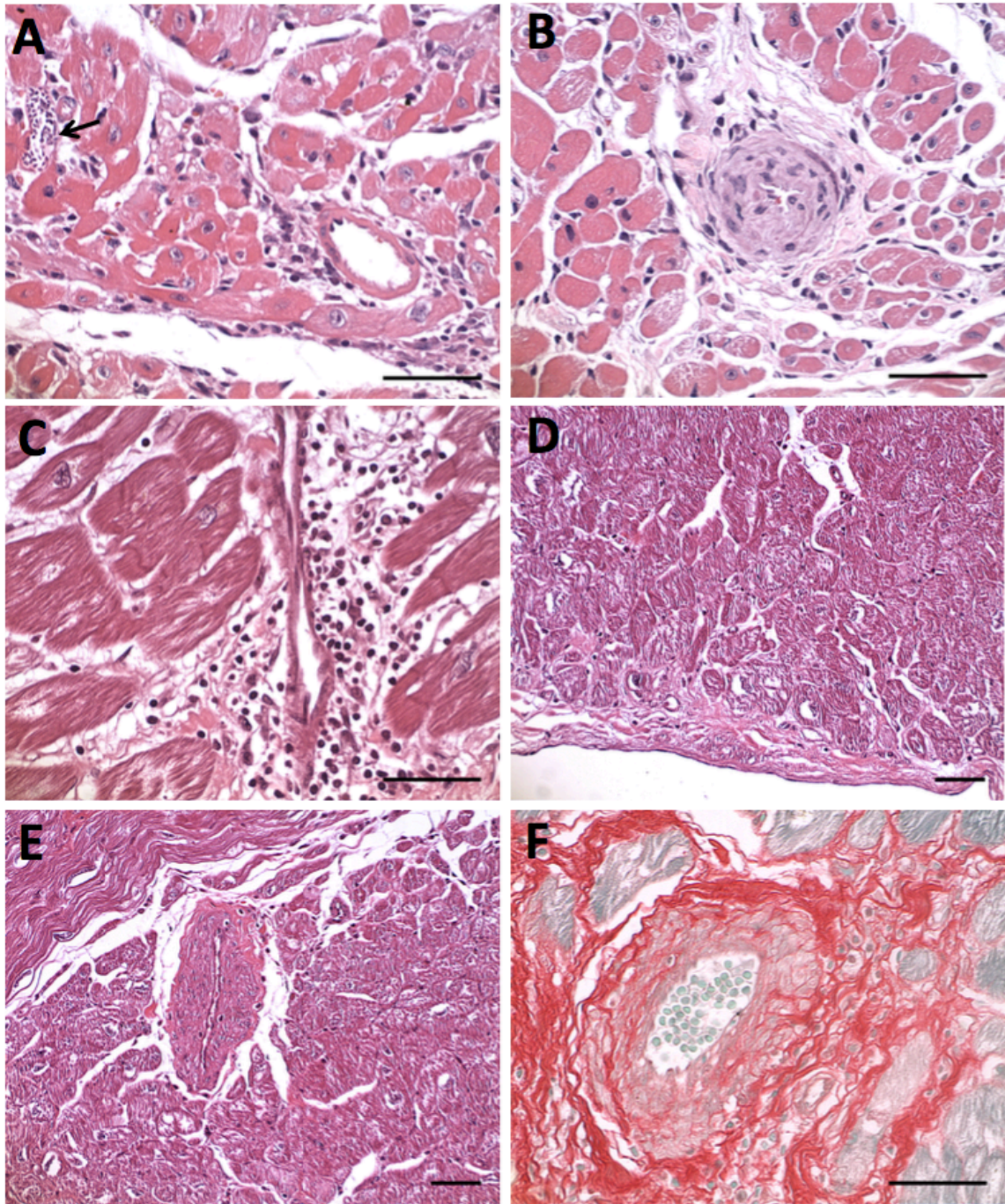


Figure S1. Vascular alterations in hearts during Chagas disease. Heart sections of mice 30 days (A) or 8 months (B) after *T. cruzi* infection, stained with H&E. Arrow indicates the presence of a parasite nest. C-F, Sections of explanted human hearts from end-stage Chagas disease heart failure subjects, stained with H&E (C-E) and Sirius red (F). Presence of perivascular inflammation (C), proliferation of microvessels (D), thickening of arteriole walls and perivascular fibrosis (E and F). Calibration bars = 50 μ M.

Sections of mouse hearts at different time points and uninfected controls were stained with anti-syndecan-4 antibodies. Syndecan-4 staining was seen mainly in blood vessels, both in mice euthanized during the acute and chronic phases of infection (Figure 2A-D). A statistically significant increase in syndecan-4⁺ blood vessels was seen at the three time points evaluated, when compared to uninfected controls (Figure 2E).

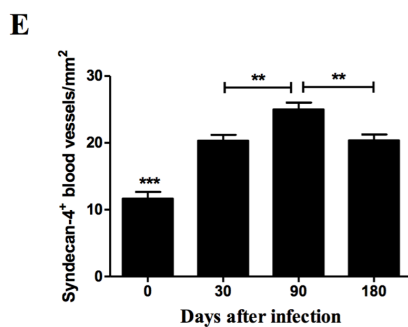
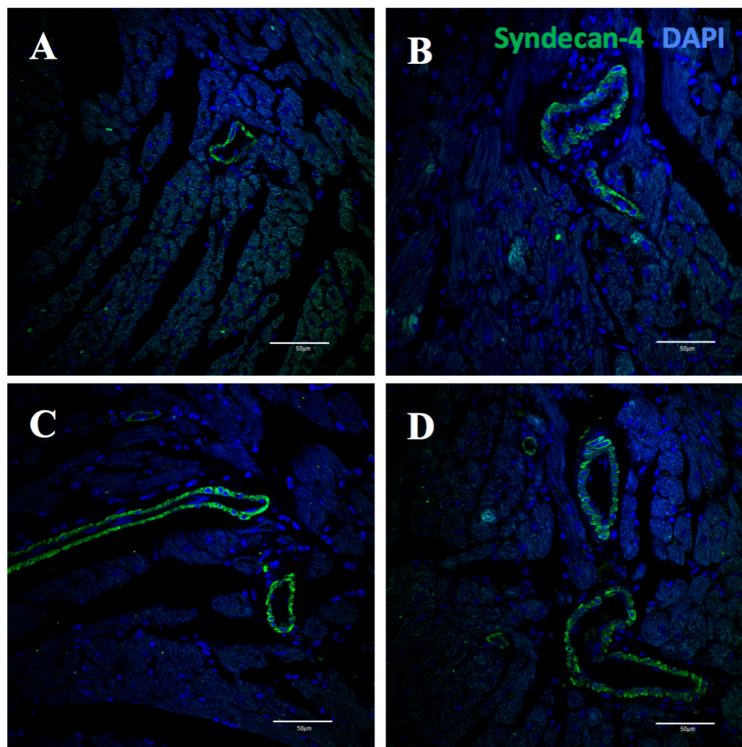


Figure 2. Expression of syndecan-4 in the heart is increased after *T. cruzi* infection. Heart sections of uninfected (A) and *T. cruzi*-infected mice, 30 (B), 90 (C) and 180 (D) days after infection were stained with anti-syndecan-4 antibody (green) and DAPI (blue) for nuclei, and observed by confocal microscopy. E, Quantification of syndecan-4⁺ blood vessels in heart sections. Data represent the mean ± SEM of 5-6 mice/group. ** P<0.01; *** P< 0.001 compared

to other groups.

To better characterize the expression of syndecan-4, we performed confocal microscopy analysis in heart sections co-stained for α -smooth muscle actin and von Willebrand factor. Endothelial cells, positive for vWF, did not show a strong expression of syndecan-4 (Figures 3C and D). In contrast, expression of syndecan-4 co-localized with α -SMA staining, indicating that smooth muscle cells are the main cell population expressing syndecan-4 (Figures 3A and B).

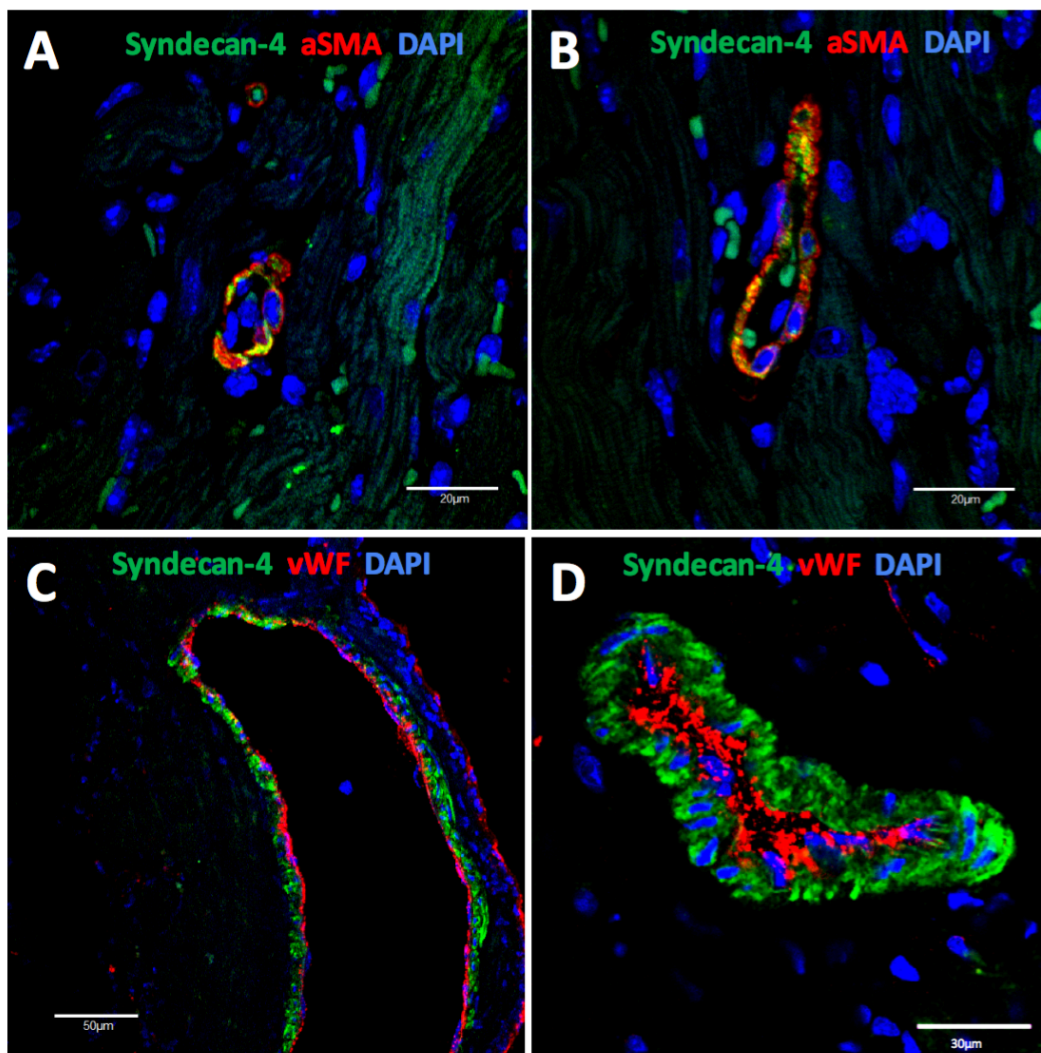


Figure 3. Expression of syndecan 4 in smooth muscle cells. Heart sections of mice 180 days after infection were stained with syndecan-4 and α -smooth muscle actin - α -SMA (A and B) or von Willebrand factor - vWF (C and D). Sections were co-stained with DAPI and observed by confocal microscopy.

Inflammation, fibrosis and syndecan-4 expression in human heart samples

Heart sections were prepared from explanted human hearts at end-stage CCC and stained with H&E for histological analysis. We observed the presence of foci of inflammatory infiltrate composed mainly of mononuclear cells, leading to the destruction of myofibers (Figures 4A, C and E). Several alterations in the microvasculature, including inflammation and perivascular fibrosis, proliferation of microvessels and thickening of vessel walls, leading to occlusion (Figure S1C-E). Additionally, extensive areas of interstitial fibrotic scar were found in Sirius red-stained sections (Figures 4B, D and F).

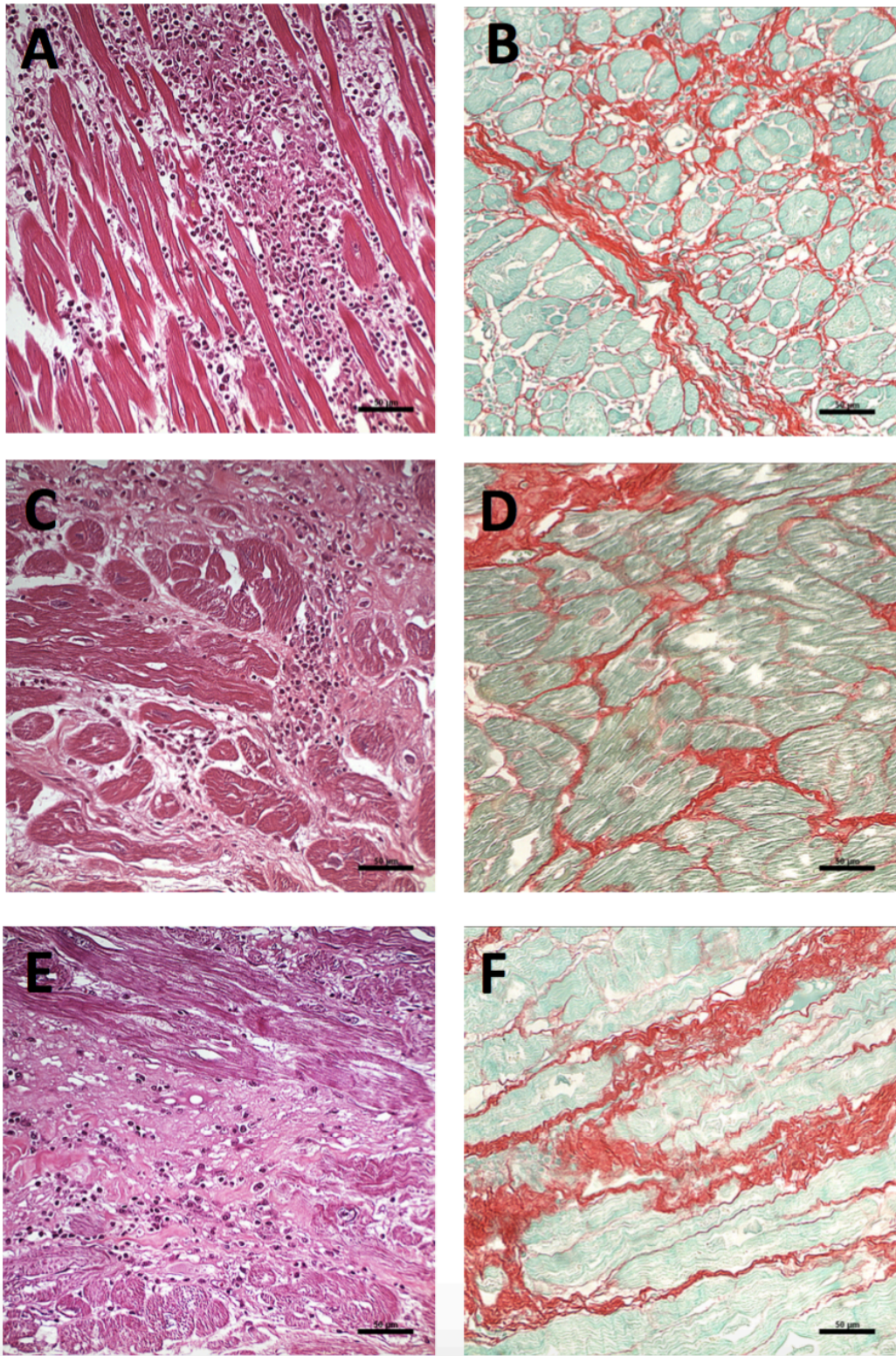


Figure 4. Presence of inflammation and fibrosis in explanted hearts from subjects with CCC. Heart sections of explants from three subjects with CCC were prepared. A, C and E, Staining with H&E, showing multifocal inflammatory infiltrate composed by mononuclear cells. B, D and

F, Sirius red staining, showing extensive areas of interstitial fibrosis.

The expression of syndecan-4 in human heart samples was evaluated by analysis using confocal microscopy. Syndecan-4 staining was also found mainly in blood vessels, co-localizing with α SMA staining, indicating expression on smooth muscle cells (Figures 5A and B). Co-staining of heart sections with vWF showed the presence of small blood vessels that did not express syndecan-4. In larger blood vessels, syndecan-4 and vWF stainings did not co-localize, indicating that endothelial cells are not the main cell type expressing syndecan-4.

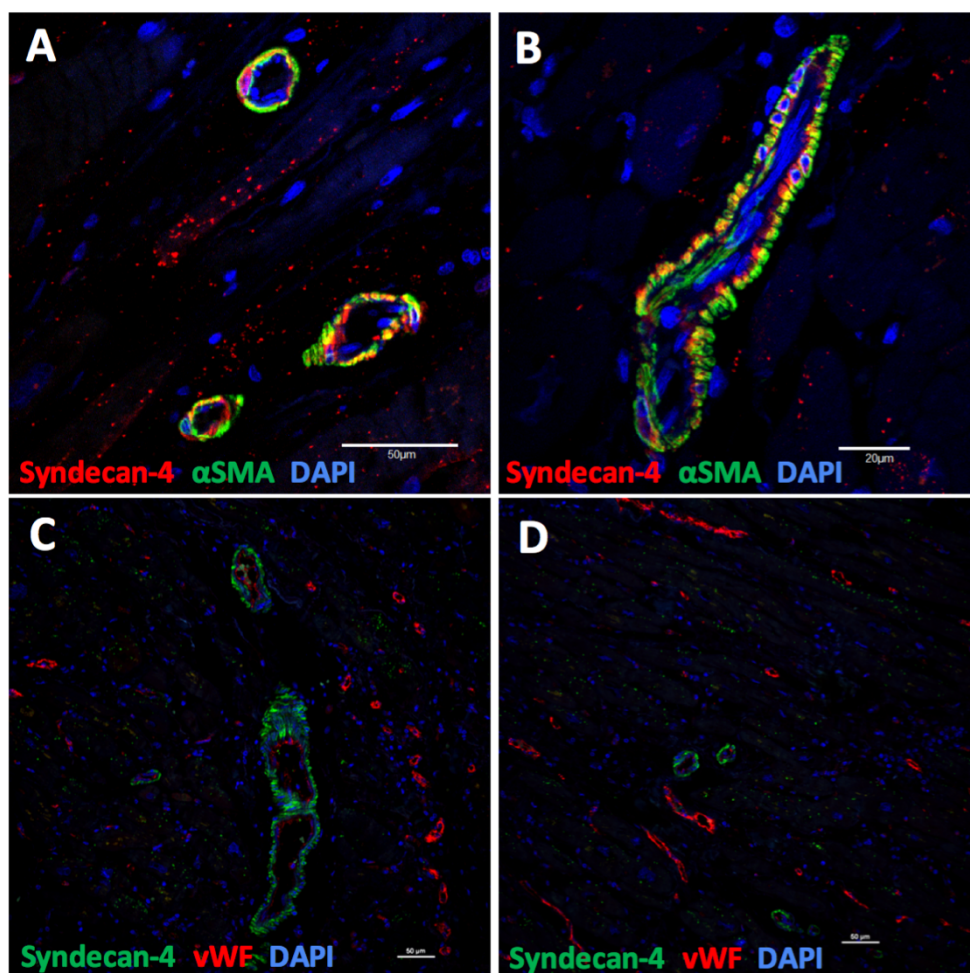


Figure 5. Expression of syndecan-4 in heart sections of subjects with CCC. Sections of explanted human hearts from subjects with CCC were stained with anti-syndecan-4 antibody and α -smooth muscle actin - α -SMA (A and B) or von Willebrand factor - vWF (C and D). Sections were co-stained with DAPI and observed by confocal microscopy.

Analysis of heart samples with CCC was performed to evaluate expression of syndecan-4 expression, inflammation and fibrosis (Table 1). Syndecan-4 expression varied and did not correlate with the degree of inflammation or fibrosis.

Table 1. Assessment of number of inflammatory cells, percentage of myocardial fibrosis and expression of syndecan-4

Subject ID	cells/mm ²	Myocardial fibrosis (%)	syndecan-4 ⁺ vessels/mm ²
P 2555/2012	1.0	2.8	56
P 3285/2013	9.8	2.0	52
P 3039/2013	27.8	1.8	51
P 1617/2014	36.0	0	72
P 0325/2014	8	5.5	66
P 2731/2014	26.8	5.4	20
P 0237/2016	7.0	3.4	76

Comparison of syndecan-4 expression, inflammation and fibrosis among subjects with end-stage CCC, ICM and idDCM

Intense inflammation and fibrosis are hallmarks of CCC. To investigate if syndecan-4 expression was associated with features of CCC, we compared the expression of syndecan-4 in human heart samples. Sections from explanted hearts were obtained from 60 individuals with end-stage cardiomyopathy. The median number of inflammatory cells/mm² was 31.0 cells/mm² (IQI: 16.8 - 109.8). There was a statistically significant difference in this variable when we compared the three groups of heart samples. The median numbers of inflammatory cells/ mm² were 127.8 cells/mm² (IQI: 31.0 - 260.3), 20.1 cells/mm² (IQI: 12.4 - 41.7) and 24.4 cells/mm² (IQI: 19.4 - 64.3) in subjects with CD, ICM and IdDCM, respectively (P=0.035; Figure 6A).

The mean percentage of myocardial fibrosis was $17.4 \pm 8.2\%$, with no statistically significant difference across the groups of heart samples. The mean percentage of myocardial fibrosis was $19.1 \pm 7.7\%$ in subjects with CD; $16.4 \pm 8.6\%$ in subjects with ICM; and $17.1 \pm 8.4\%$ in subjects with IdDCM (P=0.610; Figure 6B).

Regarding the expression of syndecan-4 assessment, only 20 samples were successfully stained for the immunostaining analysis (7 from subjects with Chagas disease, 5 from subjects with ischemic cardiomyopathy, and 8 from subjects with idiopathic cardiomyopathy). The overall median syndecan-4 positive vessels/mm² was 0.54 vessels/mm² (IQI: 0.27-1.45).

No differences were detected comparing the three groups of heart samples. In subjects with CD, the median syndecan-4 positive vessels/mm² was 0.76 vessels/mm² (IQI: 0.52 - 1.66); while in subjects with ICM it was 0.46 vessels/mm² (IQI: 0.30 - 1.17); and in subjects with IdDCM it was 0.43 vessels/mm² (IQI: 0.13 - 1.70) (P=0.466; Figure 6C).

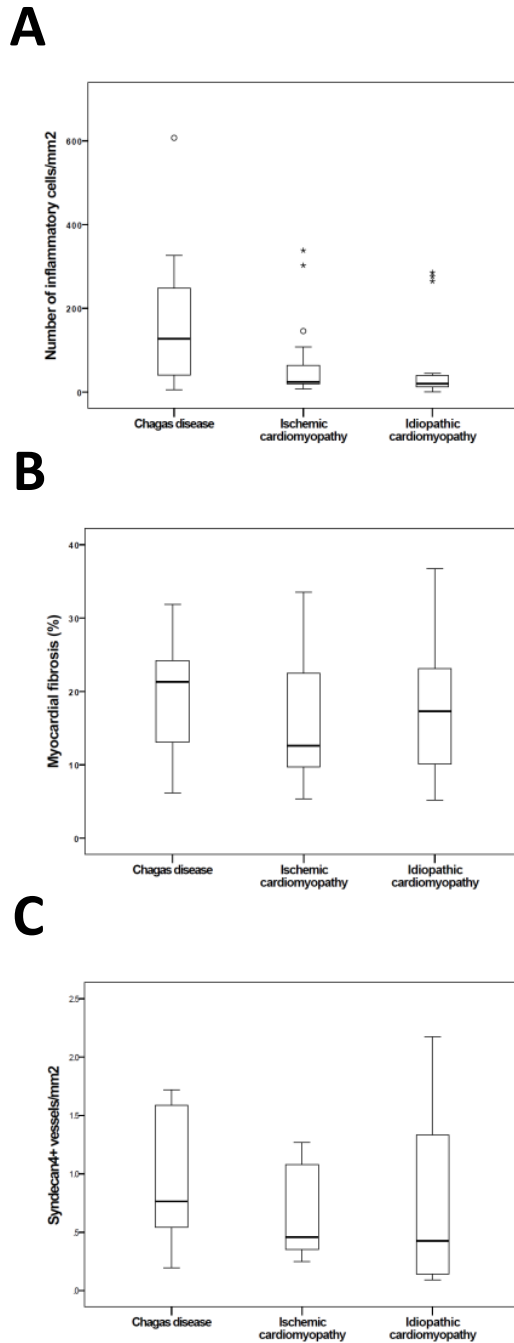


Figure 6. Comparison of inflammation, fibrosis and syndecan-4 expression in the hearts of subjects with end-stage cardiomyopathy. Heart samples of subjects with Chagas disease, ischemic cardiomyopathy, and idiopathic dilated cardiomyopathy. A, Number of inflammatory cells/mm² (n=60, Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, P=0.035). B, Percentage of myocardial fibrosis (n=60, ANOVA, P=0.610). C, Number of syndecan-4⁺ blood vessels/mm² (n=20, Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, P=0.466).

No correlation was found either between the degree of myocardial fibrosis and the number of syndecan-4⁺ vessels/mm² ($r=0.261$, $P=0.265$; Figure 7A) or between the number of inflammatory cells/mm² and the number of syndecan-4⁺ vessels/mm² ($r =0.098$, $P=0.680$; Figure 7B). When we analyzed the results per group of heart samples, we also did not find any statistically significant correlation.

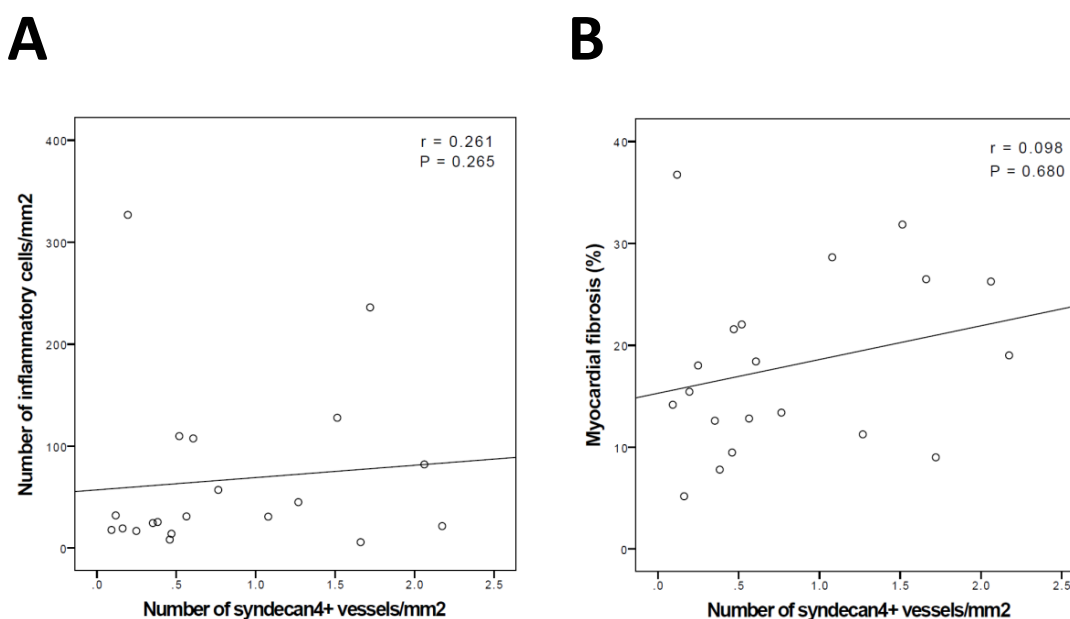


Figure 7. Analysis of correlation between syndecan-4 expression, inflammation and fibrosis in explanted hearts from subjects with end-stage cardiomyopathy. A, Correlation between syndecan-4⁺ blood vessels/mm² and number of inflammatory cells (n=20, Spearman's correlation). B, Correlation between syndecan-4⁺ blood vessels/mm² and percentage of myocardial fibrosis (n=20, Spearman's correlation).

In CD heart samples (n = 7), we found a very weak and non-significant correlation between the degree of myocardial fibrosis and the number of syndecan-4 positive vessels/mm² ($r=0.219$, $P=0.637$) and between the number of inflammatory cells/mm² and the number of syndecan-4 positive vessels/mm² ($r =0.314$, $P=0.494$). The results of these correlations were, respectively,

$r=0.835$ ($P=0.079$) and $r=0.276$ ($P=0.653$) for heart samples of subjects with ICM ($n = 5$), and $r=0.303$ ($P=0.466$) and $r=0.217$ ($P=0.606$) for heart samples of subjects with IdDCM ($n = 8$).

DISCUSSION

The current study provides a characterization of syndecan-4 expression in the heart tissue during acute and chronic *T. cruzi* infection in mice. In addition to the analysis in the mouse model, it shows, for the first time, the expression of syndecan-4 in human tissue samples of subjects who underwent orthotopic heart transplantation due to chronic Chagas disease, ischemic cardiomyopathy, and idiopathic cardiomyopathy.

Heart failure is the final common pathway of a variety of primary cardiovascular diseases regardless of the nature of the cardiomyopathy. Understanding the clinical and pathological differences among its main etiologies is crucial for achieving breakthroughs in the treatment of such a life-threatening disorder. Of special interest is the finding of new biomarkers, which may serve as molecular targets for the development of therapeutic strategies, as well as a biomarker for disease progression.

Syndecan-4 is expressed in a variety of cell types, including cardiomyocytes, endothelial cells, cardiac fibroblasts and smooth muscle cells (18, 22-24). In our study, we found the increased expression of syndecan-4 was mainly on smooth muscle cells, both in mouse and human hearts. Previous studies have shown that syndecan-4 expression and shedding is increased by mechanical stress in smooth muscle cells (25). Syndecan-4 co-localizes with integrin heterodimers in focal adhesion complexes, which are affected by physical forces, thus causing the regulating the expression of syndecan-4 (25). Thus, it is possible that the increased expression of syndecan-4 found in our study, both in humans and in mice, is induced by mechanical stress in the vessel walls caused by the inflammatory process. In line with this idea, in previous studies we found that reduction of inflammation by treatment with G-CSF or bone marrow mononuclear cells caused a reduction of syndecan-4 expression (14, 15).

Syndecan-4 has a variety of roles, including cell-cell adhesion, cell-ECM adhesion, binding to growth factors, thus affecting the recruitment of inflammatory cells, as well as cardiac fibroblast activation and fibrosis deposition (22, 25-28). The extracellular domain of syndecan-4 has

heparan sulfate chains which bind to several molecules that modulate events relevant to tissue injury and repair processes, including cell migration and proliferation, cell-substrate interactions, extracellular matrix remodeling, binding of cytokines and growth factors, including factors which promote angiogenesis, such as VEGF and RANTES (29, 30). Recently, Xi and co-workers (2016) have shown that syndecan-4 influences the migration of endothelial progenitor cells. As shown in our study and in previous reports in the literature, CCC is associated with microvasculature alterations, including the proliferation of microvessels ((31). Thus, it is possible that elevated expression of syndecan-4 participates in the promotion of microvessels formation found in Chagas heart disease.

Although syndecan-4 has been described as related to inflammatory responses, we did not find a correlation between intensity of inflammation and expression of syndecan-4. Our results showing a higher inflammation in the hearts of subjects with CCC are in accordance with data in the literature regarding the presence of a well-established inflammatory reaction in chronic Chagas disease (6), and was significantly higher than the inflammation found in the hearts of subjects with ICM and IdDCM. The finding that syndecan-4 is highly expressed in smooth muscle cells suggests that the mechanical stress caused by inflammation and disease progression may be the main factor regulating its expression in Chagas heart disease.

Myocardial fibrosis has been described as prominent not only for CD, but also for ICM and IdCM (32, 33). Explanted hearts were previously examined by de Leeuw and colleagues to determine whether specific histopathologic features were present in the myocardium of patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. Their group revealed marked fibrosis in the hearts of 21 of 37 patients with idiopathic cardiomyopathy and in 26 of 35 patients with heart diseases of known causes (33). In 2015, Ottaviani and colleagues compared the gross and histopathological parameters in hearts explanted-native or previously transplanted-from patients with end-stage heart failure with the clinical hemodynamics parameters at the time of orthotopic heart transplantation. They showed that both ischemic and non-ischemic cardiomyopathy patients of end-stage heart failure requiring heart transplantation presented high grades of fibrosis, hypertrophy and myocytolysis (32). Our study reinforces this finding, since we did not find significant differences in fibrosis area when hearts from the three etiological groups were evaluated.

We also did not find differences in the degree of myocardial fibrosis or in the number of syndecan-4 positive vessels/mm² among the three groups of heart samples. Likewise, we showed

no significant correlation between the number of syndecan-4 positive vessels/mm² and the number of inflammatory cells/mm² or between the number of syndecan-4 positive vessels/mm² and the percentage of myocardial fibrosis. There was a strong, but not statistically significant, correlation between the degree of myocardial fibrosis and the number of syndecan-4 positive vessels/mm² in heart samples of subjects with ICM. This correlation may be attributed to chance, since we had a very small sample size for subgroup analysis.

Regarding the human material, the present study was limited by reduced sample size for the immunostaining analysis, as a result of an unpredicted high number of samples that were not successfully stained, probably due to non-standardized tissue processing or tissue overfixation. Moreover, the inclusion of samples obtained from subjects with advanced heart failure may decrease the ability to detect differences in syndecan-4 expression among different etiologies that could possibly be present in earlier stages of the diseases.

In conclusion, we demonstrated the expression of syndecan-4 on smooth muscle cells both in mice and in human hearts in Chagas disease cardiomyopathy, without any evidence of correlation between either the percentage of myocardial fibrosis or the number of inflammatory cells and the number of syndecan-4 positive blood vessels. Further work is needed to clarify the role of syndecan-4 in the pathogenesis of CCC and its usefulness as a disease serological biomarker.

Acknowledgments

This study was supported by funds from National Council for Research (CNPq) and Research Foundation of Bahia State (FAPESB)

Competing interests: None.

REFERENCES

1. Organization WH. Chagas disease: control and elimination. Geneva: World Health Organization. World Health Assembly report 2010. p. 1-4.
2. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1882.
3. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:75-85.
4. Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*. 2007;115(9):1101-8.
5. WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 2015. p. 33-44.
6. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9):1109-23.
7. 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.
8. Mello RP, Szarf G, Schwartzman 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.
9. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295-306.
10. Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 2001;73(4):547-59.
11. Bonney KM, Engman DM. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *Am J Pathol*. 2015;185(6):1537-47.
12. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003;71(3):1185-93.

13. Soares MB, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR, et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2010;202(3):416-26.
14. 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.
15. 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.
16. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res.* 2005;96(5):488-500.
17. Nikkari ST, Järveläinen HT, Wight TN, Ferguson M, Clowes AW. Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol.* 1994;144(6):1348-56.
18. Li J, Brown LF, Laham RJ, Volk R, Simons M. Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. *Circ Res.* 1997;81(5):785-96.
19. Takahashi R, Negishi K, Watanabe A, Arai M, Naganuma F, Ohyama Y, et al. Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol.* 2011;57(3):325-32.
20. Kojima T, Takagi A, Maeda M, Segawa T, Shimizu A, Yamamoto K, et al. Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2001;85(5):793-9.
21. Federici Ee, Abelman Wh, Neva Fa. Chronic And Progressive Myocarditis And Myositis In C3h Mice Infected With Trypanosoma Cruzi. *Am J Trop Med Hyg.* 1964;13:272-80.
22. Samarel AM. Syndecan-4: a component of the mechanosensory apparatus of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;56:19-21.
23. Julien MA, Wang P, Haller CA, Wen J, Chaikof EL. Mechanical strain regulates

syndecan-4 expression and shedding in smooth muscle cells through differential activation of MAP kinase signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C517-25.

24. Xie J, Wang J, Li R, Dai Q, Yong Y, Zong B, et al. Syndecan-4 over-expression preserves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(2):250-8.

25. Li L, Chaikof EL. Mechanical stress regulates syndecan-4 expression and redistribution in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(1):61-8.

26. Gopal S, Mulhaupt HA, Pocock R, Couchman JR. Cell-extracellular matrix and cell-cell adhesion are linked by syndecan-4. *Matrix Biol.* 2016.

27. Okina E, Grossi A, Gopal S, Mulhaupt HA, Couchman JR. Alpha-actinin interactions with syndecan-4 are integral to fibroblast-matrix adhesion and regulate cytoskeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(12):2161-74.

28. Strand ME, Herum KM, Rana ZA, Skrbic B, Askevold ET, Dahl CP, et al. Innate immune signaling induces expression and shedding of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-4 in cardiac fibroblasts and myocytes, affecting inflammation in the pressure-overloaded heart. *FEBS J.* 2013;280(10):2228-47.

29. Li J, Partovian C, Hampton TG, Metais C, Tkachenko E, Sellke FW, et al. Modulation of microvascular signaling by heparan sulfate matrix: studies in syndecan-4 transgenic mice. *Microvasc Res.* 2002;64(1):38-46.

30. Maillard L, Saito N, Hlawaty H, Friand V, Suffee N, Chmielewsky F, et al. RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC α signaling pathway. *Biol Open.* 2014;3(10):995-1004.

31. Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA. The vasculature in chagas disease. *Adv Parasitol.* 2011;76:83-99.

32. Ottaviani G, Radovancevic R, Kar B, Gregoric I, Buja LM. Pathological assessment of end-stage heart failure in explanted hearts in correlation with hemodynamics in patients undergoing orthotopic heart transplantation. *Cardiovasc Pathol.* 2015;24(5):283-9.

33. de Leeuw N, Ruiter DJ, Balk AH, de Jonge N, Melchers WJ, Galama JM.

Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Transpl Int.* 2001;14(5):299-306.

5 MANUSCRITO II

O segundo manuscrito, intitulado “Evaluation of Serum Syndecan-4 as a Biomarker for Subjects with Chagas chronic heart failure”, descreve os resultados do estudo que avaliou os níveis séricos de syndecan-4 em indivíduos com doença de Chagas, correlacionando a concentração de syndecan-4 com o percentual de fibrose miocárdica e com a fração de ejeção ventricular esquerda.

Evaluation of Serum Syndecan-4 as a Biomarker for Subjects with Chagas chronic heart failure

Ticiana Ferreira Larocca^{1,3,*}, Carolina Thé Macedo^{1,3}, Márcia Noya-Rabelo^{1,4}, Luís Claudio Lemos Correia^{1,4}, Moisés Imbassahy Moreira¹, Alessandra Caldas¹, Jorge Andion Torreão¹, Bruno Solano de Freitas Souza^{2,3}, Juliana Fraga Vasconcelos^{2,3}, Alexandre Schaer Carvalho da Silva², Ricardo Ribeiro dos Santos², Milena Botelho Pereira Soares^{2,3}

¹Department of Cardiology, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil; ² Center for Biotechnology and Cell Therapy, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil; ³ Gonçalo Moniz Research Center, CPqGM-Fiocruz/BA, Salvador, BA, Brazil; ⁴ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil.

*Corresponding author. Av. São Rafael, 2152, São Marcos, Salvador, BA, Brazil, 41253-190. Tel: +55 71 32816455, Fax: +55 71 32816489. Email: ticianaxavier@gmail.com

Funding: This work was financially supported by FAPESB and CNPq.

Conflicts of interest: None.

Keywords: Chagas disease, cardiomyopathy, biomarkers, syndecan-4.

Abstract

Purpose: Syndecan-4 is a transmembrane glycoprotein associated with inflammation and fibrosis, its levels are increased after acute myocardial infarction, in subjects with heart failure and has been proposed as a biomarker to predict cardiovascular events. Syndecan-4 levels in subjects with Chagas disease remain unclear. The aim of this study is to explore the correlation of syndecan-4 serum concentration with the degree of myocardial fibrosis and with left ventricular ejection fraction in subjects with Chagas disease. **Materials and methods:** This study comprised 56 subjects with Chagas disease, 8 healthy controls and 8 subjects with non-Chagas heart failure. All subjects with Chagas disease underwent clinical assessments, blood analysis, ECG, X-Ray, Holter and imaging tests. Syndecan-4's serum concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** No differences were observed in syndecan-4 concentrations according to the presence or absence of myocardial fibrosis ($P=0.386$) and among different forms of Chagas disease ($P=0.918$). Additionally, no correlation was found either between myocardial fibrosis and syndecan-4 ($r=0.08$; $P=0.567$) or between left ventricular ejection fraction and syndecan-4 ($r =0.02$; $P=0.864$). **Conclusion:** Syndecan-4 concentrations have no correlation with either myocardial fibrosis or ejection fraction in subjects with Chagas disease.

Clinical Trials Registry: NCT01842867

INTRODUCTION

Chagas disease (CD), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is a major public health problem in Latin America (1) and is becoming an emerging problem in non-endemic areas due to population migration (2, 3). The chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC), the most severe form of clinical presentation in CD, has worse long-term outcomes than the cardiomyopathy due to other etiologies (4). The hallmark of CCC is the presence of a multifocal inflammatory reaction leading to myocardial fibrosis, often followed by ventricular dysfunction and arrhythmias (5-7). At this disease stage, there is no effective treatment other than heart transplantation. Thus, identifying biomarkers that might be used for early detection of cardiac involvement or as therapeutic target is of great interest.

Recently, using DNA microarray analysis, our group demonstrated several genes associated with inflammation and fibrosis process, including syndecan-4, are overexpressed in mouse hearts chronically infected with *Trypanosoma cruzi* (8). Syndecan-4 is the most studied member of the syndecan family, composed by transmembrane proteins capable of carrying heparan sulfate and chondroitin sulfate chains. Its activities include modulation of fibroblast growth factor signaling, regulation of cell migration and control of cell adhesion (9).

Circulating syndecan-4 concentrations are increased after acute myocardial infarction (10) and in heart failure patients, inversely correlated with left ventricular parameters (11), ending up as a possible useful predictor of cardiovascular events (11). Syndecan-4 is suggested to have a role in the cardiovascular system, however serum protein concentrations have not been evaluated in CD subjects. Thus, the primary aim of this study was to investigate the correlation of syndecan-4 concentrations with myocardial fibrosis and left ventricular ejection fraction (LVEF) in CD subjects. Additionally, syndecan-4 serum concentrations were compared between subjects presenting different clinical forms of CD, healthy subjects, and non-Chagas heart failure subjects.

METHODS

Study population

We conducted an observational study, in which subjects with CD, heart failure caused by other etiologies, and healthy controls were enrolled. Between January 2011 and December 2013, we enrolled 56 subjects from a convenience sample, in the CD outpatient clinics at our institution, 8 subjects with non-Chagas heart failure hospitalized from our emergency department, and 8 healthy volunteers.

Inclusion criteria for CD subjects were based on confirmation by two positive serologic tests (indirect hemagglutination and indirect immunofluorescence), and age (18-70 years). Inclusion criteria for non-Chagas heart failure (NCHF) subjects were clinical diagnosis of heart failure according to Framingham criteria(12), two negative CD serologic tests, LVEF below 55%, and age (18 - 70 years). Inclusion criteria for healthy controls (HC) were absence of clinical heart failure diagnosis or other known medical conditions, two negative serologic tests for CD, and age (18 - 70 years).

Exclusion criteria for subjects with CD were previous myocardial infarction or history of coronary artery disease, primary valve disease, terminal renal failure dialysis treatment, active liver disease, hematologic, neoplastic or bone diseases, and cardiac magnetic resonance contraindications.

We obtained structured medical history, and all CD subjects underwent physical examination, blood analysis, 12-lead ECG, chest X-Ray, 24-h Holter monitoring, conventional Doppler echocardiogram, and cardiac magnetic resonance. Healthy controls and non-Chagasic heart failure subjects underwent blood analysis.

Study complied with the Declaration of Helsinki, was approved by the Ethics Committee of the Hospital São Rafael, and is registered in ClinicalTrials.gov (identifier NCT01842867). All subjects signed written informed consent before study inclusion.

Measurement of syndecan-4

Serum syndecan-4 concentration was measured by a solid phase sandwich ELISA, according to the manufacturer's instructions (IBL Co., Ltd., Fujioka, Japan). This ELISA system

recognizes the secreted ectodomain of the syndecan-4 molecule in the blood by using two highly specific antibodies. Tetramethylbenzidine (TMB) was used as chromogen and the strength of coloring was proportional to human syndecan-4 amount. The measuring range was 20 – 1280 ng/mL. Plates were read at 450 nm using a multiplate reader (EnVision, PerkinElmer).

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's recommendations (13). The LVEF was measured using the biplane Simpson's method. 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.

Magnetic resonance imaging (MRI)

Cardiovascular magnetic resonance imaging was performed using a Sigma HDx 1.5-T system (General Electric; Fairfield, CT, USA). For assessment of the LV function, electrocardiography-gated, breath-hold long-axis, short-axis, and four-chamber views were acquired in 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, flip angle of 60°, a receiver bandwidth of 125 kHz, a 35 x 35 cm field of view (FOV), a matrix of 256x148, 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 to 20 min after the administration of a gadolinium-based contrast (0.1 mmol/kg) using RT of 7.1 ms, ET of 3.1 ms, flip angle of 20°, first cardiac phase, views per segment 16/32, matrix size of 256 x 192, slice

thickness of 8.0 mm, gap between slices of 2 mm, field of view 32 to 38 cm, inversion time 150 to 300 ms, receiver bandwidth of 31.25 kHz, number of excitations of 2. The myocardial DE technique was used to investigate myocardial fibrosis, which was estimated by a quantitative visual method (6).

Statistical analysis

Categorical data were presented as numbers (percentages), and continuous data were expressed as mean \pm SD or median (interquartile range). Comparisons of continuous variables among groups were performed with analysis of variance (ANOVA) test or Kruskal-Wallis, depending on normality assessed by Shapiro-Wilk test. Chi-Square or Fisher tests were applied for proportions comparisons. Correlations between continuous variables were evaluated by Pearson or Spearman coefficients, depending on normality. 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.

RESULTS

Baseline characteristics

The study comprised 56 subjects with Chagas disease, 41% were men, and the mean age was 58 ± 9 . Regarding the clinical form of presentation, the subjects were distributed as follows: 14 (25%) with the indeterminate form (subjects with no evidence of cardiac involvement or heart failure), 16 (29%) with the cardiac form without ventricular dysfunction and 26 (46%) with the cardiac form with ventricular dysfunction. The median for NT-ProBNP level was, respectively, 60.5 pg/ml (IIQ: 32.8 – 109.8), 92.50 pg/ml (IIQ: 62.3 – 180.5), and 816 pg/ml (IIQ:196.5 – 2128), $p < 0.001$. Other clinical and demographic characteristics of the subjects with Chagas disease are described in Table 1. Among the healthy controls, 37.5% were men, and the mean

age was 36 ± 5 . Regarding the subjects with non-Chagas heart failure, 50% were men, and the mean age was 60 ± 17 .

Table 1. Clinical and demographic characteristics of subjects with Chagas disease

	Subjects with Chagas disease (n = 56)
Male gender	3 (41.1)
Age (years)	3 ± 9
Black self-reported race	7 (30.4%)
White self-reported race	3 (58.9%)
Indeterminate form	4 (25)
Cardiac form without ventricular dysfunction	5 (28.6)
Cardiac form with ventricular dysfunction	5 (46.4)
NYHA III or IV	4 (25)
Hypertension	3 (69.6)
Diabetes	(14.3)
Current smoking	4 (25)
Hypercholesterolemia	5 (44.6)
BBB	3 (51.8) ‡
Cardiomegaly on x-Ray	7 (48.2)
RT	7 (30.4) ‡
T-ProBNP (pg/ml)	42 (67 - 779.5)
Hemoglobin (g/dl)	4.0 ± 1.0
Creatinin (mg/dl)	87 ± 0.18

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile interval) for continuous variables, or number (%) for discrete variables. NYHA = New York Heart Association; RBBB = right bundle-

branch block; VT = ventricular tachycardia. ‡ One missing data for these variables.

Cardiovascular imaging characteristics

The mean LVEF assessed by Simpson was $53 \pm 15\%$ for all subjects with Chagas disease, and $39 \pm 12\%$ for the subjects with the cardiac form with ventricular dysfunction. For subjects with non-Chagas heart failure, the mean LVEF was $33 \pm 13\%$.

Delayed enhancement was identified in 35 subjects (66%), and the total amount of myocardial fibrosis was 9% (IIQ: 2.4 - 18). Myocardial fibrosis was detected in 6 of 14 (42%) subjects in the indeterminate form (median 4.1%, IIQ: 2.1-10.8), 7 of 16 (43%) in the cardiac form without ventricular dysfunction (median 2.3%, IIQ: 1.0-5.0), and 22 of 26 (85%) subjects in the cardiac form with ventricular dysfunction (median 15%, IIQ: 7.3-25.6, $P=0.001$). Echocardiographic and MRI data for subjects with Chagas disease are described in Table 2.

Table 2. Echocardiographic and CMR findings

	Subjects with Chagas disease (n = 56)
<i>Echocardiogram*</i>	
LVEF (%)	53.2 ± 15.1
LV ESV (ml)	81.2 ± 67.2
LV EDV (ml)	175.4 ± 80.2
LV mass (g)	169 ± 59.8
<i>MRI**</i>	
LVEF (%)	55 ± 20.1
RVEF (%)	55.9 ± 14
LV ESV (ml/m ²)	83.9 ± 14

LV EDV (ml/m ²)	162.5 ± 74
LV mass (g/m ²)	121.7 ± 49.8
Fibrosis (%)	9.0 (2.4-18) ‡
Delayed enhancement	35 (66)

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile interval) or number (%) for discrete variables. EDV = end diastolic volume; ESV = end systolic volume; LGS = longitudinal global strain; LV = left ventricular; LVEF = left ventricular ejection fraction; MRI = magnetic resonance imaging; RV = right ventricular; RVEF = right ventricular ejection fraction. * Data from 55 subjects. ** Data from 53 subjects. ‡ Data from subjects with delayed enhancement on MRI (n = 35).

Assessment of syndecan-4

The mean concentration of syndecan-4 in subjects with Chagas disease was 15.4 ± 7.7 ng/ml. No differences were observed in syndecan-4 concentrations according to myocardial fibrosis, with a mean syndecan-4 concentration of 14.9 ± 5.8 ng/ml in subjects with DE versus 16.8 ± 10.2 ng/ml in subjects without DE (P=0.386; Figure 1).



Figure 1. Plasmatic concentration of syndecan-4 assessed by ELISA in subjects with and without delayed enhancement detected by magnetic resonance imaging (*t* test, $P=0.386$).

No correlation was found either between myocardial fibrosis and syndecan-4 ($r=0.08$, $P=0.567$; figure 2A) or between LVEF and syndecan-4 ($r =0.02$, $P=0.864$; figure 3A). As expected, a moderate to strong correlation was found between myocardial fibrosis and NT-ProBNP ($r=0.47$, $p < 0.001$; figure 2B), and also between LVEF and NT-ProBNP, as a negative correlation ($r= 0.69$, $p < 0.001$; figure 3B).

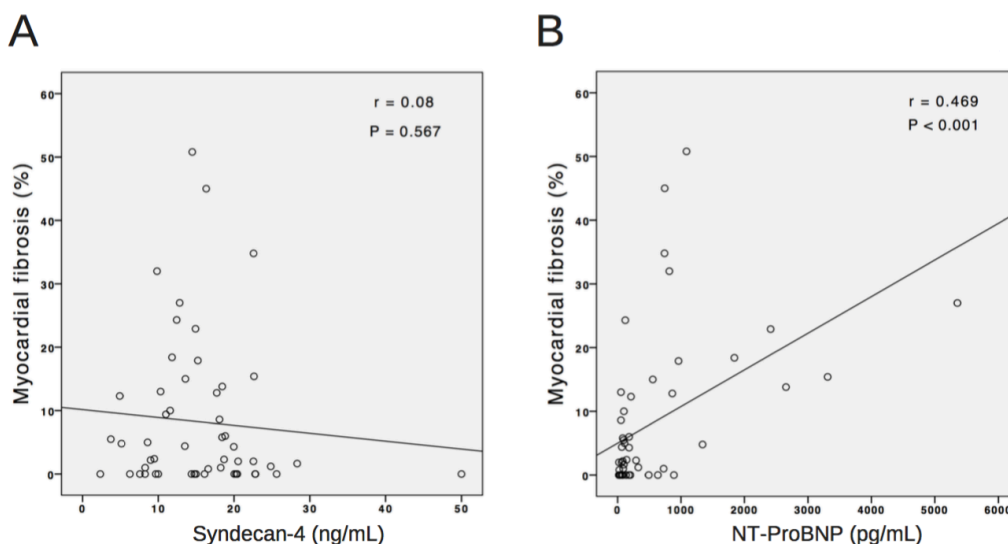


Figure 2. Correlation between plasmatic concentration of syndecan-4 and percentage of myocardial fibrosis assessed by cardiovascular magnetic resonance imaging (A, Pearson's correlation, $r=0.08$; $P=0.567$), and between plasmatic NT-ProBNP and percentage of myocardial fibrosis assessed by cardiovascular magnetic resonance imaging (B, Pearson's correlation, $r=0.469$; $P<0.001$).

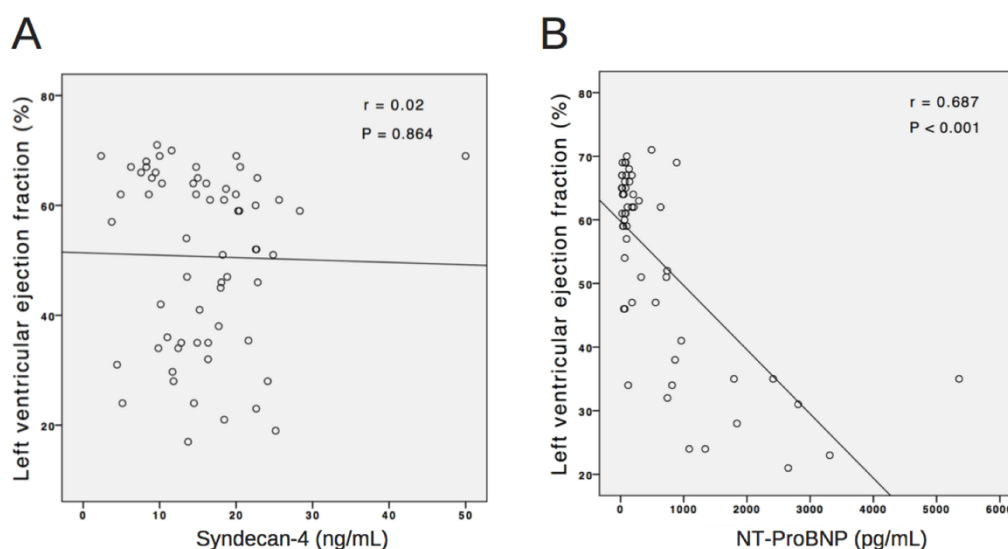


Figure 3. Correlation between plasmatic concentration of syndecan-4 and LVEF assessed by Simpson's method (A, Pearson's correlation, $r=0.02$; $P=0.864$), and between plasmatic NT-ProBNP and LVEF assessed by Simpson's method (B, Pearson's correlation, $r=0.687$; $P<0.001$).

No differences in syndecan-4 concentrations were detected comparing groups of patients with different forms of Chagas disease. In subjects with the indeterminate form, the mean syndecan-4 concentration was 14.7 ± 5.1 ng/ml; in subjects with cardiac form without ventricular dysfunction, 15.6 ± 11.5 ng/ml; and in subjects with cardiac form with ventricular dysfunction, 15.7 ± 6.0 ng/ml ($P=0.918$; Figure 4A).

Comparing groups of subjects with Chagas disease, non-Chagas heart failure e healthy controls, no differences in syndecan-4 concentration were observed either. The mean syndecan-4 concentration was 15.4 ± 7.6 ng/ml, 17.3 ± 6.0 ng/ml, and 19.0 ± 6.5 ng/ml, respectively ($P=0.395$; Figure 4B).

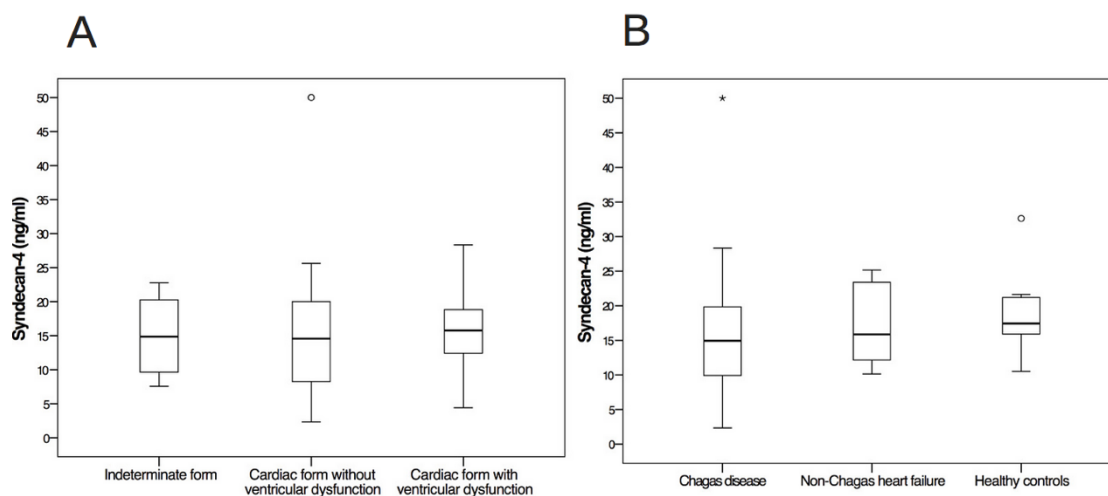


Figure 4. Plasmatic concentration of syndecan-4 assessed by ELISA in subjects with different forms of Chagas disease (A, ANOVA, $P=0.918$) and in subjects with Chagas disease, non-Chagas heart failure, and healthy controls (B, ANOVA, $P=0.395$).

DISCUSSION

The current study provides the first evaluation of the syndecan-4 as a biomarker in a population with Chagas disease. According to Morrow and de Lemos (2007), a good biomarker for clinical use must fulfill three main criteria. First, the assay for its measurement should be easily accessible for a reasonable cost. Second, it must add information to already existing tests. And third, there must be strong evidence that it is important to managing disease progression or response to therapy (14).

Although there is no previous clinical study assessing the concentrations of syndecan-4 in patients with Chagas disease, it was already shown that syndecan-4 is overexpressed in hearts of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* in experimental model of Chagas cardiomyopathy (8). In subjects with heart failure due to other etiologies, with dilated cardiomyopathy (DCM), concentration of syndecan-4 correlated negatively with LVEF and diastolic diameters (15). Additionally, Takahashi and colleagues assessed the concentration of syndecan-4 in 45 subjects with heart failure and 21 healthy subjects, finding also a moderate and negative correlation between syndecan-4 and LVEF (11), suggesting that it might be a useful

biomarker for heart failure, like NT-ProBNP (16).

Despite these data, our analysis in the clinical setting of Chagas disease showed a moderate to strong correlation between LVEF and concentration of NT-ProBNP, but no relationship between LVEF and concentration of syndecan-4. Although we have used the same methodology applied in other studies for measuring this glycoprotein, we did not find any difference in the concentration of syndecan-4 among subjects with Chagas disease, non-Chagas heart failure and healthy subjects. This result could be explained by the small sample size, considering the number of subjects enrolled for the last two groups.

Our study showed a high percentage of delayed enhancement in the three different forms of the disease: 42% for the indeterminate form, 43% for the cardiac form without ventricular dysfunction and 85% 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 (17). Despite this difference, the overall prevalence of delayed enhancement in our population of subjects with chronic Chagas cardiomyopathy is consistent with literature data, since global prevalence has demonstrated delayed enhancement ranging from 68.6% to 88.9% in this profile of subjects (6).

Since it was already demonstrated the relationship between syndecan-4 and granulation tissue formation and wound repair in experimental model of myocardial infarction (18), we expected to find a high concentration of syndecan-4 in subjects with cardiac forms of Chagas disease, for which the hallmark is the fibrosis formation. However, the concentration of syndecan-4 was not different not only among subjects with different forms of Chagas disease, but also among subjects with Chagas disease, healthy subjects and non-Chagas heart failure. Additionally, no correlation was found between the percentage of myocardial fibrosis and the syndecan-4 concentration.

We previously demonstrated similar results while evaluating the role of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in predicting myocardial fibrosis in the same setting of subjects with Chagas disease (19). Although galectin-3 and syndecan-4 have been shown to be upregulated in the hearts of mice chronically infected by *T. cruzi*, (8), and both molecules have been studied as potential biomarkers for heart failure (11, 20), the serum concentration of galectin-3 was not different among the three forms of Chagas disease (19), as well as the concentration of syndecan-4 we found in this current study.

Another interesting observation is regarding race category. In our study, according to self-

reported race, our sample was composed mainly by blacks (17 subjects, 30.4%) and mulattos (33 subjects, 58.9%). A recently published study showed that galectin-3 was independently associated with heart failure and death among whites (hazard ratio 2.2, 95% CI 1.2-3.9) but not among blacks (hazard ratio 0.8, 95% CI 0.4-1.8)(21). That might reflect racial differences in the pathways by which galectin-3, and perhaps syndecan-4, mediates disease.

This study has some limitations that could have affected the interpretation of its results. First, it was conducted at a single tertiary and academic hospital, with a small sample size, mainly for the groups with non-Chagas heart failure patients and with healthy subjects. The second limitation is that we measured syndecan-4 on a single time point, since it was a cross-sectional study, thus not giving any information regarding its importance over time. Lastly, the circulating concentration of syndecan-4 may not accurately reflect the expression of this molecule in the heart tissue.

CONCLUSION

We conclude that there is no evidence of correlation between either the degree of myocardial fibrosis or the LVEF and the serum concentration of syndecan-4 in subjects with Chagas disease. Further work is needed to validate these results, as well as to find another useful prognostic biomarkers for Chagas chronic heart failure.

Acknowledgments

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

REFERENCES

1. Organization WH. Chagas disease: control and elimination. Geneva: World Health

Organization. World Health Assembly report 2010. p. 1-4.

2. 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.

3. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(19):1882.

4. Silva CP, Del Carlo CH, Oliveira Junior MT, Scipioni A, Strunz-Cassaró 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.

5. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109-23.

6. 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.

7. Mello RP, Szarf G, Schwartzman 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.

8. 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.

9. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res.* 2005;96(5):488-500.

10. Kojima T, Takagi A, Maeda M, Segawa T, Shimizu A, Yamamoto K, et al. Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2001;85(5):793-9.

11. Takahashi R, Negishi K, Watanabe A, Arai M, Naganuma F, Ohyama Y, et al. Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol.* 2011;57(3):325-32.

12. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of

congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* 1971;285(26):1441-6.

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.

14. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation.* 2007;115(8):949-52.

15. Bielecka-Dabrowa A, von Haehling S, Aronow WS, Ahmed MI, Rysz J, Banach M. Heart failure biomarkers in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2013;168(3):2404-10.

16. Wettersten N, Maisel AS. Biomarkers for Heart Failure: An Update for Practitioners of Internal Medicine. *Am J Med.* 2016;129(6):560-7.

17. 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.

18. Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Morimoto J, Sato M, Tanaka S, et al. Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res.* 2011;108(11):1328-39.

19. Noya-Rabelo MM, Larocca TF, Macêdo CT, Torreão JA, Souza BS, Vasconcelos JF, et al. Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy. *Cardiology.* 2016;136(1):33-9.

20. Chen K, Jiang RJ, Wang CQ, Yin ZF, Fan YQ, Cao JT, et al. Predictive value of plasma galectin-3 in patients with chronic heart failure. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(8):1005-11.

21. McEvoy JW, Chen Y, Halushka MK, Christenson E, Ballantyne CM, Blumenthal RS, et al. Galectin-3 and Risk of Heart Failure and Death in Blacks and Whites. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(5).

6 DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma condição crônica negligenciada de elevada morbimortalidade e significativo impacto socioeconômico, 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 (DIAS, 2007). Negligenciada em diferentes graus e perspectivas, a doença de Chagas também não desponta como uma doença importante na literatura médica. Nessa área, são comuns relatos e séries de casos, estudos observacionais e ensaios clínicos com pequeno tamanho amostral, havendo relativamente poucos ensaios clínicos randomizados com robustez estatística razoável. Essa situação faz com que, muitas vezes, a comunidade médica se utilize da extrapolação de dados obtidos a partir de estudos de arritmias e insuficiência cardíaca de outras etiologias para o tratamento dos pacientes com a cardiomiopatia chagásica crônica.

No entanto, a doença de Chagas tem algumas peculiaridades que podem fazer com que os pacientes tenham respostas diferentes a determinadas terapias. A associação entre a atividade inflamatória pronunciada, a disfunção autonômica e a atividade metabólica faz com que haja uma fisiopatologia única na doença de Chagas, que a torna diferente de outras formas de cardiomiopatia. A utilização do ressincronizador cardíaco, por exemplo, já bem estabelecida para indivíduos com insuficiência cardíaca, grave disfunção ventricular e QRS alargado (CLELAND *et al.*, 2005), não pode ser extrapolada indiscriminadamente para os pacientes com cardiomiopatia chagásica, devido à predominância de bloqueio de ramo direito, para o qual o benefício é questionável.

Assim, consideramos que o entendimento das diferenças entre as etiologias da insuficiência cardíaca, nos seus diversos aspectos, seja de fundamental importância para a utilização racional do armamentário complementar e da terapia atualmente disponíveis, assim como para a descoberta de novas estratégias diagnósticas, prognósticas e terapêuticas visando a abordagem dos indivíduos com uma condição de impacto tão significativo como a doença de Chagas.

Especificamente para a doença de Chagas, ainda não foram completamente esclarecidos os motivos pelos quais determinados indivíduos permanecem com a forma indeterminada da doença, enquanto outros evoluem para as formas cardíacas. A identificação de pacientes na forma

indeterminada sob maior risco de evolução, e de pacientes com a forma cardíaca ainda incipiente, é crucial para que se possa instituir precocemente uma terapia com potencial de bloquear ou retardar a evolução da doença. Nesse sentido, novos biomarcadores ou métodos de imagem que possam indicar a evolução da doença são de fundamental importância para que métodos de intervenção possam alterar precocemente o seu curso.

Visando desenvolver estratégias de regeneração do miocárdio na doença de Chagas, nosso grupo de pesquisas vêm estudando terapias baseadas no transplante de células-tronco e com utilização de hormônios celulares. Essas novas abordagens terapêuticas têm o objetivo de melhorar os parâmetros função ventricular, reduzir inflamação e fibrose, reduzir arritmias e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com doença de Chagas.

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 (LAROCCA *et al.*, 2013). As células-tronco mesenquimais são células com potencial imunomodulador já bem caracterizado (GAO *et al.*, 2016), 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 (LAROCCA *et al.*, 2013).

Outros estudos já foram publicados, nos quais foi avaliado o efeito das células-tronco em doença de Chagas (VILAS-BOAS *et al.*, 2006; VILAS-BOAS *et al.*, 2011; RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2012), sendo que o único ensaio clínico randomizado, cego e controlado por placebo, não mostrou qualquer benefício em melhora de função ventricular esquerda ou de qualidade de vida (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2012). Uma questão importante a ser ressaltada é o fato de esse estudo ter incluído pacientes já com cardiomiopatia chagásica, com disfunção ventricular esquerda, para os quais é difícil demonstrar um benefício adicional ao do tratamento convencional para insuficiência cardíaca, instituído em um ambiente tão controlado quanto o de um ensaio clínico. Assim, questiona-se a possibilidade de que algumas abordagens terapêuticas, para as quais exista uma forte plausibilidade biológica, associada a baixo risco de eventos adversos sérios, terem maior benefício se instituídas em fases mais precoces, antes do desenvolvimento da disfunção ventricular esquerda.

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 primariamente na classe funcional da NYHA, mas também na função ventricular e na qualidade de vida. Serão incluídos 70 pacientes com diagnóstico de doença de Chagas, confirmada por duas sorologias diferentes, com idade entre 18 e 70 anos, com disfunção ventricular esquerda, em classes funcionais II, III ou IV da NYHA. Este estudo não terá poder estatístico para a análise de subgrupos, mas poderá indicar um novo caminho a ser seguido, caso sugira um potencial benefício da terapia com G-CSF em pacientes com classe funcional mais baixa. 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 e melhora da capacidade de exercícios e arritmias (MACAMBIRA *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Acreditando que a possibilidade de reversão de alterações cardíacas pode ser maior quando instituída a terapia mais precocemente, seja com células-tronco, seja com fatores de crescimento, nos últimos anos desenvolvemos estudos visando a busca de métodos para a identificação dos indivíduos com maior risco ou em fases mais precoces da doença. Com esse objetivo, estudamos o strain global longitudinal (SGL) do ventrículo esquerdo e dois biomarcadores, a galectina-3 e a syndecan-4, buscando estabelecer as suas correlações com o percentual de fibrose miocárdica à ressonância magnética.

A classificação rotineira das diferentes formas de apresentação da doença de Chagas, estabelecida em 1984 e utilizada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (ANDRADE *et al.*, 2011), não leva em consideração a presença de alterações que podem ser encontradas em exames complementares mais complexos, como a ressonância magnética. Assim, a despeito de pacientes com a forma indeterminada em geral terem bom prognóstico (MAGUIRE *et al.*, 1987; GONZÁLEZ *et al.*, 2012), não é possível afirmar que não tenham alterações cardíacas, que certamente serão encontradas em um percentual razoável de pacientes se analisados através de equipamentos mais sensíveis. Nosso trabalho evidenciou que 42% dos indivíduos com a forma indeterminada apresentam fibrose miocárdica, sendo que 50% desses casos tiveram percentuais de fibrose entre 2,1 e 10,8%. A relação entre fibrose miocárdica e disfunção ventricular esquerda e arritmias cardíacas já está bem estabelecida (ROCHITTE *et al.*, 2005; MELLO *et al.*, 2012), porém a evolução a longo prazo dos pacientes a forma indeterminada da doença de Chagas, com

e sem fibrose miocárdica, ainda está por ser determinada.

Em estudo prévio, nós avaliamos o valor do SGL do ventrículo esquerdo na predição de fibrose miocárdica em indivíduos com as diferentes formas da doença de Chagas crônica. O SGL é uma técnica ecocardiográfica que fornece informações detalhadas sobre a deformação miocárdica e a torsão ventricular esquerda (BLESSBERGER e BINDER, 2010). Nesse trabalho, nós correlacionamos a fibrose miocárdica com o SGL e com a fração de ejeção do VE, buscando verificar se o SGL teria valor incremental à fração de ejeção para a predição de fibrose (MACEDO *et al.*, 2015). A ressonância magnética, método não invasivo para a quantificação da fibrose miocárdica, é um exame de alto custo, não amplamente disponível e contraindicada em pacientes portadores de marcapasso cardíaco. O ecocardiograma convencional, com a medição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, já é considerado um exame extremamente útil na avaliação da morfologia e da função cardíaca, tendo a fração de ejeção uma correlação inversa com a fibrose miocárdica (ROCHITTE *et al.*, 2005). No entanto, para a detecção de alterações miocárdicas incipientes, estudos anteriores demonstraram que o strain é mais sensível e mais específico do que a fração de ejeção (KOYAMA *et al.*, 2003; RICHAND *et al.*, 2007). Apesar de nossos resultados terem evidenciado uma significativa correlação tanto do SGL quanto da FE do VE com a fibrose miocárdica, o SGL perdeu a significância estatística como preditor independente de fibrose miocárdica no modelo de análise multivariada (MACEDO *et al.*, 2015 - Anexo I).

Em relação aos biomarcadores, nosso grupo demonstrou previamente aumento da expressão de galectina-3 e syndecan-4 em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica, tendo a expressão de ambas sido modulada pela terapia com células mononucleares de medula óssea (SOARES *et al.*, 2011) e com G-CSF (VASCONCELOS *et al.*, 2013). Com base nesses dados, e também em dados de literatura que indicaram ser a galectina-3 uma molécula importante na regulação da fibrose cardíaca e do remodelamento ventricular (JOO *et al.*, 2001), tendo seus níveis aumentados em pacientes com descompensação aguda de insuficiência cardíaca (LOK *et al.*, 2010), propusemos a realização de um estudo clínico observacional, no qual avaliariamos a concentração sérica de galectina-3 em pacientes com a doença de Chagas crônica, correlacionando a galectina-3 com o percentual de fibrose miocárdica.

Para esse estudo, foram incluídos 61 indivíduos portadores de doença de Chagas confirmada por dois testes sorológicos diferentes, com idade entre 18 e 70 anos, sendo 17 indivíduos assintomáticos, com a forma indeterminada da doença, 16 pacientes com a forma cardíaca,

porém sem disfunção ventricular esquerda, e 28 pacientes com a forma cardíaca e disfunção ventricular esquerda (16 desses pacientes estavam em classe funcional III ou IV da NYHA). A mediana da concentração de galectina-3 foi de 12,1 ng/ml (IIQ: 9,4–14,4). Não observamos diferenças na concentração de galectina-3 entre indivíduos com ou sem fibrose miocárdica à ressonância magnética cardíaca ($p = 0,67$), ou entre indivíduos com as diferentes formas de apresentação da doença ($p = 0,90$), bem como não encontramos evidência de correlação entre a concentração de galectina-3 e a fibrose miocárdica ($r = 0,098$; $p = 0,47$) (NOYA-RABELO *et al.*, 2016 - Anexo II).

Essa ausência de correlação não condiz com dados previamente publicados por Lepojärvi e colaboradores, que demonstraram uma correlação positiva entre concentração sérica de galectina-3 e fibrose miocárdica, porém em indivíduos com doença arterial coronariana e fração de ejeção preservada (LEPOJÄRVI *et al.*, 2015). Também em indivíduos com cardiomiopatia dilatada não isquêmica, a galectina-3 foi capaz de predizer fibrose miocárdica à ressonância nuclear magnética (VERGARO *et al.*, 2015). Apesar desses dados, e de outros estudos sugerindo que níveis elevados de galectina-3 estão associados a pior prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca (SHAH *et al.*, 2010; DE BOER *et al.*, 2011), dois trabalhos recentes, sendo um com análise multivariada e uma revisão sistemática, refutaram a galectina-3 como preditor independente de eventos cardiovasculares (FELKER *et al.*, 2012; SRIVATSAN *et al.*, 2015).

Seguindo a nossa linha de estudo, levando em consideração o papel da galectina-3 na formação de fibrose miocárdica (SHARMA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2009), característica histológica marcante na doença de Chagas, decidimos aprofundar o estudo da galectina-3 através da análise dos seus polimorfismos genéticos nas diferentes formas de apresentação da doença. Estudos prévios já haviam demonstrado que variantes genéticas em dois sítios de polimorfismo de nucleotídeo único, conhecido como SNP (*single nucleotide polymorphism*) são capazes de modificar os níveis de proteínas (HU *et al.*, 2011). Esses SNPs, rs4644 e rs4652, correspondem aos genes *LGALS3* +191 A>C e *LGALS3* +292 A>C, respectivamente (HU *et al.*, 2011).

Em 16 indivíduos com a forma indeterminada e 39 com a forma cardíaca da doença de Chagas, nós avaliamos a relação entre os SNPs rs4644 e rs4652 da galectina-3 e as variações fenotípicas, bem como estudamos o percentual de fibrose miocárdica em cada um dos seus alelos (CRUZ *et al.*, 2015 - Anexo III). Não encontramos associação entre os genótipos de *LGALS3* (AA, AC, CC) dos SNPs rs4644 e rs4652 e a presença da forma cardíaca da doença de Chagas.

Também não observamos diferença estatisticamente significativa na mediana do percentual de fibrose miocárdica entre indivíduos com ou sem qualquer dos genótipos dos SNPs rs4644 e rs4652 (CRUZ *et al.*, 2015 - Anexo III).

Em relação à syndecan-4, objeto desta tese, o nosso trabalho caracterizou a expressão dessa proteína em tecido cardíaco de camundongos agudamente e cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, tendo demonstrado, pela primeira vez, a expressão de syndecan-4 em fragmentos de corações de indivíduos submetidos a transplante cardíaco ortotópico por doença de Chagas crônica, cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia dilatada idiopática.

Um resultado muito interessante foi o encontro da expressão aumentada de syndecan-4 predominantemente nas células musculares lisas, tanto em corações de camundongos quanto em tecido cardíaco humano. Sabe-se que, em geral, a syndecan-4 pode estar expressa em uma grande variedade de tipos celulares, incluindo cardiomiócitos, células endoteliais, fibroblastos cardíacos e células musculares lisas (LI *et al.*, 1997; JULIEN *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2012; SAMAREL, 2013). Estudos anteriores, entretanto, já demonstraram que a expressão e a liberação de syndecan-4 são aumentadas pelo estresse mecânico nas células musculares lisas (LI e CHAIKOF, 2002). Dessa forma, acreditamos que o estresse físico causado pelo processo inflamatório característico da doença de Chagas possa estar ocasionando especificamente uma maior expressão de syndecan-4 nas células musculares lisas, tanto em modelo experimental da doença quanto em seres humanos. Corroborando essa hipótese, trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram que a redução da inflamação, através do tratamento com G-CSF ou com células mononucleares de medula óssea, levou à redução na expressão de syndecan-4 (SOARES *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Em relação à fibrose miocárdica, trata-se de um achado comum a diversas doenças cardíacas, como, por exemplo miocardites virais e infarto agudo do miocárdio. Do ponto de vista histológico, já foi descrita previamente fibrose miocárdica em indivíduos com cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia idiopática (DE LEEUW *et al.*, 2001; OTTAVIANI *et al.*, 2015). Ao examinar corações de indivíduos em estágio final de insuficiência cardíaca, Leeuw e colaboradores identificaram a presença de fibrose importante em 21 dos 37 indivíduos com cardiomiopatia idiopática, e em 26 de 35 indivíduos com doenças cardíacas de outras causas (DE LEEUW *et al.*, 2001). Do mesmo modo, um estudo recente demonstrou que, tanto na cardiomiopatia isquêmica quanto na não isquêmica, casos que requerem transplante cardíaco ortotópico apresentavam elevados graus de fibrose, hipertrofia e miocitólise (OTTAVIANI *et al.*,

2015). Esses dados são coerentes com os achados do nosso estudo, que evidenciou fibrose miocárdica em grau semelhante nos 3 grupos de amostras de tecido cardíaco avaliados.

Quanto à quantificação do número de vasos positivos para syndecan-4, consideramos os nossos resultados como exploratórios, devido ao pequeno tamanho amostral para a análise da expressão de syndecan-4. Apesar de termos recebido amostras de tecido cardíaco de 60 indivíduos transplantados por doença de Chagas, cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia dilatada idiopática, apenas 20 amostras puderam ser apropriadamente marcadas para a análise da expressão dessa proteína, por questões técnicas ou por processamento inadequado do tecido. A ausência de diferença na expressão de syndecan-4 entre os 3 grupos de amostras pode ser de fato verdadeira, ou ter sido decorrente do pequeno tamanho amostral. O mesmo pode ter havido com a ausência de correlação entre essa expressão e o número de células inflamatórias. Estudos adicionais com análises de novas amostras poderão auxiliar a esclarecer essas questões.

No estudo de corte transversal, nós buscamos avaliar a syndecan-4 como um possível biomarcador para pacientes portadores de doença de Chagas, correlacionando essa proteína ao percentual de fibrose miocárdica, o que permitiria a identificação de pacientes nas fases mais precoces da evolução para cardiomiopatia dilatada. Uma correlação entre syndecan-4 e fibrose miocárdica poderia auxiliar no seguimento de pacientes com a forma indeterminada da doença com dosagens periódicas de syndecan-4, no intuito de detectar aqueles pacientes com maior risco de aumento da área de fibrose, com consequente progressão para formas cardíacas da doença, já tendo sido demonstrada uma significativa correlação negativa entre fibrose miocárdica e fração de ejeção (ROCHITTE *et al.*, 2005).

Por outro lado, indivíduos com as formas cardíacas da doença também poderiam se beneficiar do seguimento com dosagens de syndecan-4, visando um possível monitoramento terapêutico, já que algumas das drogas para insuficiência cardíaca podem ter um efeito antifibrótico, com melhora do remodelamento ventricular esquerdo, como, por exemplo, os inibidores da enzima conversora da angiotensina (KANASAKI *et al.*, 2011). Apesar de termos dados clínicos de acompanhamento de até 5 anos da maioria dos pacientes do estudo, não dispomos de uma segunda dosagem sérica de syndecan-4, que poderia esclarecer a importância dessa molécula no processo evolutivo e no prognóstico da doença.

Uma importante limitação desse estudo foi a utilização de uma amostra de conveniência, sem que tivesse sido feito um cálculo amostral especificamente para a detecção de diferenças na

concentração de syndecan-4 entre os grupos estudados ou para a avaliação da correlação entre syndecan-4 e fibrose miocárdica ou fração de ejeção ventricular esquerda. Talvez de fato não exista diferença nas concentrações de syndecan-4 entre os pacientes chagásicos com as três formas de apresentação da doença, porém é provável que a ausência de diferença entre indivíduos doentes (tanto portadores de doença de Chagas quanto aqueles com insuficiência cardíaca não chagásica) e voluntários saudáveis se deva ao pequeno tamanho amostral. Considerando que utilizamos a mesma metodologia e os mesmos kits comerciais utilizados em outros estudos para a mensuração da syndecan-4, era de se esperar que fosse detectada diferença entre os indivíduos cardiopatas e os voluntários saudáveis.

Um aspecto que merece uma reflexão especial nesse trabalho é a avaliação do NT-ProBNP plasmático, molécula que já está bem estabelecida como biomarcador em insuficiência cardíaca, com importante significado prognóstico a curto e longo prazo (NOVEANU *et al.*, 2011), correlacionando-se negativamente com a fração de ejeção ventricular esquerda (LEE *et al.*, 2015). Apesar do pequeno tamanho amostral, os dados obtidos no nosso estudo foram coerentes com a literatura, no sentido de evidenciar uma forte correlação negativa entre a concentração plasmática de NT-proBNP e a fração de ejeção ventricular esquerda, o que não ocorreu com a concentração sérica de syndecan-4. Essa observação sugere que, caso a syndecan-4 fosse um marcador pelo menos tão importante quanto o NT-proBNP, essa correlação entre a syndecan-4 e a fração de ejeção tivesse sido detectada, mesmo com o pequeno tamanho amostral, como em estudo prévio com 45 pacientes com cardiomiopatia dilatada ($r=-0,36$, $p=0,02$) (BIELECKA-DABROWA *et al.*, 2013) e também em 45 indivíduos com insuficiência cardíaca de diversas etiologias ($r=-0,599$, $p<0,001$) (TAKAHASHI *et al.*, 2011).

O BNP e o NT-ProBNP são considerados excelentes biomarcadores para insuficiência cardíaca aguda e para o seguimento de insuficiência cardíaca crônica. No entanto, não é uma tarefa fácil encontrar novos biomarcadores com tão boa performance, principalmente em doença de Chagas. Enquanto que os peptídeos natriuréticos são amplamente aceitos pela comunidade científica, alguns marcadores metabólicos e inflamatórios têm resultados contraditórios. A leptina, por exemplo, uma proteína produzida principalmente por adipócitos, pode ter um papel importante no estado catabólico, contribuindo para o desenvolvimento da caquexia nos estágios finais da insuficiência cardíaca, já tendo sido descrita a elevação dos seus níveis e de seu receptor solúvel em pacientes com insuficiência cardíaca avançada (SCHULZE *et al.*, 2003). Contrariamente, Richartz e colaboradores demonstraram que a concentração de leptina

plasmática é significativamente mais baixa em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica do que em indivíduos controles (RICHARTZ *et al.*, 2001). Na doença de Chagas, Fernandes e colaboradores avaliaram os níveis plasmáticos de leptina nas diferentes formas de apresentação da doença, tendo demonstrado níveis significativamente mais baixos ($p < 0,001$) de leptina no grupo com insuficiência cardíaca ($1,4 \pm 0,8$ ng/ml) quando comparados com indivíduos na forma indeterminada ($5,3 \pm 5,3$ ng/ml), indivíduos com ECG alterado ($9,7 \pm 10,7$ ng/ml) e grupo controle ($8,1 \pm 7,8$ ng/ml) (FERNANDES *et al.*, 2007). Apesar da diferença encontrada, esses resultados são questionáveis quando se analisa o tamanho amostral (52 pacientes com doença de Chagas divididos nos 3 primeiros grupos), a dispersão dos dados, além da apresentação de dados não paramétricos como média e desvio-padrão, ao invés de mediana e intervalo interquartil. Uma questão que também não pôde ser esclarecida por esse trabalho é se existe diferença com significância estatística nos níveis de leptina entre indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas e indivíduos controles.

O trabalho de Fernandes e colaboradores, assim como o nosso, ilustra a dificuldade em se realizar pesquisa no Brasil, principalmente para o estudo de doenças negligenciadas. Novos estudos são necessários com o objetivo de aprofundar as questões abordadas na nossa tese, levando a uma conclusão mais robusta. Até o momento, nós concluímos que, apesar da expressão aumentada de syndecan-4 no tecido cardíaco, tanto de camundongo quanto de seres humanos, essa proteína, em sua forma solúvel, não representa um bom biomarcador em indivíduos com doença de Chagas. A possível participação, entretanto, da syndecan-4 na patogênese da doença de Chagas ainda precisa ser esclarecida, visto que se trata de uma molécula comprovadamente associada aos processos de inflamação e fibrose, características importantes na doença.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira etapa do nosso trabalho demonstrou a expressão de syndecan-4 em células musculares lisas tanto em camundongos quanto em tecido cardíaco humano de indivíduos com cardiomiopatia chagásica crônica, sem, no entanto, evidência de correlação entre o percentual de fibrose miocárdica ou o número de células inflamatórias com o número de vasos positivos para syndecan-4.

O nosso estudo de corte transversal mostrou que não há evidência de correlação entre concentração sérica de syndecan-4 e o grau de fibrose miocárdica ou a fração de ejeção do ventrículo esquerdo em indivíduos na fase crônica da doença de Chagas. Do mesmo modo, também concluímos não haver correlação entre a expressão gênica de syndecan-4 e inflamação ou fibrose miocárdica em tecido cardíaco de indivíduos com doença de Chagas, cardiomiopatia isquêmica ou cardiomiopatia dilatada.

Estudos adicionais são necessários para avaliar a expressão de syndecan-4 em tecido cardíaco de indivíduos sem doenças cardíacas, a fim de determinar a expressão gênica basal dessa proteína, para posterior comparação com as demais amostras de tecido cardíaco provenientes de indivíduos com doença de Chagas e outras cardiomiopatias. Do mesmo modo, é de fundamental importância a busca por novos biomarcadores com potencial para a identificação precoce dos pacientes sob maior risco para o desenvolvimento de formas graves da doença de Chagas, para que possamos atuar de modo a retardar a sua progressão.

REFERÊNCIAS

ABEL, L. C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Autoimmun**, v. 17, n. 1, p. 99-107, aug. 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488642> >.

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124-31, mar. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339570> >.

ALMEIDA, I. C. et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J.**, v. 19, n. 7, p. 1476-1485, apr. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747016> >.

ANDRADE, J. et al. I Diretriz Latino-Americana para Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 97: p. 1-48, 2011.

ANDRADE, S. G. et al. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 187-200, apr.-jun. 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1842413> >.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. Pathogenesis of Chagas' chronic myocarditis; importance of ischemic lesions. **Arq. Bras. Med.**, v. 45, n. 7-8, p. 279-288, jul.-aug. 1955. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13283896> >.

ANDRADE, Z. A.; LOPES, E. A. A histochemical study of experimental Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 5, p. 236-242, sep.-oct. 1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14110096> >.

BARBOSA, A. P. et al. Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 97, n. 6, p. 517-525, dec. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030565> >.

BARBOSA JUNIOR, A.; ANDRADE, Z. Identificação do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 17: p. 123-126, 1984.

BASTOS, C. J. et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 6, p. e711, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559542> >.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, n. 5, p. e52-4, sep. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640226> >.

BERN, C. et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, nov. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000201> >.

BERNFIELD, M. et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 729-777, 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872465> >.

BERNFIELD, M. et al. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 365-393, 1992. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1335744> >.

BIELECKA-DABROWA, A. et al. The multi-biomarker approach for heart failure in patients with hypertension. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 5, p. 10715-10733, may. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25984599> >.

BIELECKA-DABROWA, A. et al. Biomarkers and echocardiographic predictors of myocardial dysfunction in patients with hypertension. *Sci. Rep.*, v. 5, p. 8916, mar. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747153> >.

BIELECKA-DABROWA, A. et al. Differences in biochemical and genetic biomarkers in patients with heart failure of various etiologies. **Int. J. Cardiol.**, v. 221, p. 1073-1080, oct. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27448535> >.

BIELECKA-DABROWA, A. et al. Heart failure biomarkers in patients with dilated cardiomyopathy. **Int. J. Cardiol.**, v. 168, n. 3, p. 2404-2410, oct. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416015> >.

BLESSBERGER, H.; BINDER, T. NON-invasive imaging: Two dimensional speckle tracking echocardiography: basic principles. **Heart**, v. 96, n. 9, p. 716-722, may. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424157> >.

BOCCHI, E. A.; FIORELLI, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, n. 6, p. 1833-1838, jun. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426756> >.

BORDA, E. et al. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 57, n. 3, p. 679-686, sep. 1984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088139> >.

BRITO, M. **Informe Técnico: gerenciamento do risco sanitário na transmissão de doença de chagas aguda por alimentos**: Ofício circular 33/2008 – GQTSA/GGALI/ANVISA, 2008.

BUSTAMANTE, J. M. et al. *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, n. 7, p. 889-896, jun. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062560> >.

BUSTAMANTE, J. M. et al. *Trypanosoma cruzi* reinfections provoke synergistic effect and cardiac beta-adrenergic receptors' dysfunction in the acute phase of experimental Chagas' disease. **Exp. Parasitol.**, v. 103, n. 3-4, p. 136-142, mar.-apr. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880590> >.

CALDAS, I. S. et al. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitol. Res.**, v. 103, n. 2, p. 413-421, jul. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454349> >.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 331-335, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677750> >.

CARCANVALLO, R. et al. Nova espécie do complexo oliveirai (Nova denominação para o complexo matogrossensis) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 71-79, 2001.

CAROD-ARTAL, F. J. et al. Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas disease. **Stroke**, v. 36, n. 5, p. 965-970, may. 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845889> >.

CARRASCO SÁNCHEZ, F. J. Galectin-3-independent prognosis in heart failure. **Clin. Res. Cardiol.**, v. 100, n. 2, p. 183, feb. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959997> >.

CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, p. 159–218, 1909.

CHAGAS, C. Processos patojenicos da tripanozomiose americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, p. 5-36, 1916.

CHEN, A. et al. Prognostic value of serum galectin-3 in patients with heart failure: A meta-analysis. **Int. J. Cardiol.**, v. 182C, p. 168-170, dec. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25577755> >.

CHIALE, P. A. et al. High prevalence of antibodies against beta 1- and beta 2-adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 26, n. 4, p. 864-869, oct. 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7560610> >.

CHIN-HONG, P. V. et al. Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. **Am. J. Transplant.**, v. 11, n. 4, p. 672-80, apr. 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401868> >.

CIZMECI-SMITH, G. et al. Syndecan-4 is a primary-response gene induced by basic fibroblast growth factor and arterial injury in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 1, p. 172-1780, jan. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9012653> >.

CLELAND, J. G. et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 15, p. 1539-1549, apr. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753115> >.

COUCHMAN, J. R. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 4, n. 12, p. 926-937, dec. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685171> >.

CRUZ, G. A. S. et al. Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 105, n. 5, p. 472-478, nov. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312551> >.

DANTAS, R. O.; DEGHAIDE, N. H.; DONADI, E. A. Esophageal manometric and radiologic findings in asymptomatic subjects with Chagas' disease. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 28, n. 3, p. 245-248, apr. 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10192612> >.

DE ANDRADE, A. L. et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, v. 348, n. 9039, p. 1407-1413, nov. 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8937280> >.

DE BOER, R. A. et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. **Ann. Med.**, v. 43, n. 1, p. 60-68, feb. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189092> >.

DE LEEUW, N. et al. Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. **Transpl. Int.**, v. 14, n. 5, p. 299-306, sep. 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11692213> >.

DI LULLO, L. et al. Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. **Cardiorenal. Med.**, v. 5, n. 4, p. 254-266, oct. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26648942> >.

DIAS, J.; COURA, J. Epidemiologia. In: **Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico.**: Fiocruz Publisher, 1997.

DIAS, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 22, n. 3, p. 147-156, jul.-sep. 1989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2486527> >.

DIAS, J. C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 11-18, oct. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891281> >.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 3, p. 296-300, may-jun. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719812> >.

DIEZ, M. et al. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation

and treatment follow-up in heart transplantation. **Am. J. Transplant.**, v. 7, n. 6, p. 1633-1640, jun. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17511688> >.

DOBRA, K.; NURMINEN, M.; HJERPE, A. Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. **Anticancer Res.**, v. 23, n. 3B, p. 2435-2444, may-jun. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894525> >.

DUFFY, T. et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 3, n. 4, p. e419, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381287> >.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 3, p. 287-292, jun. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448974> >.

FABBRO, D. L. et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 1, p. 1-10, jan-feb. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486245> >.

FABRINO, D. L. et al. Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. **Nitric Oxide**, v. 11, n. 2, p. 166-174, sep. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15491849> >.

FEIT, A.; EL-SHERIF, N.; KOROSTOFF, S. Chagas' disease masquerading as coronary artery disease. **Arch. Intern. Med.**, v. 143, n. 1, p. 144-145, jan. 1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6849594> >.

FELKER, G. M. et al. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. **Circ. Heart Fail.**, v. 5, n. 1, p. 72-78, jan. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016505> >.

FERNANDES, F. et al. Leptin levels in different forms of Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, n. 12, p. 1631-6, Dec 2007. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713658> >.

FERREIRA, R. C. et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 407-411, apr. 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886425> >.

FITZGERALD, M. L. et al. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J. Cell Biol.*, v. 148, n. 4, p. 811-824, feb. 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684261> >.

FREITAS, H. F. et al. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.*, v. 102, n. 2, p. 239-247, jul. 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982491> >.

FUKUNAGA, N. et al. Establishment of a model of atrial fibrillation associated with chronic kidney disease in rats and the role of oxidative stress. *Heart Rhythm*, v. 9, n. 12, p. 2023-2031, dec. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906534> >.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.*, v. 7, p. e2062, jan. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26794657> >.

GARCIA, S. et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, apr. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793134> >.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.*, v. 115, n. 1-2, p. 22-27, jul-aug. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646412> >.

GASCÓN, J. et al. Diagnosis, management, and treatment of chronic chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Rev. Esp. Cardiol.**, (Engl Ed), v. 60, n. 3, p. 285-293, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24774523> >.

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 1, p. 19-22, jan. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488221> >.

GLASSOCK, R. J.; PECOITS-FILHO, R.; BARBERATO, S. H. Left ventricular mass in chronic kidney disease and ESRD. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 4 Suppl 1, p. S79-91, dec 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996010> >.

GOMES, J. A. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, mar. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595431> >.

GONZÁLEZ, J. et al. Sudden death in indeterminate Chagas disease is uncommon. A systematic review.: **Rev. Argent. Cardiol.**, p. 240-246, 2012.

GÖTTE, M. Syndecans in inflammation. **FASEB J.**, v. 17, n. 6, p. 575-591, apr. 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665470> >.

HIGUCHI, M. E. L. et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc. Res.**, v. 60, n. 1, p. 96-107, oct. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522411> >.

HU, C. Y. et al. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. **Clin. Rheumatol.**, v. 30, n. 9, p. 1227-1233, sep. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21475983> >.

IANNI, B. M. et al. Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, n. 1, p. 59-62, jul. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500748> >.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 51, n. 10, p. e69-75, nov. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932171> >.

JAROSZYŃSKI, A. J. et al. Syndecan-4 Is an Independent Predictor of All-Cause as Well as Cardiovascular Mortality in Hemodialysis Patients. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0163532, 2016 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27685148> >.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n. 3, p. 348-357, mar. 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8470772> >.

JOO, H. G. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, n. 4, p. 555-564, apr 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11310841> >.

JULIEN, M. A. et al. Mechanical strain regulates syndecan-4 expression and shedding in smooth muscle cells through differential activation of MAP kinase signaling pathways. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 292, n. 1, p. C517-25, jan. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822948> >.

KANASAKI, M. et al. Elevation of the antifibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a blood pressure-independent beneficial effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitors. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 4, p. 25, nov. 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126210> >.

KEATING, S. M. et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. **Int J Cardiol**, v. 199, p. 451-9, nov. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26277551> >.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 11, p. 513-516, nov. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125464> >.

KLIMENT, C. R. et al. Oxidative stress alters syndecan-1 distribution in lungs with pulmonary

fibrosis. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 6, p. 3537-3545, feb. 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073610> >.

KLIMENT, C. R.; OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase protects cardiovascular syndecan-1 from oxidative shedding. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 50, n. 9, p. 1075-1080, may 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334435> >.

KOJIMA, T. et al. Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. **Thromb Haemost**, v. 85, n. 5, p. 793-799, may. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372670> >.

KOYAMA, J.; RAY-SEQUIN, P. A.; FALK, R. H. Longitudinal myocardial function assessed by tissue velocity, strain, and strain rate tissue Doppler echocardiography in patients with AL (primary) cardiac amyloidosis. **Circulation**, v. 107, n. 19, p. 2446-2452, may. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743000> >.

KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.**, v. 6, p. 63-116, 1968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4239747> >.

LAROCCA, T. F. et al. Transplantation of adipose tissue mesenchymal stem cells in experimental chronic chagasic cardiopathy. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 100, n. 5, p. 460-468, may. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568098> >.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 342-348, apr. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395248> >.

LEE, M. et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement is useful in predicting left ventricular hypertrophy regression after aortic valve replacement in patients with severe aortic stenosis. **Heart Asia**, v. 7, n. 1, p. 23-28, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27326209> >.

LEPOJÄRVI, E. S. et al. Serum PINP, PIIINP, galectin-3, and ST2 as surrogates of myocardial fibrosis and echocardiographic left ventricular diastolic filling properties. **Front. Physiol.**, v. 6, p. 200, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26217237> >.

LI, J. et al. Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. **Circ. Res.**, v. 81, n. 5, p. 785-796, nov. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351452> >.

LI, L.; CHAIKOF, E. L. Mechanical stress regulates syndecan-4 expression and redistribution in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, n. 1, p. 61-68, jan. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788462> >.

LIMA-COSTA, M. F. et al. Plasma B-type natriuretic peptide as a predictor of mortality in community-dwelling older adults with Chagas disease: 10-year follow-up of the Bambui Cohort Study of Aging. **Am. J. Epidemiol.**, v. 172, n. 2, p. 190-196, jul. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581155> >.

LIU, Y. H. 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.**, v. 296, n. 2, p. H404-12, feb. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098114> >.

LO PRESTI, M. S. et al. Changes in the cardiac beta-adrenergic system provoked by different *T. cruzi* strains. **Int. J. Cardiol.**, v. 111, n. 1, p. 104-112, jul. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246441> >.

LOK, D. J. et al. 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.**, v. 99, n. 5, p. 323-328, may. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130888> >.

LOPES, C. C.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 2, p. 157-167, feb. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470302> >.

LUZ, P. R. et al. Association of IP-10 and PDGF-BB levels with clinical forms of chronic Chagas disease. **Int. J. Cardiol.**, v. 169, n. 4, p. e53-5, nov. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24182907> >.

MACEDO, C. T. et al. Assessment of speckle tracking strain predictive value for myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease: **IJC Heart and Vasculature**, v. 8, p. 75-80, 2015.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin. Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p. 753-770, nov. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076807> >.

MADY, C. et al. Serum NT pro-BNP: relation to systolic and diastolic function in cardiomyopathies and pericardiopathies. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 91, n. 1, p. 46-54, jul. 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660945> >.

MADY, C. et al. Capacidade funcional Máxima, Fração de ejeção e Classe Funcional na Cardiomiopatia Chagásica. Existe relação entre esses índices?: **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 84, 2005.

MAGUIRE, J. H. et al. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**, v. 75, n. 6, p. 1140-1145, jun. 1987. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3552307> >.

MARIN-NETO, J.; SIMÕES, M.; SARABANDA, A. Cardiopatia Chagásica. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 72, p. 247-263, 1999.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, mar. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339569> >.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Trop.**, v. 130, p. 167-174, feb. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24139912> >.

MELLO, R. P. et al. Delayed enhancement cardiac magnetic resonance imaging can identify the risk for ventricular tachycardia in chronic Chagas' heart disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 98, n. 5, p. 421-430, may. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460166> >.

MELO, R. C. et al. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. **Cell Biol. Int.**, v. 27, n. 10, p. 853-861, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499666> >.

MOIA, B.; ROSENBAUM, M. B. The electrocardiogram in chronic Chagas' myocarditis. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 13, p. 236-243, sep. 1960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13771742> >.

MOREIRA, M. A. C. et al. Prognostic value of natriuretic peptides in Chagas' disease: a head-to-head comparison of the 3 natriuretic peptides. **Congest Heart Fail**, v. 15, n. 2, p. 75-81, 2009 mar-apr. 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379453> >.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N. Engl. J. Med.**, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, oct. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323937> >.

MOTT, K. E.; HAGSTROM, J. W. The pathologic lesions of the cardiac autonomic nervous system in chronic Chagas' myocarditis. **Circulation**, v. 31, p. 273-286, feb. 1965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14261745> >.

NIKKARI, S. T. et al. Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. **Am. J. Pathol.**, v. 144, n. 6, p. 1348-5136, jun. 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8203472> >.

NOBRE, F.; SERRANO JR, C. **Tratado de Cardiologia**. Socesp.: Manole. 1^a ed., 2005.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror- γ t, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, p. 914326, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25152568> >.

NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; CALDAS, I. S. Galectin-3 and Chagas Disease-Associated Cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 213, n. 5, p. 871, mar. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464205> >.

NOVEANU, M. et al. Direct comparison of serial B-type natriuretic peptide and NT-proBNP levels for prediction of short- and long-term outcome in acute decompensated heart failure. **Crit Care**, v. 15, n. 1, p. R1, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208408> >.

NOYA-RABELO, M. M. et al. Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy. **Cardiology**, v. 136, n. 1, p. 33-39, aug. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27548475> >.

OKAMOTO, E. E. et al. Biomarkers in *Trypanosoma cruzi*-Infected and Uninfected Individuals with Varying Severity of Cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, p. e3227, oct. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275382> >.

OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D. et al. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 4, p. 563-570, oct. 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790431> >.

OLIVEIRA, J. S. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. **Am. Heart J.**, v. 110, n. 5, p. 1092-1098, nov. 1985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3904376> >.

OLIVEIRA, J. S. et al. Apical aneurysm of Chagas's heart disease. **Br. Heart J.**, v. 46, n. 4, p. 432-437, oct. 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7295439> >.

OTTAVIANI, G. et al. Pathological assessment of end-stage heart failure in explanted hearts in correlation with hemodynamics in patients undergoing orthotopic heart transplantation.

Cardiovasc. Pathol., v. 24, n. 5, p. 283-289, sep-oct. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26129629> >.

PALOMINO, S. A.; AIELLO, V. D.; HIGUCHI, M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 94, n. 6, p. 571-579, sep. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11064759> >.

PAOLETTI, E. et al. Associations of Left Ventricular Hypertrophy and Geometry with Adverse Outcomes in Patients with CKD and Hypertension. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 2, p. 271-279, feb. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26668021> >.

PEREIRA BARRETTO, A. C. et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. **Am. Heart J.**, v. 111, n. 2, p. 307-312, feb. 1986. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3946173> >.

PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a foodborne illness. **J. Food Prot.**, v. 72, n. 2, p. 441-6, feb. 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350996> >.

PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 11, p. 4896-4899, nov. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823286> >.

PINEDA, M. A. et al. Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective Immune Responses in a Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **J. Infect. Dis.**, mar. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25805753> >.

RAPRAEGER, A. C. Syndecan-regulated receptor signaling. **J. Cell Biol.**, v. 149, n. 5, p. 995-998, may. 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831602> >.

RASSI, A. Implantable cardioverter-defibrillators in patients with Chagas heart disease: misperceptions, many questions and the urgent need for a randomized clinical trial. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, v. 18, n. 12, p. 1241-1243, dec. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971129> >.

RASSI, A. et al. The influence of corticoids, in Chronic Chagas disease, administered in virtue of associated disorders. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 2, p. 93-99, mar-apr 1997.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148341> >.

RASSI, A.; DIAS, J. C.; MARIN-NETO, J. A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v. 95, n. 7, p. 524-534, apr. 2009.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131444> >.

RASSI, A. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, n. 8, p. 799-808, aug. 2006. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928995> >.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease).

Infect. Dis. Clin. North Am., v. 26, n. 2, p. 275-291, jun. 2012. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632639> >.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, apr.

2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

RASSI, A.; RASSI, A. J.; RASSI, G. Fase aguda da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2nd ed. Rio de Janeiro, 2010.

RASSI, A.; RASSI, S. G. Sudden death in Chagas' disease. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 76, n. 1, p.

75-96, Jan 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175486> >.

RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1101-1108, mar. 2007. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339568> >.

RASSI, A. J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, A. Chagas disease. In: FRANCO-PAREDES, C.; SANTOS-PRECIATO, J.I (eds.), **Neglected Tropical Diseases - Latin america and Caribbean**. 2015. p. 41-75.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 152-158, jul. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753470> >.

RASSI JÚNIOR, A. et al. Ventricular arrhythmia in Chagas disease. Diagnostic, prognostic, and therapeutic features. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 65, n. 4, p. 377-87, oct. 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728815> >.

REGUEIRO, A. et al. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. **Int. J. Cardiol.**, v. 165, n. 1, p. 107-112, apr. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907431> >.

REIFENBERG, K. et al. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. **Am. J. Pathol.**, v. 171, n. 2, p. 463-472, aug. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556594> >.

REIS, M. M. et al. Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 6, p. 509-518, nov-dec. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175580> >.

REIS, M. M. et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 83, n. 2, p. 165-172, may. 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143377> >.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. et al. Cell therapy in Chagas cardiomyopathy (Chagas arm of the multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies study): a multicenter randomized trial. **Circulation**, v. 125, n. 20, p. 2454-2461, may. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523306> >.

RICHAND, V. 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.**, v. 100, n. 1, p. 128-132, jul. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599454> >.

RICHARDS, A. M. The natriuretic peptides in heart failure. **Basic Res. Cardiol.**, v. 99, n. 2, p. 94-100, mar. 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963668> >.

RICHARTZ, B. M. et al. Leptin: a parameter for metabolic changes in heart failure. **Z. Kardiol.**, v. 90, n. 4, p. 280-285, apr. 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381576> >.

ROCHITTE, C. E. et al. Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. **Artif Organs**, v. 31, n. 4, p. 259-267, apr. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437493> >.

ROCHITTE, C. E. et al. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. **J Am Coll Cardiol**, v. 46, n. 8, p. 1553-1558, oct. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226184> >.

ROSENBAUM, M. B. Chagasic myocardopathy. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 7, p. 199-225, nov. 1964. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14223289> >.

ROSENBAUM, M. B.; ALVAREZ, A. J. The electrocardiogram in chronic chagasic myocarditis. **Am. Heart J.**, v. 50, n. 4, p. 492-527, oct. 1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13258478> >.

ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **Int. J. Cardiol.**, v. 30, n. 3, p. 335-340, mar. 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2055674> >.

ROSSI, M. A.; CAROBREZ, S. G. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, n. 2, p. 155-160, apr. 1985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3986128> >.

ROSSI, M. A.; GONÇALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **Am. J. Pathol.**, v. 114, n. 2, p. 209-216, feb. 1984. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6230012> >.

SABINO, E. C. et al. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. **Circulation**, v. 127, n. 10, p. 1105-1115, mar. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393012> >.

SAMAREL, A. M. Syndecan-4: a component of the mechanosensory apparatus of cardiac fibroblasts. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 56, p. 19-21, mar. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266594> >.

SARTORI, A. M. et al. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 101, n. 1, p. 31-50, jan. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244408> >.

SCHIJMAN, A. G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 1, p. e931, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264349> >.

SCHULZE, P. C. et al. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. **Eur. J. Heart Fail.**, v. 5, n. 1, p. 33-40, jan. 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559213> >.

SHAH, R. V. et al. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. **Eur. J. Heart Fail.**, v. 12, n. 8, p. 826-832, aug. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525986> >.

SHARMA, U. C. et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. **Circulation**, v. 110, n. 19, p. 3121-8, nov. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520318> >.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, n. 6, p. 845-852, mar 2012. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238161> >.

SILVA, J. S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 12, p. 4862-4867, dec. 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591147> >.

SMIT, M. D. et al. Role of inflammation in early atrial fibrillation recurrence. **Europace**, v. 14, n. 6, p. 810-817, jun. 2012. 1532-2092. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237586> >.

SOARES, M. B. et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 202, n. 3, p. 416-426, aug. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565256> >.

SOARES, M. B. et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1448-1455, may. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21467843> >.

SOARES, M. B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 73, n. 4, p. 547-559, dec. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743602> >.

SOARES, M. B. et al. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 2, p. 703-709, aug. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485928> >.

SOSA ESTANI, S. et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 4, p. 526-529, oct. 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790423> >.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma*

cruzi: experiences in Argentina. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, n. 6, p. 583-587, dec. 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17075335> >.

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.**, v. 22, n. 9, p. 1096-1110, sep. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25268020> >.

STIMPERT, K. K.; MONTGOMERY, S. P. Physician awareness of Chagas disease, USA. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, n. 5, p. 871-2, may. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20409389> >.

TAKAHASHI, R. et al. Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. **J. Cardiol.**, v. 57, n. 3, p. 325-332, may. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397460> >.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 550-554, may. 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334941> >.

TKACHENKO, E.; RHODES, J. M.; SIMONS, M. Syndecans: new kids on the signaling block. **Circ. Res.**, v. 96, n. 5, p. 488-500, mar. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774861> >.

VAN OVERTVELT, L. et al. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 4033-4040, aug. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417171> >.

VASCONCELOS, J. F. 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**, v. 27, n. 12, p. 4691-4702, dec. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23964077> >.

VERANI, J. R. et al. Survey of obstetrician-gynecologists in the United States about Chagas disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 4, p. 891-895, oct. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889886> >.

VERGARO, G. et al. Galectin-3 and myocardial fibrosis in nonischemic dilated cardiomyopathy. **Int. J. Cardiol.**, v. 184, p. 96-100, apr. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697876> >.

VILAS-BOAS, F. et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 87, n. 2, p. 159-166, aug. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951834> >.

VILAS-BOAS, F. et al. Bone marrow cell transplantation in Chagas' disease heart failure: report of the first human experience. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 96, n. 4, p. 325-331, apr. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359478> >.

VILLAR, J. C. et al. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD003463, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869663> >.

VILLAR, J. C. et al. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 5, p. CD003463, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867876> >.

VIOTTI, R. et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 2, p. 635-639, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24247135> >.

VIOTTI, R. et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann. Intern. Med.**, v. 144, n. 10, p. 724-734, may. 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702588> >.

WALLACE, J. A. et al. Chagas disease: a proposal for testing policy for solid-organ transplant

in the United States. **Prog. Transplant**, v. 23, n. 3, p. 272-277, sep. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23996948> >.

WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control? **Acta Trop.**, v. 115, n. 1-2, p. 28-34, jul-aug. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044970> >.

WHO. Chagas disease: control and elimination. Geneva: World Health Organization. **World Health Assembly Rep.**, p. 1-4, 2010.

WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, p. 3-44, 2015.

WU, H. et al. Syndecan-4 shedding is involved in the oxidative stress and inflammatory responses in left atrial tissue with valvular atrial fibrillation. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 6, p. 6387-6396, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26261514> >.

XIE, J. et al. Syndecan-4 over-expression preserves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 53, n. 2, p. 250-258, aug. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561100> >.

ZACKS, M. A. et al. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, n. 4, p. 695-715, dec. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341444> >.

ZHANG, Y. et al. Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF-alpha. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 21, p. 14786-147890, may. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329676> >.

ANEXOS

ANEXO I

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

ANEXO II

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

ANEXO III

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