

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA COM G-CSF PARA A MELHORA DOS
SINTOMAS EM PACIENTES PORTADORES DE CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA: ENSAIO CLÍNICO FASE II, PROSPECTIVO, BICÊNTRICO, DUPLO-
CEGO, RANDOMIZADO E CONTROLADO POR PLACEBO**

CAROLINA THÉ MACÊDO

Salvador – Bahia

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA COM G-CSF PARA A MELHORA DOS
SINTOMAS EM PACIENTES PORTADORES DE CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA: ENSAIO CLÍNICO FASE II, PROSPECTIVO, BICÊNTRICO, DUPLO-
CEGO, RANDOMIZADO E CONTROLADO POR PLACEBO.**

CAROLINA THÉ MACÊDO

Orientadora: Prof.^a Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação
em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa, como parte dos requisitos
necessários para obtenção de grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2020

"AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA COM G-CSF PARA A MELHORA DOS SINTOMAS EM PACIENTES PORTADORES DE CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA: ENSAIO CLÍNICO FASE II, PROSPECTIVO, BICÊNTRICO, DUPLOCEGO, RANDOMIZADO E CONTROLADO POR PLACEBO"

CAROLINA THÉ MACÊDO

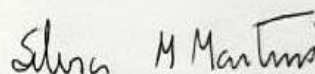
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 09 de dezembro de 2020.

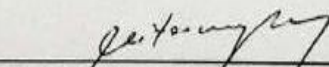
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Wilson Nadruz Junior
Professor Associado
UNICAMP



Dra. Silvia Marinho Martins
Médica
PROCAPE



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Instituto Gonçalo Moniz e Programa de desenvolvimento tecnológico em Saúde Pública

VPPLR- Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

À minha família Daniel, Eduardo e Isabela pelo amor e apoio constantes, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo “eu te amo mamãe” diário.

Aos meus pais, Leila e Absolon, e aos meus irmãos, Michele e Lúcio, por serem meus maiores incentivadores e admiradores.

À Dra. Milena Botelho Pereira Soares, uma das mais brilhantes pesquisadoras que conheço, uma orientadora que se tornou minha amiga, sempre disposta a ajudar, mas também a estimular a busca pelo aprendizado diariamente.

À Ticiania Larocca, amiga de todos os momentos, pelas madrugadas de trabalho me ajudando e pelas gargalhadas acolhedoras.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, grande médico e pesquisador, por ter me transmitido um pouco da sua vasta experiência em doença de Chagas.

Às minhas queridas amigas e coordenadoras de estudo clínico, Daniela Paixão e Milena Bezerra, cujo apoio na organização e condução deste estudo foi fundamental e sem as quais ele não poderia ter acontecido.

À equipe de cardiologia do Hospital São Rafael, em especial à minha chefe, Dra. Márcia Noya, pelo suporte e orientação durante o andamento do estudo.

Ao Dr. Roque Aras, chefe do ambulatório de doença de Chagas do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), pelo apoio em inúmeros projetos de pesquisa, sempre disponível a ajudar a equipe e ao paciente.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz pela qualidade das suas pós graduações, disseminando a cultura e a importância da pesquisa para o crescimento do nosso país.

À biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz pela importante apoio na formatação final da tese.

Aos pacientes que participaram desse estudo, que com muito amor e confiança nos permitiram realizar este trabalho.

“Arriving at one goal is the starting point to another”

MACÊDO, Carolina Thé. Avaliação da eficácia da terapia com g-csf para a melhora dos sintomas em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica: ensaio clínico fase ii, prospectivo, bicêntrico, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo. 2020. 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é uma condição clínica potencialmente fatal, sendo responsável pela maior parte da morbimortalidade da doença de Chagas crônica. Apesar do mecanismo fisiopatogênico único, o tratamento padrão da CCC é semelhante ao esquema terapêutico para insuficiência cardíaca (IC) de outras etiologias. Sendo uma doença negligenciada, uma nova abordagem terapêutica é de extrema necessidade, e o reposicionamento de medicamentos já usados na prática clínica é uma estratégia de pesquisa muito usada atualmente por ser considerada mais rápida e potencialmente eficaz para o desenvolvimento de um novo tratamento. Estudos anteriores mostraram que o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) melhora a função cardíaca em modelos animais de CCC e também em ensaios clínicos de IC de outras etiologias. Nesse estudo, realizamos um ensaio randomizado duplo-cego controlado por placebo com objetivo de avaliar a eficácia e a segurança da terapia com G-CSF com o uso concomitante de terapia padrão para IC em pacientes com CCC. **MÉTODOS:** Na Bahia, Brasil, foram incluídos 37 pacientes com cardiomiopatia chagásica, idade entre 20 e 75 anos, classe funcional II a IV da New York Heart Association (NYHA) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) $\leq 50\%$. Todos os pacientes receberam tratamento padrão para IC por dois meses antes da randomização para o grupo G-CSF (10 mcg / kg / dia) ou placebo, ambos associados a manutenção do tratamento para IC. O desfecho primário foi a estabilização ou melhora da classe funcional desde o início até 6 e 12 meses após o tratamento. A análise estatística foi por intenção de tratar. **RESULTADOS:** As características basais dos pacientes foram bem equilibradas entre os grupos. A maioria dos pacientes apresentava insuficiência cardíaca em classe II da NYHA (86,4%) e, em ambos os grupos, uma média baixa de FEVE ($32\% \pm 7$ no grupo G-CSF e $33\% \pm 10$ no grupo placebo). A frequência do desfecho primário em 6 meses foi de 78% vs 66% ($p: 0,47$) e aos 12 meses foi de 68% vs 72% ($p: 0,80$) nos grupos placebo e G-CSF, respectivamente. Em relação ao perfil de segurança, o G-CSF foi seguro, sem qualquer adverso grave relacionado ao tratamento teste e nenhuma diferença na mortalidade em comparação com o grupo placebo. Embora a análise exploratória dos desfechos secundários não tenha sido estatisticamente significativa, o consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx) mostrou uma tendência de melhora no grupo G-CSF aos 12 meses. **CONCLUSÃO:** A terapia com G-CSF no CCC é segura e bem tolerada, porém sua eficácia na prevenção da progressão dos sintomas não pôde ser demonstrada pelo presente estudo.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Cardiomiopatia chagásica, Fibrose, Imunomodulação, G-CSF.

MACÊDO, Carolina Thé. Efficacy and Safety of G-CSF Therapy in Chagas Cardiomyopathy: A Phase II Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. 2020. 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

BACKGROUND: Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is a life-threatening clinical condition, resulting in most of the morbidity and mortality caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* infection. Despite of having a unique physio pathogenic mechanism, CCC standard treatment is the same than any other heart failure (HF) syndromes. As for any neglected diseases, a new therapeutic approach is of utmost need, and drug repurposing is the quickest research and development strategy to deliver a new treatment. Previous studies showed that granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) improves heart function in a model of CCC. Herein we report the interim results of a double-blind, placebo controlled randomized trial to evaluate the efficacy and safety of G-CSF therapy with concomitant use of standard heart failure therapy in patients with CCC. **METHODS:** In the state of Bahia, Brazil, 37 patients with Chagas cardiomyopathy, age between 20 and 75 years, New York Heart Association (NYHA) functional class II to IV and left ventricular ejection fraction (LVEF) of $\leq 50\%$ were included. All patients received standard HF treatment for two months before randomization to either G-CSF (10 mcg/kg/day) or placebo group, both associated with HF treatment. The primary end point was either maintenance or improvement of NYHA class from baseline to 6 and 12 months after treatment and intention to treat analysis was used. **RESULTS:** Overall, baseline characteristics were well balanced between groups. Most of the patients had NYHA class II of heart failure (86.4%) and, in both groups, low mean LVEF ($32\% \pm 7$ in G-CSF group and $33\% \pm 10$ in placebo group). Frequency of primary endpoint at 6 months was 78% vs 66% ($p:0.40$) and at 12 months was 68% vs 72% ($p:0.8$) in placebo and G-CSF groups, respectively. Regarding safety profile, G-CSF was safe, without any serious adverse event related and no difference in mortality compared with placebo group. Although exploratory analysis of secondary endpoints were not statistically significant at 12 months, maximal oxygen consumption (VO_2 max) showed a tendency for improvement in G-CSF group. **CONCLUSION:** G-CSF therapy in CCC is safe and well tolerated, however it's efficacy in preventing symptom's progression could not be demonstrated by the present study.

Clinical Trial Registration—URL: <http://www.clinicaltrials.gov>. Unique identifier: NCT02154269

Keywords: Chagas disease; cardiomyopathy; G-CSF; Fibrosis; Immunomodulation therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 2: Fisiopatologia da doença de Chagas e exames diagnósticos em cada fase da doença.

Figura 3: Estratificação de risco da CCC.

Figura 4: Tratamento padrão de insuficiência cardíaca.

Figura 5: Ações do G-CSF no coração.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de casos notificados de DC aguda na Bahia.

Tabela 2: Taxa de mortalidade por doença de Chagas, segundo local de residência, 2008 a 2017.

Tabela 3: Fontes de transmissão de DC aguda, anos 2012 a 2016.

Tabela 4: Recomendações terapêuticas para tratamento etiológica da doença de Chagas.

Tabela 5: Estudos randomizados da terapia com G-CSF em cardiopatias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
BAV	Bloqueio átrio-ventricular
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CRF	<i>Case report form</i>
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTM_G-CSF	Célula-tronco mesenquimal com super expressão do G-CSF
DALY	Anos potenciais de vida perdidos com incapacidades
DC	Doença de Chagas
DCO	Débito cardíaco
DCAM	Dispositivo de assistência circulatória mecânica
DVD	Diâmetro ventricular diastólico
DVS	Diâmetro ventricular sistólico
ECG	Eletrocardiograma
FE	Fração de ejeção
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFN gama	Interferon gama
IL	Interleucina
MS	Ministério da Saúde
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNM	Ressonância nuclear magnética

RMC	Ressonância magnética cardíaca
TC	Transplante cardíaco
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TV	Taquicardia ventricular
TVNS	Taquicardia ventricular não sustentada
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VS	Volume sistólico
VDF	Volume diastólico final
VSF	Volume sistólico final

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	16
2.1.1	Aspectos Gerais	16
2.1.2	Transmissão	18
2.1.3	Diagnóstico	22
2.1.4	Patogênese	23
2.1.4.1	<i>Fase aguda</i>	23
2.1.4.2	<i>Fase crônica</i>	24
2.2	CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA.....	29
2.2.1	Diagnóstico da cardiomiopatia chagásica crônica	29
2.2.2	Quadro clínico da CCC	31
2.2.3	Fatores Prognósticos e estratificação de Risco da CCC	33
2.3	TRATAMENTO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	36
2.3.1	Terapia-padrão	36
2.3.2	Novas terapias	40
2.3.3	Terapia com G-CSF	41
3	OBJETIVOS	46
4	CAPÍTULO 1	47
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença parasitária que afeta mais de 21 países nas Américas, atingindo 6 milhões de pessoas e apresentando cerca de 30 mil casos novos por ano na região até o ano de 2019 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019a). Esta doença é responsável por grande impacto na saúde pública do Brasil. Entre os anos de 2000 a 2010, o total de anos potenciais de vida perdidos devido a esta doença foi de 7 milhões de anos, sendo 9% deste total devido à anos de vida perdidos e 91% a anos de vida com incapacidade (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2019a).

A DC caracteriza-se por uma fase aguda, na maioria das vezes assintomática ou oligossintomática, e uma fase crônica, sendo esta última dividida em forma indeterminada, forma cardíaca e forma cardio-digestiva. A maioria dos pacientes permanecem na forma indeterminada ao longo da vida, sendo que após cerca de 10 a 30 anos, 30% destes podem evoluir para a forma cardíaca da doença, responsável pela maior morbi-mortalidade entre todos os tipos descritos (RASSI et al., 2010).

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) atinge cerca 1.5 milhões de pessoas no mundo e acarreta cerca de 12.000 mortes por ano (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Dentre as cardiopatias não isquêmicas, a cardiopatia chagásica é uma das principais causas de insuficiência cardíaca na América Latina e no Brasil (DE ALBUQUERQUE et al., 2015). Adicionalmente, a CCC possui pior prognóstico do que as de outras etiologias, incluindo a hipertensiva, idiopática e isquêmica, sendo a presença da DC um preditor independente de mortalidade em portadores dessa doença (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A terapia anti-*Trypanosoma cruzi* para a DC não é totalmente eficaz na fase aguda e, na fase crônica, não há evidência que esta terapia controle a progressão para cardiopatia (MORILLO et al., 2015b).

A fase crônica da DC pode evoluir assintomática por anos. Quando a CCC se manifesta como insuficiência cardíaca, o tecido miocárdico já se apresenta disfuncional e remodelado após um longo período de inflamação crônica associada a mecanismos imuno-mediados relacionados à presença do parasita, além de reações imunológicas. Nesta fase, o miocárdio apresenta infiltrado inflamatório importante e fibrose de distribuição difusa. O tratamento disponível consiste na terapia padrão para insuficiência cardíaca, arritmias e eventos tromboembólicos, que pouco interfere no processo inflamatório e/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 e pouca disponibilidade de órgãos, além de acarretar uma série de problemas relacionados à reativação da doença de Chagas e à imunossupressão (PINTO DIAS et al., 2016).

Portanto, novas terapias são necessárias para evitar ou retardar a progressão da CCC. O uso de citocinas que modulem os processos inflamatórios relacionados à evolução da doença pode se constituir em uma alternativa importante para o tratamento desta doença.

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma citocina já conhecida, segura e usada na prática clínica para mobilização de neutrófilos em casos de neutropenia e para mobilização de células tronco (CT) da medula óssea em protocolos de transplante de medula óssea (BOOZ, 2007; GASCÓN et al., 2018).

Estudos em modelos animais de DC demonstraram que esta citocina possui potencial efeito de imunomodulação através da capacidade de mobilização e recrutamento de células-tronco da medula óssea e linfócitos T regulatórios, além da redução de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e IFN gama (SILVA et al., 2018). Adicionalmente, sua aplicação acarretou na redução de arritmias, fibrose miocárdica e carga parasitária no coração (MACAMBIRA et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2013).

O potencial efeito benéfico do G-CSF no coração também foi demonstrado em estudos de cardiopatias de diversas etiologias, reduzindo do infiltrado inflamatório e fibrose miocárdica (D'AMARIO et al., 2018; THEISS et al., 2013).

Dentro deste cenário descrito, desperta grande interesse uma possível ação do uso do G-CSF no quadro clínico de pacientes portadores de CCC já em uso de terapia padrão para insuficiência cardíaca. Para tanto, esta tese teve como objetivo investigar se o uso do G-CSF influencia no quadro clínico de pacientes portadores de CCC já em uso de terapia padrão para insuficiência cardíaca.

Considera-se a relevância da investigação dessa questão pela perspectiva de que sua possível confirmação poderia fornecer importante auxílio ao tratamento da CCC, reduzindo sintomas, com conseqüente melhoria da qualidade de vida, redução do número de internações hospitalares e dos custos para o sistema público de saúde com benefícios diretos para a sociedade brasileira.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1. Aspectos gerais

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo parasita flagelado *Trypanosoma cruzi*, apresentando curso clínico bifásico com fase aguda e fase crônica, sendo estas sintomáticas ou não. Durante a fase crônica, pode se manifestar nas forma indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2019a).

Acredita-se que o parasito que causa a doença de Chagas esteja presente no continente americano há vários milênios, sendo o ciclo silvestre bem mais antigo que o doméstico. A pesquisa de ácido desoxirribonucléico (DNA, *desoxyribonucleic acid*) do *T. cruzi*, através da reação de polimerase em cadeia (PCR) em fragmentos de tecidos humanos obtidos de múmias de nove mil anos a.C., descobertas no deserto de Atacama, região sul do Peru e norte do Chile, mostrou-se positiva em 40% das amostras analisadas (AUFDERHEIDE et al., 2004). Estudos de paleoepidemiologia mostram que houve uma evolução do parasito a partir de ancestrais comuns com tripanosomas australianos, existentes antes da separação dos continentes, há cerca de 230 milhões de anos (ORREGO; QUINTANA, 2007).

A DC é uma morbidade que afeta mais de 21 países nas Américas, atingindo 6 milhões de pessoas e apresentando cerca de 30 mil casos novos por ano na região até o ano de 2019 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019a).

Antigamente confinada aos países das américas Central e do Sul, nos últimos anos, devido ao processo de migração global, estima-se que aproximadamente 300.000 norte-americanos e 100.000 europeus foram infectados pelo *T. cruzi* (BERN et al., 2011; BERN; MONTGOMERY, 2009).

Estima-se que mais de 80% da população de infectados pelo *T. cruzi* no mundo não possuem acesso ao diagnóstico na fase inicial da doença e, mesmo em casos detectados na fase crônica, menos de 1% destes são tratados. Este conjunto de fatores leva à progressão da doença para formas mais graves quando o tratamento é limitado, elevando o seu impacto na morbimortalidade da população e nos custos para a saúde pública (PINTO DIAS et al., 2016).

Estudo sobre a carga da CCC no Brasil demonstrou que, entre os anos de 2000 a 2010, o total de anos potenciais de vida perdidos (DALYs) foi de 7.402.559 anos, sendo 9% deste total devido a anos de vida perdidos e 91% a anos de vida com incapacidade (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2019a).

No Brasil, casos suspeitos DC aguda devem ser imediatamente notificados em menos de 24 horas aos órgãos de saúde responsáveis. Mais recentemente, também casos crônicos se tornaram de notificação compulsória após a publicação da Portaria n. 264 17/02/2020 do Ministério da Saúde, o que facilitará a obtenção, no futuro, de uma estimativa mais acurada da prevalência da DC no nosso país (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2020).

Como exemplo ilustrativo, no estado da Bahia foram notificados 498 casos suspeitos de DC aguda de 2014 a 2019, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Número de casos notificados de DC aguda na Bahia.

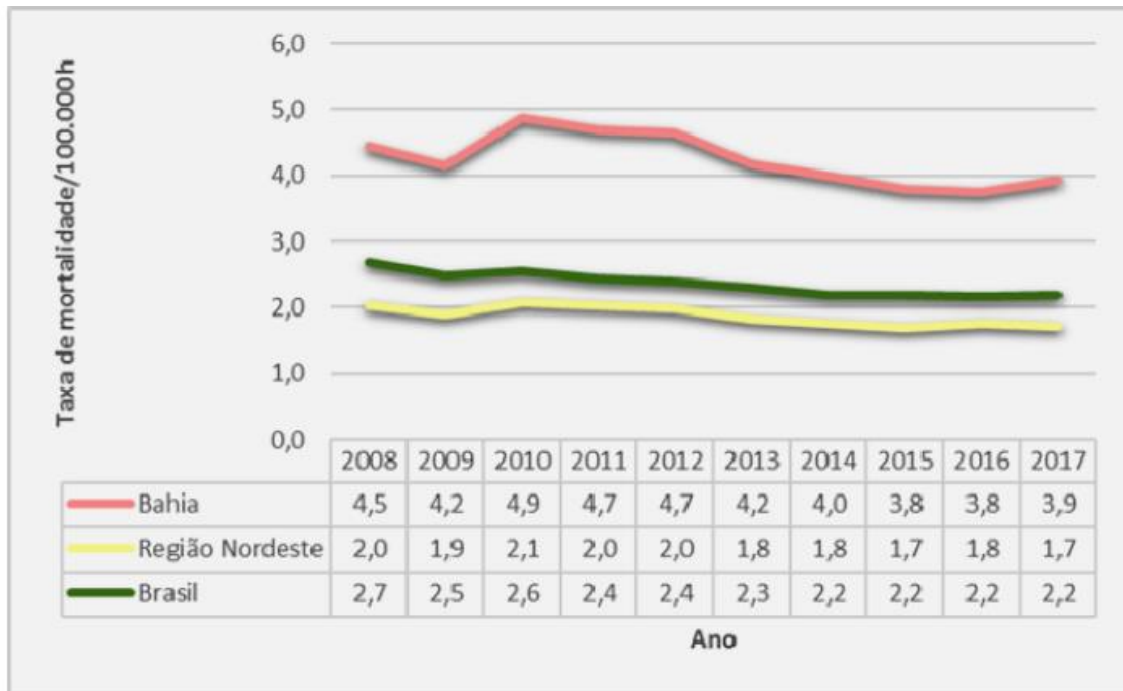
Macrorregião Residência	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total
Centro-Leste	-	11	7	6	16	7	47
Centro-Norte	-	2	16	12	44	-	74
Extremo Sul	-	2	2	1	10	1	16
Leste	-	13	16	12	16	-	57
Nordeste	-	9	-	6	1	1	17
Norte	3	24	13	40	12	2	94
Oeste	-	5	11	26	20	-	62
Sudoeste	1	17	7	13	27	13	78
Sul	-	-	4	11	33	5	53
BAHIA	4	83	76	127	179	29	498

Fonte: Boletim Epidemiológico da Bahia, n. 1, junho/2019 (o documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte).

No Brasil, a situação epidemiológica foi modificada nos últimos anos devido a ações de controle do vetor e a mudanças socioeconômicas e ambientais, levando a alterações das estratégias de vigilância epidemiológica. Estima-se que no país existam cerca de 1.9 a 4.6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, correspondendo a 1-2.4% da população (COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS, 2018; MARTINS-MELO et al., 2014a).

A DC é uma das quatro maiores causas de mortalidade por doenças infecto-parasitária no nosso país (cerca de 2.19 para cada 100.000 habitantes em 2017), sendo a Bahia um dos quatro estados com maior taxa de mortalidade no Brasil (Tabela 2).

Tabela 2: Taxa de mortalidade por doença de Chagas, segundo local de residência, 2008 a 2017



Fonte: Boletim Epidemiológico da Bahia, n. 1, junho /2019 (o documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte).

Constata-se, ainda, que a DC é uma das enfermidades incluídas no grupo das doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Este grupo é composto por doenças transmissíveis, localizadas em 149 países de clima tropical, que acometem mais de um bilhão de pessoas, com custo de bilhões de dólares às economias dos países envolvidos. O quadro geral exposto aponta para a relevância da implantação de uma maior vigilância epidemiológica e do fomento de pesquisas para o desenvolvimento de melhorias na terapia dessa enfermidade (ROGERLÂNDIO MARTINS-MELO et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), [s.d.]).

2.1.2. Transmissão

As formas de transmissão do *T. cruzi* são: vetorial; oral; vertical; transfusional; acidental e outras causas. No passado, a forma mais comum de transmissão era a vetorial, ocorrendo em cerca de 80 a 90% dos casos, através de um inseto hematófago vetor triatomíneo, conhecido

popularmente como “barbeiro”. Atualmente são conhecidos 17 gêneros e 130 espécies de triatomíneos em todo mundo (CARCANVALLO et al., 2001).

No Brasil, do total de 68 espécies já descritas no país, foram registrados três gêneros (*Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*) e 13 espécies de maior impacto epidemiológico para transmissão vetorial do parasito (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2019a).

A contaminação do inseto vetor acontece quando este se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado. Formas tripomastigotas do *T. cruzi* ingeridas se transformam em epimastigotas no seu trato digestivo, se multiplicam e, após três a quatro semanas, transformam-se em tripomastigotas metacíclicos. Estas últimas são as formas infectantes para o hospedeiro e são eliminadas nas fezes e/ou urina do inseto no momento do seu repasto sanguíneo.

Após a penetração através do local da picada ou de mucosas, os tripomastigotas metacíclicos invadem diferentes tipos celulares, transformam-se em amastigotas e, posteriormente em tripomastigotas, os quais causam ruptura das células e passam a circular na corrente sanguínea. Estas formas podem invadir outras células do hospedeiro ou ser novamente ingeridas pelo triatomíneo hematófago (Figura 1) (BERN, 2015).

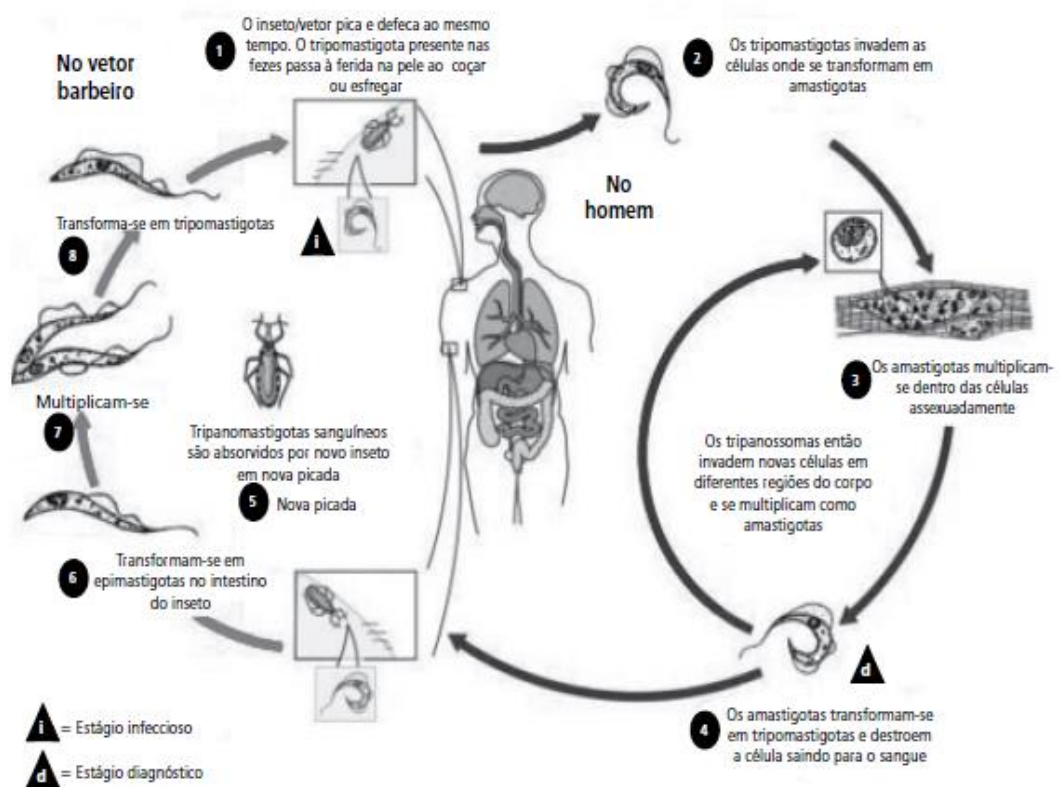


Figura 1: Ciclo evolutivo do *T. cruzi*. (Fonte: Guia de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, terceira edição, 2019 (o documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte)).

No passado, a prevenção da doença de Chagas era voltada primariamente ao combate ao vetor, principal fonte de transmissão da doença (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002). As medidas preventivas incluíam a melhoria das condições de higiene e das moradias, locais que poderiam alojar o inseto. Em função das ações para controle do vetor implementadas desde 1970, em 2006 o Brasil recebeu a certificação internacional de interrupção de transmissão pelo *Triatoma infestans*, um dos principais vetores de transmissão da doença. Contudo, o risco de transmissão persiste devido à existência de outras espécies de triatomíneos com alto potencial de colonização e infecção natural (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2019b). Além disso, entre 2012 a 2016, foram detectados focos residuais do *T. infestans* em 1 município da Bahia e 3 no Rio Grande do Sul (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2019a).

Além do controle do vetor, a triagem clínico-epidemiológica e sorológica de forma mais efetiva nos bancos de sangue de países endêmicos contribuiu para uma redução significativa dos novos casos da doença de Chagas por via transfusional. No Brasil, no ano de 2010, a prevalência média estimada de sorologia reagente para *T. cruzi* entre candidatos à doação de sangue foi de 0.18% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015) e, em 2018, foi de 0.62% no estado da Bahia (BAHIA.SECRETARIA DE SAÚDE, 2019a)

Contudo, a transmissão da DC por via oral ainda é uma preocupação no Brasil devido ao consumo de alimentos infectados pelo *T. cruzi*. Atualmente, é a principal forma de transmissão no país (Tabela 3).

Tabela 3: Fontes de transmissão de DC aguda, anos 2012 a 2016.

Forma de transmissão	Ano de notificação					Total	%
	2012	2013	2014	2015	2016		
Oral	129	102	131	209	298	869	73,0
Vetorial	8	19	24	33	21	105	8,9
Vertical	2	1	2	0	1	6	0,5
Acidental e Transplante	1	2	2	0	1	6	0,5
Em branco	49	39	37	26	53	204	17,1
Total	189	163	196	268	374	1.190	100,0

Fonte: Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, v. 50, Janeiro/ 2019 (o documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte).

No Brasil, a DC aguda decorrente de transmissão por via oral está mais concentrada na região da Amazônia, mais especificamente no estado do Pará, responsável por 89% desse tipo de ocorrência, especialmente entre os meses de agosto e fevereiro, meses de safra de açaí na região (BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE,2019a).

Bastos et al descreveram 13 casos de forma aguda da doença no estado da Bahia, secundários à ingestão de água contaminada com fezes do *T. cruzi*. A maior parte destes pacientes desenvolveu um quadro de miocardite (BASTOS et al., 2010). Também existem relatos de casos agudos da doença em áreas ditas livres do protozoário, como em Santa Catarina em 2005, por provável ingestão de caldo de cana contaminado (ANVISA, 2008).

Casos de DC aguda também foram registrados na Colômbia, Venezuela e Bolívia. Em 2007, na Venezuela, aconteceu um dos maiores surtos registrados mundialmente de DC aguda por via oral por ingestão de suco contaminado. A infecção foi confirmada em 103 pessoas de uma comunidade escolar, levando a um estado de emergência de saúde pública que, através de rápido diagnóstico e pronto tratamento, evitou altas taxas de mortalidade (ALARCÓN DE NOYA et al., 2010).

Esta forma de transmissão oral, por ingestão de alimentos contaminados pelo parasito, sendo o triatomíneo ou suas fezes, pode ser também considerada como vetorial, por ser dependente da presença dos vetores. Pode também ocorrer por ingestão de carne crua ou mal cozida de caça ou alimentos contaminados pela secreção de glândulas anais de marsupiais infectados (BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE, 2019b)

A transmissão vertical acontece por via transplacentária ou no momento do parto. Pode ocorrer também durante aleitamento materno sendo mais comum na fase aguda da doença. Na fase crônica, a transmissão pela amamentação pode acontecer devido a sangramentos decorrentes de fissura mamária, não propriamente pelo leite materno. Uma meta-análise de estudos realizados no Brasil demonstrou uma prevalência de infecção em gestantes de 1.1% com taxa de transmissão vertical de 1.7% (MARTINS-MELO et al., 2014b). As demais formas de transmissão são mais raras, a saber: a forma laboratorial, devido à manipulação inadequada de material contaminado e o transplante de órgãos infectados, principalmente coração e rins (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; BAHIA.SECRETARIA DE SAÚDE , 2019b).

O período de incubação da doença de Chagas aguda varia de acordo com a via de transmissão: de 5 a 15 dias, na vetorial; de 30 a 40 dias, na transfusional; do quarto ao nono mês de gestação, na transplacentária; e cerca de 7 a 22 dias, na via oral (RASSI et al., 2010).

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da doença de Chagas se baseia em critérios parasitológicos e sorológicos. Na fase aguda os métodos parasitológicos diretos são os mais indicados, pela alta parasitemia. Orienta-se a realização simultânea de diferentes métodos parasitológicos diretos, tais como:

- Lâmina corada de gota espessa ou esfregaço;
- Métodos de concentração (Strout, micro-hematócrito e creme leucocitário);
- Pesquisa a fresco de tripanossomatídeos.

Os métodos sorológicos nesta fase são métodos indiretos, não sendo os mais indicados para confirmação da fase aguda (BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE , 2019b).

Devido à baixa parasitemia na fase crônica, os métodos parasitológicos têm baixa sensibilidade, sendo usados principalmente no controle do tratamento específico ou em casos incomuns. Portanto, nessa fase da doença, o diagnóstico é baseado principalmente em critérios sorológicos, utilizando-se um teste de alta sensibilidade (ELISA ou imunofluorescência indireta) associado a outro de alta especificidade (hemaglutinação indireta). O diagnóstico molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR) é de uso restrito e realizada por centros de pesquisa e laboratório de referência nacional devido à ausência de protocolos definidos e de kits comerciais para uso na rotina de vigilância epidemiológica, não sendo considerado um método diagnóstico isolado para confirmar ou afastar o diagnóstico de DC aguda ou crônica. Considera-se, como marcadores da infecção, dois testes positivos de métodos distintos para a presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* , sendo o ELISA preferencialmente um deles (Figura 2) (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; DE ANDRADE et al., 2011; SCHMUNIS; YADON, 2010).

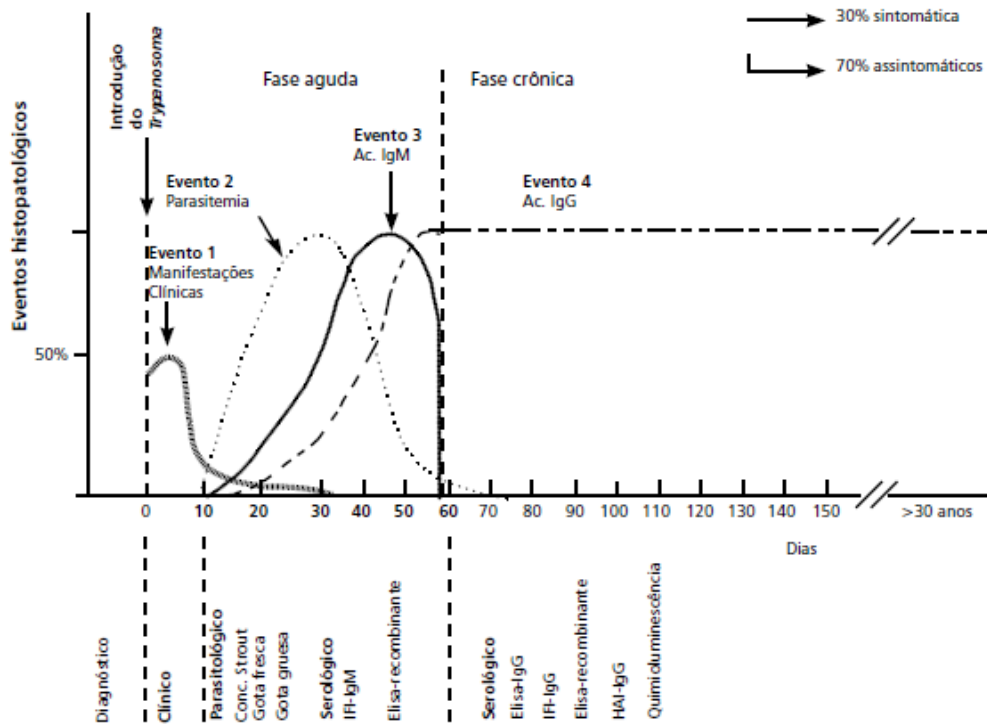


Figura 2: Fisiopatologia da doença de Chagas e exames diagnósticos em cada fase (Fonte: Guia de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, terceira edição, 2019 – o documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte).

2.1.4 Patogênese

2.1.4.1 Fase aguda

A fase aguda caracteriza-se principalmente pela presença de formas tripomastigotas do parasito no sangue periférico e por formas amastigotas se multiplicando no interior das células do hospedeiro, com importante crescimento populacional do *T. cruzi*. Em torno do 12º dia após a contaminação, ocorre um intenso parasitismo no coração (FABRINO et al., 2004; MELO et al., 2003).

O sistema imune é ativado com reações celulares e humorais para combater a infecção pelo *T. cruzi*, levando ao controle biológico, mas não à eliminação do parasita. Macrófagos e células dendríticas promovem endocitose dos parasitas, com produção de citocinas associadas à resposta Th2, tais como a IL-4, o IFN- γ , a IL-10 e a IL-12, ativando linfócitos T com atividade

microbicida e, conseqüentemente, auxiliando no controle da parasitemia (MARIN-NETO et al., 2007a).

Outros mecanismos descritos são 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 na célula cardíaca (BUSTAMANTE et al., 2003; LO PRESTI et al., 2006).

Clinicamente, essa fase está associada a um conjunto de sinais e sintomas inespecíficos e leves, podendo existir lesão na área de inoculação (chagoma), edema uni ou bipalpebral (sinal de Romaña), hepatoesplenomegalia, linfadenopatias e febre. Em menos de 5% dos casos, pode haver o desenvolvimento de meningoencefalite ou miocardite. A miocardite é a principal manifestação cardíaca desta fase, podendo estar associada à pericardite ou endocardite. Análises por eletrocardiograma podem indicar a presença de taquicardia sinusal, complexos QRS de baixa voltagem e/ou alterações da repolarização ventricular (BESTETTI et al., 1988, 1991; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009). Habitualmente, o quadro clínico da fase aguda regride de forma espontânea após aproximadamente 4-8 semanas, com a redução do percentual de parasitos no sangue e nos tecidos, marcando o início da fase crônica da doença (RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

2.1.4.2 Fase crônica

A fase crônica divide-se em: forma indeterminada, forma cardíaca e forma cardio-digestiva.

A) **Forma indeterminada**

A forma indeterminada caracteriza-se por um longo estágio latente da doença, na qual não existem manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de comprometimento cardíaco e/ou digestivo. A maioria dos pacientes portadores de DC permanece nesta forma, tendo um bom prognóstico que é associado a baixas taxas de mortalidade em estudos com 10 anos de seguimento (COURA et al., 1985; MARIN-NETO et al., 2002a).

As diretrizes mais atuais em DC indicam a realização do exame de ecocardiograma, além do ECG e radiografia de tórax, para caracterização desta forma da doença (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; DE ANDRADE et al., 2011). Com a facilidade de acesso e aplicação

rotineira do ecocardiograma na prática clínica, vêm se demonstrando que mesmo em pacientes classificados como forma indeterminada da doença, existem pequenas alterações no VE anteriormente não evidenciadas ao ECG e radiografia. Estudos sugerem que mesmo a presença de alterações mínimas do VE ao ecocardiograma têm implicações prognósticas na DC, como progressão mais rápida para IC (DE ALMEIDA-FILHO et al., 2002; PAZIN-FILHO et al., 2007). Portanto, existe a discussão se estes pacientes assintomáticos, sem alterações ao ECG e radiografia, mas com exame de ecocardiograma minimamente alterado não deveriam ser reclassificados portadores de cardiopatia chagásica e ao invés de forma indeterminada. Esta nova caracterização auxiliaria na introdução precoce de tratamento específico para DC, prevenindo sua evolução para formas mais avançadas da CCC nas quais o tratamento anti-*T. cruzi* não é mais efetivo (MARIN-NETO et al., 2002b).

Cerca de 10 a 30 anos após a infecção inicial, até 30% dos pacientes desenvolvem lesões cardíacas e até 10%, alterações digestivas, neurológicas ou mistas, sendo a cardiopatia a doença de pior prognóstico dentre essas (PINTO DIAS et al., 2016; RASSI; MARIN-NETO, 2010). O mecanismo implicado na evolução da forma indeterminada para forma cardíaca ainda não está completamente esclarecido. No entanto, foi observado que, em indivíduos com a CCC, há um aumento da produção de citocinas relacionadas à resposta Th1, tais como como o IFN- γ e TNF α , com menor produção de IL-10 em comparação com indivíduos na forma indeterminada (ABEL et al., 2001b; MARIN-NETO et al., 2002b, 2007a). Esses dados são corroborados por estudos em animais, onde respostas do tipo Th1 são predominantes nos corações de camundongos com CCC (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2001). Isto sugere que o desequilíbrio entre as respostas imunes Th1 e Th2 é um dos fatores que levariam à progressão da DC da forma assintomática para as formas sintomáticas (MARIN-NETO et al., 2002a, 2007a; RASSI et al., 2010).

B) Formas digestiva e cardio-digestiva

A forma digestiva acomete cerca de 10-15% dos pacientes portadores de DC, principalmente na região sul da Amazônia no Brasil, Argentina, Chile e Bolívia. Esta distribuição geográfica deve-se provavelmente a diferenças entre as cepas dos parasitas de cada local (RASSI; MARIN-NETO, 2010). O quadro clínico caracteriza-se disfagia, odinofagia e dor retroesternal, devido ao megaesôfago e/ou constipação, diarreia, meteorismo e até fecaloma pelo megacólon. A maioria dos casos de megacólon são associados a megaesôfago. A

investigação, além do exame clínico, é realizada através de radiografias com uso de contraste, endoscopia e colonoscopia. Para avaliações mais acuradas pode-se usar a tomografia computadorizada ou ressonância magnética (RASSI et al., 2010). O tratamento, a depender da fase da doença, vai desde mudança de hábitos alimentares, medicações até cirurgia (PINTO DIAS et al., 2016).

A forma cardio-digestiva é uma combinação da forma cardíaca com megaesôfago e/ou megacólon. Sua prevalência exata ainda não é conhecida devido à escassez de estudos apropriados, tendo sido estimada em cerca de 8% em estudo realizado em 2015 (ANDRADE et al., 2015; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

C) Forma cardíaca

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é uma cardiopatia inflamatória caracterizada pela miocardite fibrosante crônica (infiltrados inflamatórios focais e disseminados, miocitólise, mionecrose e fibrose progressiva), com progressiva disfunção contrátil miocárdica (ANDRADE; ANDRADE, 1955; ANDRADE; LOPES, 1963; KÖBERLE, 1968).

Vários fatores parecem contribuir para o desenvolvimento da forma cardíaca crônica, sendo a fisiopatologia da CCC não totalmente esclarecida. Na CCC ocorre uma exacerbação da resposta Th1, com aumento da produção de IFN- γ e TNF α , levando a uma cardiopatia mais grave, além da ocorrência de outros fatores que levam a um desbalanço entre a resposta imune protetora e agressora do organismo (ABEL et al., 2001a; MARIN-NETO et al., 2007a; NOGUEIRA et al., 2014).

Alguns autores defendem que tanto a persistência do parasita quanto a resposta imunológica direcionada aos antígenos do *T. cruzi* têm papel fundamental na evolução da doença (NUNES et al., 2018a; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2009).

Evidências de estudos clínicos e experimentais que embasam esta teoria são descritas abaixo:

1) O uso de técnicas mais sensíveis de detecção da presença do parasita como imunohistoquímica e PCR (*polimerase chain reaction*) demonstraram alta frequência de antígenos do *T. cruzi* e do seu DNA em lesões crônicas, além da relação da sua presença com a inflamação tecidual (HIGUCHI et al., 1993; JONES et al., 1993; TARLETON, 2001; ZHANG; TARLETON, 1999);

2) Reinfecções e exposição contínua ao agente etiológico levam ao aumento da carga parasitária associada à piora da evolução da doença (BUSTAMANTE et al., 2002, 2003, 2007; STORINO et al., 2002);

3) A redução da carga parasitária através do tratamento com benzonidazol ou nifurtimox promove a melhora do quadro clínico e alterações no ECG (FABBRO et al., 2007; GARCIA et al., 2005; VIOTTI et al., 2006);

Por outro lado, devido à falta de correlação entre o parasitismo residual e o alto grau de inflamação tecidual miocárdica, outros autores sugerem que a evolução da CCC está também relacionada ao desenvolvimento de uma resposta autoimune direcionada a antígenos cardíacos após o estímulo pelo *T. cruzi*. Evidências originadas de estudos realizados corroboram esta hipótese, tais como:

- 1) A presença no soro de pacientes chagásicos de auto anticorpos da classe IgG direcionados contra receptores muscarínicos e adrenérgicos dos cardiomiócitos se correlacionam a alterações elétricas e mecânicas miocárdicas (BORDA; STERIN-BORDA, 1996; CHIALE et al., 1995; COSTA et al., 2000);
- 2) A presença de linfócitos T autoreativos ao tecido cardíaco e sistema nervoso em camundongos e pacientes chagásicos. O primeiro estudo que investigou o papel dos linfócitos T autoreativos na CCC foi realizado por nosso grupo através de um modelo animal de transplante cardíaco heterotópico. O coração transplantado era proveniente de um animal singênico e sem DC. Neste estudo, foi demonstrada a autoreatividade do linfócito T CD4 do animal chagásico contra o tecido cardíaco transplantado, promovendo a rejeição do mesmo. Nos animais controle livres de DC essa rejeição não aconteceu (RIZZO; CUNHA-NETO; TEIXEIRA, 1989; SANTOS et al., 1992)
- 3) Posteriormente, nosso grupo isolou do baço de um animal chagásico uma linhagem de linfócitos T CD4 e foram realizados experimentos *in vitro* da reação destas células com amostras de tecido miocárdico. A linhagem foi sensibilizada por meses *in vitro* através de exposições repetidas a amostras de tecido de corações singênicos. Após a sensibilização, demonstrou-se que essas células T anti-cardiomiócito causaram destruição de mioblastos tanto *in vitro* quanto a rejeição de coração transplantado singênico quando injetadas localmente. Além disso, a injeção dessa linhagem celular em camundongo atímico causou intensa miocardite (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2001).

- 4) O desenvolvimento da miocardite autoimune da DC parece estar relacionada à quebra no mecanismo de auto-tolerância aos antígenos cardíacos do sistema imune, sendo este desequilíbrio induzido pela infecção do *T. cruzi* (ENGMAN; LEON, 2002; LEON et al., 2004; PONTES-DE-CARVALHO et al., 2002; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2001).

Portanto, é provável que a evolução da CCC esteja relacionada a ambos os mecanismos descritos acima (Soares et al, 2001).

Essa agressão crônica ao coração decorrente dos mecanismos imunopatológicos culmina em um dano progressivo às fibras miocárdicas e, secundariamente, promove o desenvolvimento de distúrbios neurogênicos e da circulação coronária. A redução da população de neurônios do sistema nervoso autônomo no coração é característico da infecção pelo *T. cruzi*, levando à disautonomia cardíaca (DÁVILA; INGLESSIS; MAZZEI DE DÁVILA, 1998; MOTT; HAGSTROM, 1965; OLIVEIRA, 1985). Esta redução acomete principalmente os neurônios parassimpáticos, e, em menor escala, os neurônios do sistema simpático. Conseqüentemente, ocorrem perda da variabilidade da frequência cardíaca com perda da resposta rápida a variações pressóricas e de retorno venoso, alteração do controle da microcirculação coronária, arritmias e morte súbita (ALBERTO et al., 2020; AMORIM; MARIN NETO, 1995; MARIN-NETO, 1998; RASSI; RASSI; RASSI, 2001).

Alterações do sistema vascular associadas à lesão endotelial podem levar a modificações da perfusão miocárdica. Conseqüentemente, os pacientes portadores de CCC podem apresentar sintomas que simulam isquemia miocárdica, tais como dor precordial, alterações no eletrocardiograma e ecocardiograma. Adicionalmente, associado ao processo inflamatório local, ocorrem aumento da ativação plaquetária, formação de pequenos trombos, vasoespasma e disfunção endotelial. Todos esses processos, conjuntamente, podem estar relacionados ao desenvolvimento de alterações segmentares e aneurisma apical do VE, da CCC (MARIN-NETO et al., 2007b; MARIN-NETO; SIMÕES; RASSI JUNIOR, 2013; OLIVEIRA et al., 1981; PRADO et al., 2011; ROSSI et al., 2010).

2.2. CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

2.2.1 Diagnóstico da cardiomiopatia chagásica crônica

Define-se como cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) a presença de alterações eletrocardiográficas típicas em indivíduo com DC confirmada, independente da presença de sintomas (NUNES et al., 2018b).

Para o acompanhamento da CCC, fazem parte da avaliação inicial o eletrocardiograma de 12 derivações, cujos achados mais sugestivos incluem bloqueio atrioventricular, bloqueio completo do ramo direito e bloqueio divisional anterossuperior do ramo esquerdo, e a radiografia de tórax, que pode evidenciar aumento de área cardíaca e congestão venocapilar pulmonar (BESTETTI et al., 1991; PINTO DIAS, 2016; RASSI; RASSI; LITTLE, 2000; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009)

O teste ergoespirométrico vem ganhando cada vez mais espaço na avaliação de pacientes portadores de CCC, principalmente para a avaliação funcional, já que esse teste demonstra a redução da capacidade funcional máxima, além de indicar propensão ao desenvolvimento de arritmias ventriculares esforço-induzidas (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; MADY et al., 1997).

O Holter de 24 horas é também um método importante para a detecção de arritmias ventriculares e, idealmente, deve ser realizado em todos os pacientes com CCC, pois a presença de arritmias supraventriculares e ventriculares nesses pacientes confere pior prognóstico. A fibrilação ventricular pode ser a primeira manifestação da doença e constitui a principal causa de morte súbita nessa população, principalmente nos casos de disfunção ventricular esquerda grave (RASSI; RASSI; RASSI, 2001). Além disso, a redução da variabilidade da frequência cardíaca ao Holter em pacientes com Chagas está associada a pior prognóstico (ALBERTO et al., 2020).

A ressonância nuclear magnética (RNM) 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, a RNM permite o estudo da função e caracterização tecidual através da técnica de realce tardio, o que antigamente era possível somente através da biópsia endomiocárdica (ROCHITTE et al., 2005, 2007). Esta técnica permite a detecção precoce de fibrose e/ou necrose miocárdicas, alterações não diagnosticadas por métodos menos sensíveis. A detecção precoce do envolvimento miocárdico em pacientes portadores de DC ainda sem manifestação de cardiomiopatia pode ser útil tanto no prognóstico quanto no diagnóstico

diferencial de quadros de insuficiência cardíaca de etiologia não conhecida (REGUEIRO et al., 2013). Nosso grupo de pesquisas avaliou através da RNM a presença e extensão de fibrose miocárdica em pacientes na forma indeterminada da DC. Foi possível demonstrar que a extensão da fibrose miocárdica nesta amostra era semelhante a pacientes em fases iniciais de CCC, sugerindo que muitos pacientes assintomáticos e estagiados como forma indeterminada estão na verdade em forma cardíaca inicial (NOYA-RABELO et al., 2018).

A ecocardiografia consiste em um exame complementar com menor custo que a RNM, que utiliza ultrassom para gerar imagens em tempo real do coração e dos vasos da base, fornecendo informações essenciais sobre a função ventricular e indicando diversos fatores prognósticos como presença de trombos, função diastólica e sistólica biventricular, entre outros. Na CCC, a utilização da ecocardiografia é importante para o diagnóstico de disfunções segmentares da contratilidade do ventrículo esquerdo (VE), tais como a hipocinesia de parede ínfero-lateral e inferior (a mais comum delas), o aumento das dimensões ventriculares e a redução da fração de ejeção, sendo estas últimas disfunções importantes fatores prognósticos de mortalidade na CCC. Outro achado característico da CCC através da ecocardiografia é a presença de aneurisma apical de VE que varia de 8,5% em pacientes assintomáticos a 55% em pacientes com cardiomiopatia grave (ACQUATELLA, 2007; ACQUATELLA et al., 2018). Além da imagem bi ou tridimensional do ecocardiograma, atualmente se tem aplicado a técnica de análise da deformação miocárdica chamada *strain*, a qual permite a detecção de alterações mínimas de deslocamento de segmentos miocárdicos, através do mapeamento da movimentação de pontos do miocárdio chamados “speckles”, mesmo antes da queda global da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Os tipos de *strain* são o radial, longitudinal, circunferencial e o global. Este método é acurado e permite o diagnóstico precoce de disfunções miocárdicas incipientes e subclínicas (ACQUATELLA et al., 2018).

Em 2015, avaliamos o valor incremental da medida do *strain* global na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) para predição de fibrose miocárdica em pacientes na forma indeterminada e cardíaca (com ou sem sintomas). Apesar de não termos demonstrado o valor incremental do *strain* na FEVE, o valor do *strain* manteve correlação com a presença de fibrose miocárdica na RNM (MACEDO et al., 2015). Em outro estudo também foi demonstrado que a medida reduzida do *strain* global, circunferencial e radial em pacientes com DC forma indeterminada ou com CCC em estágios iniciais se correlaciona com a presença de fibrose miocárdica (GOMES et al., 2016).

Métodos adicionais também podem ser usados para o acompanhamento da CCC, tais como o cateterismo cardíaco, a ventriculografia radioisotópica e a cintilografia miocárdica entre outros, a depender dos fatores de risco e quadro clínico do paciente.

2.2.2 Quadro clínico da CCC

Os sinais e sintomas característicos desta forma da doença podem ser divididos em três grupos de síndromes: insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas e eventos tromboembólicos, os quais podem coexistir em um mesmo paciente (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2009). A mortalidade da fase avançada da doença é alta, sendo a morte súbita a causa mais comum (55-60%), seguida pela insuficiência cardíaca (25-30%) e eventos embólicos (10-15%) (RASSI; RASSI; RASSI, 2001; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2009).

- Síndrome da Insuficiência Cardíaca

A síndrome da insuficiência cardíaca geralmente tem início com alterações segmentares do VE, posteriormente evoluindo para falência biventricular. Essa síndrome manifesta-se por dispneia progressiva aos esforços físicos, evoluindo para dispneia em repouso, ortopnéia, dispneia paroxística noturna, edema de membros inferiores, congestão hepática e estase de jugulares. Em alguns pacientes os sintomas relacionados a disfunção ventricular direita podem ser mais proeminentes que os da disfunção esquerda. Devido aos distúrbios da microcirculação, os pacientes podem apresentar dor precordial atípica simulando um quadro de isquemia miocárdica (MARIN-NETO et al., 2007a; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009).

A IC chagásica possui pior prognóstico do que as de outras etiologias, incluindo a hipertensiva, idiopática e isquêmica, sendo a presença da DC um preditor independente de mortalidade em portadores dessa doença. Suspeita-se que a intensa fibrose difusa com grave remodelamento cardíaco associado aumenta o risco de arritmias e de outros eventos adversos (BARBOSA et al., 2011; BESTETTI et al., 2013; NUNES et al., 2010; VILAS BOAS et al., 2013).

- Síndrome Arritmogênica

A síndrome arritmogênica caracteriza-se por arritmias atriais e ventriculares com uma grande variedade de anormalidades do sistema de condução. Alterações eletrocardiográficas no curso da DC são preditoras de gravidade e prognóstico da doença. Em uma coorte de pacientes portadores de DC acompanhada por 10 anos foi demonstrado que a presença de qualquer uma das seguintes alterações ao ECG era preditor independente de mortalidade: extrassístoles ventriculares e supraventriculares frequentes, fibrilação atrial, bloqueio do ramo direito, sobrecarga ventricular esquerda e sinais de infarto do miocárdio antigo. A presença de pelo menos uma dessas alterações dobrou o risco de mortalidade, sendo que o risco aumentava proporcionalmente ao número de alterações no ECG do paciente (MAGUIRE et al., 1987; RIBEIRO et al., 2014).

Queixas como palpitações e síncope são comuns, sendo decorrentes de taquiarritmias ventriculares e atriais, bradicardia e bloqueio atrioventricular. Em muitos casos, é indicado o implante de marcapasso definitivo.

Morte súbita, mais comumente associada arritmias ventriculares malignas, pode acontecer em qualquer fase da CCC, mesmo antes do desenvolvimento de IC (FILHO et al., 1994; LEITE et al., 2001; LISBOA DA SILVA, 2012; RASSI; RASSI; RASSI, 2001).

- Síndrome Tromboembólica

A DC é uma das principais causas de acidente vascular cerebral (AVC) da América Latina, constituindo até 20% das causas dessa ocorrência em regiões endêmicas para DC (CARDOSO et al., 2014; CAROD-ARTAL et al., 2005). Na maioria dos casos o AVC relacionado a CCC é decorrente de fenômenos cardioembólicos devido à formação de trombos intracardíacos e contribuem para a elevada morbimortalidade da doença (ARAS et al., 2003; SAMUEL et al., 1983).

Fatores de risco para o AVC na CCC incluem arritmias atriais, presença de aneurisma apical ventricular, idade avançada, disfunção ventricular esquerda e dilatação atrial. O quadro clínico mais típico é o de déficit sensorial ou motor em regiões de face, braço e perna além de afasia, déficit visual e cognitivo (CAROD-ARTAL et al., 2005; DE SOUSA et al., 2008; NUNES et al., 2009, 2015).

O tromboembolismo pulmonar, complicação frequente e grave da CCC, geralmente decorre de trombose venosa profunda, ocasionada por redução crônica do débito cardíaco (MACIEL et al., 1995; MARIN-NETO et al., 2007a; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009)

2.2.3 Fatores prognósticos e estratificação de risco da CCC

A fase crônica da DC pode ser classificada pelo quadro clínico, conforme descrito acima (forma indeterminada, cardíaca e digestiva e mista), como também de acordo com estágios baseados no tempo e progressão da doença cardíaca e na gravidade dos sintomas, conforme recomendações nacionais e internacionais adaptadas à etiologia chagásica (DE ANDRADE et al., 2011; HUNT et al., 2005; RASSI et al., 2018):

1) **Classificação de acordo com o tempo e progressão da CCC** (NUNES et al., 2018a):

Estágio A: Pacientes sob risco de desenvolver ICC. Possuem sorologia positiva, não têm cardiopatia estrutural ou sintomas de ICC. Também não têm alterações digestivas;

Estágio B1: Pacientes com cardiopatia estrutural, evidenciada por alterações eletrocardiográficas ou ecocardiográficas, mas com função ventricular global normal e sem sinais e sintomas atuais ou prévios de ICC;

Estágio B2: Pacientes com cardiopatia estrutural, caracterizada por disfunção ventricular global, mas sem sinais e sintomas prévios ou atuais de ICC;

Estágio C: Pacientes com disfunção ventricular e com sintomas prévios ou atuais de ICC. (NYHA I, II, III ou IV);

Estágio D: Pacientes com sintomas refratários de ICC em repouso, apesar de tratamento clínico otimizado, necessitando intervenções especializadas.

2) **Classificação pela Gravidade dos Sintomas: Classe Funcional da New York Heart Association** (LITTLE, 1994; RASSI et al., 2018)

Classe I: Ausência de sintomas;

Classe II: Atividades físicas habituais causam sintomas. Limitação leve;

Classe III: Atividades físicas menos intensas que as habituais causam sintomas. Limitação importante, porém, confortável no repouso;

Classe IV: Incapacidade para realizar qualquer atividade sem apresentar desconforto. Sintomas no repouso.

A classificação funcional da NYHA foi usada por Rassi e colaboradores para desenvolver um escore para calcular o risco de mortalidade em 10 anos em pacientes portadores de CCC. O escore é composto por 6 fatores com pesos diferentes (RASSI et al., 2006):

1. Classe funcional do NYHA III ou 4: 5 pontos;
2. Cardiomegalia: 5 pontos;
3. Alteração segmentar ou global da contratilidade do VE: 3 pontos;
4. Taquicardia ventricular não sustentada: 3 pontos;
5. Baixa voltagem do QRS: 2 pontos;
6. Sexo masculino: 2 pontos.

A soma dos pontos vai de 0 a 20 com a seguinte estratificação de risco de morte em 10 anos (Figura 3):

Baixo (10%): 0-6 pontos;

Intermediário (44%): 7-11 pontos;

Alto (84%): 12-20 pontos.

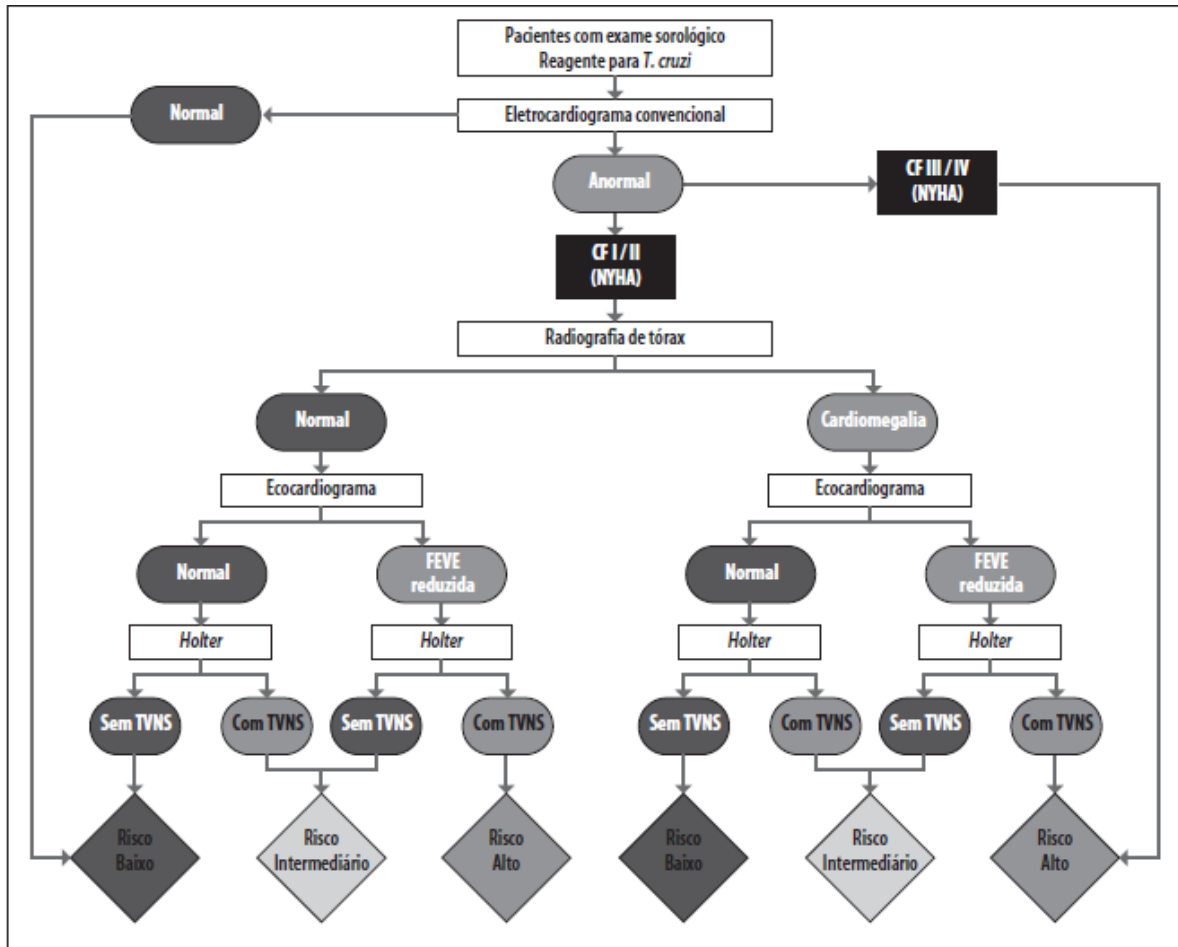


Figura 3: Estratificação de Risco da CCC. (Fonte: II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiologia e Serviços de Saúde. O documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte). CF: Classe Funcional; NYHA: New York Heart Association; FEVE: Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo; TVNS: Taquicardia Ventricular Não Sustentada.

O estudo BENEFIT, um dos maiores estudos clínicos recentemente publicados sobre CCC, demonstrou que o escore de Rassi foi suficientemente acurado em prever eventos cardíacos compostos como morte súbita, IC, transplante cardíaco, TV sustentada, necessidade de marcapasso, entre outros (MORILLO et al., 2015a).

Em outro estudo clínico com portadores de cardiomiopatia chagásica, foi demonstrado que o grau de fibrose miocárdica diagnosticada pela RNM se correlaciona inversamente com a fração de ejeção e diretamente com a classe funcional pela NYHA (ROCHITTE et al., 2005).

Diante do exposto, fica claro que classificação da NYHA auxilia no manejo terapêutico e tem relação com o prognóstico da IC de diversas etiologias, incluindo a chagásica. Além disso, ela é de fácil realização e usada internacionalmente, devendo ser aplicada ao paciente portador de CCC sempre que possível (HAWWA et al., 2017; LITTLE, 1994; RASSI et al., 2018; YAP et al., 2015).

2.3 TRATAMENTO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

2.3.1 Terapia-padrão

O tratamento atual da síndrome de insuficiência cardíaca (IC) está direcionado à interferência sobre os mecanismos neuro-hormonais os quais estimulam a progressão da doença ao longo do tempo. Além de cuidados relacionados aos hábitos de vida, especialmente dietéticos, vários medicamentos têm a propriedade de interferir favoravelmente no curso natural da doença e aumentar a longevidade de seus portadores. Inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores dos receptores da angiotensina, bloqueadores da aldosterona e β -bloqueadores proporcionaram melhora do prognóstico e redução de cerca de 30% da mortalidade destes pacientes (Figura 4) (RASSI et al., 2018)

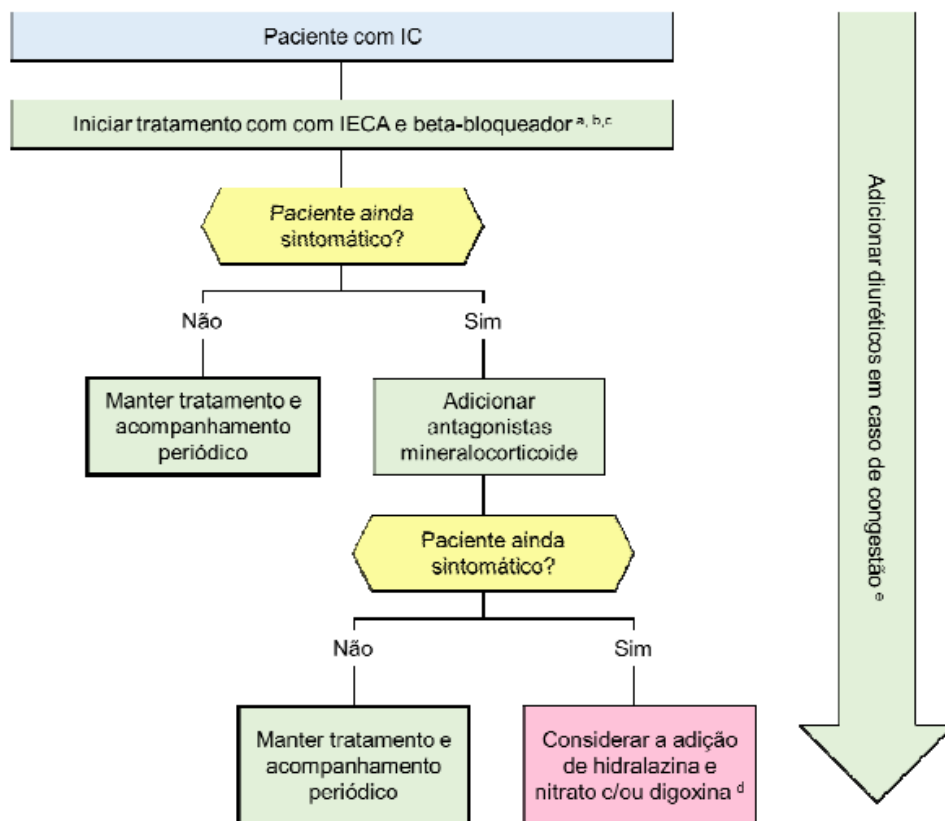


Figura 4: Tratamento padrão de Insuficiência Cardíaca. (Fonte: CONITEC, Ministério da Saúde 2018. O documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte).

As únicas terapias anti-tripanosômicas específicas disponíveis para a DC consistem no uso de compostos nitroheterocíclicos (nitrofurano e nifurtimox) ou do derivado de nitroimidazol (benzonidazol), medicamentos registrados há mais de 40 anos com atividade anti-*T. cruzi*.

O benzonidazol é uma pro-droga que exerce sua atividade tripanocida através da produção de metabólitos reativos, tendo efeito contra as formas intra e extracelulares do parasita. É a droga mais utilizada no contexto do Brasil, e apresenta eficácia comprovada na fase aguda da DC, tendo alcançado taxas de cura maiores que 80% (CALDAS et al., 2008; CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; MÜLLER KRATZ et al., 2018). Contudo, essa droga induz diversos efeitos colaterais, tais como dermatite, leucopenia, neuropatia periférica, náuseas e vômitos, e tem uma taxa de descontinuação em torno de 15-20% (MOLINA et al., 2015; MÜLLER KRATZ et al., 2018).

Apesar da eficácia das drogas acima citadas ser menor na fase crônica (20-60%) e ainda ser controversa (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019), ensaios experimentais e estudos observacionais apontaram para um efeito benéfico do uso do benzonidazol nessa fase, ao reduzir tanto distúrbios cardíacos característicos da CCC (GARCIA et al., 2005) quanto a progressão dessa doença (VIOTTI et al., 2006). Na população pediátrica (abaixo de 18 anos) cronicamente infectada pelo *T. cruzi*, dois estudos demonstraram taxas de cura superiores a 60% pelo método ELISA, não apresentando, contudo, benefício nas alterações eletrocardiográficas em estudos de seguimento (DE ANDRADE et al., 1996; MOLINA; SALVADOR; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, 2014; SOSA ESTANI et al., 1998).

Recentemente foi publicado um grande estudo clínico randomizado, cego e multicêntrico que testou a eficácia do benzonidazol em pacientes com CCC estabelecida. O objetivo primário era avaliar se o tratamento com benzonidazol neste grupo levaria a redução de eventos cardiovasculares maiores e de morte em relação ao placebo. Contudo, o estudo não demonstrou benefício do tratamento com o benzonidazol na redução da progressão da cardiomiopatia nestes pacientes (27.5% no grupo tratamento e 29.1% no grupo placebo, IC 95%:0.81-1.07, p:0.31) (MORILLO et al., 2015a).

Com base nestes estudos, o último Consenso Brasileiro em DC no ano de 2015 recomenda como classe I (condições para as quais há evidências conclusivas, ou, na sua falta, consenso geral de que o procedimento é seguro e útil/eficaz) o tratamento antiparasitário na fase aguda, na doença congênita e em crianças de até 12 anos de idade. O tratamento na fase crônica é considerado IIa (Peso ou evidência/opinião a favor do procedimento. A maioria aprova) na forma indeterminada e na cardiomiopatia sem doença avançada. O tratamento de CCC com doença avançada é considerado classe III (Condições para as quais há evidências e/ou consenso

de que o procedimento não é útil/eficaz e, em alguns casos, pode ser prejudicial) (PINTO DIAS et al., 2016). Além disso, documentos mais recentes sobre tratamento em DC, como o protocolo do Ministério da Saúde de 2018 e a diretriz da Organização Panamericana de Saúde (OPAS) em 2019, ratificam que, na CCC fase avançada, não existe evidência científica suficiente para corroborar o tratamento com agentes tripanocidas (Tabela 4) (COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS, 2018; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2019b).

Tabela 4: Recomendações terapêuticas para tratamento etiológica da doença de Chagas.

Fase da doença de Chagas	Faixa etária	Tratamento etiológico
Aguda	Todas as faixas etárias	1ª linha: benznidazol 2ª linha: nifurtimox
Crônica indeterminada ou digestiva	Crianças e adolescentes	1ª linha: benznidazol 2ª linha: nifurtimox
	Adultos < 50 anos	1ª linha: benznidazol Não usar nifurtimox
	Adultos ≥ 50 anos	Não tratar de rotina**
Crônica cardíaca (fases iniciais*)	Todas as faixas etárias	Decisão compartilhada: oferecer possibilidade de tratamento, sendo tratar com benznidazol ou não tratar alternativas válidas Não usar nifurtimox
Crônica cardíaca (doença avançada)	Todas as faixas etárias	Não tratar

Fonte: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas, n.397, CONITEC, Ministério da Saúde, 2018 (o documento permite a reprodução total ou parcial da obra, citando-se a fonte).

Pela necessidade do desenvolvimento de terapias mais eficazes e mais toleradas, outras drogas vêm sendo estudadas, a exemplo do antifúngico posaconazol. Esta droga foi comparada ao

tratamento padrão com benzonidazol em pacientes com DC crônica, sendo mais associada à falha de tratamento que o tratamento convencional (MOLINA; SALVADOR; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, 2014). Em 2017, outro estudo clínico foi realizado com as mesmas medicações objetivando determinar se o regime em monoterapia era superior à associação das mesmas na redução do parasitismo em indivíduos chagásicos assintomáticos. Novamente, não foi demonstrada superioridade do posaconazol no regime de monoterapia ou em associação comparando-se à monoterapia padrão com benzonidazol (MORILLO et al., 2017).

O estudo E1124 foi um estudo de fase II que avaliou a eficácia na eliminação do parasita no sangue periférico da pro-droga ravuconazol em pacientes com DC crônica. Esta droga foi administrada em 3 diferentes regimes de doses e comparada ao benzonidazol e placebo. Apesar de inicialmente ter demonstrado eficácia na eliminação do parasita, o efeito do ravuconazol não se demonstrou sustentável durante o seguimento de 12 meses, diferentemente do benzonidazol que foi eficaz precocemente e de modo sustentado durante o estudo (ALONSO-VEGA et al., 2018).

Atualmente, novos estudos clínicos vêm testando a eficácia de diferentes regimes de tratamento do benzonidazol e/ou da sua associação com outras drogas tanto para eliminação do parasita quanto para redução da progressão da CCC. Além disso, estudos experimentais estão em andamento para o desenvolvimento de uma vacina anti-*T. cruzi* (BARRY et al., 2016).

Casos refratários à terapêutica clínica de pacientes com CCC em fase avançada podem se beneficiar de procedimentos intervencionistas não-farmacológicos. Neste sentido, o transplante cardíaco (TC) ortotópico, procedimento complexo e de alto custo, é considerado o padrão-ouro de tratamento. Embora alguns estudos sugiram que a sobrevida do paciente após transplante cardíaco em portadores de cardiomiopatia chagásica seja um pouco melhor que a de pacientes com insuficiência cardíaca por outras etiologias (BOCCHI; FIORELLI, 2001), nesta população há o risco de reativação da infecção pelo uso de imunossupressores pós-transplante devido ao parasitismo tecidual persistente. Além disso, por sua dependência de compatibilidade entre doadores, atualmente esta técnica cirúrgica ainda beneficia uma reduzida quantidade de indivíduos, resultando em um número de transplantes bem menor do que a demanda.

No contexto da ICC, outros procedimentos intervencionistas, tais como a cardiomioplastia e a ventriculectomia, não demonstraram eficácia sustentada a longo prazo, pois não modificaram ou até aumentaram as taxas de mortalidade (BESTETTI; BRASIL; BOMBONATO, 1997; BRAILE et al., 2000).

Uma das terapias mais atuais no tratamento de IC avançada é o uso de dispositivos de assistência circulatória mecânica (DACM), que são classificados como dispositivos temporários

ou de longa permanência. Esses dispositivos são usados como ponte para transplante ou como alternativa ao transplante cardíaco com bons resultados principalmente em países desenvolvidos, onde esta terapia já é uma realidade. Contudo, esses dispositivos são de alto custo, além do fato de que o implante e o seguimento pós-implante serem dependentes de equipe multiprofissional altamente especializada suportada por uma estrutura hospitalar adequada. Por tais razões, esta terapia somente é acessível a poucos hospitais privados do sul/sudeste no Brasil, não sendo uma alternativa ainda factível para a maioria dos pacientes com IC avançada no nosso país (AYUB-FERREIRA et al., 2016).

2.3.2 Novas terapias

No contexto atual em que não existe ainda um tratamento definitivo para portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, o desenvolvimento de terapias que retardem a evolução para uma forma mais grave da insuficiência cardíaca e/ou restaurem a função cardíaca do paciente são de grande importância. Por esses motivos, os estudos através do tratamento de cardiomiopatias com células-tronco (CT) e/ou fatores de crescimento vem aumentando continuamente.

As CT são células não diferenciadas que possuem duas características principais: a habilidade de auto renovação e a capacidade de se diferenciar em células com funções mais especializadas. As CT embrionárias e adultas são as mais estudadas no campo da medicina regenerativa. Por questões éticas e de segurança, as células-tronco adultas são as mais utilizadas, tendo como fonte diversos tecidos do corpo como a medula óssea, o tecido adiposo, a polpa dentária, o cordão umbilical e a placenta (SOARES; DOS SANTOS, 2009).

A medula óssea e outros tecidos possuem populações de CT chamadas de estromais ou mesenquimais (CTM), sendo estas células multipotentes. O método de coleta das CTM de medula óssea é fácil e bem estabelecido na prática clínica, devido a transplantes de medula óssea (PITTENGER et al., 1999). Vários estudos com CTM realizados em modelos animais de doenças cardíacas demonstraram a capacidade de regeneração tecidual do miocárdio, além da melhora da função cardíaca (KOCHER et al., 2001; OLIVARES et al., 2004; WANG et al., 2001).

As CTM possuem efeitos parácrinos, incluindo indução da angiogênese, recrutamento de CT circulantes e ativação de CT presentes no tecido cardíaco. Um grande número de evidências sugere que os principais benefícios das CTM nas cardiopatias decorram dos efeitos parácrinos destas células (CHENG; YAU, 2008).

Estudos usando CTM em modelos animais portadores de DC crônica do nosso grupo demonstraram redução da inflamação de maneira dose-dependente além de redução de aproximadamente 60% da fibrose cardíaca dois meses após a terapia (SOARES et al., 2004). Outros autores também mostraram redução de fibrose cardíaca após aplicação de CTM em modelos animais de cardiopatia diabética e melhora da função ventricular em cardiopatia isquêmica (JIN et al., 2020; TANG et al., 2006).

Contudo, até o momento, estudos clínicos não demonstraram a eficácia da aplicação das CTM em diversos tipos de cardiopatias, ainda sendo necessárias mais avaliações para possibilitar sua aplicação na prática clínica.

2.3.3 Terapia com G-CSF

A fase crônica da DC pode evoluir assintomática por anos. Quando a CCC se manifesta como insuficiência cardíaca, o tecido miocárdico já se apresenta disfuncional e remodelado após um longo período de inflamação crônica associada a mecanismos imuno-mediados. O uso de citocinas que modulem os processos inflamatórios relacionados à progressão da CCC pode se constituir em uma alternativa importante para o tratamento desta doença.

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma citocina usada clinicamente por via subcutânea para tratamento de neutropenia e como terapia adjuvante em protocolos de transplante de medula óssea, com o objetivo de mobilizar células-tronco da medula óssea, incluindo CTM, CT hematopoiéticas e endoteliais (BOOZ, 2007; GASCÓN et al., 2018). Essa é uma droga segura e tem baixa incidência de indução de eventos adversos.

O G-CSF é produzido por inúmeros tipos celulares e órgãos, mais notadamente pelo tecido miocárdico após infarto, constituindo-se em um mecanismo de reparo primário a lesões no nosso organismo (INCE; NIENABER, 2007). O seu receptor (CD114) está presente em células hematológicas, assim como em cardiomiócitos e em células endoteliais. Este receptor faz parte de uma família de receptores de citocinas classe I, que após ligação ao G-CSF sofrem dimerização e agem por múltiplas vias intracelulares após a ativação de vias específicas da tirosina cinase (HARADA et al., 2005).

Seus efeitos cardiovasculares podem se dar por meio de ações diretas no tecido cardíaco, de mobilização de CT e de sua ação imunomodulatória. Evidências de estudos experimentais sugerem que o G-CSF tem efeito protetor em cardiomiócitos através da indução de proteínas antiapoptóticas pela indução da via STAT3 pelo seu receptor (KURDI; BOOZ, 2007). Além

disso, também age estimulando outra via protetora cardíaca, a da AKT/Proteína Cinase B e inibindo a expressão de moléculas relacionadas ao remodelamento miocárdico (especialmente a fibrose) como o receptor 1 da angiotensina II e TNF-alfa (LI et al., 2006a; MIYATA et al., 2006). Modelos experimentais de doença cardíaca isquêmica demonstraram o potencial uso do G-CSF na regeneração miocárdica, reduzindo a fibrose e a apoptose de cardiomiócitos (D'AMARIO et al., 2018; THEISS et al., 2013). Demonstrou-se também que o G-CSF pode reduzir a apoptose da célula endotelial e aumentar a vascularização em corações infartados (LI et al., 2006b).

Um estudo em modelo animal demonstrou elevados níveis de mRNA do G-CSF e a presença de receptores para G-CSF em cardiomiócitos no período de desenvolvimento cardíaco. A expressão do G-CSF e do seu receptor foi detectada em células cardíacas embrionárias desde estágios iniciais da embriogênese. Animais que tiveram a expressão de G-CSF bloqueada faleceram no final da gestação por hipoplasia cardíaca, e a aplicação intrauterina de G-CSF levou à proliferação e hiperplasia de cardiomiócitos. Esses resultados indicam uma importante função do G-CSF no desenvolvimento de cardiomiócitos (SHIMOJI et al., 2010).

Um estudo publicado em 2015 com pacientes com insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio demonstrou a capacidade do G-CSF de mobilizar células progenitoras endoteliais, causando uma melhora da função cardíaca com redução do remodelamento ventricular e do gasto energético do miocárdio (Figura 5) (ZHAO et al., 2015).

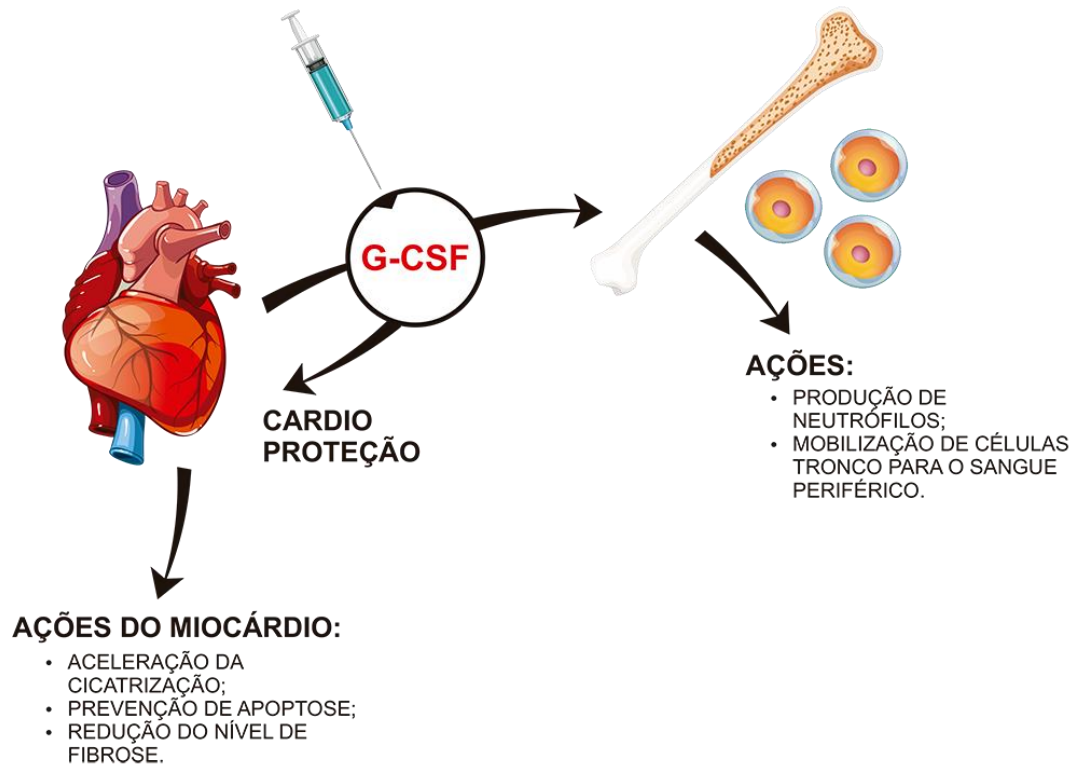


Figura 5: Potenciais ações do G-CSF no coração. Adaptada de (BOOZ, 2007)

Em pacientes portadores de insuficiência cardíaca de etiologia não isquêmica, a administração periférica de G-CSF associada a de células-tronco autólogas, por via intracoronária, causou a melhora da classe funcional pela NYHA, da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, da capacidade do exercício e da qualidade de vida (HAMSHERE et al., 2015).

Além dos efeitos descritos acima, estudos demonstraram que o G-CSF tem efeitos na imunidade adaptativa através de vários mecanismos incluindo a ativação e o recrutamento de linfócitos T regulatórios e de células supressoras de origem mielóide, sendo ambos os tipos celulares com potencial imunomodulador. Pode ativar a expressão de genes imunomodulatórios de linfócitos T, como GATA-3 e STAT5, bem como inibir diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias por estes linfócitos em doses farmacológicas (SLOAND et al., 2000). Atua também na mobilização de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$, assim como na diferenciação de células dendríticas tolerogênicas (KARED et al., 2005; RUTELLA et al., 2005). Todas essas ações corroboram a atuação do G-CSF como uma citocina com potencial imunomodulador (RUTELLA et al., 2005; WAIGHT et al., 2011).

Com base nas evidências sobre o potencial papel benéfico do G-CSF em cardiomiopatias de diversas etiologias, essa citocina começou a ser estudada também no contexto da doença de

Chagas.

Nosso grupo avaliou a eficácia do G-CSF em modelo animal de CCC, comparando grupos de animais que receberam somente injeção de solução salina com outro que recebeu somente G-CSF, sendo avaliadas as funções cardiopulmonar e histopatológica desses grupos. No grupo que recebeu 3 ciclos do G-CSF, foi demonstrada redução de arritmias, aumento da distância de caminhada, redução da fibrose miocárdica e do número de células inflamatórias em relação aos animais com solução salina. Comparando-se com o grupo que recebeu somente 1 ciclo de G-CSF, o grupo com mais injeções demonstrou melhores resultados. Além disso, o grupo que recebeu 1 ciclo de G-CSF apresentou melhor resposta do que o grupo que recebeu somente salina (MACAMBIRA et al., 2009). Posteriormente, em outro estudo de modelo animal do nosso grupo, o uso do G-CSF causou a redução da miocardite e da carga parasitária, além de ter aumentado o recrutamento de linfócitos T regulatórios e a modulação de citocinas pró-inflamatórias (VASCONCELOS et al., 2013).

Com o objetivo de potencializar os efeitos tróficos da terapia celular, nosso grupo analisou os efeitos de células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas para superexpressar G-CSF (CTM_G-CSF) em comparação ao transplante de células tronco mesenquimais não modificadas ou a solução salina em modelo animal de CCC. Foi demonstrado no grupo CTM_G-CSF a maior redução de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, de fibrose miocárdica, além de citocinas pró inflamatórias, tais como TNF α e IFN gama (SILVA et al., 2018).

Tendo como base as evidências de estudos experimentais, nosso grupo conduziu um estudo clínico de fase I para avaliação da segurança da aplicação de CTM via intracoronária em pacientes portadores CCC em classe funcional III e IV da NYHA. Vinte e oito pacientes foram incluídos, com realização de punção da crista ilíaca para coleta de CT da medula óssea. Posteriormente, 20 ml da suspensão de CTM foram lentamente injetados por cateter dentro das coronárias. Com o objetivo de intensificar os efeitos da injeção da CTM, após 25 dias do transplante os pacientes receberam G-CSF subcutâneo durante 5 dias (5 μ g/kg/dia). Além de demonstrar que o procedimento era seguro e exequível, o estudo também avaliou a potencial eficácia da terapia. Seguimento de 60 dias pós-terapia demonstrou tendência de melhora em diversos parâmetros como classe funcional da NYHA, qualidade de vida, distância caminhada em 6 minutos e fração de ejeção do VE (VILAS-BOAS et al., 2006)

Em 2007, com o patrocínio do Ministério da Saúde, foi criado um protocolo para estudo clínico multicêntrico de fase II/III para avaliar a eficácia da terapia celular em 4 diferentes cardiopatias, incluindo a DC (TURA et al., 2007).

No braço da CCC, os pacientes incluídos tinham classe funcional II a IV da NYHA e receberam injeção intracoronária de CTM ou placebo. Cerca de 25 dias após o transplante, foi administrado G-CSF via subcutânea por 5 dias na dose de 5 µg/kg/dia ou seu placebo correspondente. O tempo de seguimento foi de 12 meses, sendo o objetivo primário a aferição da mudança da fração de ejeção do VE. Neste estudo não foi possível demonstrar benefício do transplante de CTM por via intracoronária na melhora da função ventricular esquerda ou na qualidade de vida (DOS SANTOS et al., 2012).

Torna-se claro que estudos clínicos com a aplicação de imunomodulação por meio de uso de citocinas em pacientes com CCC ainda são escassos, apesar das evidências experimentais dos seus benefícios. Neste contexto, o G-CSF desponta como uma possível terapia a ser associada ao tratamento padrão da CCC, com potencial eficácia, tanto para a melhora do quadro clínico, quanto para o controle da lesão miocárdica causada pela resposta inflamatória e pela presença do *T. cruzi*.

Hipótese do estudo:

O uso do G-CSF como terapia associada ao tratamento padrão na CCC é eficaz na melhora e/ou estabilização do quadro clínico, aferido pela classe funcional da New York Heart Association (NYHA) em comparação ao tratamento padrão associado a placebo.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do uso do G-CSF como terapia adjuvante ao tratamento padrão na CCC em comparação ao tratamento padrão associado a placebo para melhorar e/ou estabilizar o quadro clínico conforme aferição pela classe funcional da NYHA.

OBJETIVO PRIMÁRIO:

Avaliar o efeito da terapia com G-CSF sobre:

1. A classe funcional da NYHA;

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

A) Avaliação de eficácia

Avaliar o efeito da terapia com G-CSF sobre:

1. A capacidade funcional de acordo com dados de ergometria e do teste de caminhada de 6 minutos;
2. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo aferidos pelo ecocardiograma bidimensional e ressonância nuclear magnética;
3. A presença de arritmias ventriculares ao Holter de 24 horas;
4. A qualidade de vida dos pacientes, através do questionário de Minnesota;
5. O perfil de biomarcador prognóstico de insuficiência cardíaca, através da dosagem de NT-ProBNP;
6. O perfil inflamatório, através da dosagem de citocina como o TNF α .

B) Avaliação de segurança

Avaliar o efeito da terapia com G-CSF sobre:

1. A frequência de eventos adversos por sistema;
2. A frequência de eventos adversos graves de intensidade III ou IV.

4. CAPÍTULO 1

O manuscrito intitulado “**Efficacy and safety of G-CSF therapy in Chagas cardiomyopathy: a phase II, double-blind placebo controlled randomized clinical trial**” descreve os resultados do primeiro estudo clínico que avaliou a eficácia e segurança da terapia com G-CSF na melhora da classe funcional de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica. De forma exploratória, também foram avaliados a efeito do G-CSF na função ventricular esquerda e no perfil de biomarcador e de citocinas.

Efficacy and Safety of G-CSF Therapy in Chagas Cardiomyopathy: A Phase II Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial

Carolina T Macedo, Ticiana F Larocca*, Márcia Noya-Rabelo, Roque Aras Junior, Cristiano R B Macedo, Moisés I Moreira, Alessandra C Caldas, Jorge A Torreão, Victor M A Monsão, Clarissa L M Souza, Juliana F Vasconcelos, Milena R Bezerra, Daniela P Petri, Bruno S F Souza, Antonio G F Pacheco, Andre Daher, Ricardo Ribeiro-dos-Santos, Milena B P Soares*

Department of Cardiology, Hospital São Rafael, Salvador, Brazil (C T Macedo PhD, M Noya-Rabelo PhD, M I Moreira MD, A C Caldas MD, J A Torreão PhD)

Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Brazil (C T Macedo, T F Larocca PhD, J F Vasconcelos PhD, B S F Souza PhD, Prof R Ribeiro-dos-Santos PhD; Prof M B P Soares PhD)

Senai Institute on Innovation in Advanced Health Systems, SENAI CIMATEC, Salvador, Brazil (C T Macedo, M R Bezerra, R Ribeiro-dos-Santos, M B P Soares)

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil (M Noya-Rabelo)

University Hospital Prof. Edgard Santos, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil (Prof R A Junior PhD, Prof C R B Macedo PhD, C L M Souza MD)

Hospital Geral Roberto Santos, Salvador, Brazil (V M A Mansão MD)

Center for Biotechnology and Cell Therapy, Hospital São Rafael, Salvador, Brazil (D P Petri, B S F Souza)

D’Or Institute for Research and Education (IDOR), Rio de Janeiro, Brazil (B S F Souza)

Scientific Computing Program (PROCC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil (A G F Pacheco, PhD)

Vice-Presidency of Research and Reference Laboratories, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil (A Daher, PhD)

Correspondence to: Prof. Milena B P Soares Gonçalo Moniz Institute, 40296-710, Salvador, Brazil. +55 71 3176-2260. milena.soares@fiocruz.br

Summary

Background Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is a life-threatening clinical condition responsible for most of the morbidity and mortality of Chagas disease with no effective treatment. Previous studies showed that granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) improved heart function models of CCC. Herein, we report the interim results of the safety and efficacy of G-CSF therapy versus placebo in adults with Chagas cardiomyopathy

Method This was a double-blind, randomized, placebo-controlled trial designed to evaluate the efficacy and safety of G-CSF therapy with concomitant use of standard heart failure therapy in patients with CCC. Patients with CCC between 20 and 75 years of age, New York Heart Association (NYHA) functional class II to IV, and left ventricular ejection fraction (LVEF) 50% or below were included. A randomization list using blocks of 2 and 4 and an allocation rate of 1:1 was generated by R software which was stratified by functional class. Double blinding was done to both arms and assessors were masked to allocations. All patients received standard HF treatment for 2 months before 1:1 randomization to either the G-CSF (10 mcg/kg/day subcutaneously) or placebo group (1 mL of 0.9% saline subcutaneously). Both groups received 4 cycles of subcutaneous injections for 5 consecutive days on top of HF treatment. The primary endpoint was either maintenance or improvement of NYHA class from baseline to 6 and 12 months after treatment, and intention-to-treat analysis was used. This trial is registered with ClinicalTrials.gov (NCT02154269).

Findings Between September 24, 2015 and July 30, 2018 we screened 535 patients with CCC in Salvador, Brazil, of whom 37 were randomized. Overall, baseline characteristics were well balanced between groups. Most patients had NYHA class II heart failure (86.4%); low mean LVEF was $32 \pm 7\%$ in the G-CSF group and $33 \pm 10\%$ in the placebo group. Frequency of primary endpoint was 78% (95% CI 0.60-0.97) vs. 66% (95% CI 0.40-0.86), $p = 0.47$, at 6 months and 68% (95% CI 0.43-0.87) vs. 72% (95% CI 0.46-0.90), $p = 0.80$, at 12 months in placebo and G-CSF groups, respectively. G-CSF treatment was safe, without any related serious adverse events. There was no difference in mortality between both arms, with five deaths (18.5%) in treatment versus four (12.5%) in placebo arm. Exploratory analysis demonstrated that the maximum rate of oxygen consumption during exercise (VO_2 max) showed an improving trend in the G-CSF group.

Interpretation G-CSF therapy was safe and well tolerated in 12 months of follow up. Despite of prevention of symptom progression could not be demonstrated in the present study, our results support further investigation of G-CSF therapy in Chagas cardiomyopathy patients.

Funding The Fiocruz Programme of Excellence in Clinical Research, through the Brazilian National Council of Research (CNPq).

Introduction

Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is a life-threatening clinical condition that is responsible for most of the morbidity and mortality caused by infection by the protozoa *Trypanosoma cruzi*. About 30% of asymptomatic infected patients, i.e., those who have the indeterminate form of Chagas disease, will develop cardiac manifestations at some point in their lives, although this might take up to 30 years to occur following the primary infection. The main clinical features include heart failure, sudden death, arrhythmias, stroke, and systemic embolism, with sudden death (55–60%) and heart failure (25–30%) as the most common causes of death.^{1,2}

CCC is the leading cause of non-ischemic heart failure in Latin America, with most of the 2 million cases and 12,500 deaths per year occurring in Brazil and Argentina (Andrade et al., 2011).^{3,4} Chagas disease prevalence is also increasing in Europe and in the USA. In the USA, it is currently estimated that 30,000 to 40,000 individuals may have CCC, and Chagas disease has already been listed by the Centers for Disease Control (CDC) as one of the five most neglected parasitic infections.⁵

Although the first reports of Chagas disease date back more than 100 years, the pathogenesis of CCC is still not fully understood. Several studies have demonstrated that the persistence of *T. cruzi* causes permanent myocardial inflammation due to both direct parasite–target response and infection-triggered auto-reactivity, leading to interstitial edema, fibrosis, apoptosis, and chronic myocarditis.⁶

Currently, nifurtimox and benznidazole are the only effective anti-trypanosomal therapies available for Chagas disease, but their use is not recommended in patients with chronic cardiomyopathy due to the lack of evidence that these drugs can potentially avert progression of the disease.^{7,8} Despite its unique pathophysiological mechanism, standard therapy for CCC is the same as that used to treat any other heart failure syndrome, usually including beta blockers, diuretics, angiotensin-converting enzyme inhibitors (or angiotensin receptor blockers), and spironolactone. Management of late-phase chronic cardiac disease may also include implanted cardiac defibrillators and pacemakers. Heart transplantation is not widely performed as it has significant disadvantages, such as high cost, a limited number of donors, and potential complications of immunosuppressive therapy.^{4,7} Therefore, new therapeutic approaches, mainly targeting specific features of the pathogenic mechanisms of CCC, are urgently needed.

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a pleotropic cytokine widely used in clinical practice essentially as an adjunctive drug to chemotherapy, due to its ability to induce granulopoiesis and mobilize bone marrow-derived stem cells to the peripheral blood for bone marrow transplantation. The G-CSF receptor is expressed in several cell types, including immune cells, and G-CSF treatment was shown to induce T cell tolerance in several immune-mediated disease models.⁸ Moreover, there is evidence that G-CSF induces cardiomyogenesis and plays an important role in heart development during embryogenesis.^{9–11} Therefore, this cytokine has been explored over the last few years as a potential adjuvant therapy for cardiac diseases.¹²

In previous studies, it was shown that G-CSF administration improved exercise capacity; reduced inflammation, fibrosis, and tissue parasitism; and modulated the production of pro-inflammatory mediators in a mouse model of CCC.^{13,14} These effects were attributed, at least partially, to the immunomodulatory activity of G-CSF.¹⁴ In addition, genetically modified mesenchymal stem cells overexpressing G-CSF have also demonstrated immunomodulatory effects by reducing inflammatory mediators, leukocyte infiltration, and myocardial fibrosis.¹⁵

In an attempt to address the lack of effective therapy for CCC, we performed a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial to evaluate the efficacy and safety of G-CSF therapy with concomitant use of standard heart failure therapy in patients with CCC.

Research in context

Evidence prior to this study

Benznidazole and nifurtimox are trypanocide drugs that have great efficacy in the acute phase of Chagas disease. However, both are related to a significant number of side effects, with poor clinical effect in the chronic phase of the disease. Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is a life-threatening clinical condition that is responsible for most of the morbidity and mortality of the disease. Despite its unique pathophysiological mechanism, the standard treatment for CCC is the same as that used to address heart failure (HF) caused by other etiologies. We searched PUBMED register for randomized clinical trials published until 2021 focused in CCC treatments. We identified five randomized controlled trials, one using cell therapy, one using benznidazole, one using omega 3 fatty acid, one using selenium and one using carvedilol plus enalapril. Only two of them analyzed disease progression. The first one, conducted by our group, concluded that intracoronary cell therapy does not have additional benefits over standard therapy for CCC in patients with severe heart failure. The second trial concluded that benznidazole did not significantly reduce cardiac clinical progression within five years of follow-up. Other strategies for the treatment of Chagas disease are being studied and focus mainly on modulating myocarditis, fibrosis, and myocardial regeneration.

Added value of this study

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a pleotropic cytokine widely used in clinical practice, mainly as an adjunctive drug to chemotherapy, due to its ability to induce granulopoiesis. It can also promote the mobilization of bone marrow-derived stem cells to the peripheral blood for bone marrow transplantation. This cytokine has been

explored over the last few years as a potential adjuvant therapy in cardiac disease, as it is known to be essential to heart development at the earliest stages, and there is also evidence that it induces cardiomyogenesis. In previous experimental studies, our group demonstrated that G-CSF therapy in animal models of CCC was able to reduce myocardial fibrosis, inflammation, and arrhythmias. Moreover, there was a significant improvement in functional capacity. We also showed that genetically modified mesenchymal stem cells overexpressing G-CSF had increased immunomodulatory effects, which ultimately led to a reduced number of inflammatory mediators and lower levels of leukocyte infiltration and myocardial fibrosis.

Implications of all the available evidence

This study is the first randomized clinical trial to assess the effects of G-CSF in Chagas cardiomyopathy. It provides a new treatment strategy that could avert heart disease progression by immunomodulatory actions, leading to improvements in myocarditis, myocardial fibrosis, and regeneration.

Methods

Study design

This study was a double-blind, randomized, placebo-controlled, prospective, comparative superiority trial designed to evaluate the efficacy and safety of G-CSF therapy with concomitant use of standard heart failure therapy in patients with CCC, conducted at two tertiary hospitals in Salvador, northeast Brazil: Hospital São Rafael (HSR) and Hospital Edgard Santos. Double-blinding was limited to the G-CSF and placebo arms.

All patients received standard therapy for heart failure and were randomly assigned to additionally receive either: (a) 10 mcg/kg/day of G-CSF, or (b) 1 mL of 0.9% saline as placebo. Both groups received four cycles of subcutaneous injections for five consecutive days of either saline or G-CSF solution prepared for administration with indistinguishable 1 mL syringes. There were nine-day intervals (a weekend followed by a full week) between cycles. G-CSF was manufactured by the Aché laboratory. If G-CSF therapy effectiveness were demonstrated at the end of the study, patients in the placebo arm were offered G-CSF treatment. The clinical study protocol and informed consent form were reviewed and approved by the Ethics Committee at HSR (Certificate of Presentation of Ethical Appreciation number 22133513.4.0000.0048), which was accredited by the Brazilian National Council on Ethics in Research (CONEP), Ministry of Health. The study was registered at <https://www.clinicaltrials.gov> on 06/03/2014 (unique identifier: NCT02154269) and was conducted in accordance with Good Clinical Practice Guidelines (GCP) and Brazilian National Health Council resolution 466/2012. During the study, monitoring visits were conducted carried out to ensure GCP adherence.

Study participants

Between September 24, 2015 and July 30, 2018, we screened 535 patients with Chagas cardiomyopathy in Salvador, Bahia, Brazil, of whom 37 were randomized. The inclusion criteria were previous diagnosis of heart failure as per the Framingham criteria; Chagas disease diagnosis confirmed by two serological tests using distinct methods; age between 20 and 75 years; New York Heart Association (NYHA) functional class II to IV heart failure; and echocardiogram showing left ventricular ejection fraction (LVEF) of 50% or below using the Simpson method. Exclusion criteria were: severe valvular heart disease (except for functional mitral or tricuspid regurgitation); myocardial infarction or history of confirmed coronary artery disease; viral myocarditis; alcohol or drug abuse; acute or chronic kidney disease or previous dialysis therapy; evidence of acute systemic infection; chronic obstructive pulmonary disease with continuous use of steroids or bronchodilators; liver, blood, and neoplastic diseases or hemostasis disorders; chronic inflammatory or infectious diseases; other diseases that could affect life expectancy; any other comorbidity affecting 2-year survival; pregnancy confirmed by human chorionic gonadotropin (β -hCG) testing; and breastfeeding.

Written informed consent was obtained from every subject prior to enrolment. If the study subject was illiterate, an impartial third party witnessed the informed consent process. All subjects were informed of the nature and possible associated risks of the trial and that they were free to withdraw their consent to participate at any time. The investigators and study staff ensured confidentiality of all records.

Randomization and masking

A randomization list using blocks of 2 and 4 and an allocation rate of 1:1 was generated by R software version 3.2. using the Mersenne–Twister method, which was stratified by functional class. The study coordinators provided sealed opaque envelopes. Subjects, clinical study staff, statisticians, and investigators were masked to treatment assignment. Two nurses, a medical investigator, and a hematologist were not blinded. The hematologist was responsible for checking the full blood count on a regular basis in order to monitor G-CSF safety. The blinded investigators did not have access to full blood count tests. The nurses were responsible for preparing and administering the treatments. All laboratory tests, clinical assessments, exams, and imaging were masked to group allocation.

Procedures

Before randomization, all patients received standard heart failure treatment for 2 months in order to optimize baseline drugs and doses for the follow-up visits. According to the current heart failure guidelines,¹⁶ when the study was started, the standard drug regimen for CCC was spironolactone (25 mg/day); furosemide and digoxin, in selected cases; captopril (37.5–150 mg/day); or hydralazine (75 mg/day) with isosorbide mononitrate (20 mg/day), in case of contraindication with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers; carvedilol (6.25–50 mg/day); and amiodarone (200–400 mg/day), if appropriate.

After this 60 day period, all patients underwent clinical evaluation and were submitted to the following baseline tests: urinalysis, blood indices (including full blood count, renal function, electrolytes, liver function, troponin I, ultrasensitive PCR, N-terminal brain natriuretic peptide (NT-proBNP), cytokines, transthoracic echocardiogram, 6 min walk test, treadmill test, cardiac magnetic resonance, 24 h electrocardiogram (ECG) reading, 12-lead conventional electrocardiogram, urinary and serum β -hCG test (before every treatment cycle, if appropriate), and chest x-ray. The echocardiogram was performed according to current guidelines and the Simpson rule was used to calculate LVEF. Complete follow-up assessments were performed at 6 and 12 months after treatment. Hematologic assessments were done after every treatment cycle.

Outcomes

The primary outcome, NYHA functional class, was assessed at baseline and at 6, 9, and 12 months of follow-up by a blinded cardiologist. According to the protocol, improvement was defined as either regression or maintenance of baseline functional class within 12 months of follow-up for patients in NYHA class II or III and regression of functional class, or no more than one hospitalization due to acutely decompensated heart failure during follow-up for patients in NYHA class IV.

Secondary efficacy endpoints included LVEF (measured by echocardiogram and cardiac magnetic resonance), functional capacity (assessed by treadmill test and 6-minute walking test), quality of life (Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire), presence of tachyarrhythmia on 24 h ECG reading, prognostic biomarkers of heart failure (NT-proBNP), and cytokine profile (tumor necrosis alpha (TNF- α) concentration). The study time chart is presented in Figure 1.

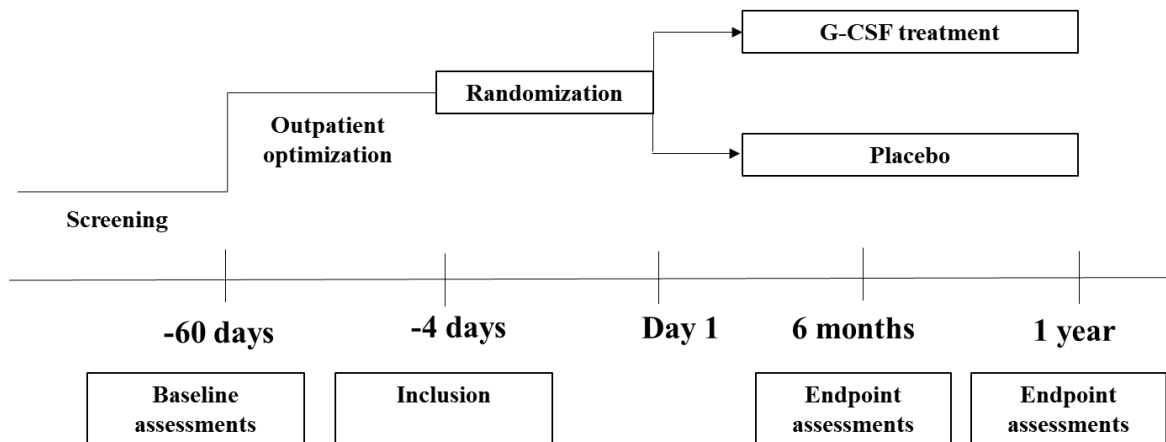


Figure 1: Study time chart. Patients were screened for eligibility before optimization of pharmacological therapy for at least 8 weeks. Patients included in study were randomized to receive granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) or placebo and were followed up for 12 months.

A safety analysis was conducted in the intention-to-treat population, describing frequency, causality, and severity of adverse events (AEs) in each arm. All AEs were subdivided into serious and non-serious events, and were also classified as not related, probably related, or highly likely related to the assigned treatment.

Patients were encouraged to seek immediate advice from the investigators if any AE was suspected. AEs were reported using the Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDra). All clinical or laboratory abnormalities were categorized as grade I to IV according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) of the National Cancer Institute. Any suspected serious AEs (by standard definitions) were reported to the sponsor and to the Ethical Review Committee.

A Data and Safety Monitoring Board (DSMB) was established by the study coordinators, composed of Chagas disease specialists, a cardiologist, a statistician, and another health professional. Meetings occurred periodically, and all changes in the study protocol had to be approved by an independent DSMB and the local ethical committee.

Statistical analysis

Study data were collected and managed using Research Electronic Data Capture (REDCap) electronic data capture tools hosted at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). REDCap is a secure, web-based software platform designed to support data capture, including double entry.

This study was powered to provide evidence of the superiority of G-CSF treatment over placebo. Based on the current literature, subjects with NYHA functional class II to IV heart failure treated only with standard therapy were expected to have a functional class improvement of 10% in the placebo group and 40% in the G-CSF group during 12-month follow-up. Thus, for a 30% absolute difference in NYHA class to be detected with a 95% confidence level and 80% statistical power, a sample size of 29 subjects per treatment group was needed. Taking into account a 15% loss of follow-up in 12 months, the final sample size was 35 subjects per treatment group. An interim analysis with half the sample size was planned in the DSMB charter. Those interim results are presented here, using intention-to-treat analysis.

Primary endpoint analysis was done by intention-to-treat and for missing data, last observation carrying forward as replacement strategy was used, and death before final assessment was considered as treatment failure.

Baseline characteristics and adverse events of the study population were summarized using descriptive statistics with frequencies and percentages for categorical variables. For numerical variables, mean and standard deviation (SD) values were used.

The proportions of categorical variables were compared using Pearson's chi-squared test with Yates's continuity correction at a significance level of 5%. Differences in continuous variables between groups were compared using the t test or Mann-Whitney test. Two-sided p -values <0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using IBM SPSS statistics software version 25.

Role of funding source

The Fiocruz Programme of Excellence in Clinical Research, through the Brazilian National Council of Research (CNPq), a public organization, sponsored this study. It had a role in study design, monitoring, and data analysis, and no role in data collection, data interpretation or writing of the report. The corresponding author had full access to all data and the final responsibility to submit for publication.

Results

A total of 535 subjects were assessed for eligibility at both trial sites (Hospital São Rafael and Hospital Edgard Santos) in Salvador, Brazil, from September 2015 to October 2018. Thirty-seven subjects were randomized (1:1) to one of the treatment arms: (a) G-CSF (10 mcg/kg/day) with concomitant use of standard heart failure therapy, or (b) 0.9% saline plus standard heart failure therapy (placebo). Eighteen subjects were allocated to the treatment group and 19 to the placebo group. The main reason for not including the majority of subjects was unavailability for follow-up, as the vast majority of patients lived in the countryside or remote areas. Nine patients died during follow-up (figure 2).

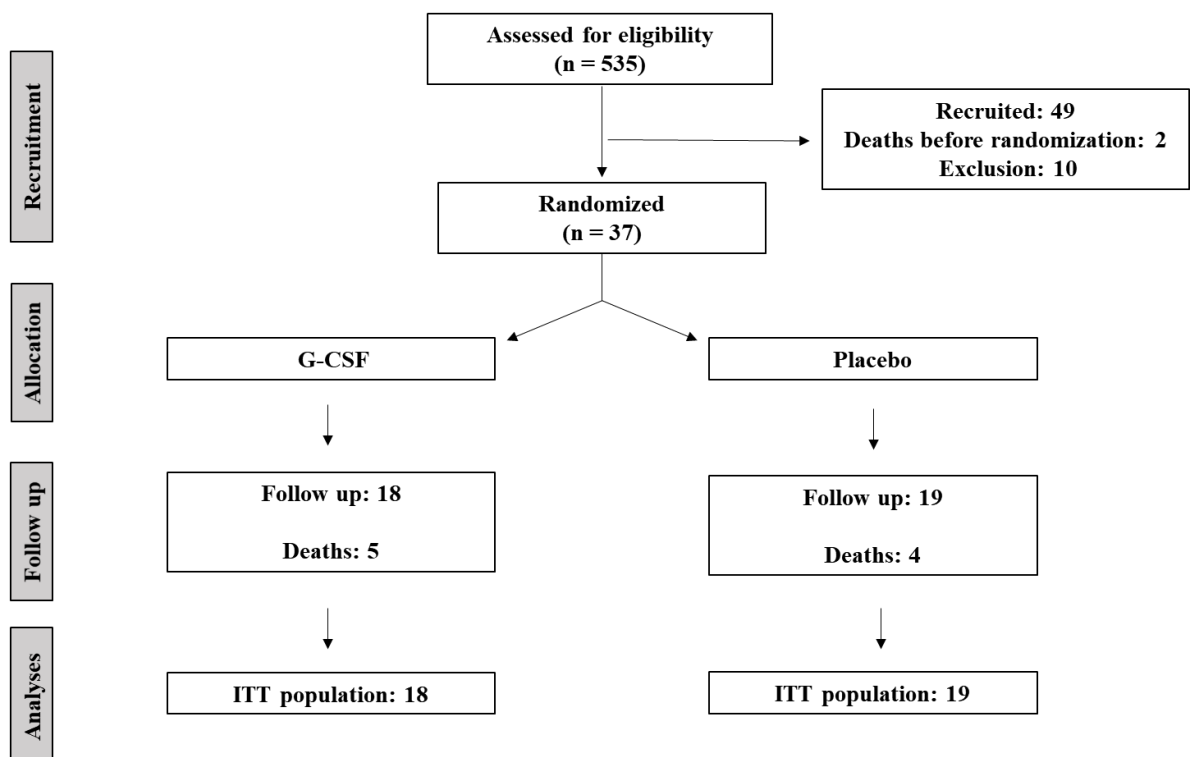


Figure 2: Flowchart showing the flow of patients throughout the trial. ITT, intention-to-treat.

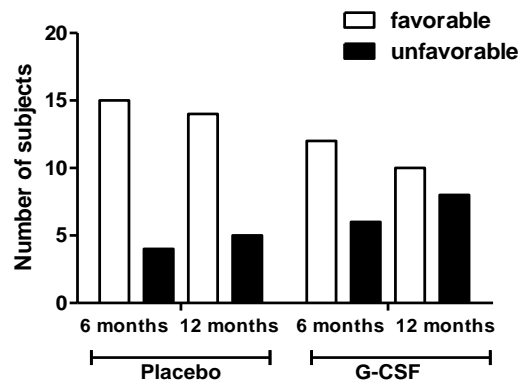
The baseline characteristics of the subjects were similar between the treatment groups (table 1).

Table 1: Baseline characteristics of subjects

		Treatment groups	
		Placebo + SHFT (19 subjects)	G-CSF + SHFT (18 subjects)
Gender	Male	11 (57.8%)	10 (55.0%)
	II	16 (43.2%)	16 (43.2%)
NYHA class	III or IV	3 (8.1%)	2 (5.4%)
	Hypertension	No	12 (63%)
Dyslipidemia	No	12 (63%)	9 (50%)
Age (years)		59 (± 8)	60 (± 8)
BMI		24.38 (± 7.14)	23.33 (± 5.94)
LVEF (Simpson method)		33 (± 10)	32 (± 7)

Absolute number and percentage (%) were used to present categorical variables. Quantitative data presented using mean \pm standard deviation (SD). SHFT, standard heart failure therapy; NYHA, New York Heart Association; BMI, body mass index; LVEF, left ventricular ejection fraction.

The primary outcome was measured by evaluating NYHA functional class improvement, comparing baseline with 6 and 12-month data. All 37 subjects were included in this intent-to-treat analysis. Death before end of follow-up was considered as deterioration. The overall frequency of either maintenance or improvement of clinical condition was primary endpoint was 78% (95% CI 0.60-0.97) vs. 66% (95% CI 0.40-0.86), $p = 0.47$, at 6 months and 68% (95% CI 0.43-0.87) vs. 72% (95% CI 0.46-0.90), $p = 0.80$, at 12 months in placebo and G-CSF groups, respectively (figure 3).

**Figure 3: Progression of NYHA functional class at 6 and 12 months ($p = 0.47$ and 0.80 , respectively).**

The distribution across the NYHA classes in both groups at inclusion ($T = 0$) and at 6 and 12 months after treatment is shown in figure 4.

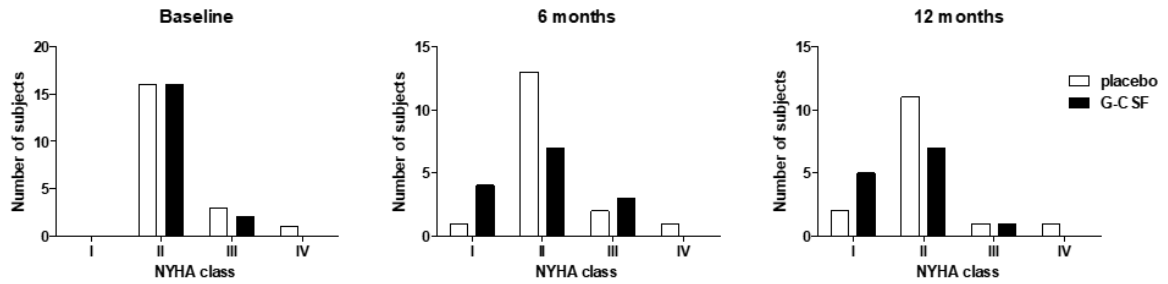


Figure 4: NYHA class distributions at baseline (T = 0) and at 6 and 12 months after treatment ($p = 0.20$ and 0.38 , respectively).

The secondary outcomes included improvement of LVEF (as measured by echocardiogram) at 6 and 12 months compared to baseline results (table 2). The frequency of improvement in placebo and G-CSF arms was 23% vs. 26% ($p = 0.83$) at 6 months and 31% vs. 20% at 12 months, respectively ($p = 0.47$). The difference in percentage of myocardial fibrosis measured by cardiac magnetic resonance at baseline and 12 months between placebo (23.5%) and G-CSF (30.6%) groups was not significant ($p = 0.23$).

Twenty-two subjects performed a treadmill test at enrollment and the last follow-up visit. Nine subjects (41%) had 10% higher oxygen consumption than at baseline. Although not statistically significant, the maximum oxygen consumption at 12 months was better in the G-CSF group than in the placebo group, showing a tendency of improvement ($p = 0.06$). Quality of life was assessed using the Minnesota questionnaire at randomization and at 6 and 12 months. An independent samples median test of the total score showed no statistical difference between the groups at 6 or 12 months ($p = 1.0$ and 0.69).

Table 4: Secondary endpoints at baseline and 12 months after treatment

	Group	Baseline	p -value	12 months	p -value
LVEF (%)	Placebo	33 (± 10.7)	0.63	35 (± 12)	0.24
	G-CSF	31 (± 7.8)		31 (± 6.7)	
VO ₂ max	Placebo	22.7 (± 10.7)	0.95	20 (± 12)	0.064
	G-CSF	22.9 (± 7.8)		26 (± 6.7)	
Myocardial fibrosis (%)	Placebo	23.8 (± 13.4)	0.75	23.5 (± 13.7)	0.23
	G-CSF	25.5 (± 14)		30.6 (± 9.9)	
Six minutes walking test	Placebo	450 (390–480)	0.86	450 (348–502)	1.0
	G-CSF	456 (390–471)		429 (360–495)	
MLHLQ	Placebo	43.2 (± 19.5)	0.43	35.1 (± 17.3)	0.23
	G-CSF	38.4 (± 16.7)		26 (± 20.5)	

LVEF, left ventricular ejection fraction; VO₂ max, maximum oxygen consumption during exercise (mL/kg/min). Myocardial fibrosis evaluated by cardiac magnetic resonance. Six-minute walking test distance: median (first to third quartile). Scores for Minnesota Living with Heart Failure (MLHFQ) physical subscale range from 0 to 40, emotional subscale from 0 to 25, and total scale from 0 to 105, with higher scores indicating worse health status.

Analysis of incidence of non-sustained ventricular tachycardia (NSVT) was performed by 24 h ECG monitoring. At 12 months, the median NSVT was maintained in the G-CSF group and increased in the placebo group compared to baseline, even though no statistical significance was found ($p = 0.7$).

N-terminal pro-BNP (NT-proBNP) concentration was measured at enrollment and at 12 months, and no statistical significance was detected between the groups at both time points ($p = 0.47$ and 0.86 , respectively). The results are presented in table S1.

Finally, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) concentration was measured as an exploratory analysis. We found a significant increase in TNF- α concentration at days 5 and 47 during the G-CSF application period, followed by a decrease in concentration until the values were similar to those in the placebo group at 12 months ($p = 0.69$). These results are demonstrated in table S2.

There were 11 deaths during the study, two of which happened before randomization. Overall mortality was 24.3% and, out of the nine remaining deaths, five occurred in the treatment group and four in the placebo group. Fifty-nine serious adverse events (SAE) were reported, none of which were related to G-CSF treatment. The classification of SAEs and their frequency per treatment group is presented in table 3.

Table 3. Classification and frequency of serious adverse events (SAEs) per treatment group

SAE	Placebo (32 SAEs) n (%)	G-CSF (27 SAEs) n (%)
Death	4 (12.5%)	5 (18.5%)
Life-threatening	8 (25.0%)	7 (25.9%)
Inpatient hospitalization or prolonged existing hospitalization	20 (62.5%)	9 (33.3%)
Clinically significant	0 (0.0%)	6 (22.2%)

n: total number of events in each group, not number of patients who had events.

A total of 283 adverse events were reported using MedDra. The AEs were aggregated using the system organ classes (SOC), and those with a frequency higher than 3.0% in either treatment arm are presented in table 4.

Table 4: AEs with a frequency higher than 3.0% per treatment arm

AE	Placebo (108 AEs) n (%)	G-CSF (148 AEs) n (%)
Cardiac disorders	7 (6.4%)	5 (3.3%)
Gastrointestinal disorders	28 (25.9%)	25 (16.8%)
General disorders and administration site conditions	16 (14.8%)	31 (20.9%)
Infections and infestations	5 (4.6%)	14 (9.4%)
Investigations (other clinical disorders investigated)*	4 (3.7%)	5 (3.3%)
Metabolic and nutrition disorders	6 (5.5%)	1 (0.6%)
Musculoskeletal and connective tissue disorders	13 (12.0%)	18 (12.1%)
Nervous system disorders	12 (11.1%)	16 (10.8%)
Reproductive system and breast disorders	1 (0.9%)	6 (4.0%)
Respiratory, thoracic, and mediastinal disorders	11 (10.1%)	19 (12.8%)
Skin and subcutaneous tissue disorders	1 (0.9%)	6 (4.0%)
Vascular disorders	4 (3.7%)	2 (1.3%)

*: total number of events in each group, not number of patients who had events.

Discussion

Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is a life-threatening condition for which no specific and effective treatment has been found. Since drug repurposing is the quickest research and development strategy to deliver a new treatment, our group designed this trial in an attempt to repurpose G-CSF as a potential treatment for CCC, given its well-established safety profile and promising results in experimental models of this disease. The present study was the first randomized clinical trial assessing the effects of therapy with G-CSF in symptomatic patients with CCC. Although it was well tolerated, no statistically significant clinical improvement was demonstrated in terms of efficacy.

The New York Heart Failure (NYHF) classification has been shown to be an independent predictor of mortality in patients with chronic heart failure, including Chagas cardiomyopathy.¹⁷ Additionally, it is easily applied, well validated, and widely used for risk stratification in heart failure. In this study, for most of the subjects, their NYHA classification was either maintained or improved during the study follow-up. This may have been the result of standard heart failure treatment optimization before randomization and close monitoring throughout the follow-up, as the same trend was observed in both study arms. No parameters used to evaluate the influence of G-CSF treatment were statistically significant, including the primary outcome (NYHA); however, there was a trend showing that G-CSF treatment could potentially avert the natural progression of CCC, promoting some improvement in the clinical condition of patients 6 months after treatment. This may indicate that a different treatment regimen, with courses of G-CSF distributed over longer periods, might be more effective in inducing prolonged improvement in CCC.

Regarding cardiomyopathies with other etiologies and the use of G-CSF, the overall mortality in our study was higher (24.3%). A study recently published on ischemic cardiomyopathy showed an overall mortality of 15.8% with no statistical difference between G-CSF and placebo groups.¹⁸ However, we did not expect to have a similar mortality rate, as it is well known that CCC carries a worse prognosis with a higher mortality rate compared

to heart failure with other etiologies. In a recent study, mortality from cardiovascular and other causes was 40% higher in patients with CCC than in patients with ischemic heart disease.¹⁹ Our study might more accurately reflect this aspect, as we had a follow-up period of 12 months. Our mortality rate is in keeping with what was described by Shen and collaborators. Their overall mortality rate by CCC was 29.2% in a study with more than 2000 patients comparing cardiovascular mortality and hospitalization between heart diseases with different etiologies, including Chagas.^{19,20}

The relationship between myocardial fibrosis with ventricular dysfunction and cardiac arrhythmias in patients with CCC is well established.²¹ In our study, assessment of fibrosis by cardiac magnetic resonance showed a trend in regression of myocardial fibrosis in 18.8% of patients, without a significant difference between the groups. This reduction in the percentage of myocardial fibrosis, along with some improvement in the incidence of cardiac arrhythmias, was previously demonstrated by our group in an experimental model of CCC.^{13,15} A possible explanation for the better therapeutic response in mice is the earlier time of intervention during the course of the disease, when the inflammatory response and fibrosis may be more effectively modulated by G-CSF.

The influence of the timing of G-CSF administration on its effects has been suggested in the literature. Several studies demonstrated that earlier application of G-CSF led to further improvement in parameters such as functional class, left ventricular function, and cardiac remodeling.^{18,22-24} In our study, G-CSF therapy was carried out at an advanced stage of the disease, in patients with greatly reduced left ventricular function. It is reasonable to suppose that earlier administration of G-CSF could potentially promote better results. Additionally, the worst response to G-CSF in patients with Chagas disease, compared to other cardiomyopathies, might also be related to differences in their pathogenesis. In addition to the presence of the parasite, CCC has greater myocardial inflammatory infiltrates, as shown by an analysis of explanted hearts from patients with CCC compared to other etiologies of heart failure.²⁵

Other studies have also shown that G-CSF can improve left ventricular function and reduce cardiac remodeling and TNF- α levels.^{14,18,23} Here we found a transient increase in G-CSF-treated group, which decreased to levels similar to those of placebo group at the end of follow up. We also measured the concentration of NT-proBNP, a biomarker that is strongly correlated with NYHA functional class, as previously described.²⁶ No statistically significant differences in NT-proBNP concentration between the experimental groups were demonstrated.

Regarding exercise tolerance, the maximum rate of oxygen consumption during exercise (VO_2) is an index widely used to objectively assess exercise capacity and cardiovascular reserve. Szlachcic et al. demonstrated that the survival rate in individuals with VO_2 levels greater than 10 mL/kg/min was 80%, whereas it was 20% in those with lower VO_2 levels.²⁷ Mady et al. demonstrated that the VO_2 level, along with LVEF, was an independent predictor of mortality during a 30-month follow-up of patients with CCC.²⁸ In our study, there was a trend of improved VO_2 in the G-CSF group at 12 months, but it did not reach statistical significance.

For quality-of-life assessment, the Minnesota Living with Heart Failure (MLHF) questionnaire was used. Although not statistically significant, the difference between groups was greater in the final evaluation at 12 months, with a tendency toward lower scores (better quality of life) in the G-CSF group.

The follow-up duration also may have had an influence on the results. Although 12 months might have been adequate for assessing functional class and quality of life, this period is unlikely to be long enough to show differences in parameters with slower and more progressive changes, such as left ventricular function, myocardial fibrosis, and functional capacity on exercise testing. In fact, assessment of G-CSF treatment showed benefits when patients with ischemic cardiomyopathy were evaluated 10 years after treatment.¹⁸

A low recruitment rate and a lack of statistically significant results are the main limitations of our study and were considered relevant enough to halt the study following the interim analysis.

Despite its limitations, our study shows that treatment with G-CSF is safe in patients with chronic Chagas cardiomyopathy, with no significant differences between groups regarding the incidence of adverse events and mortality. This is consistent with the current scientific evidence showing that G-CSF has been widely applied in clinical practice with few serious side effects.^{29,30}

The possible efficacy of this therapy in Chagas cardiomyopathy still needs to be clarified, possibly by testing the administration of G-CSF earlier in the course of the disease and with a longer follow-up period, since G-CSF is a cytokine with proven benefits in studies using experimental models of CCC and clinical studies of heart failure with other etiologies.

In conclusion, G-CSF therapy in CCC is safe and well tolerated, but its efficacy in preventing clinical progression of the disease could not be demonstrated in the present study.

Contributors

A.D., C.T.M., T.F.L., M.B.P.S., R.R.d.S., and A.G.P. participated in the study concept and design. C.T.M. and T.F.L. were the principal investigators. C.T.M., T.F.L., M.d.R.B., D.P.P., B.S.d.F.S., C.L.e.M.d.S., M.N.-R., R.A.J., and C.R.B.d.M. conducted data collection and quality assurance. J.F.V., V.M.A.M., M.I.M., A.C.C., and J.A.T. performed imaging exams and laboratory analysis. A.D., C.T.M., and A.G.P. performed data analysis. A.D., C.T.M., T.F.L., M.B.P.S., and A.G.P. participated in interpretation of the data and writing and critical revision of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Interests

The authors declare they do not have a known conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank all subjects who participated in this study, Hospital São Rafael and Hospital Edgard Santos, and the VPPCB/FIOCRUZ teams.

References

- 1 Rassi AJr, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 2001; 76: 86-96.
- 2 Rassi AJr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 152-158.
- 3 Rassi AJr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375: 1388-1402.
- 4 de Andrade JP, Neto JAM, de Paola AAV, et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: Executive summary. *Arq Bras Cardiol* 2011; 96: 434-442.
- 5 Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2009; 49: e52-e54.
- 6 Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007; 115, 1109-1123.
- 7 Dias JCP, Ramos NAJr, Gontijo ED, et al II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. *Epidemiol Serv Saúde* 2016; 25: 7-86.
- 8 Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: A novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol* 2005; 175, 7085-7091.
- 9 Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T, et al. Granulocyte-colony stimulating factor directly enhances proliferation of human troponin I-positive cells derived from idiopathic dilated cardiomyopathy through specific receptors. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23, 1430-1437.
- 10 Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, et al. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 227-237.
- 11 Tsukamoto T, Sogo T, Ueyama T, et al. Chimeric G-CSF Receptor-Mediated STAT3 Activation Contributes to Efficient Induction of Cardiomyocytes from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Biotechnol J* 2020; 15: e1900052.
- 12 Pourtaji A, Jahani V, Moallem SMH, Karimani A, Mohammadpour AH. Application of G-CSF in Congestive Heart Failure Treatment. *Curr Cardiol Rev* 2019; 15: 83-90.
- 13 Macambira SG, Vasconcelos JF, Costa CRS, et al. Granulocyte colony stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: Preservation and improvement of cardiac structure and function. *FASEB J* 2009; 23: 3843-3850.
- 14 Vasconcelos JF, Souza BSF, Lins TFS, 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: 4691-4702.
- 15 Silva DN, Souza BSF, Vasconcelos JF, et al. Granulocyte-colony stimulating factor-overexpressing mesenchymal stem cells exhibit enhanced immunomodulatory actions through the recruitment of suppressor cells in experimental Chagas disease cardiomyopathy. *Front Immunol* 2018; 9: 1449.
- 16 Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol* 2016; 18: 891-975.
- 17 Scrutenid D, Lagioia R, Ricci A, Clemente M, Boni L, Rizzon P. Prediction of mortality in mild to moderately symptomatic patients with left ventricular dysfunction: The role of the New York Heart Association classification, cardiopulmonary exercise testing, two-dimensional echocardiography and Holter Monitoring. *Eur Heart J* 1994; 15: 1089-1095.
- 18 Leone AM, D'Amario D, Cannata F, et al. The Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients with a Large Anterior Wall Acute Myocardial Infarction to Prevent Left Ventricular Remodeling: A 10-Year Follow-Up of the RIGENERA Study. *J Clin Med* 2020; 9: 1214.
- 19 Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, et al. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. *Arq Bras Cardiol* 2018; 111: 436-539.
- 20 Shen L, Ramires F, Martinez F, et al. Contemporary characteristics and outcomes in Chagasic heart failure compared with other nonischemic and ischemic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2017; 10: e004361.
- 21 Rochitte CE, Nacif MS, de Oliveira Júnior AC, et al. Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. *Artif Organs* 2007; 31: 259-267.

- 22 Leone AM, Galiuto L, Garramone B, et al. Usefulness of granulocyte colony-stimulating factor in patients with a large anterior wall acute myocardial infarction to prevent left ventricular remodeling (the RIGENERA study). *Am J Cardiol* 2007; 100: 397-403.
- 23 Achilli F, Malafroate C, Maggiolini S, et al. G-CSF treatment for STEMI: final 3-year follow-up of the randomised placebo-controlled STEM-AMI trial. *Heart* 2014; 100: 574-581.
- 24 Achilli F, Pontone G, Bassetti B, et al. G-CSF for Extensive STEMI. *Circ Res* 2019; 125: 295-306.
- 25 Larocca TF, Souza BSF, Macedo CT, et al. Assessment of syndecan-4 expression in the hearts of *Trypanosoma cruzi*-infected mice and human subjects with chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Surg Exp Pathol* 2018; 1: 5.
- 26 Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, et al. Invasive and noninvasive correlations of B-type natriuretic peptide in patients with heart failure due to Chagas cardiomyopathy. *Congest Heart Fail* 2008; 14: 121-126.
- 27 Szlachcic J, Massie BM, Kramer BL, Topic N, Tubau J. Correlates and prognostic implication of exercise capacity in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1985; 55: 1037-1042.
- 28 Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 90: 3098-3102.
- 29 Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma EK, Tleyjeh IM, Hornung CA, Dawn B. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2008; 156: 216-226.e9.
- 30 Tigue CC, McKoy JM, Evens AM, Trifilio SM, Tallman MS, Bennett CL. Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety considerations from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 185-192.

Supplementary material

Table S1: NT-proBNP concentration per treatment group (pg/ml)

	Treatment group	N	Mean	P Value (G-CSF vs Placebo)
Baseline	Placebo	19	1574.74 (±1354.19)	0.47
	G-CSF	16	2137.88 (±2798.59)	
12 months	Placebo	14	1854.71 (±2269.68)	0.86
	G-CSF	11	1704.73 (±1855.99)	

Values are mean ± standard deviation. NT-BNP= N-terminal pro hormone of brain natriuretic peptide

Table S2: TNF-α mean concentrations and standard deviation (SD) in pg/ml

	Treatment group		P value G-CSF vs Placebo
	Placebo	G-CSF	
	Mean	Mean	
D1	1.58 (±0.64)	1.51 (±0.63)	0.767
D5	1.63 (±0.73)	2.62 (±1.02)	0.010
D47	1.34 (±0.48)	2.11 (±0.69)	0.002
12 months	1.28 (±0.69)	1.40 (±0.88)	0.692

Values are mean ± standard deviation. D1, D5, D47 and 12 months are the days that blood samples were collected.

5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada com elevada prevalência, morbimortalidade e significativo impacto para saúde pública no Brasil. A CCC resultante da evolução da DC não tratada na fase aguda tem alta mortalidade com mais de 12.000 mortes/ano, principalmente no Brasil (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Não há, até hoje, tratamento específico para CCC, sendo que a terapia aplicada é a mesma que a usada para IC de outras causas. O presente estudo foi o primeiro ensaio clínico randomizado a avaliar a terapia com G-CSF no contexto de cardiomiopatia chagásica crônica. Apesar de o tratamento ter sido bem tolerado, na análise de eficácia da terapia com G-CSF associada à terapia padrão para insuficiência cardíaca em pacientes sintomáticos portadores de cardiomiopatia chagásica não observamos melhora significativa quando comparados os dois grupos experimentais.

O G-CSF vem sendo aplicado amplamente na prática clínica com poucos efeitos colaterais graves (ABDEL-LATIF et al., 2008; MILLER, 1994; POWLES et al., 1990; TIGUE et al., 2007). Nosso estudo foi condizente com as evidências científicas, sendo o tratamento com G-CSF seguro e bem tolerado, não havendo diferenças significativas entre os grupos quanto à incidência de eventos adversos e quanto à mortalidade.

Apesar de não significativa, a mortalidade geral em nosso estudo, de 24.3%, foi maior em relação a um estudo prévio do nosso grupo em CCC. Neste estudo, foi analisado o uso de G-CSF (1 ciclo) associado ao transplante de célula tronco mesenquimal. A taxa de mortalidade geral foi de 7.1% em 2 meses de seguimento, sem relação significativa com o tratamento. Contudo, como o tempo de seguimento foi menor neste estudo, podemos supor que a mortalidade no nosso estudo foi maior devido ao tempo de seguimento mais prolongado de 12 meses. Por outro lado, Shen e colaboradores publicaram estudo com mais de dois mil pacientes, comparando a mortalidade cardiovascular e internação hospitalar entre cardiopatias de diversas etiologias, incluindo Chagas. Nesta avaliação, a CCC apresentou maiores taxas de hospitalização e mortalidade, sendo a mortalidade geral de 29.2%, compatível com a taxa de mortalidade do nosso estudo (RASSI et al., 2018; SHEN et al., 2017; VILAS-BOAS et al., 2006).

Em relação a cardiopatias de outras etiologias e o uso de G-CSF, a mortalidade geral do

nosso estudo foi maior, em correspondência a evidências científicas conhecidas. Estudo recentemente publicado por Leone e colaboradores em cardiomiopatia isquêmica mostrou que a mortalidade geral foi de 15,8% sem diferença estatística entre os grupos G-CSF e terapia padrão. Após 10 anos de seguimento, observou-se uma maior sobrevida no grupo G-CSF sem diferença entre os grupos quanto aos demais eventos adversos. (LEONE et al., 2020). Nesta mesma área, o estudo intitulado STEM-AMI com seguimento de três anos, também não demonstrou diferença entre os grupos G-CSF e a terapia padrão quanto à mortalidade e eventos adversos (ACHILLI et al., 2014).

Portadores de cardiomiopatia chagásica têm maior mortalidade que pacientes com cardiopatias de outras etiologias, sendo um grupo de maior risco. Em 2013, Vilas Boas e colaboradores demonstraram que a cardiomiopatia secundária à doença de Chagas é um fator preditor independente de mortalidade, com risco 3 vezes maior que a cardiomiopatia isquêmica (VILAS BOAS et al., 2013). Em outro estudo mais recente, a mortalidade por causa cardiovascular e por outras causas foi 40% maior em portadores de CCC do que na cardiopatia isquêmica (SHEN et al., 2017).

Adicionalmente, a maior mortalidade no nosso estudo também pode estar relacionada à gravidade do quadro clínico dos pacientes incluídos, cuja média da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi de 33% no grupo placebo e 32% no grupo G-CSF. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo é importante marcador de prognóstico na insuficiência cardíaca com maior mortalidade entre os pacientes com menores níveis desta fração. No estudo SOLVD, a mortalidade em pacientes com FEVE entre 23% a 35% foi de 28%, naqueles com FEVE de 23% a 29%, a mortalidade foi de 39% e naqueles com FEVE de 6 a 22%, a mortalidade alcançou 50%. Outros estudos corroboram esta tendência (CINTRON et al., 1993; COHN et al., 1993; YUSUF, 1991). Em relação à melhora da FEVE ao ecocardiograma e ressonância magnética cardíaca, não houve diferença entre os grupos G-CSF e placebo ao final do estudo.

A gravidade dos sintomas em pacientes com IC está relacionada com a mortalidade. A classificação mais usada na prática clínica e validada para graduação dos sintomas é a New York Heart Association. Estudos demonstram mortalidade de 64% em pacientes em classe funcional IV e de 51%, 35% e 30% em classe funcional III, II e I, respectivamente (COHN et al., 1993; YUSUF, 1991). Na avaliação de eficácia do estudo, não foi possível demonstrar diferença significativa entre os grupos quanto ao desfecho primário. A evolução favorável (melhora ou estabilização da CF) foi de 68% no grupo placebo e 72% no G-CSF. A mediana da classe funcional também não diferiu entre os grupos nas avaliações de 6, 9 e 12 meses.

Este resultado não condiz com dados previamente publicados, no qual foi demonstrada

uma tendência de melhora da classe funcional em pacientes portadores de CCC que fizeram uso de 1 ciclo de G-CSF após a administração de células mononucleares da medula óssea com $p < 0,0001$ (VILAS-BOAS et al., 2006). Além disso, no contexto de cardiomiopatia isquêmica, o uso de G-CSF demonstrou melhora não somente na classe funcional, mas também melhor qualidade de vida (LEONE et al., 2020).

Na nossa avaliação de qualidade de vida, aplicamos a versão em português do questionário Minnesota Living with Heart Failure (MLHF). Nesse questionário, quando menor o score, melhor é a qualidade de vida. Apesar de não termos visto diferença significativa entre os grupos, a diferença do resultado entre os grupos foi maior na avaliação final de 12 meses, com tendência de menor valor no grupo G-CSF em relação ao placebo.

Na CCC, a relação entre fibrose miocárdica com disfunção ventricular esquerda e arritmias cardíacas já está bem estabelecida (ROCHITTE et al., 2005, 2007). Em nosso estudo, a avaliação de fibrose pela RMN evidenciou uma regressão da fibrose miocárdica em 3 de 16 pacientes (18.8%). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos terapia e placebo. Nosso grupo de pesquisas já demonstrou em estudos experimentais em modelos animais de CCC que a terapia com G-CSF reduz o percentual de fibrose miocárdica, assim como a incidência de arritmias cardíacas (MACAMBIRA et al., 2009; SILVA et al., 2018). É possível que o efeito terapêutico em camundongos tenha sido melhor que em humanos devido a diferenças na resposta de roedores, assim como pelo menor tempo de doença crônica.

Estudos prévios demonstraram que o G-CSF pode melhorar a função ventricular esquerda, reduzir remodelamento cardíaco e os níveis de $TNF\alpha$ (ACHILLI et al., 2014; LEONE et al., 2020; Vasconcelos et al., 2013; SILVA et al., 2018). No entanto, na análise exploratória do perfil neuro-humoral (BNP) e de $TNF\alpha$ não houve diferenças entre os grupos. É possível que o tratamento em uma fase mais precoce promova maior modulação da resposta, como foi observado no modelo experimental.

O VO_2 é um índice bastante usado para avaliar a capacidade de exercício, reserva cardiovascular e tolerância ao esforço de forma mais objetiva. Szlachcic e colaboradores demonstraram que a sobrevivência em indivíduos com níveis de VO_2 maiores que 10 ml/kg/min foi de 80%, enquanto naqueles com valores menores de VO_2 a sobrevivência era de 20% (SZLACHCIC et al., 1985). Em CCC, o nível de VO_2 é um importante fator prognóstico. No estudo de Mady e colaboradores, o VO_2 , juntamente com a FEVE, foi um preditor independente de mortalidade em período de seguimento de 30 meses (MADY et al., 1994). No nosso estudo, houve uma tendência de incremento do VO_2 máximo no grupo do G-CSF, porém não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Acreditamos que um dos fatores que pode ter influenciado nestes achados é o momento de administração da terapia com G-CSF. A aplicação do G-CSF foi mais precoce em diversos estudos clínicos que demonstraram benefícios em vários aspectos, tais como classe funcional, função ventricular esquerda e remodelamento cardíaco (Tabela 5). No nosso estudo, a terapia com G-CSF foi realizada em fase tardia da CCC em pacientes com função ventricular esquerda bastante reduzida, sendo possível, portanto, que a aplicação mais precoce possa promover mais benefícios. Adicionalmente, a análise de amostras de tecido miocárdico de corações explantados de pacientes portadores de CCC, cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia dilatada idiopática realizada pelo nosso grupo demonstrou maior infiltrado inflamatório miocárdico nos tecidos de CCC do que nos tecidos das outras etiologias, mesmo com graus de fibrose miocárdica semelhantes (LAROCCA et al., 2018). Portanto, é possível que devido à maior carga inflamatória da CCC em relação às outras cardiomiopatias, a terapia com G-CSF na CCC não induza alterações tão evidentes e rápidas como na cardiopatia de origem isquêmica, por exemplo.

Tabela 5: Estudos randomizados de terapia com G-CSF em cardiopatias

ESTUDO	DESENHO	CONCLUSÃO
1.Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI)	78 pacientes com infarto do miocárdio tratados com angioplastia + G-CSF ou + placebo (aplicação sc por 6 dias consecutivos), incluídos em até 48 h do evento. Desfecho: Espessamento da parede ventricular em 6 meses pela RMC	A aplicação do G-CSF foi segura. Não houve diferença no remodelamento ventricular entre os grupos.
2.Granulocyte colony-stimulating factor attenuates left ventricular remodelling after acute anterior STEMI:resultados do ensaio simples-cego, randomizado, controlado por placebo, multicêntrico Stem Cell Mobilization in Acute Myocardial Infarction (STEM-AMI)	60 pacientes com IAM anterior com supra de segmento ST, indicação de angioplastia e FEVE <45% foram randomizados para G-CSF ou Placebo (aplicação sc por 5 dias consecutivos). Incluídos em até 12 horas do evento. Desfecho primário: Incremento de 5% na FEVE em 6 meses medidos pela RMC.	Administração precoce do G-CSF durante quadro de IAM atenua remodelamento ventricular após angioplastia bem sucedida e com FEVE<45%
.G-CSF treatment for STEMI: Seguimento de 3 anos do STEM-AMI	60 pacientes com IAM anterior, com supra do segmento ST, indicação de angioplastia e FEVE <45% foram randomizados para G-CSF ou Placebo (aplicação sc por 5 dias consecutivos). Desfecho primário: FEVE e tamanho da área do IAM pela RMC em 3 anos. Incluídos em até 12 horas do evento secundários: eventos cardiovasculares maiores	A terapia com G-CSF pode ser benéfica a longo prazo em atenuar o remodelamento do ventrículo esquerdo secundário a IAM. Não houve diferenças nos eventos cardiovasculares clínicos entre os grupos.
4.G-CSF for Extensive STEMI (subestudo do estudo de fase III, STEM-AMI OUTCOME)	161 pacientes com IAM com supra do segmento ST foram randomizados para receber terapia padrão + G-CSF ou terapia padrão isolada. O desfecho primário foi avaliação da FEVE, remodelamento cardíaco e strain miocárdico pela ressonância.	Administração precoce do G-CSF apresenta efeitos benéficos quanto a FEVE, remodelamento cardíaco e Strain em pacientes com IAM com supra do segmento ST.
5.Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation In Evolving Acute Myocardial Infarction by Use of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI)	56 pacientes com IAM receberam G-CSF ou terapia padrão por 6 dias após a angioplastia. Desfecho Primário: Avaliações funcionais e morfológicas pelo eco e metabólicas pelo PET em 35 dias e quatro meses	Melhora do espessamento da parede ventricular e motilidade segmentar na zona infartada. Melhor atividade metabólica na zona infartada aos 4 meses.

6. Usefulness of granulocyte colony-stimulating factor in patients with a large anterior wall acute myocardial infarction to prevent left ventricular remodeling (RIGENERA study)	41 pacientes com IAM de parede anterior foram randomizados para uso de G-CSF por 5 dias ou terapia padrão. Todos os pacientes foram submetidos a angioplastia primária e possuíam a FEVE <50% Desfecho: primário: FEVE e variáveis de remodelamento cardíaco ao ecocardiograma em 5 meses de acompanhamento.	A terapia com G-CSF previne o remodelamento cardíaco e melhora a função ventricular em pacientes com IC secundária a isquemia.
7. A The Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients with a Large Anterior Wall Acute Myocardial Infarction to Prevent Left Ventricular Remodeling Seguimento de 10 anos do estudo RIGENERA)	Foi realizado acompanhamento a longo prazo (10 anos) dos pacientes do estudo RIGENERA, para avaliação da incidência de efeitos adversos, qualidade de vida, sobrevida e função ventricular. Foram realizados exames com ecocardiografia e aplicados os questionários de Minnesota e o SHFM (Seattle Heart Failure Model)	A terapia com G-CSF foi segura e associada com redução do remodelamento reverso do miocárdio e maior qualidade de vida.
8. Randomized trial of combination cytokine and adult autologous bone marrow progenitor cell administration in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy: the REGENERATE-DCM clinical trial	60 pacientes com cardiomiopatia dilatada não isquêmica, FEVE <45% e CF pela NYHA > 2 foram randomizados em 4 grupos comparando-se placebo com G-CSF associada ou não à célula tronco aplicada via intracoronária. Todos os pacientes exceto o grupo placebo receberam 5 dias de G-CSF. O desfecho primário foi a mudança da FEVE no terceiro mês.	Este estudo demonstrou o benefício da terapia com G-CSF associada a aplicação de células tronco via intracoronária com melhora da função ventricular, da classe funcional, nível de BNP e capacidade funcional.
9. Efficacy and safety of G-CSF therapy in Chagas cardiomyopathy: a phase II, double-blind placebo controlled randomized clinical trial	37 pacientes com cardiomiopatia chagásica, com FEVE <50% e CF pela NYHA >2 foram randomizados para receber terapia padrão + G-CSF (4 ciclos de 5 dias, 10 mcg/kg/dia) e terapia padrão+placebo. Os pacientes foram acompanhados por 1 ano, com exames laboratoriais e de imagem, além de avaliação clínica e qualidade de vida pelo questionário de Minnesota. O end point primário era a melhora ou estabilização da classe funcional em 6, 9 e 12 meses após o tratamento.	O tratamento com G-CSF foi seguro e bem tolerado, mas não houve diferença entre os grupos quanto a melhora da classe funcional.

Fontes: 1.(RIPA et al., 2006); 2.(ACHILLI et al., 2010); 3.(ACHILLI et al., 2014); 4.(ACHILLI et al., 2019); 5.(INCE et al., 2005); 6.(LEONE et al., 2007); 7.(LEONE et al., 2020); 8.(HAMSHERE et al., 2015).

As principais limitações encontradas durante a realização do nosso estudo se deveram à dificuldade de inclusão dos pacientes. Apesar de termos avaliado mais de 500 pacientes, a maioria destes reside em cidades do interior da Bahia, fato que os incapacitava a seguir o cronograma do estudo que consistia de 4 ciclos de aplicação do G-CSF ou placebo por 5 dias seguidos com intervalos de 9 dias entre os ciclos. Além das aplicações, os pacientes deveriam comparecer para realizar avaliações clínicas, laboratoriais e por imagem em períodos estabelecidos. Portanto, novos protocolos de estudo visando investigar futuramente outros esquemas terapêuticos ou maior número de pacientes devem levar em consideração aspectos que permitam a maior participação nos estudos.

Outro ponto importante é o tempo seguimento destes pacientes por 12 meses. Apesar de ser adequado para avaliação do desfecho primário de classe funcional, cuja variação é mais rápida, pode não ter sido suficiente para avaliação de outros parâmetros que se alteram de forma mais lenta e progressiva, tais como a função ventricular esquerda e a capacidade funcional ao teste ergométrico.

O tamanho amostral pode ter influenciado nos resultados, sendo necessário em futuros estudos um tamanho amostral maior para que pequenas diferenças entre os grupos possam ser

detectadas.

Portanto, a possível eficácia da terapia com G-CSF na cardiomiopatia chagásica crônica ainda precisa ser esclarecida e estudada, visto que se trata de uma citocina com comprovados efeitos benéficos cardíacos em estudos com modelos experimentais de CCC e em estudos clínicos com cardiopatias de outras etiologias

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a terapia com G-CSF no CCC é segura e bem tolerada, porém sua eficácia na prevenção da progressão/manutenção dos sintomas não pôde ser demonstrada pelo presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATIF, A. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **American Heart Journal**, v. 156, n. 2, 2008.
- ABEL, L. C. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, n. 1, p. 99–107, 2001a.
- ABEL, L. C. J. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, n. 1, p. 99–107, 1 ago. 2001b.
- ACHILLI, F. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor attenuates left ventricular remodelling after acute anterior STEMI: Results of the single-blind, randomized, placebo-controlled multicentre STem cEll Mobilization in Acute Myocardial Infarction (STEM-AMI) Trial. **European Journal of Heart Failure**, v. 12, n. 10, p. 1111–1121, out. 2010.
- ACHILLI, F. *et al.* G-CSF treatment for STEMI: Final 3-year follow-up of the randomised placebo-controlled STEM-AMI trial. **Heart**, v. 100, n. 7, p. 574–581, 1 abr. 2014.
- ACHILLI, F. *et al.* G-CSF for Extensive STEMI. **Circulation Research**, v. 125, n. 3, p. 295–306, 19 jul. 2019.
- ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, Mar 6;115(9):1124-31, 2007
- ACQUATELLA, H. *et al.* Recommendations for Multimodality Cardiac Imaging in Patients with Chagas Disease: A Report from the American Society of Echocardiography in Collaboration With the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Depa. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 31, n. 1, p. 3–25, 1 jan. 2018.
- ALARCÓN DE NOYA, B. *et al.* Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas

Disease at a School in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, 1 maio 2010.

ALBERTO, A. C. *et al.* Association between circadian Holter ECG changes and sudden cardiac death in patients with Chagas heart disease. **Physiological Measurement**, Mar 6;41(2):025006, 2020

ALONSO-VEGA, C. *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, Apr;18(4):419-430 2018.

AMORIM, D. D.; MARIN NETO, J. A. Functional alterations of the autonomic nervous system in Chagas' heart disease. **São Paulo Medical Journal**, 113(2):772-84 1995.

ANDRADE, C. DE M. *et al.* Chagas disease: Morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 706–715, 1 nov. 2015.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. [Pathogenesis of Chagas' chronic myocarditis; importance of ischemic lesions]. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 45, n. 7–8, p. 279–288, 1955.

ANDRADE, Z. A.; LOPES, E. A. A histochemical study of experimental chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 5, p. 236–242, 1963.

ANVISA. **Informe Técnico: Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos**: Ofício circular 33/2008 – GQTSA/GGALI/ANVISA 2008. [s.l: s.n.].

ARAS, R. *et al.* Cerebral infarction in autopsies of chagasic patients with heart failure. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 81, n. 4, p. 414–416, 2003.

AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 2004.

AYUB-FERREIRA, S. *et al.* Diretriz de assistência circulatória mecânica da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 2, 2016.

BAHIA.SECRETARIA DE SAÚDE . Boletim Epidemiológico de Doença de Chagas na Bahia. v. 1, 2019a.

BAHIA.SECRETARIA DE SAÚDE . Boletim epidemiológico da Doença de Chagas na Bahia. **Boletim epidemiológico**, v. 1, 2019b.

- BARBOSA, A. P. *et al.* Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, n. 6, p. 517–525, 2011.
- BARRY, M. A. *et al.* A therapeutic nanoparticle vaccine against *Trypanosoma cruzi* in a BALB/c mouse model of Chagas disease. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 976–987, 2 abr. 2016.
- 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e711, 2010.
- BERN, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655–681, 2011.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 19, p. 1882, 2015.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 5, p. e52-4, 2009.
- BESTETTI, R. B. *et al.* The usefulness of the resting electrocardiogram for characterizing acute Chagas' heart disease in the rat. **International Journal of Cardiology**, v. 18, n. 3, p. 305–315, 1988.
- BESTETTI, R. B. *et al.* Changes in electrocardiographic patterns at different stages of Chagas' heart disease in rats. **Clinical Science (London)**, v. 80, n. 1, p. 33–37, 1991.
- BESTETTI, R. B. *et al.* Prognosis of patients with chronic systolic heart failure: Chagas disease versus systemic arterial hypertension. **International Journal of Cardiology**, Oct 3;168(3):2990-1, 2013
- BESTETTI, R. B.; BRASIL, J. C.; BOMBONATO, R. [Partial left ventriculectomy. Data update, possible indications, and future perspectives]. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 5, p. 295–297, 1997.
- 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. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 71, n. 6, p. 1833–1838, 2001.
- BOOZ, G. W. G-CSF – Based Stem Cell Therapy for the Heart — Unresolved Issues Part A: Paracrine Actions, Mobilization and Delivery. **Congestive Heart Failure**, n. august, p. 221–

227, 2007.

BORDA, E. S.; STERIN-BORDA, L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 54, n. 2, p. 149–156, 1996.

BRAILE, D. M. *et al.* Dynamic cardiomyoplasty: long-term clinical results in patients with dilated cardiomyopathy. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 69, n. 5, p. 1445–1447, 2000.

BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 36, 2019a.

BRASIL.MINISTERIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Panorama da vigilância de doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2018**. [s.l: s.n.].

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. v. 50, 2019a.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE . **Guia de vigilância em saúde 3ª edição**. [s.l: s.n.].

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE . **Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020 - DOU - Imprensa Nacional**. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas, n. 397, p. 1–144, 2018.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 889–896, 2002.

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. **Experimental Parasitology**, v. 103, n. 3–4, p. 136–142, 2003.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. **Parasitology Research**, v. 100, n. 6, p. 1407–1410, 2007.

CALDAS, I. S. *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 413–421, 2008.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 13 out. 2019.

CARCANVALLO, R. U. *et al.* Nova espécie do complexo oliveirai (Nova denominação para o complexo matogrossensis) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 96(1): 71-79, January, 2001.

CARDOSO, R. N. *et al.* Chagas cardiomyopathy is associated with higher incidence of stroke: A meta-analysis of observational studies. **Journal of Cardiac Failure**, v. 20, n. 12, p. 931–938, 1 dez. 2014.

CARLOS PINTO DIAS, J. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde: Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 25, p. 7–86, 2016.

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, 2005.

CHENG, A. S.; YAU, T. M. Paracrine Effects of Cell Transplantation: Strategies to Augment the Efficacy of Cell Therapies. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 20, n. 2, p. 94–101, jun. 2008.

CHIALE, P. A. *et al.* High prevalence of antibodies against beta 1- and beta 2-adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. **Journal of American College of Cardiology**, v. 26, n. 4, p. 864–869, 1995.

CINTRON, G. *et al.* Prognostic significance of serial changes in left ventricular ejection fraction in patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 87, n. 6 SUPPL. 1, 1993.

COHN, J. N. *et al.* Ejection fraction, peak exercise oxygen consumption, cardiothoracic ratio, ventricular arrhythmias, and plasma norepinephrine as determinants of prognosis in heart failure. **Circulation**, v. 87, n. 6 SUPPL. VI, 1993.

COSTA, P. C. S. *et al.* Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 439–446, 2000.

COURA, J. R. *et al.* Morbidade da doença de Chagas. IV. Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 73–80, jan. 1985.

D'AMARIO, D. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of cardiovascular diseases: An update with a critical appraisal. **Pharmacological research**, v.

127, p. 67–76, 1 jan. 2018.

DÁVILA, D. F.; INGLESSIS, G.; MAZZEI DE DÁVILA, C. A. Chagas' heart disease and the autonomic nervous system *International Journal of Cardiology*. **International Journal of Cardiology**, Sep 30;66(2):123-7,1998.

DE ALBUQUERQUE, D. C. *et al.* I registro Brasileiro de insuficiência Cardíaca – Aspectos clínicos, qualidade assistencial e desfechos hospitalares. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 104, n. 6, p. 433–442, 6 jul. 2015.

DE ALMEIDA-FILHO, O. C. *et al.* Minor segmental dyssynergy reflects extensive myocardial damage and global left ventricle dysfunction in chronic Chagas disease. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 15, n. 6, p. 610–616, 1 jun. 2002.

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, 1996.

DE ANDRADE, J. P. *et al.* I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of chagas' heart disease. Executive summary. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 6, p. 434–442, jun. 2011.

DE SOUSA, A. S. *et al.* Prevention strategies of cardioembolic ischemic stroke in Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 5, p. 306–310, 2008.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603–612, 2002.

DOS SANTOS, R. 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, 2012.

Effects of Enalapril on Mortality in Severe Congestive Heart Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 23, p. 1429–1435, 4 jun. 1987.

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 123–132, 2002.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2007.

- 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, 2004.
- FILHO, M. M. *et al.* Clinical and Electrophysiologic Features of Syncope in Chronic Chagasic Heart Disease. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 5, n. 7, p. 563–570, 1994.
- GARCIA, S. *et al.* Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.
- GASCÓN, P. *et al.* MONITOR-GCSF DLBCL subanalysis: Treatment patterns/outcomes with biosimilar filgrastim for chemotherapy-induced/febrile neutropenia prophylaxis. **European Journal of Haematology**, v. 100, n. 3, p. 241–246, 1 mar. 2018.
- GOMES, V. A. M. *et al.* Analysis of Regional Left Ventricular Strain in Patients with Chagas Disease and Normal Left Ventricular Systolic Function. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 29, n. 7, p. 679–688, 1 jul. 2016.
- HAMSHERE, S. *et al.* Randomized trial of combination cytokine and adult autologous bone marrow progenitor cell administration in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy: The REGENERATEDCM clinical trial. **European Heart Journal**, v. 36, n. 44, p. 3061–3069, 2015.
- HARADA, M. *et al.* G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 305–311, 20 mar. 2005.
- HAWWA, N. *et al.* Comparison Between the Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire and New York Heart Association in Assessing Functional Capacity and Clinical Outcomes. **Journal of Cardiac Failure**, v. 23, n. 4, p. 280–285, 1 abr. 2017.
- HIGUCHI, M. DE L. *et al.* Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101–106, 1993.
- HUNT, S. A. *et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guideli. **Circulation.**, v. 112, n. 12, 20 set. 2005.
- INCE, H. *et al.* Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: Final 1-year results of the front-integrated

revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by gran. **Circulation**, v. 112, n. 9 SUPPL., 30 ago. 2005.

INCE, H.; NIENABER, C. A. Future investigations in stem cell activation with granulocyte-colony-stimulating factor after myocardial infarction. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. SUPPL. 1, p. S119–S122, fev. 2007.

JIN, L. *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy via the secretion of prostaglandin E2. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 11, n. 1, 17 mar. 2020.

JONES, E. M. *et al.* Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 3, p. 348–357, 1993.

KARED, H. *et al.* Treatment with granulocyte colony - Stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4 + CD25+ regulatory T-cells. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 78–84, jan. 2005.

KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 63–116, 1968.

KOCHER, A. A. *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nature Medicine**, v. 7, n. 4, p. 430–436, 2001.

KURDI, M.; BOOZ, G. W. Can the protective actions of JAK-STAT in the heart be exploited therapeutically? Parsing the regulation of interleukin-6-type cytokine signaling. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Aug;50(2):126-41, 2007.

LAROCCA, T. F. *et al.* Assessment of syndecan-4 expression in the hearts of *Trypanosoma cruzi*-infected mice and human subjects with chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Surgical and Experimental Pathology**, v. 1, n. 1, 2018.

LEITE, L. R. *et al.* The impact of syncope during clinical presentation of sustained ventricular tachycardia on total and cardiac mortality in patients with chronic chagasic heart disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 77, n. 5, p. 446–452, 2001.

LEON, J. S. *et al.* A cardiac myosin-specific autoimmune response is induced by immunization with *Trypanosoma cruzi* proteins. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3410–3417, jun. 2004.

LEONE, A. M. *et al.* Usefulness of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With a Large Anterior Wall Acute Myocardial Infarction to Prevent Left Ventricular Remodeling

(The Rigenera Study). **American Journal of Cardiology**, v. 100, n. 3, p. 397–403, 1 ago. 2007.

LEONE, A. M. *et al.* The Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients with a Large Anterior Wall Acute Myocardial Infarction to Prevent Left Ventricular Remodeling: A 10-Year Follow-Up of the RIGENERA Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1214, 23 abr. 2020.

LI, Y. *et al.* Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 1, p. 32–44, jan. 2006a.

LI, Y. *et al.* Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 549, n. 1–3, p. 98–106, 7 nov. 2006b.

LISBOA DA SILVA, R. M. F. Chagas disease and focus on syncope in chronic chagasic cardiomyopathy. **E-Journal of Cardiology Practice**, Vol. 10, N° 30 - 18 Jun 2012.

LITTLE, B. & C. Classification of Functional Capacity and Objective Assessment. **American Heart Association**, p. 253–256, 1994.

LO PRESTI, M. S. *et al.* Changes in the cardiac beta-adrenergic system provoked by different T. cruzi strains. **International Journal of Cardiology**, v. 111, n. 1, p. 104–112, 2006.

MACAMBIRA, S. G. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: Preservation and improvement of cardiac structure and function. **FASEB Journal**, v. 23, n. 11, p. 3843–3850, 2009.

MACEDO, C. T. *et al.* Assessment of speckle tracking strain predictive value for myocardial fibrosis in subjects with Chagas disease. **International Journal of Cardiology Heart and Vasculature**, v. 8, p. 75–80, 1 set. 2015.

MACIEL, B. C. *et al.* Ventricular function in Chagas' heart disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 2, p. 814–820, 1995.

MADY, C. *et al.* Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, n. 6, p. 3098–3102, 1994.

MADY, C. *et al.* [Maximal functional capacity and diastolic function in patients with cardiomyopathy due to Chagas' disease without congestive heart failure]. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 4, p. 237–241, 1997.

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,

1987.

MARIN-NETO, J. A. Cardiac dysautonomia and pathogenesis of Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 66, n. 2, p. 129–131, 1998.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Forma indeterminada da moléstia de Chagas. Proposta de novos critérios de caracterização e perspectivas de tratamento precoce da cardiomiopatia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 6, p. 623–627, 2002a.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, p. 1109–1123, 2007a.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V; RASSI JUNIOR, A. Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 536–541, 2013.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, 2014a.

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 Biology International**, v. 27, n. 10, p. 853–861, 2003.

MILLER, L. L. American Society of Clinical Oncology recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: Evidence-based, clinical practice guidelines. **Journal of Clinical Oncology**, Nov;12(11):2471-508,1994.

MIYATA, S. *et al.* Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 2, p. 386–397, 2006.

MOLINA, I. *et al.* Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6125–6131, 1 out. 2015.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 10, p. 966, 2014.

MORILLO, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, out.

2015a.

MORILLO, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 1 out. 2015b.

MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. **Journal of American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

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, 1965.

MÜLLER KRATZ, J. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 3 out. 2018.

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 of Inflammation**, v. 2014, p. 914326, 2014.

NOYA-RABELO, M. M. *et al.* The presence and extension of myocardial fibrosis in the undetermined form of chagas' disease: A study using magnetic resonance. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 2, p. 124–131, 1 fev. 2018.

NUNES, M. C. P. *et al.* Left Atrial Volume Provides Independent Prognostic Value in Patients With Chagas Cardiomyopathy. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 22, n. 1, p. 82–88, jan. 2009.

NUNES, M. C. P. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Embolic Cerebrovascular Events Associated with Chagas Heart Disease. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 151–157, 1 set. 2015.

NUNES, M. C. P. *et al.* Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 12, p. e169–e209, 18 set. 2018a.

NUNES, M. DO C. *et al.* Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management. **Circulation**, v. 138, 2018b.

NUNES, M. DO C. P. *et al.* Predictors of Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy: Relevance of Chagas Disease as an Etiological Factor. **Revista Española de Cardiología**, v. 63, n. 7, p. 788–797, jan. 2010.

OLIVARES, E. L. *et al.* Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed

infarcted rat hearts. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 2 56-2, ago. 2004.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* Apical aneurysm of Chagas's heart disease. **British Heart Journal**, v. 46, n. 4, p. 432–437, 1981.

OLIVEIRA, J. S. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. **American Heart Journal**, v. 110, n. 5, p. 1092–1098, 1985.

ORREGO, F.; QUINTANA, C. Darwin's illness: a final diagnosis. **Notes and Records of the Royal Society of London**, v. 61, n. 1, p. 23–29, 2007.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 1 mar. 2020a.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease**. Washington, DC: Pan American Health Organization, 2019b.

PAZIN-FILHO, A. *et al.* Left Ventricular Global Performance and Diastolic Function in Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 20, n. 12, p. 1338–1343, dez. 2007.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 2 abr. 1999.

PONTES-DE-CARVALHO, L. *et al.* Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. **Journal of Autoimmunity**, v. 18, n. 2, p. 131–138, 2002.

POWLES, R. *et al.* Human recombinant GM-CSF in allogeneic bone-marrow transplantation for leukaemia: double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 336, n. 8728, p. 1417–1420, 8 dez. 1990.

PRADO, C. M. *et al.* The vasculature in chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 76, p. 83–99, 2011.

RASSI, A. *et al.* Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 799–808, 2006.

RASSI, A. *et al.* Clinical phases and forms of Chagas disease. DOI: [10.1016/B978-0-12-384876-5.00027-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00027-7), **American Trypanosomiasis. Chagas disease. One hundred years of research**, 709-741, first edition, Chapter: 27, Elsevier Inc, Burlington (MA), 2010.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v. 23, p. 883–889, 2000.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 152–158, 2009.

RASSI, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden death in chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 76, n. 1, p. 86–96, 2001.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 152–158, 2009.

RASSI, S. *et al.* Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 3, p. 436–539, 2018.

REGUEIRO, A. *et al.* Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. **International journal of cardiology**, v. 165, n. 1, p. 107–12, 30 abr. 2013.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *et al.* A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 2, p. 93–101, 2001.

RIBEIRO, A. L. P. *et al.* Electrocardiographic abnormalities in elderly Chagas disease patients: 10-year follow-up of the Bambui Cohort Study of Aging. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 1, 2014.

RIPA, R. S. *et al.* Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: Result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarct. **Circulation**, v. 113, n. 16, p. 1983–1992, 25 abr. 2006.

RIZZO, L. V.; CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, A. R. L. Autoimmunity in Chagas' disease:

Specific inhibition of reactivity of CD4⁺ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 9, p. 2640–2644, 1989.

ROCHITTE, C. E. *et al.* Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: A marker of disease severity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, n. 8, p. 1553–1558, 18 out. 2005.

ROCHITTE, C. E. *et al.* Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. **Artificial organs**, v. 31, n. 4, p. 259–67, abr. 2007.

ROGERLÂNDIO MARTINS-MELO, F. *et al.* Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. **Bull World Health Organ**, v. 94, p. 103–110, 2016.

ROSSI, M. A. *et al.* Coronary Microvascular Disease in Chronic Chagas Cardiomyopathy Including an Overview on History, Pathology, and Other Proposed Pathogenic Mechanisms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e674, 31 ago. 2010.

RUTELLA, S. *et al.* Granulocyte Colony-Stimulating Factor: A Novel Mediator of T Cell Tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 11, p. 7085–7091, 1 dez. 2005.

SAMUEL, J. *et al.* Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' disease. **American Journal of Cardiology**, Jul;52(1):147-51, 1983.

SANTOS, R. R. DOS *et al.* Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *trypanosoma cruzi*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 29–39, 1 jan. 1992.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SHEN, L. *et al.* Contemporary characteristics and outcomes in chagasic heart failure compared with other nonischemic and ischemic cardiomyopathy. **Circulation: Heart Failure**, v. 10, n. 11, 2017.

SHIMOJI, K. *et al.* G-CSF Promotes the Proliferation of Developing Cardiomyocytes In Vivo and in Derivation from ESCs and iPSCs. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p. 227–237, 5 mar. 2010.

SILVA, D. N. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor-overexpressing mesenchymal stem cells exhibit enhanced immunomodulatory actions through the recruitment of suppressor cells in experimental chagas disease cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–12, 2018.

- SLOAND, E. M. *et al.* Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. **Blood**, v. 95, n. 7, p. 2269–2274, 1 abr. 2000.
- SOARES, M. B. P. *et al.* Transplanted Bone Marrow Cells Repair Heart Tissue and Reduce Myocarditis in Chronic Chagasic Mice. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 2, p. 441–447, 2004.
- SOARES, M. B. P.; DOS SANTOS, R. R. Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 325–332, 2009.
- SOSA ESTANI, S. *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 4, p. 526–529, 1998.
- STORINO, R. *et al.* Cardiopatía chagásica en pacientes de área endémica versus contagiados en forma ocasional. **Revista de Saude Publica**, v. 36, n. 6, p. 755–758, dez. 2002.
- SZLACHCIC, J. *et al.* Correlates and prognostic implication of exercise capacity in chronic congestive heart failure. **The American Journal of Cardiology**, v. 55, n. 8, p. 1037–1042, 1 abr. 1985.
- TANG, J. *et al.* Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 353–361, ago. 2006.
- TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 550–554, 2001.
- THEISS, H. D. *et al.* Antidiabetic gliptins in combination with G-CSF enhances myocardial function and survival after acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 4, p. 3359–3369, 9 out. 2013.
- TIGUE, C. C. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: An overview of safety considerations from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. **Bone Marrow Transplantation**, Aug;40(3):185-92, 2007
- TURA, B. R. *et al.* Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart study. **Trials**, v. 8, p. 1–4, 2007.
- 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 Journal**, v. 27, n. 12, p. 4691–4702, 2013.

VILAS-BOAS, F. *et al.* Resultados iniciais do transplante de células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 2, p. 159–166, 2006.

VILAS BOAS, L. G. C. *et al.* Outcome of Chagas cardiomyopathy in comparison to ischemic cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 167, n. 2, p. 486–490, 31 jul. 2013.

VIOTTI, R. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic chagas disease with benznidazole versus no treatment: A nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724–734, 16 maio 2006.

WRIGHT, J. D. *et al.* Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 16 nov. 2011.

WANG, J. S. *et al.* The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 122, n. 4, p. 699–705, 1 out. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Tropical Diseases**. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 1 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

YAP, J. *et al.* Correlation of the New York Heart Association Classification and the 6-Minute Walk Distance: A Systematic Review. **Clinical Cardiology**, Oct;38(10):621-8, 2015.

YUSUF, S. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. **New England Journal of Medicine**, Aug 1;325(5):293-302,1991

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite Persistence Correlates with Disease Severity and Localization in Chronic Chagas' Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 2, p. 480–486, ago. 1999.

ZHAO, Z. *et al.* Effect of granulocyte colony stimulating EPC on cardiac function and myocardial energy expenditure in patients with heart failure after myocardial infarction. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 9, p. 16578–84,

2015.

ANEXOS

ANEXO 1

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

Cardiology 2017; 136: 33-39

DOI: 10.1159/000447529

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

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

^aDepartment of Cardiology, Hospital São Rafael, ^bEscola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, ^cGonçalo Moniz Research Center, CPqGM-Fiocruz/BA, ^dCenter for Biotechnology and Cell Therapy, and ^eClinical Diagnostics Laboratory, Hospital São Rafael, Salvador, Brazil

Key Words

Chagas disease · Biomarkers · Galectin-3

Abstract

Objectives: Chagas cardiomyopathy has worse long-term outcomes than other cardiomyopathies. A biomarker strategy to refer subjects for noninvasive cardiac imaging may help in the early identification of cardiac damage in subjects with Chagas disease. Galectin-3 (Gal-3) is a mediator of cardiac fibrosis shown to be upregulated in animal models of decompensated heart failure. Here we assessed the correlation of Gal-3 with myocardial fibrosis in patients with Chagas disease. **Methods:** This study comprised 61 subjects with Chagas disease. All subjects underwent clinical assessments, Doppler echocardiography and magnetic resonance imaging. Plasma Gal-3 was determined by ELISA. **Results:** Delayed enhancement (DE) was identified in 37 of 61 subjects (64%). The total amount of myocardial fibrosis was 9.4% [interquartile interval (IQI): 2.4–18.4]. No differences were observed in Gal-3 concentration according to the presence or absence of myocardial fibrosis, with a median Gal-3 concen-

tration of 11.7 ng/ml (IQI: 9.4–15) in subjects with DE versus 12.9 ng/ml (IQI: 9.2–14) in subjects without DE ($p = 0.18$). No correlation was found between myocardial fibrosis and Gal-3 concentration ($r = 0.098$; $p = 0.47$). **Conclusions:** There is no correlation between the degree of myocardial fibrosis and the concentration of Gal-3 in subjects with Chagas disease.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

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

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

KARGER

© 2016 S. Karger AG, Basel

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

Márcia Maria Noya-Rabelo
 Av. São Rafael, 2652
 São Marcos
 Salvador, BA, 41233-190 (Brazil)
 E-Mail marcianoya@gmail.com

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

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

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

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

Methods

Study Population

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

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

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

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

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

Magnetic Resonance Imaging

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

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

Gal-3 and NT-ProBNP

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

Table 1. Subjects' clinical and demographic characteristics

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

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

method with a final fluorescent detection (ELFA). The samples were transferred into the wells containing anti-Gal-3 or anti-NT-proBNP antibodies conjugated with alkaline phosphatase. The intensity of the fluorescence is proportional to the concentration of antigens present in the sample. The measurement range was 3.3–100 ng/l for Gal-3 and 20–25,000 pg/ml for NT-proBNP.

Sample Size Calculation

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

Statistical Analysis

Categorical variables are presented as numbers and percentages and continuous variables are presented as means (SD) or me-

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

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

Results

Baseline Characteristics

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

Table 2. Myocardial fibrosis on cardiac MRI

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

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

Table 3. Myocardial fibrosis and subjects' clinical characteristics

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

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

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

Myocardial Fibrosis

DE was identified in 37 of 61 subjects (64%). The total amount of myocardial fibrosis was 9.4% (IQR: 2.4–18.4) with a progressive increase across the different forms of the disease. Myocardial fibrosis was detected in 6 of 17 subjects in the indeterminate form (median 4.1%, IQR: 2.1–10.7), 7 of 16 in the cardiac form without ventricular

dysfunction (median 2.3%, IQR: 1.0–5.0) and 22 of 28 subjects in the cardiac form with ventricular dysfunction (median 15.2%, IQR: 7.8–25.0, $p = 0.001$). DE was detected more frequently in the inferolateral and apical segments of the left ventricle. Moreover, subjects with DE showed a lower ejection fraction (68 ± 13 vs. $48 \pm 18\%$; $p < 0.001$), higher NT-proBNP values [197 pg/ml (IQR: 91–2,682) vs. 73 pg/ml (IQR: 34–190); $p = 0.01$; tables 2, 3] and ventricular tachycardia detected on Holter monitoring (43 vs. 15%; $p = 0.03$).

Assessment of Gal-3

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

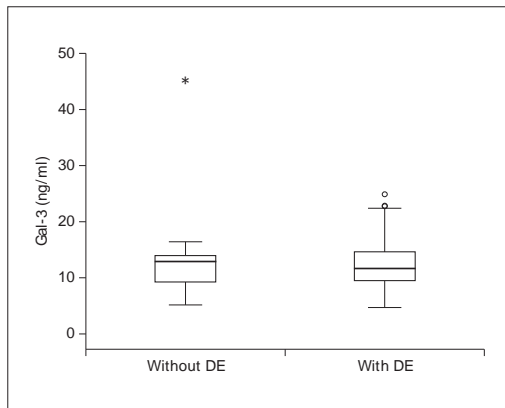


Fig. 1. Plasmatic concentration of Gal-3 assessed by ELISA in subjects with and without DE detected by MRI (Mann-Whitney U test, $p = 0.67$).

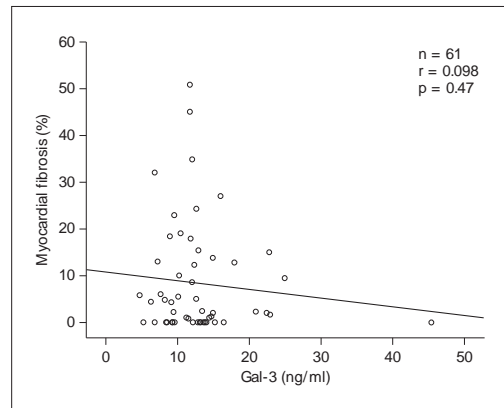


Fig. 2. Correlation between plasmatic concentration of Gal-3 and percentage of myocardial fibrosis assessed by cardiovascular MRI (Spearman's correlation, $r = 0.098$, $p = 0.47$).

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

Discussion

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

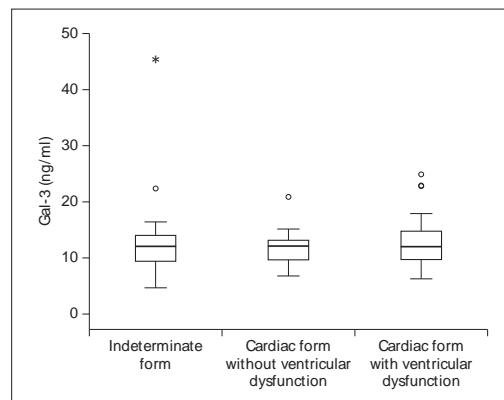


Fig. 3. Plasmatic concentration of Gal-3 assessed by ELISA in subjects with different forms of Chagas disease (Kruskal-Wallis, one-way ANOVA, $p = 0.90$).

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

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

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

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

Gal-3 to be ineffective in the prediction of mortality when variables such as estimated glomerular filtration rate, LV ejection fraction and NT-proBNP were considered in the analysis.

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

Conclusion

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

Acknowledgements

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

Conflict of Interest

There were no conflicts of interest.

References

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

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

ANEXO 2

Lack of association between serum syndecan-4, myocardial fibrosis and ventricular dysfunction in subjects with chronic Chagas disease.

Plos One 2017 12(12): e01489408

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408>

Conclusions

Our results demonstrate the lack of correlations between serum syndecan-4, myocardial fibrosis and cardiac dysfunction in subjects with Chagas disease. Further studies are required to show if syndecan-4 concentrations can be marker for prognosis assessment or disease progression.

Introduction

Chagas disease (CD), caused by infection with 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]. Subjects with Chagas disease can be classified in two large groups: those with the indeterminate form, without clinical symptoms or abnormalities in routine tests, and those with the determinate form, with symptoms, abnormal tests, or both [4]. Most of the cases in the chronic phase present as the indeterminate form, but after years or decades they may evolve to the determinate form, presenting either cardiac, digestive, or cardio-digestive symptoms [5]. Chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC), the most severe form of clinical presentation in CD, has worse long-term prognosis when compared to cardiomyopathies due to other etiologies [6].

The hallmark of CCC is the presence of a multifocal inflammatory reaction leading to myocardial fibrosis, often followed by ventricular dysfunction and arrhythmias [5,7,8]. At this disease stage, there is no effective treatment other than heart transplantation. Since the cardiac form of Chagas disease occurs in approximately 30% of the infected patients, and usually develops during 10–30 years after the acute phase, it is of great interest to identify biomarkers that might be used for early detection of cardiac involvement [6].

Previously, we performed a transcriptomic analysis and demonstrated that several genes associated with inflammation and fibrosis, including syndecan-4, are overexpressed in the hearts of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* [9]. 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. Although syndecan-4 is expressed by several cell types [10], it is mainly expressed in endothelial cells, smooth muscle cells and cardiomyocytes [11]. It is already known that the expression of the syndecans can be altered under certain pathophysiological conditions, including mechanical stress [12] and tumor metastasis [13], in response to growth factors present in the tissue micro-environment, such as FGF2, TNF- α and TGF- β [14–16].

Recently, evidence pointing to the involvement of syndecan-4 in the pathogenesis of cardiovascular diseases has emerged. Circulating syndecan-4 concentrations are increased after acute myocardial infarction [17] and also in heart failure, inversely correlated with left ventricular ejection fraction [18], suggesting a possible role as a predictive biomarker of cardiovascular events [19]. However, serum syndecan-4 concentrations have neither been evaluated in CD subjects nor correlated with significant predictors of outcomes in this group of patients. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential role of serum syndecan-4 as a novel biomarker for disease severity in CD, by concentrations with myocardial fibrosis and left ventricular ejection fraction (LVEF). Additionally, syndecan-4 serum concentrations were compared between subjects presenting different clinical forms of CD.

Materials and methods

Study population

We conducted an observational study in which subjects with CD were enrolled. Between January 2011 and December 2013, we enrolled 56 subjects in the CD outpatient clinics at our institution. All subjects with Chagas disease were classified in groups according to the clinical form of presentation, as follows: indeterminate form (subjects with no evidence of cardiac involvement or heart failure), cardiac form without ventricular dysfunction and cardiac form with ventricular dysfunction.

Inclusion criteria for CD subjects were based on confirmation by two positive serologic tests (indirect hemagglutination and indirect immunofluorescence), 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 magnetic resonance imaging contraindications.

We obtained structured medical history, and all CD subjects underwent physical examination, blood analysis, 12-lead electrocardiogram, chest X-Ray, 24-h Holter monitoring, conventional Doppler echocardiogram, and cardiovascular magnetic resonance imaging. All patients with heart failure and/or arrhythmias received the standard therapy with diuretics, beta-blockers, ACE inhibitors, angiotensin II receptor blockers, digoxin, or amiodarone, as appropriate.

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

Measurement of syndecan-4 and NT-ProBNP

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 sensitivity of the test was 3.94 pg/mL. Plates were read at 450 nm using a multiplate reader (EnVision, PerkinElmer).

Plasma NT-ProBNP measurements were performed with an automated quantitative enzyme linked fluorescent assay (VIDAS[®] NT-proBNP2; bioMérieux, France), according to the manufacturer's instructions.

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. Left ventricle and left atrial dimensions were measured according to the American Society of Echocardiography's recommendations [20]. 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 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

Cardiovascular magnetic resonance imaging (MRI) 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 [7].

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 included 56 subjects with Chagas disease, 41% were men, and the mean age was 58 \pm 9 years. 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](#).

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.

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](#). Echocardiographic data for all subjects with heart failure are shown in [Table 3](#).

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

Form	Indeterminate	Cardiac without dysfunction	Cardiac with dysfunction	p
n	14	16	26	
Male gender	5 (36)	4 (25)	14 (54)	0.181
Age (years)	60 ± 10	56 ± 8	59 ± 9	0.670
Black or mulatto self-reported race	13 (93)	14 (88)	23 (88)	1.00
NYHA III or IV	0	0	14 (54)	<0.001
Hypertension	11 (79)	12 (75)	16 (62)	0.332
Diabetes	3 (21)	0	5 (19)	0.253
Current smoking	2 (14)	3 (19)	9 (35)	0.371
Hypercholesterolemia	6 (43)	8 (50)	11 (42)	0.645
RBBB	0	15 (94)	14 (54)	<0.001
Cardiomegaly (x-Ray)	2* (14)	6 (38)	19 (73)	0.001
VT	0	3 (19)	14 (54)	0.002
NT-ProBNP (pg/ml)	60.5 (32.8–109.8)	92.5 (66.3–180.5)	839.5 (239.8–2271)	<0.001
hsPCR	1.1 (0.2–3.8)	1.2 (0.5–4.7)	1.1 (0.7–3.3)	0.75
Hemoglobin (g/dl)	14.1 ± 1.1	13.7 ± 0.9	14.2 ± 0.9	0.167
Creatinin (mg/dl)	0.83 ± 0.16	0.81 ± 0.12	0.93 ± 0.18	0.030

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile interval) for continuous variables, or number (%) for discrete variables. hsCRP = highly sensitive C Reactive Protein. NYHA = New York Heart Association; RBBB = right bundle-branch block; VT = ventricular tachycardia.

*Cardiomegaly not confirmed by echocardiography.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408.t001>

Assessment of syndecan-4

The mean concentration of syndecan-4 in subjects with Chagas disease was 15.4 ± 7.7 ng/ml. No correlation was observed between syndecan-4 concentrations and 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 ($P = 0.386$; Fig 1).

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

No differences in syndecan-4 concentrations were detected comparing groups of subjects 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 ($P = 0.918$; Fig 4).

Discussion

According to Morrow and de Lemos, 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 [21]. In the current study, we provided the first evaluation of syndecan-4 as a biomarker for heart disease severity in a population with Chagas disease.

Previously, we showed that syndecan-4 is overexpressed in hearts of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* in experimental model of Chagas disease cardiomyopathy

Table 2. Echocardiographic and CMR findings in subjects with Chagas disease.

Form	Indeterminate	Cardiac without dysfunction	Cardiac with dysfunction	p
Echocardiogram*				
LVEF (%)	64.5 ± 3.5	64.7 ± 3.9	39 ± 12.3	<0.001
LV ESV (ml)	33 ± 7.1	36 ± 12.3	136 ± 67	<0.001
LV EDV (ml)	129.8 ± 22.6	115.8 ± 22	240.3 ± 83.5	<0.001
LV mass (g)	136.8 ± 28.5	134.6 ± 34.8	215.3 ± 58.7	<0.001
Diastolic dysfunction				
Type I	6 (43)	6 (38)	14 (58)	0.038
Type II	0	1 (7)	6 (25)	0.007
Type III	0	0	0	
Tei index	0.53 ± 0.08	0.50 ± 0.1	0.61 ± 0.19	0.341
E/E' ratio	8.5 ± 1.8	8.1 ± 3.0	12.9 ± 8.0	0.018
Tricuspid annular systolic velocity (cm/s)	13 ± 2.3	12 ± 1.7	12.1 ± 1.8	0.032
MRI**				
LVEF (%)	70.9 ± 8.4	67.0 ± 6.6	35.3 ± 15.3	<0.001
RVEF (%)	65.2 ± 9.5	58.8 ± 9.6	46.8 ± 14.9	<0.001
LV ESV (ml/m ²)	35.2 ± 13.3	40.5 ± 15.3	148.9 ± 86.2	<0.001
LV EDV (ml/m ²)	118.8 ± 22.6	119.9 ± 29.8	222.9 ± 79.2	<0.001
LV mass (g/m ²)	111.6 ± 30.2	93.6 ± 29.8	150 ± 60.4	0.004
Fibrosis (%)‡	4.1 (2.1–10.8)	2.3 (1.0–5.0)	15.0 (7.3–25.6)	0.001
Delayed enhancement	6 (42)	7 (43)	22 (85)	0.006

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile interval) or number (%) for discrete variables. EDV = end diastolic volume; ESV = end systolic volume; LV = left ventricular; LVEF = left ventricular ejection fraction; MRI = magnetic resonance imaging; RVEF = right ventricular ejection fraction.

* Data from 55 subjects.

** Data from 53 subjects.

‡ Data from subjects with delayed enhancement on MRI (n = 35).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408.t002>

[9]. In the present study, however, no increase in serum concentration of syndecan-4 was observed in subjects with chronic Chagas disease cardiomyopathy, regardless of disease severity. This could imply that syndecan-4 is not involved in the pathogenesis of the disease in humans. Therefore, additional studies in human heart samples may help clarify whether syndecan-4 expression is increased in the heart tissue in individuals with chronic Chagas cardiomyopathy, as seen in the experimental model of Chagas disease.

Table 3. Echocardiographic data in subjects with heart failure.

n	26
LVEF (%)	39 ± 12.3
LV mass (g)	215.3 ± 58.7
Left atrium (mm)	40 ± 5.9
Diastolic dysfunction	
Type I	14 (58)
Type II	6 (25)
Type III	0

Data are expressed as mean ± SD or number (%) for discrete variables. LV = left ventricular; LVEF = left ventricular ejection fraction.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408.t003>

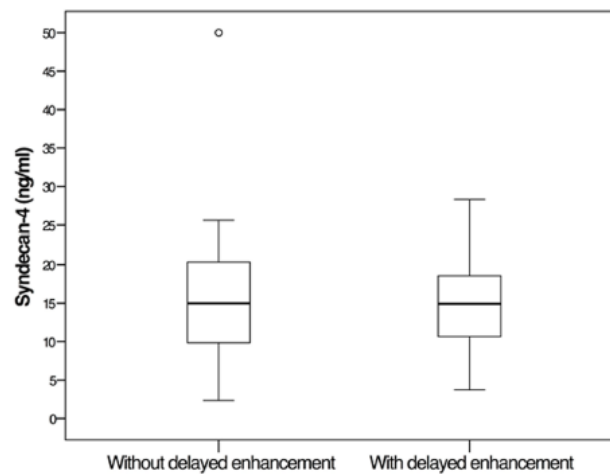


Fig 1. Serum concentration of syndecan-4 assessed by ELISA in subjects with and without delayed enhancement detected by magnetic resonance imaging. Circle = outlier, * = extreme outlier, *t* test, $P = 0.386$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408.g001>

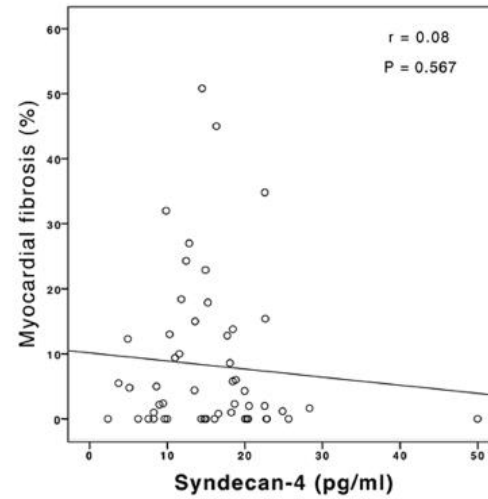
It was previously reported that, in subjects with dilated cardiomyopathy due to other etiologies, serum levels of syndecan-4 correlated negatively with LVEF and diastolic diameters [22]. However, we did not find any correlation between syndecan-4 and left ventricular systolic or diastolic diameters in our study. 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 [19], suggesting that, like NT-ProBNP, it might be a useful biomarker for heart failure [23].

Despite the lack of correlation between syndecan-4 and cardiac disease severity, our analysis in the clinical setting of Chagas disease showed a moderate to strong correlation between LVEF and concentration of NT-ProBNP. It is noteworthy that, in the present study, we used the same assay employed in a previous study for measuring syndecan-4 [19], that reported association between syndecan-4 levels and cardiac disease severity.

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 [24]. 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 [7].

Since it was already demonstrated the relationship between syndecan-4 and granulation tissue formation and wound repair in experimental model of myocardial infarction [25], 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. The concentration of syndecan-4, however, was not different among subjects with different forms of Chagas disease.

A



B

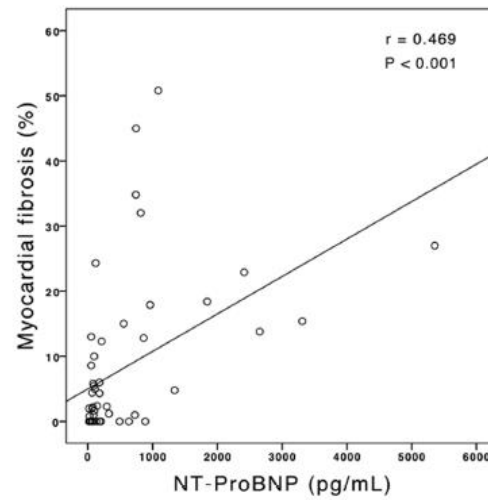


Fig 2. Correlation between percentage of myocardial fibrosis assessed by cardiovascular MRI and concentration of syndecan-4 and NT-ProBNP. A: Pearson's correlation, $r = 0.08$, $P = 0.567$. B: Pearson's correlation, $r = 0.469$, $P < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408.g002>

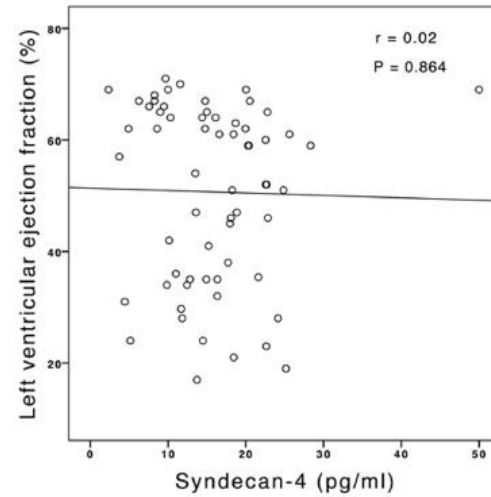
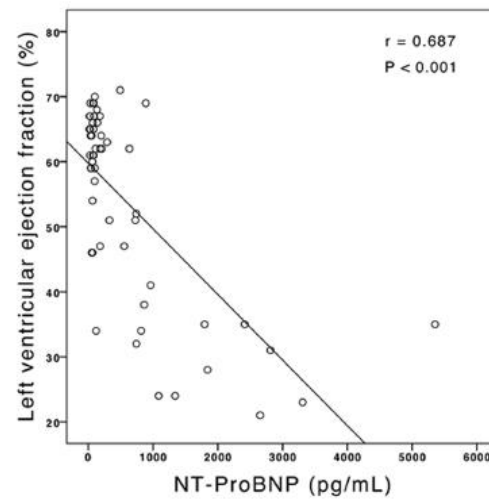
A**B**

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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408.g003>

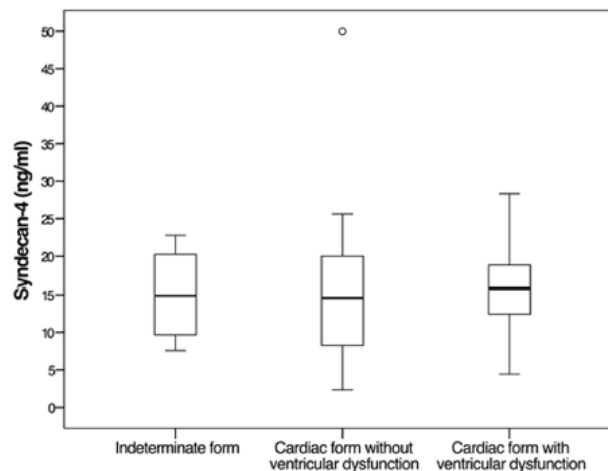


Fig 4. Serum concentration of syndecan-4 assessed by ELISA in subjects with different forms of Chagas disease. ANOVA, $P = 0.918$. Circle = outlier, * = extreme outlier, $P = 0.395$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189408.g004>

Additionally, no correlation was found between the percentage of myocardial fibrosis and syndecan-4 concentration.

Ethnicity is a known factor that influences the predictive values of biomarkers in the cardiovascular field [26]. Indeed, the studies evaluating syndecan-4 as a heart failure biomarker published so far include mostly Asians or Caucasian populations, and data from mixed, and afro-descendent populations, such as the one included in our study, cannot be found in the literature. Similarly, galectin-3, another biomarker that has been studied in the field of heart failure, was shown to have a prognostic value for heart in Caucasians, but not in an afro-descendent population [27]. Plasma levels of galectin-3 also did not correlate with disease severity in Chagas disease patients [28].

In conclusion, our study showed a lack of correlation between either the degree of myocardial fibrosis or the LVEF and the serum concentration of syndecan-4 in subjects with Chagas disease. The current study has limitations, including being conducted in a single tertiary and academic hospital, with a small sample size, and being a cross-sectional study with a single measurement of syndecan-4. Studies with larger number of patients are required to determine the influence of ethnicity on the predictive role of syndecan-4 as a biomarker for heart failure of different etiologies. All supporting information for this study can be found in [S1 Table](#).

Supporting information

S1 Table. Dataset for the syndecan-4 study.
(XLS)

Acknowledgments

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

Author Contributions

Conceptualization: Ticiana Ferreira Larocca, Márcia Noya-Rabelo, Bruno Solano de Freitas Souza, Milena Botelho Pereira Soares.

Data curation: Ticiana Ferreira Larocca, Carolina Thé Macêdo, Juliana Fraga Vasconcelos.

Formal analysis: Ticiana Ferreira Larocca, Carolina Thé Macêdo.

Funding acquisition: Ricardo Ribeiro dos Santos, Milena Botelho Pereira Soares.

Investigation: Ticiana Ferreira Larocca, Carolina Thé Macêdo, Moisés Imbassahy Moreira, Alessandra Carvalho Caldas, Jorge Andion Torreão, Alexandre Schaer Carvalho da Silva.

Methodology: Carolina Thé Macêdo, Márcia Noya-Rabelo, Luís Cláudio Lemos Correia, Moisés Imbassahy Moreira, Alessandra Carvalho Caldas, Jorge Andion Torreão, Bruno Solano de Freitas Souza, Juliana Fraga Vasconcelos, Alexandre Schaer Carvalho da Silva.

Resources: Milena Botelho Pereira Soares.

Supervision: Ricardo Ribeiro dos Santos, Milena Botelho Pereira Soares.

Writing – original draft: Ticiana Ferreira Larocca, Carolina Thé Macêdo, Milena Botelho Pereira Soares.

Writing – review & editing: Márcia Noya-Rabelo, Luís Cláudio Lemos Correia, Bruno Solano de Freitas Souza, Ricardo Ribeiro dos Santos, Milena Botelho Pereira Soares.

References

1. WHO. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2011.08.007> PMID: 22123367
3. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015; 373(19):1882.
4. Chagas C. Processos patojenicos da tripanozomiasis americana. : Mem Inst Oswaldo Cruz; 1916. p. 5–36.
5. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007; 115(9):1109–23. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.824296> PMID: 17339569
6. Silva CP, Del Carlo CH, Oliveira MT Junior, 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. PMID: 19142362
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. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.067> PMID: 16226184
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. PMID: 22460166
9. Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR, et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. *Cell Cycle*. 2011; 10(9):1448–55. <https://doi.org/10.4161/cc.10.9.15487> PMID: 21467843
10. Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(12):926–37. <https://doi.org/10.1038/nrm1257> PMID: 14685171
11. 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. PMID: 8203472

12. 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. PMID: [11788462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11788462/)
13. Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; 12(2):89–98. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0241> PMID: [11292374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11292374/)
14. Cizmeci-Smith G, Langan E, Youkey J, Showalter LJ, Carey DJ. 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.* 1997; 17(1):172–80. PMID: [9012653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9012653/)
15. Zhang Y, Pasparakis M, Kollias G, Simons M. Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF-alpha. *J Biol Chem.* 1999; 274(21):14786–90. PMID: [10329676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10329676/)
16. 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.* 2003; 23(3B):2435–44. PMID: [12894525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12894525/)
17. 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. PMID: [11372670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11372670/)
18. Ma X, Ouyang P, Zhang Z, Lai W, Xu D. [Changes and clinical significance of serum level of syndecan-4 protein in patients with chronic congestive heart failure]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2013; 29(8):866–9. PMID: [23948417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23948417/)
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. <https://doi.org/10.1016/j.jicc.2011.01.012> PMID: [21397460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21397460/)
20. 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. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2005.10.005> PMID: [16376782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16376782/)
21. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation.* 2007; 115(8):949–52. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.683110> PMID: [17325253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17325253/)
22. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.157> PMID: [23416015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23416015/)
23. Wettersten N, Maisel AS. Biomarkers for Heart Failure: An Update for Practitioners of Internal Medicine. *Am J Med.* 2016; 129(6):560–7. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.01.013> PMID: [26844635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26844635/)
24. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.07.089> PMID: [21907431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21907431/)
25. 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. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.235689> PMID: [21493899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21493899/)
26. Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, Kumar A, Ference B, Afonso L. Association of novel biomarkers with future cardiovascular events is influenced by ethnicity: results from a multi-ethnic cohort. *Int J Cardiol.* 2013; 166(2):487–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.11.034> PMID: [22240756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22240756/)
27. 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).
28. 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. <https://doi.org/10.1159/000447529> PMID: [27548475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27548475/)

ANEXO 3

Assessment of syndecan-4 expression in the hearts of *Trypanosoma cruzi*-infected mice and human subjects with chronic Chagas disease cardiomyopathy

Surgical and experimental Pathology 2018 1:5

DOI: <https://doi.org/10.1186/s42047-018-0012-9>

Larocca et al. *Surgical and Experimental Pathology*
<https://doi.org/10.1186/s42047-018-0012-9>

(2018) 1:5

Surgical and Experimental
 Pathology

RESEARCH

Open Access



Assessment of syndecan-4 expression in the hearts of *Trypanosoma cruzi*-infected mice and human subjects with chronic Chagas disease cardiomyopathy

Ticiane 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}, Daniela Nascimento Silva^{1,2}, Diogo Crispim Nascimento Portella^{1,2}, Washington Luis Conrado dos Santos^{2,3}, Fabio Rocha Fernandes Tavora⁴, João David de Souza Neto⁴, Ricardo Ribeiro dos Santos¹ and Milena Botelho Pereira Soares^{1,2*}

Abstract

Background: Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is characterized by the presence of a multifocal inflammatory response and myocardial damage, leading to fibrosis, arrhythmias and ventricular dysfunction. The expression of syndecan-4, a transmembrane proteoglycan, was previously found to be increased in the hearts of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. The possible involvement of syndecan-4 in the disease pathogenesis, however, remains unknown. Here we evaluated the pattern of expression of syndecan-4 in the heart tissue of *T. cruzi* infected mice and subjects with Chagas cardiomyopathy, correlating with the degree of inflammation and fibrosis.

Methods: The expression of syndecan-4 was evaluated by immunofluorescence and RT-qPCR in the hearts of C57Bl/6 mice at different time points after infection with the Colombian strain of *T. cruzi*. Immunostainings for syndecan-4 were performed in heart samples obtained from CCC patients and other etiologies of heart failure. The number of infiltrating inflammatory cells and area of fibrosis were also evaluated and quantified.

(Continued on next page)

* Correspondence: milena@bahia.fiocruz.br

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

²Gongolo Moniz Research Center, HOCRUZ, Rua Waldemar Falção, 121, Candeal, Salvador, BA, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Results: In the experimental model, the number of infiltrating inflammatory cells and fibrosis area in the hearts progressively increased after the acute phase of infection, while syndecan-4 expression remained elevated in similar levels in both the acute and chronic phases. Confocal microscopy analysis demonstrated the localization of syndecan-4 expression in blood vessels, co-localized with α -SMA, a marker for vascular smooth muscle cells (VSMCs). Confocal microscopy analysis of human hearts samples showed a similar pattern of syndecan-4 expression in blood vessels. 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 evaluated in subjects with CCC, idiopathic dilated cardiomyopathy and ischemic cardiomyopathy. No differences in the number of syndecan-4 positive vessels/mm² were found comparing the three groups ($P = 0.466$), whereas CCC patients presented a higher number of infiltrating inflammatory cells, compared to the other etiologies of heart failure. Additionally, no correlation between syndecan-4 and fibrosis or numbers of inflammatory cells was found.

Conclusions: Syndecan-4 is expressed in the heart during the acute and chronic phases of Chagas disease, in association with VSMCs, independently of the degree of myocardial fibrosis or the number of infiltrating inflammatory cells.

Keywords: Syndecan-4, Chagas disease, Cardiomyopathy

Background

Chagas disease (CD), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, represents the third largest tropical disease burden, after malaria and schistosomiasis (Organization WH 2010). Despite the significant reduction in the number of infected people that has occurred worldwide, CD still represents a major public health problem in endemic countries, mainly Latin America, and is becoming an emerging problem in non-endemic countries, such as USA, Spain, Japan, and Australia, due to population migration (Bern 2015; Schmunis 2007). 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 (Rassi and Rassi 2007; WHO 2015). The hallmark of CCC is the presence of a multifocal inflammatory reaction, which leads to myocardial fibrosis, often followed by ventricular dysfunction and arrhythmias (Marin-Neto et al. 2007; Rochitte et al. 2005; Mello et al. 2012). In this stage of the disease, the conventional therapy for CD has not shown significant benefits (Morillo et al. 2015), and there is no effective treatment other than orthotopic heart transplantation.

Although the pathogenesis of CD has not been fully understood, it is well known that the persistent cardiac damage that occurs during the chronic phase is, at least partially, a result of immune responses directed to the parasites, as well as to autoreactive cells, which recognize heart antigens (Soares et al. 2001; Bonney and Engman 2015). Previous studies indicate a role for Th1 lymphocytes, with a high production of IFN- γ , which has been associated with progression to severe forms of the disease in subjects with CCC (Soares et al. 2001; Gomes et al. 2003). IFN- γ and TNF- α are overexpressed in the hearts of mice chronically infected with *T. cruzi* (Soares et al. 2010) and

can activate macrophages, an important cell population in 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 (Soares et al. 2011). 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 granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), two protocols that significantly reduced cardiac inflammation and fibrosis in the mouse model of *T. cruzi* infection (Soares et al. 2011; Vasconcelos et al. 2013), 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 cardiac myocytes, playing a role in processes such as fibroblast growth factor signaling, regulation of cell migration and control of cell adhesion (Tkachenko et al. 2005; Nikkari et al. 1994; Li et al. 1997). In clinical settings, syndecan-4 concentration has been shown to be increased in subjects with heart failure, inversely correlated with left ventricular ejection fraction (Ma et al. 2013), and also after acute myocardial infarction (Kojima et al. 2001). Takahashi and colleagues demonstrated that syndecan-4 might be useful as a possible biomarker to predict cardiovascular events, such as death and hospitalization caused by worsening of heart failure (Takahashi et al. 2011).

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.

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 ± 2 °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. 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 (Federici et al. 1964). 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.

Real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from heart samples with TRIzol reagent (Invitrogen, Molecular Probes, Oregon, USA) and concentration was determined by photometric measurement. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to synthesize cDNA of 1 µg RNA following manufacturer's recommendations. RT-qPCR assay was performed to detect the expression levels of *SDC4*. The RT-qPCR amplification mixtures contained template cDNA, Taqman Master Mix and probe (all from Applied Biosystems). The samples were normalized with *HPRT1* (endogenous control). All reactions were run in triplicate on an ABI7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) under standard thermal cycling conditions. The threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method of comparative PCR was used to analyze the results.

Human samples

The study complied with the Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethics Committee of the São Rafael Hospital 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 (400× 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

Histological sections of paraffin embedded tissues were dewaxed 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 400× magnification, using the Image Pro Plus v.7.0 software (Media Cybernetics).

Statistical analysis

Categorical data were presented as percentages. Continuous variables were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk 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

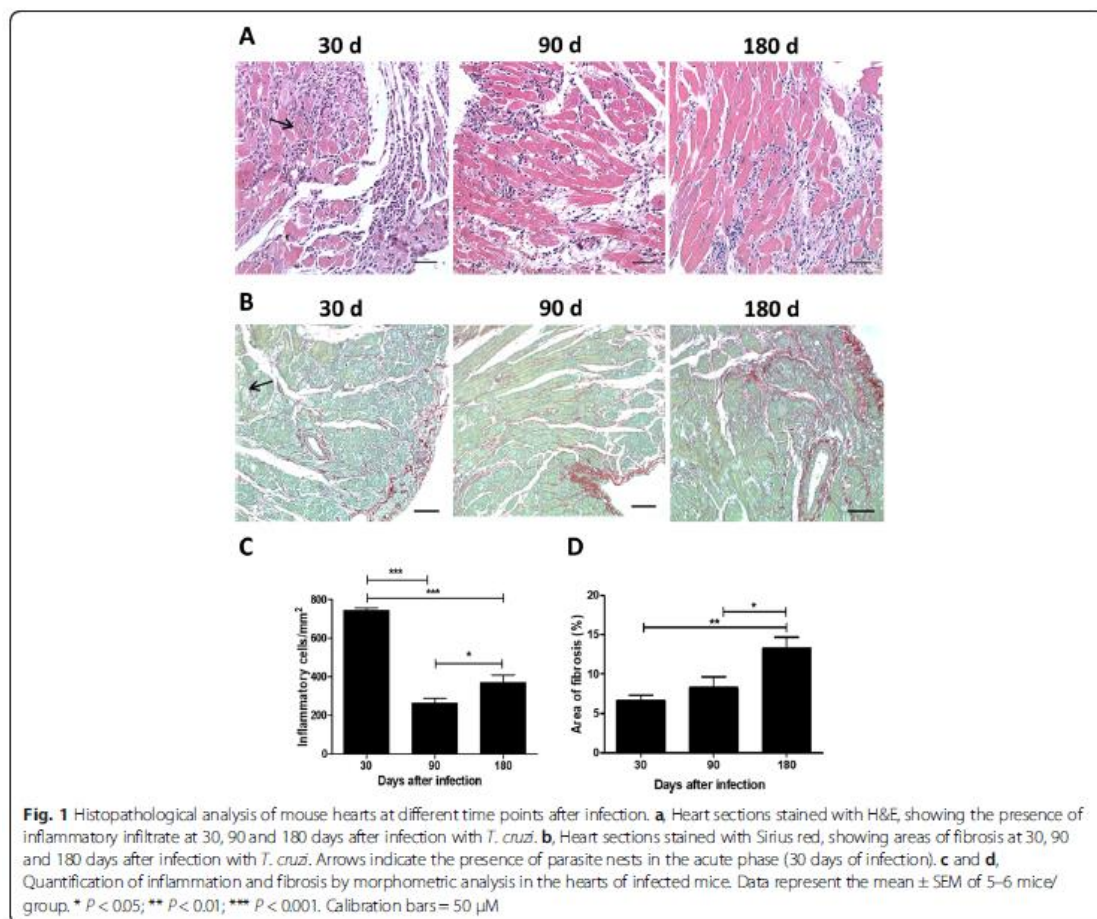
Analysis of inflammation, fibrosis and syndecan-4 expression in the hearts of mice during the course of infection with *T. cruzi*

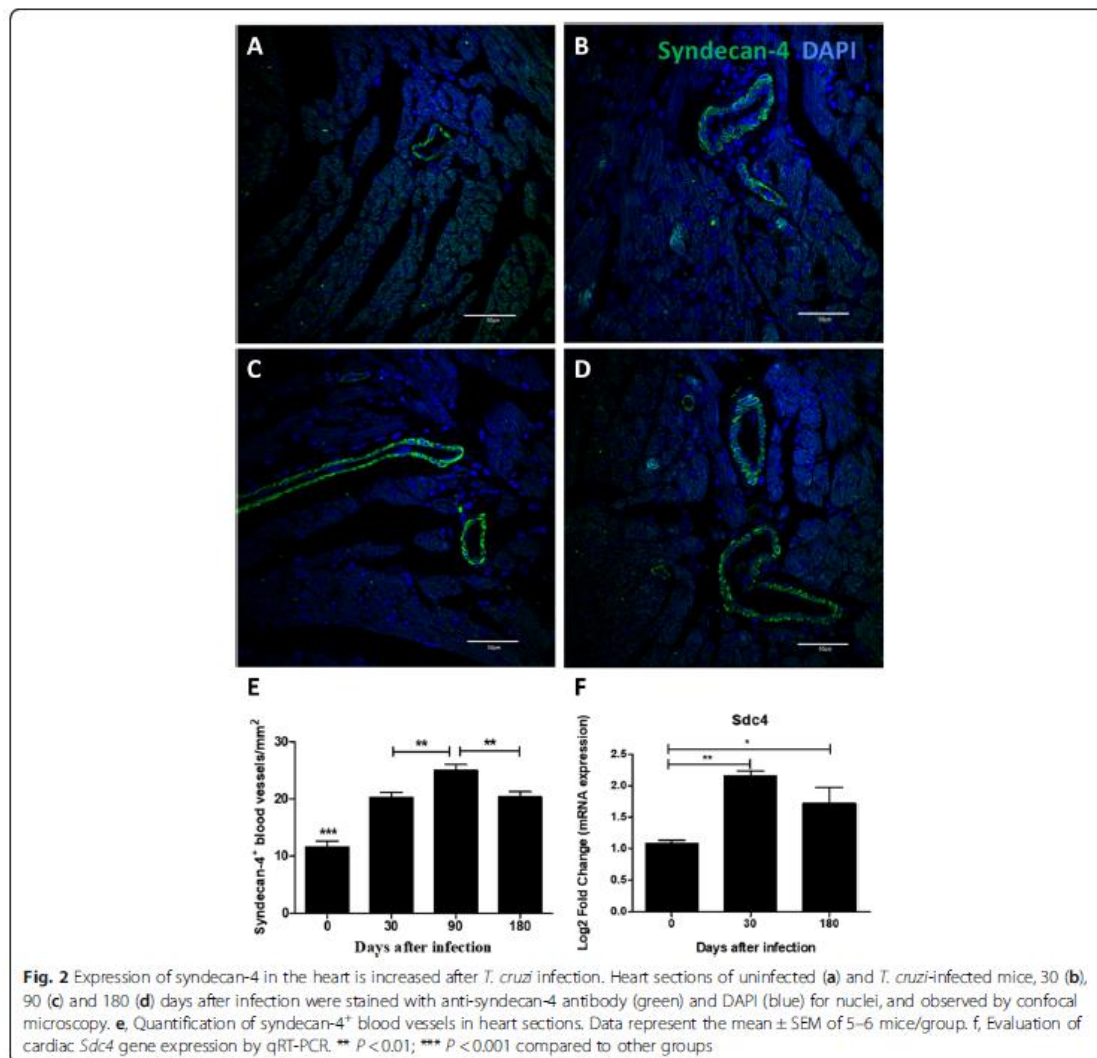
Groups of mice infected with *T. cruzi* were euthanized at different time points after infection for histological and immunofluorescence analyses. H&E-stained heart sections obtained from mice during the acute phase (30 days) of infection showed the presence of intense and diffuse inflammatory infiltrates mainly composed by mononuclear cells. Parasite nests and perivascular inflammation were also frequently present (Fig. 1a and Additional file 1: Figure S1A). A marked decrease on inflammation was seen 90 days after infection, followed by a slight increase of a multifocal inflammatory infiltrate, and areas of myocytolysis thereafter (Fig. 1a and c). The presence of arterioles and veins with thickened wall due to VSMC proliferation was frequently seen during the chronic phase (Additional file 1: Figure S1B). The presence of diffuse interstitial fibrosis was

observed in Sirius red-stained sections, and morphometric analysis showed a progressive increase in cardiac fibrosis with time of infection (Fig. 1b and d).

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

To better characterize the expression of syndecan-4, we performed confocal microscopy analysis in heart sections co-stained for α -smooth muscle actin (α -SMA) and von Willebrand factor (vWF). Co-localization between vWF, a marker for endothelial cells, and syndecan-4 was observed (Fig. 3a and b). However, co-localization of syndecan-4 and α -SMA was much more intense and frequently found,





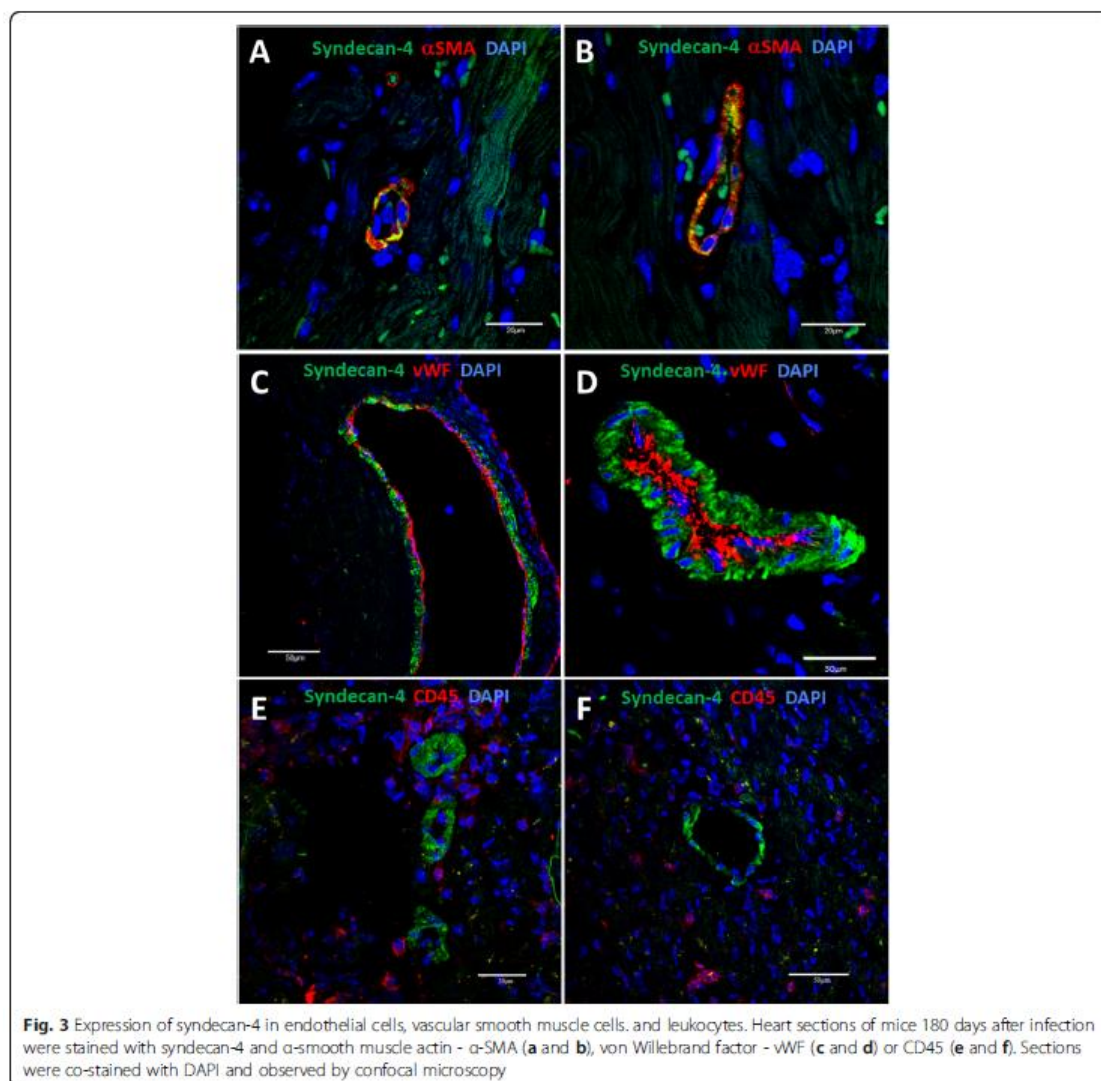
indicating that vascular smooth muscle cells (VSMCs) are the main cell population expressing syndecan-4 in this model (Fig. 3c and d). We also performed double staining for the pan-leukocyte marker CD45 and syndecan-4, but did not observe co-staining (Fig. 3e and f).

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 infiltrates composed mainly of mononuclear cells near areas of myocytolysis (Fig. 4a, c and e). Alterations in the microvasculature, including perivascular

inflammation, fibrosis, proliferation of microvessels and thickening of vessel walls, leading to occlusion, were also observed (Additional file 1: Figure S1C-E). Additionally, extensive areas of interstitial fibrotic scar were found in Sirius red-stained sections (Fig. 4b, d and f).

The expression of syndecan-4 in human heart samples was evaluated by analysis using confocal microscopy. Syndecan-4 staining was also found in myocytes and mainly in blood vessels, co-localizing with α SMA staining, indicating expression on VSMCs (Fig. 5a and b). Co-localization between syndecan-4 and vWF was found in lower extent (Fig. 5c and d). 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.

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 (IQE: 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 (IQE: 31.0–260.3), 20.1 cells/mm² (IQE: 12.4–41.7) and 24.4 cells/mm² (IQE: 19.4–64.3) in subjects with CD, ICM and IdDCM, respectively ($P = 0.035$; Fig. 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 ($P = 0.610$; Fig. 6b).

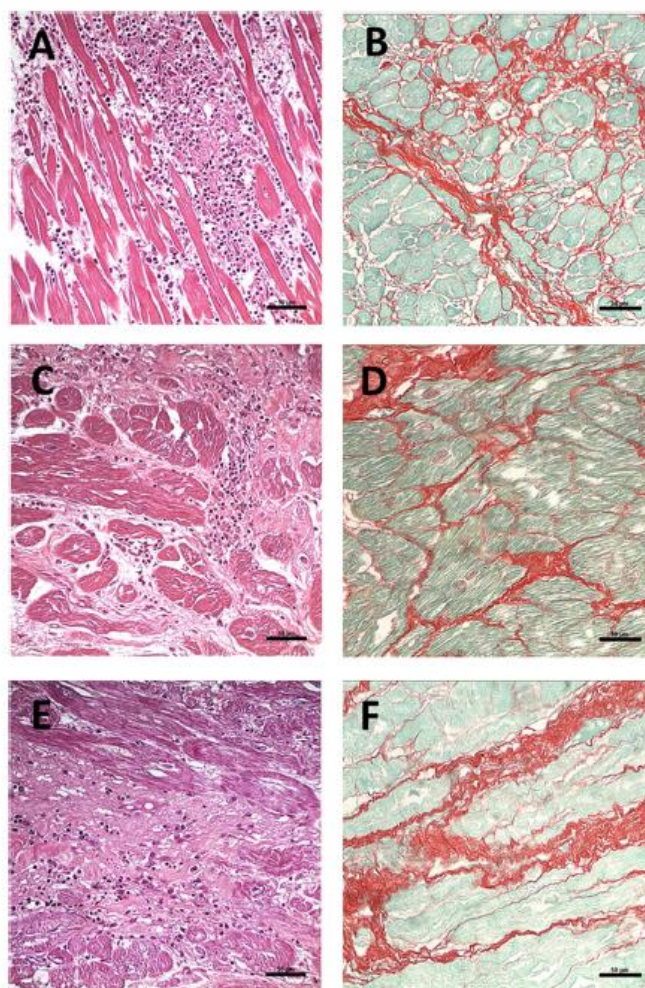


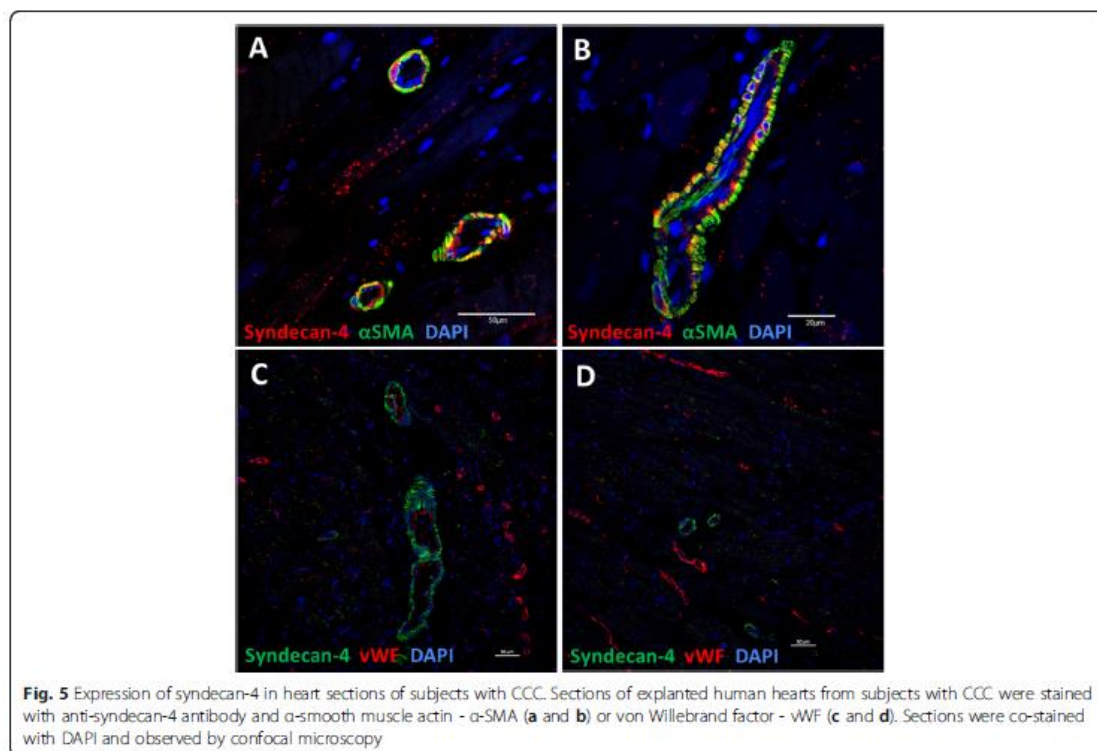
Fig. 4 Presence of inflammation and fibrosis in explanted hearts from subjects with CCC. Heart sections of explants from three subjects with CCC were prepared. **a, c and e**, Staining with H&E, showing multifocal inflammatory infiltrate composed by mononuclear cells. **b, d and f**, Sirius red staining, showing extensive areas of interstitial fibrosis

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) ($P = 0.466$; Fig. 6c).

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

In CD heart samples ($n = 7$), we found no significant correlation between the number of syndecan-4 positive vessels/mm² and either the degree of myocardial fibrosis



($r = 0.219$, $P = 0.637$) or the number of inflammatory cells/ mm^2 ($r = 0.314$, $P = 0.494$). 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

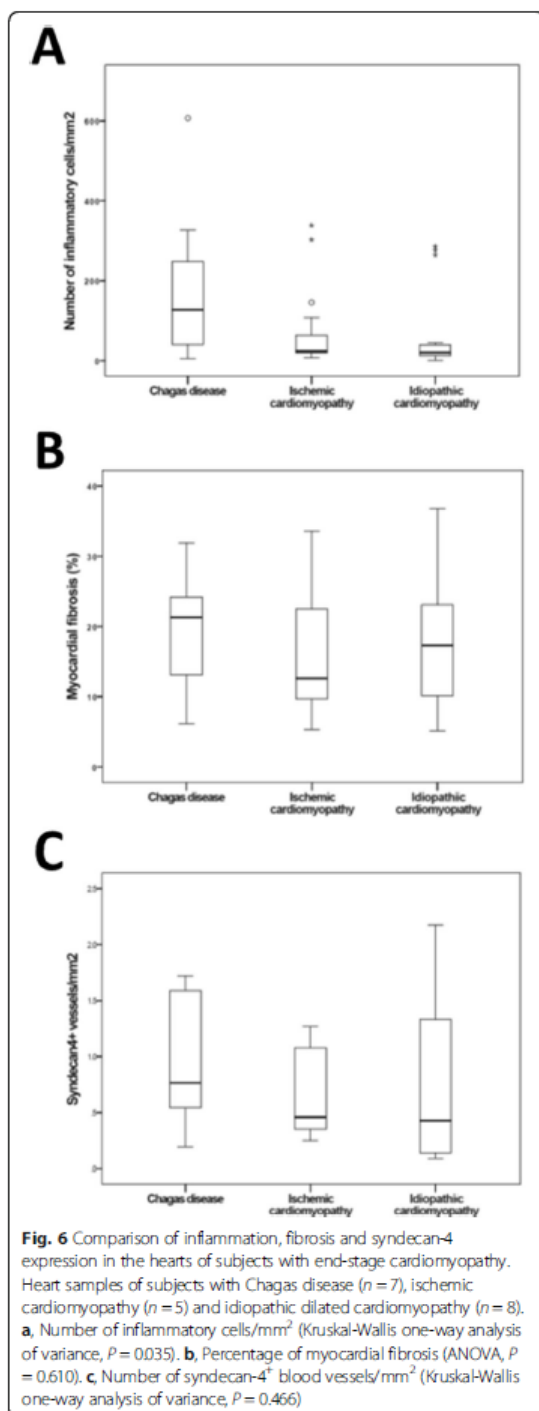
Heart failure is the final common pathway of a variety of primary cardiovascular diseases regardless of the nature of the cardiomyopathy. Understanding the clinical and pathological differences among its main

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

Subject ID	Cells/ mm^2 (n)	Myocardial fibrosis (%)	Syndecan-4 ⁺ vessels/ mm^2 (n)
AP#1	31.0	12.8	0.56
AP#2	109.8	22.0	0.52
AP#3	127.8	31.8	1.51
AP#4	236.0	9.0	1.72
AP#5	5.8	26.5	1.66
AP#6	326.8	15.4	0.20
AP#7	57.0	13.4	0.76

etiologies is crucial for achieving breakthroughs in the treatment of such a life-threatening disorder. Finding new biomarkers is of special interest, as they may also serve as molecular targets for the development of therapeutic strategies. 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.

Syndecan-4 is expressed in a variety of cell types, including cardiomyocytes, endothelial cells, cardiac fibroblasts and smooth muscle cells (Li et al. 1997; Samarel 2013; Julien et al. 2007; Xie et al. 2012). In our study, we found that, although present in cardiomyocytes and endothelial cells, syndecan-4 expression was highly increased in VSMCs upon *T. cruzi* infection, both in mouse and human hearts. Previous studies have shown that syndecan-4 expression and shedding is increased by mechanical stress in VSMCs (Li and Chaikof 2002). Syndecan-4 co-localizes with integrin heterodimers in focal adhesion complexes, which are affected by physical

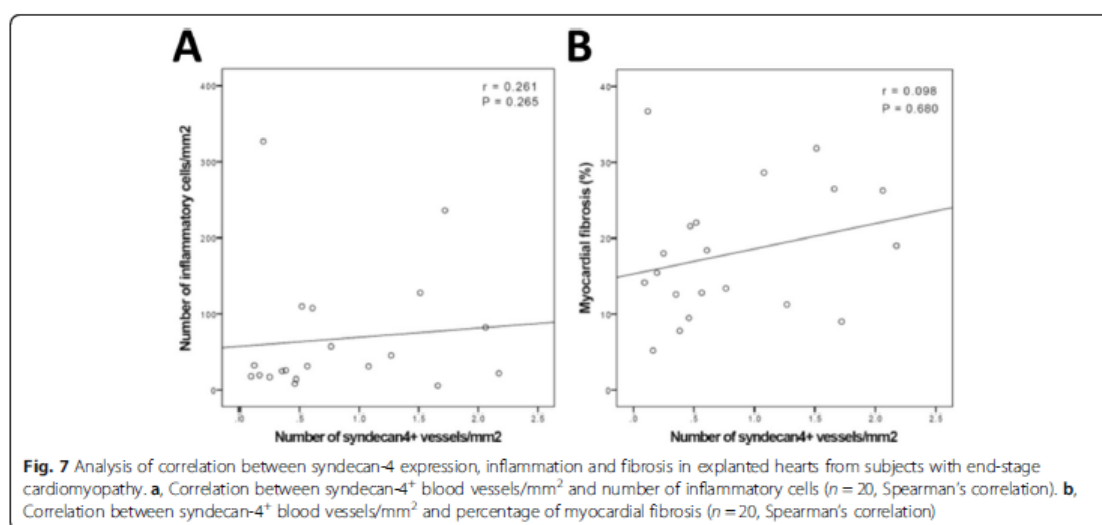


forces, thus causing the regulating the expression of syndecan-4 (Li and Chaikof 2002). Therefore, it is possible that the increased expression of syndecan-4 is induced by mechanical stress in the vessel walls. The role of syndecan-4 as a mechanosensor has already been demonstrated (Bellin et al. 2009). The implications of this finding to the disease pathogenesis are currently unknown and speculative, and should be further explored in future studies using adequate tools to block or enhance cardiac syndecan-4 expression.

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 (Samarel 2013; Li and Chaikof 2002; Gopal et al. 2017; Okina et al. 2012; Strand et al. 2013). The extracellular domain of syndecan-4 has heparan sulfate chains, which bind to several molecules that modulate processes of tissue injury and repair, including cell migration and proliferation, cell-substrate interactions, extracellular matrix remodeling, binding of cytokines and growth factors (Li et al. 2002; Maillard et al. 2014). 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 (Prado et al. 2011). 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 expression has been linked to inflammatory responses, we did not find a correlation between the degree of inflammation and syndecan-4 expression. 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 (Marin-Neto et al. 2007). Interestingly, a significantly higher number of inflammatory cells was found in the hearts of subjects with ICM and IdDCM, in the presence of similar degrees of cardiac fibrosis.

Myocardial fibrosis has been described as prominent not only for CD, but also for ICM and IdCM (Ottaviani et al. 2015; de Leeuw et al. 2001). 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 (de Leeuw et al. 2001). 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. The authors 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 (Ottaviani et al. 2015). Our study reinforces this finding, since we did not find significant differences in fibrosis area when hearts from the three etiological groups were evaluated.

Additionally, we did not find differences in the degree of myocardial fibrosis or in the density of syndecan-4 positive vessels among the three groups of heart samples. Likewise, we showed no significant correlation between the number of syndecan-4 density and the number of inflammatory cells or the percentage of myocardial fibrosis. These data are complementary and in accordance with our recently published study, which showed lack of association between serum syndecan-4 and myocardial fibrosis measured by magnetic resonance imaging in subjects with CCC (Larocca et al. 2017).

Regarding the human material, the present study was limited by the reduced sample size for the immunostaining analysis, as a result of a surprisingly 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.

Conclusion

In conclusion, we demonstrated the expression of syndecan-4 on VSMCs in both mice and human hearts in Chagas 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.

Additional file

Additional file 1: 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. (TIFF 3081 kb)

Abbreviations

CCC: Chronic Chagas cardiomyopathy; CD: Chagas disease; CNPq: National Council for Research; FAPESB: Research Foundation of Bahia State; G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor; H&E: Hematoxylin and eosin; ICM: Ischemic cardiomyopathy; IdDCM: Idiopathic dilated cardiomyopathy; NIH: National Institutes of Health; RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; RT-qPCR: Real time reverse transcription polymerase chain reaction; VEGF: Vascular endothelial growth factor; vWF: Von Willebrand factor; α -SMA: α -smooth muscle actin

Funding

This study was supported by funds from National Council for Research (CNPq), Research Foundation of Bahia State (FAPESB), and Funding Authority for Studies and Projects (FINEP).

Availability of data and materials

Please contact author for data requests.

Authors' contributions

TFL – Conceptualization, design of the study, methodology, data analysis, writing original draft. BSFS – Conceptualization, methodology, data analysis, writing – review and editing. CTM – Design of the study, methodology, data analysis. CMA – Methodology, data analysis. JFV – Methodology, data analysis. DNS – Methodology, data analysis. DCNP – Methodology, data analysis. FT – Methodology and resources. JDSL – Methodology and resources. WLC – Methodology, data analysis. RRS – Conceptualization, resources, funding acquisition. MBPS – Conceptualization, design of the study, methodology, data analysis, writing – review and editing, final approval of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All of the experimental work in mice received prior approval by local Animal Experimentation Ethics Committee of Hospital São Rafael, with the reference number 01/13. The Ethics Committee of Hospital São Rafael, with the reference number 51025115.3.0000.0048, approved the use of human heart samples in this study.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Center for Biotechnology and Cell Therapy, São Rafael Hospital, Salvador, BA, Brazil. ²Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brazil. ³Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil. ⁴Messejana Hospital, Fortaleza, CE, Brazil.

Received: 5 March 2018 Accepted: 7 September 2018

Published online: 10 December 2018

References

- Bellin RM, Kubicek JD, Frigault MJ, Kamien AJ, Steward RL, Barnes HM et al (2009) Defining the role of syndecan-4 in mechanotransduction using surface-modification approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(52):22102–22107
- Bern C (2015) Chagas' disease. *N Engl J Med* 373(19):1882
- Bonney KM, Engman DM (2015) Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *Am J Pathol* 185(6):1537–1547
- de Leeuw N, Ruiters DJ, Balk AH, de Jonge N, Melchers WJ, Galama JM (2001) Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Transpl Int* 14(5):299–306
- Federici EE, Abelman WH, Neva FA (1964) Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 13:272–280
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71(3):1185–1193
- Gopal S, Multhaupt HA, Pocock R, Couchman JR (2017) Cell-extracellular matrix and cell-cell adhesion are linked by syndecan-4. *Matrix Biol* 60(61):57–69
- Julien MA, Wang P, Haller CA, Wen J, Chalkof EL (2007) 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* 292(1):C517–C525
- Kojima T, Takagi A, Maeda M, Segawa T, Shimizu A, Yamamoto K et al (2001) Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 85(5):793–799
- Larocca TF, Macêdo CT, Noya-Rabelo M, Lemos Correia LC, Moreira MI, Caldas AC et al (2017) Lack of association between serum syndecan-4, myocardial fibrosis and ventricular dysfunction in subjects with chronic Chagas disease. *PLoS One* 12(12):e0189408
- Li J, Brown LF, Laham RJ, Volk R, Simons M (1997) Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. *Circ Res* 81(5):785–796
- Li J, Partovian C, Hampton TG, Metals C, Tkachenko E, Sellke FW et al (2002) Modulation of microvascular signaling by heparan sulfate matrix: studies in syndecan-4 transgenic mice. *Microvasc Res* 64(1):38–46
- Li L, Chalkof EL (2002) Mechanical stress regulates syndecan-4 expression and redistribution in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(1):61–68
- Ma X, Ouyang P, Zhang Z, Lai W, Xu D (2013) Changes and clinical significance of serum level of syndecan-4 protein in patients with chronic congestive heart failure. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 29(8):866–869
- Mallard L, Saito N, Hlawaty H, Friend V, Suffee N, Chmielewski F et al (2014) RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC α signaling pathway. *Biol Open* 3(10):995–1004
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Madel BC, Simões MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115(9):1109–1123
- Mello RP, Szarf G, Schwartzman PR, Nakano EM, Espinosa MM, Szejnfeld D et al (2012) Delayed enhancement cardiac magnetic resonance imaging can identify the risk for ventricular tachycardia in chronic Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol* 98(5):421–430
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F et al (2015) Randomized trial of Benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med* 373(14):1295–1306
- Nikkari ST, Järveläinen HT, Wight TN, Ferguson M, Clowes AW (1994) Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol* 144(6):1348–1356
- Okina E, Grossi A, Gopal S, Multhaupt HA, Couchman JR (2012) Alpha-actinin interactions with syndecan-4 are integral to fibroblast-matrix adhesion and regulate cytoskeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 44(12):2161–2174
- Organization WH (2010) Chagas disease: control and elimination. World Health Organization. World Health Assembly report, Geneva, pp 1–4
- Ottaviani G, Radovanovic R, Kar B, Gregoric I, Buja LM (2015) Pathological assessment of end-stage heart failure in explanted hearts in correlation with hemodynamics in patients undergoing orthotopic heart transplantation. *Cardiovasc Pathol* 24(5):283–289
- Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA (2011) The vasculature in chagas disease. *Adv Parasitol* 76:83–99
- Rassi A, Rassi SG (2007) Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation* 115(9):1101–1108
- Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Avila LF et al (2005) Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. *J Am Coll Cardiol* 46(8):1553–1558
- Samarel AM (2013) Syndecan-4: a component of the mechanosensory apparatus of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 56:19–21
- Schmunis GA (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(Suppl 1):75–85
- Soares MB, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR et al (2010) Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis* 202(3):416–426
- Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR et al (2011) Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. *Cell Cycle* 10(9):1448–1455
- Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc* 73(4):547–559
- Strand ME, Herum KM, Rana ZA, Skrbic B, Askevold ET, Dahl CP et al (2013) 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* 280(10):2228–2247
- Takahashi R, Negishi K, Watanabe A, Arai M, Naganuma F, Ohyama Y et al (2011) Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol* 57(3):325–332

Funding

This study was supported by funds from National Council for Research (CNPq), Research Foundation of Bahia State (FAPESB), and Funding Authority for Studies and Projects (FINEP).

Availability of data and materials

Please contact author for data requests.

Authors' contributions

TFL – Conceptualization, design of the study, methodology, data analysis, writing original draft. BSFS – Conceptualization, methodology, data analysis, writing – review and editing. CTM – Design of the study, methodology, data analysis. CMA – Methodology, data analysis. JFV – Methodology, data analysis. DNS – Methodology, data analysis. DCNP – Methodology, data analysis. FT – Methodology and resources. JDSL – Methodology and resources. WLC – Methodology, data analysis. RRS – Conceptualization, resources, funding acquisition. MBPS – Conceptualization, design of the study, methodology, data analysis, writing – review and editing, final approval of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All of the experimental work in mice received prior approval by local Animal Experimentation Ethics Committee of Hospital São Rafael, with the reference number 01/13. The Ethics Committee of Hospital São Rafael, with the reference number 51025115.3.0000.0048, approved the use of human heart samples in this study.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Center for Biotechnology and Cell Therapy, São Rafael Hospital, Salvador, BA, Brazil. ²Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brazil. ³Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil. ⁴Messejana Hospital, Fortaleza, CE, Brazil.

Received: 5 March 2018 Accepted: 7 September 2018

Published online: 10 December 2018

References

- Bellin RM, Kubicek JD, Frigault MJ, Kamien AJ, Steward RL, Barnes HM et al (2009) Defining the role of syndecan-4 in mechanotransduction using surface-modification approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(52):22102–22107
- Bern C (2015) Chagas' disease. *N Engl J Med* 373(19):1882
- Bonney KM, Engman DM (2015) Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *Am J Pathol* 185(6):1537–1547
- de Leeuw N, Ruiters DJ, Balk AH, de Jonge N, Melchers WJ, Galama JM (2001) Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Transpl Int* 14(5):299–306
- Federici EE, Abelman WH, Neva FA (1964) Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 13:272–280
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71(3):1185–1193
- Gopal S, Multhaupt HA, Pocock R, Couchman JR (2017) Cell-extracellular matrix and cell-cell adhesion are linked by syndecan-4. *Matrix Biol* 60(6):57–69
- Julien MA, Wang P, Haller CA, Wen J, Chalkof EL (2007) 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* 292(1):C517–C525
- Kojima T, Takagi A, Maeda M, Segawa T, Shimizu A, Yamamoto K et al (2001) Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 85(5):793–799
- Larocca TF, Macêdo CT, Noya-Rabelo M, Lemos Correia LC, Moreira MI, Caldas AC et al (2017) Lack of association between serum syndecan-4, myocardial fibrosis and ventricular dysfunction in subjects with chronic Chagas disease. *PLoS One* 12(12):e0189408
- Li J, Brown LF, Laham RJ, Volk R, Simons M (1997) Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. *Circ Res* 81(5):785–796
- Li J, Partovian C, Hampton TG, Metals C, Tkachenko E, Sellke FW et al (2002) Modulation of microvascular signaling by heparan sulfate matrix: studies in syndecan-4 transgenic mice. *Microvasc Res* 64(1):38–46
- Li L, Chalkof EL (2002) Mechanical stress regulates syndecan-4 expression and redistribution in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(1):61–68
- Ma X, Ouyang P, Zhang Z, Lai W, Xu D (2013) Changes and clinical significance of serum level of syndecan-4 protein in patients with chronic congestive heart failure. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 29(8):866–869
- Mallard L, Saito N, Hlawaty H, Friend V, Suffee N, Chmielewski F et al (2014) RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC α signaling pathway. *Biol Open* 3(10):995–1004
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Madel BC, Simões MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115(9):1109–1123
- Mello RP, Szarf G, Schwartzman PR, Nakano EM, Espinosa MM, Szejnfeld D et al (2012) Delayed enhancement cardiac magnetic resonance imaging can identify the risk for ventricular tachycardia in chronic Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol* 98(5):421–430
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F et al (2015) Randomized trial of Benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med* 373(14):1295–1306
- Nikkari ST, Järveläinen HT, Wight TN, Ferguson M, Clowes AW (1994) Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol* 144(6):1348–1356
- Okina E, Grossi A, Gopal S, Multhaupt HA, Couchman JR (2012) Alpha-actinin interactions with syndecan-4 are integral to fibroblast-matrix adhesion and regulate cytoskeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 44(12):2161–2174
- Organization WH (2010) Chagas disease: control and elimination. World Health Organization. World Health Assembly report, Geneva, pp 1–4
- Ottaviani G, Radovanovic R, Kar B, Gregoric I, Buja LM (2015) Pathological assessment of end-stage heart failure in explanted hearts in correlation with hemodynamics in patients undergoing orthotopic heart transplantation. *Cardiovasc Pathol* 24(5):283–289
- Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA (2011) The vasculature in chagas disease. *Adv Parasitol* 76:83–99
- Rassi A, Rassi SG (2007) Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation* 115(9):1101–1108
- Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Avila LF et al (2005) Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. *J Am Coll Cardiol* 46(8):1553–1558
- Samarel AM (2013) Syndecan-4: a component of the mechanosensory apparatus of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 56:19–21
- Schmunis GA (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(Suppl 1):75–85
- Soares MB, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR et al (2010) Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis* 202(3):416–426
- Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR et al (2011) Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. *Cell Cycle* 10(9):1448–1455
- Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc* 73(4):547–559
- Strand ME, Herum KM, Rana ZA, Skrbic B, Askevold ET, Dahl CP et al (2013) 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* 280(10):2228–2247
- Takahashi R, Negishi K, Watanabe A, Arai M, Naganuma F, Ohyama Y et al (2011) Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol* 57(3):325–332

ANEXO 4

The Presence and Extension of Myocardial Fibrosis in the Undetermined Form of Chagas' Disease: A Study Using Magnetic Resonance

Arq Bras Cardiol. 2018; 110(2):124-131

DOI: 10.5935/abc.20180016



Artigo Original

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

The Presence and Extension of Myocardial Fibrosis in the Undetermined Form of Chagas' Disease: A Study Using Magnetic Resonance

Marcia Maria Noya-Rabelo,^{1,2} Carolina The Macedo,^{1,2} Ticiane Larocca,³ Admilson Machado,² Thais Pacheco,² Jorge Torneio,¹ Bruno Solano de Freitas Souza,⁴ Milena B. R Soares,⁴ Ricardo Ribeiro-dos-Santos,⁵ Luis Claudio Lemos Correia,^{1,2} Hospital São Rafael - Fundação Monte Sábior,¹ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,² Centro de Biotecnologia e Terapia Celular,³ Salvador, BA - Brazil

Resumo

Fundamento: Dados prévios têm demonstrado que pacientes na forma indeterminada podem apresentar fibrose miocárdica à ressonância magnética (RM). No entanto, são poucas as informações disponíveis quanto ao grau de fibrose miocárdica apresentada por esses indivíduos, o que guardaria relação com o potencial desta variável na predição da evolução para a forma cardíaca da doença de Chagas.

Objetivos: Descrever a frequência e extensão da fibrose miocárdica avaliada por RM em pacientes da forma indeterminada, comparando com as outras formas da doença.

Métodos: Pacientes consecutivamente admitidos tiveram história clínica colhida e foram submetidos à realização de exames laboratoriais e RM.

Resultados: Foram estudados 61 pacientes portadores da doença de Chagas, com média de idade de 58 ± 9 anos, sendo 17 pacientes na forma indeterminada, 16 na forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo (VE) e 28 na forma com disfunção do VE. Foi considerado estatisticamente significativa $p < 0,05$. Realce tardio foi detectado em 37 pacientes (64%). Foi identificada fibrose miocárdica em 6 indivíduos na forma indeterminada (41%; IC95% 23 - 66), proporção semelhante à observada na forma cardíaca sem disfunção do VE (44%); $p = 1,0$. Entre os indivíduos com fibrose, a área total do miocárdio acometida foi de 4,1% (IIQ: 2,1 - 10,7) na forma indeterminada versus 2,3% (IIQ: 1 - 5) na forma cardíaca sem disfunção do VE ($p = 0,18$). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos indivíduos na forma indeterminada foi semelhante aos portadores da forma cardíaca sem disfunção ventricular ($p = 0,09$).

Conclusão: A presença de fibrose na forma indeterminada da doença de Chagas tem frequência e extensão semelhante à forma cardíaca sem disfunção, o que sugere que a primeira faz parte de um espectro de doença subclínica, em vez da ausência de acometimento cardíaco. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(2):124-131)

Palavras-chave: Doença de Chagas; Cardiomiopatia Chagásica; Fibrose; Imagem por Ressonância Magnética.

Abstract

Background: Previous data has shown that patients in the indeterminate form of Chagas disease may present myocardial fibrosis as shown on through magnetic resonance imaging (MRI). However, there is little information available regarding the degree of severity of myocardial fibrosis in these individuals. This variable has the potential to predict the evolution of Chagas' disease into its cardiac form.

Objectives: To describe the frequency and extent of myocardial fibrosis evaluated using an MRI in patients in the indeterminate form, and to compare it with other forms of the disease.

Methods: Patients were admitted one after another. Their clinical history was collected and they were submitted to laboratory exams and an MRI.

Results: Sixty-one patients with Chagas' disease, with an average age of 58 ± 9 years old, 17 patients in the indeterminate form, 16 in the cardiac form without left ventricular (LV) dysfunction and 28 in the cardiac form with LV dysfunction were studied. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Late enhancement was detected in 37 patients (64%). Myocardial fibrosis was identified in 6 individuals in indeterminate form (41%; 95% CI 23-66) in a proportion similar to that observed in cardiac form without LV dysfunction (44%); $p = 1.0$. Among the individuals with fibrosis, the total area of the affected myocardium was 4.1% (IIQ: 2.1 - 10.7) in the indeterminate form versus 2.3% (IIQ: 1-5) in the cardiac form without LV ($p = 0.18$). The left ventricular fraction ejection in subjects in the indeterminate form was similar to that of the individuals in the cardiac form without ventricular dysfunction ($p = 0.09$).

Conclusion: The presence of fibrosis in the indeterminate form of Chagas' disease has a frequency and extension similar to that of in the cardiac form without dysfunction, suggesting that the former is part of a subclinical disease spectrum, rather than lacking cardiac involvement. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(2):124-131)

Keywords: Chagas Disease; Chagas Cardiomyopathy; Fibrosis; Magnetic Resonance Imaging.

Full text in English - <http://www.scielo.org/abc/abc>

Correspondência: Marcia Maria Noya Rabelo - Rua Jacina Cruz Card. Rio Jacint. 12 013. CEP 43-713-480. Porto. Lauro de Freitas. BA - Brasil
E-mail: marcianoya@cardiol.br; marcianoya@gmail.com
Artigo recebido em 03/06/2017. revisado em 17/06/2017. aceite em 21/06/2017

DOI: 10.5935/abc.20180016

Introdução

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

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

Nessa linha de raciocínio, vários pesquisadores consideram a fibrose miocárdica como um possível substrato para o desenvolvimento e a progressão da disfunção ventricular, arritmia e para a morte.^{4,5,10} O processo etiopatogênico que promove a fibrose envolve uma relação multifatorial entre os aspectos relacionados ao agente etiológico e aqueles relativos ao hospedeiro.¹¹⁻¹⁴

O advento da ressonância magnética cardíaca (RMC), com a utilização da técnica de realce tardio, permite a identificação de fibrose miocárdica, sendo considerada padrão-ouro com estreita correlação anatomopatológica.¹⁵ Há evidências de que a RMC é capaz de fornecer imagens com alta resolução espacial e elevada acurácia na avaliação da função ventricular.¹⁶ Dados prévios têm demonstrado que mesmo pacientes com a forma indeterminada podem apresentar fibrose miocárdica quando testados por RMC.¹⁷ No entanto, são poucos os dados disponíveis quanto ao grau de fibrose miocárdica apresentada por esses indivíduos, o que guardaria relação com o potencial dessa variável na predição de evolução para a forma crônica. O intuito deste trabalho é descrever a frequência e a extensão da fibrose miocárdica avaliada por RMC em pacientes da forma indeterminada. A fim de contextualizar essa magnitude, esses pacientes foram comparados ao grupo com forma crônica cardíaca com ou sem disfunção do ventrículo esquerdo.

Métodos

População do estudo

Indivíduos com doença de Chagas foram recrutados, entre janeiro de 2012 e dezembro de 2013, no ambulatório de doença de Chagas do Hospital São Rafael, centro de referência terciário em Salvador, Bahia, Brasil.

Os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 70 anos e diagnóstico da doença de Chagas confirmado por dois testes sorológicos positivos (hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta). Os critérios de exclusão foram: forma aguda da doença de Chagas; infarto do miocárdio

prévio ou doença arterial coronariana conhecida ou presença de dois fatores de risco; doença valvular primária; doença renal terminal em diálise; hepatite ativa ou cirrose; doenças hematológicas, neoplásicas ou ósseas e contraindicação para ressonância magnética.

O estudo cumpriu o determinado pela Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Rafael. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Informado antes de sua inclusão.

Formas da Doença de Chagas

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

Dados clínicos e laboratoriais

Todos os indivíduos realizaram exames bioquímicos, eletrocardiograma de 12 derivações, radiografia de tórax, holter 24 horas, teste ergométrico, ecocardiograma com doppler e RMC. Para classificação do escore de Rassi foi conferida pontuação da seguinte forma: classes funcionais III e IV pela New York Heart Association (NYHA) (5 pontos), cardiomegalia ao raio-X (5 pontos), disfunção ventricular esquerda global ou segmentar ao ecocardiograma (3 pontos), taquicardia ventricular não sustentada ao holter 24 horas (3 pontos), baixa voltagem do QRS ao eletrocardiograma (2 pontos) e sexo masculino (2 pontos). Foram então classificados em 8 grupos de risco de acordo com a pontuação obtida: baixo risco (0 a 5 pontos), risco intermediário (7 a 11 pontos) e alto risco (12 a 20 pontos).¹⁸

Ressonância magnética cardíaca

A RMC foi realizada utilizando-se o sistema Sigma HDx1,5-T (General Electric; Fairfield, CT, EUA). Para avaliação da função do ventrículo esquerdo foram adquiridas imagens sincronizadas ao eletrocardiograma, em apnéia expiratória, nos planos eixo curto, eixo longo e quatro câmaras, em sequências diferentes. Os parâmetros de aquisição aplicados para a sequência dinâmica foram: tempo de repetição (TR) de 3,5 ms, tempo de eco (TE) de 1,5 ms, ângulo de inclinação (flip angle) de 60°, largura de banda de 125 kHz, campo de visão de 35 x 35 cm, matriz de 256 x 148, resolução temporal (RT) de 85 ms, espessura de corte de 8,0 mm, sem intervalo entre os cortes. Imagens por técnica de realce tardio foram adquiridas a cada batimento cardíaco, 10 a 20 minutos após a administração de um contraste à base de gadolínio (0,1 mmol/kg), utilizando TR de 7,2 ms, TE de 3,1 ms, ângulo de inclinação de 20°, primeira fase do ciclo cardíaco, número de linhas por seguimento de 16/32, tamanho da matriz 256 x 192, espessura de corte de 8,0 mm, intervalo entre os cortes de 2 mm, campo de visão de 32 x 38 cm, tempo

Artigo Original

de inversão de 150 a 300 ms, largura de banda de 31,25 kHz, 2 NDx (número de excitações). A técnica de realce tardio foi usada para investigar a presença de fibrose miocárdica, a qual foi estimada por um método qualitativo (visual), pela presença ou ausência de realce tardio, localização e padrão apresentados; e de modo quantitativo, em valores percentuais em relação à massa total do miocárdio. Todas as análises foram realizadas com o programa Siemens Argus (Siemens AC, Munique, Alemanha).

Análise estatística

Os dados categóricos foram expressos em números (percentagens, intervalo de confiança de 95% — IC95%), e os dados contínuos foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IIQ). Determinou-se a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação das variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada pelo teste *t* de Student não pareado e Anova (one-way analysis). Foi utilizado o método de Bonferroni para comparação *post-hoc* entre os grupos. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação de proporções. Para análise das variáveis contínuas não normais utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Regressão linear simples foi usada nas associações entre massa fibrótica e fração de ejeção do ventrículo esquerdo. As análises foram realizadas empregando o programa SPSS, versão 20.0 (IBM), e valores de *p* inferiores a 0,05 (teste bicaudal) foram considerados estatisticamente significativos.

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

Resultados

Características clínicas

Foram avaliados 61 indivíduos portadores da doença de Chagas, 56% do sexo feminino, idade média de 58 ± 9 anos, sendo 17 indivíduos na forma indeterminada, 16 na forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo (VE) e 28 na forma cardíaca com disfunção do VE. A maioria dos indivíduos (74%) estava em classe funcional I ou II da NYHA e 4 (6,6%) apresentaram envolvimento gastrointestinal concomitante. 82% eram procedentes da zona urbana, sendo que 50 indivíduos moravam previamente em casa de taipa e 44 informaram contato com o triatomíneo. O relato de familiares dos portadores da doença de Chagas ocorreu em 64%. Oito pacientes utilizaram benznidazol com finalidade de tratamento etiológico. A prevalência de hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemia e tabagismo foi semelhante entre os três grupos. A mediana do escore de Rassi foi 5 (IIQ: 0–11), assim distribuídos: 36 indivíduos classificados como de baixo risco (59%), 10 como de risco intermediário (16%) e 15 como alto risco (25%). Demais características clínicas e demográficas estão descritas na Tabela 1 e na Figura 1.

Presença e extensão da fibrose miocárdica

Realce tardio foi encontrado em 37 dos 58 indivíduos submetidos à RMC (64%). O percentual de área total do miocárdio acometida por fibrose foi de 9,4% (IIQ: 2,4–18,4), localizada com maior frequência nos segmentos infero-lateral e apical do VE. A localização subendocárdica e transmural da fibrose foram as mais prevalentes (72%), entretanto, a fibrose transmural ocorre com maior frequência naquelas com disfunção ventricular; $p = 0,001$. Foi identificada fibrose miocárdica em 6 dos 17 indivíduos na forma indeterminada (41%; IC95%: 23–66), proporção semelhante à observada na forma cardíaca sem disfunção do VE (44%; 7 dos 16 indivíduos); $p = 1,0$. Entre os indivíduos com fibrose, a área total do miocárdio acometida foi de 4,1% (IIQ: 2,1–10,7) na forma indeterminada versus 2,8% (IIQ: 1–5) na forma cardíaca sem disfunção do VE ($p = 0,18$). Naquelas com disfunção ventricular, o percentual de fibrose foi maior do que nos outros grupos, ocorrendo em 28 dos 25 indivíduos (92%), com área acometida de 15,2% (IIQ: 7,8–25); $p < 0,001$ (Figura 2).

Impacto da fibrose miocárdica

A fração de ejeção do VE foi significativamente mais baixa nos indivíduos com realce tardio, quando comparados aos indivíduos sem realce (69 ± 13 versus $48 \pm 15\%$); $p < 0,0001$. Foi observada correlação negativa entre a extensão da fibrose e fração de ejeção ($r = 0,565$; $p < 0,001$), evidenciada uma redução progressiva da fração de ejeção, por análise de regressão linear, a cada incremento percentual da área acometida por fibrose. Essa análise demonstrou um coeficiente de regressão (β) de $-0,968$, o que corresponde à estimativa de redução da fração de ejeção do VE a cada aumento de 1% na área de fibrose (Figura 3).

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

Gravidade da doença na forma indeterminada versus forma cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo

A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) nos indivíduos na forma indeterminada foi de $72 \pm 8\%$, semelhante à FEVE nos portadores da forma cardíaca sem disfunção ventricular $67 \pm 6\%$; $p = 0,09$. Não foram observadas diferenças quando avaliados os níveis de NT-ProBNP (125 pg/mL versus 159 pg/mL; $p = 0,61$), PCR ultrasensível (4,6 mg/L versus 2,5 mg/L; $p = 0,40$), TNF- α (0,9 pg/mL versus 1,2 pg/mL; $p = 0,56$), interleucinas ($p = 0,85$), IFN- γ (2,7 pg/mL versus 3,8 pg/mL; $p = 0,56$) e METs (10 versus 9,4; $p = 0,66$) alcançado no teste ergométrico e a localização do realce tardio ($p = 0,44$) quando comparados os portadores da forma indeterminada com aqueles da forma cardíaca sem disfunção (Tabela 2).

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas

Variáveis	Sujeitos (n = 81)	Forma indeterminada (n = 17)	Forma cardíaca sem distúrbio ventricular (n = 16)	Forma cardíaca com distúrbio ventricular (n = 28)
Características demográficas				
Idade (anos), média ± desvio padrão	50 ± 8	50 ± 11	50 ± 9	50 ± 7
Sexo feminino, n (%)	36 (50)	12 (70)	12 (75)	12 (43)
Moroso em casa de taipa, n (%)	50 (62)	15 (88)	15 (94)	20 (71)
Famílias com serologia positiva, n (%)	39 (54)	11 (65)	14 (88)	14 (50)
Forma digestiva, n (%)	4 (5)	–	2 (13)	2 (7)
Índice de massa corpórea (kg/m ²), média ± desvio padrão	25 ± 4	25 ± 4	27 ± 4	25 ± 3
Comorbidades, n (%)				
Hipertensão arterial	44 (72)	14 (82)	12 (75)	18 (64)
Diabetes mellitus	9 (10)	4 (23)	–	5 (18)
Stroke	5 (7)	1 (6)	1 (6)	2 (7)
Tabagismo	15 (20)	3 (18)	3 (18)	10 (36)
Insuficiência cardíaca congestiva NYHA III/IV	15 (20)	–	–	15 (57)
Características laboratoriais				
Creatinina (mg/dL)	0,88 (0,7 – 0,98)	0,84 (0,7 – 0,98)	0,78 (0,6 – 0,91)	0,94 (0,7 – 1,0)
Sódio (mmol/L)	140 ± 3	138 ± 2	139 ± 2	139 ± 2
Hemoglobina (g/dL)	13,9 ± 0,9	14,2 ± 1,3	13,4 ± 0,7	14,2 ± 1,0
Coletado total (mg/dL)	193 ± 38	202 ± 40	194 ± 42	200 ± 45
Proteína C reativa (mg/dL)	1,15 (0,63 – 4,02)	1,71 (0,38 – 6,54)	1,24 (0,51 – 4,76)	1,05 (0,73 – 3,62)
NT-ProBNP (pg/mL)	686 (38 – 816)	40,5 (34 – 108)	96,0 (73 – 181)	636,5* (189 – 2271)
Troponin I (ng/mL)	0,094 (0,012 – 0,04)	0,012 (0,012 – 0,012)	0,012 (0,012 – 0,028)	0,036 (0,019 – 0,08)
LVEF (%)	54 ± 15	54 ± 3	54 ± 4	43 ± 10*
METS	9 ± 2,5	12 ± 3	9 ± 2	8 ± 2

NYHA: New York Heart Association; NT-ProBNP: N-terminal pro B-type natriuretic peptide; LVEF: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; METS: metabolic equivalent of task.

Dados expressos em média ± desvio-padrão ou percentual (%) para variáveis discretas e mediana e intervalo interquartil para variáveis contínuas com distribuição não normal. *p < 0,001, teste exato de Fisher. **p < 0,001, Kruskal-Wallis one-way analysis of variance.

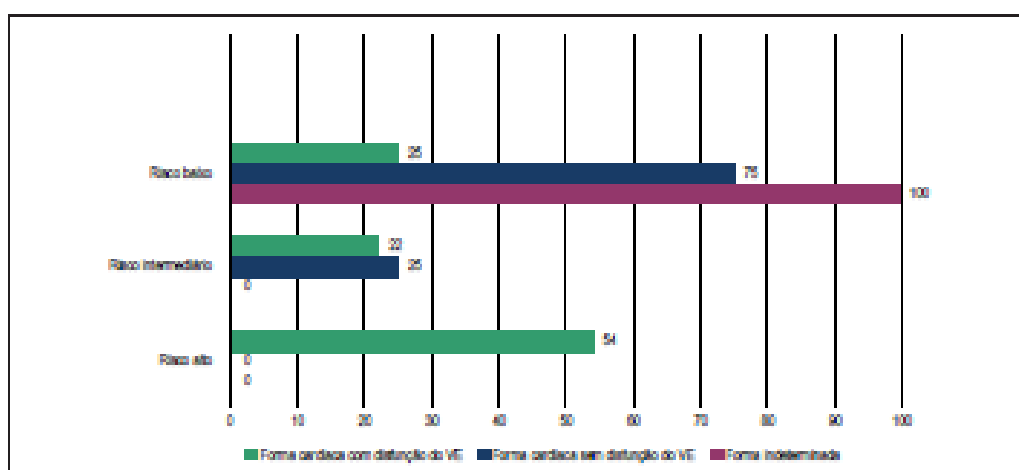


Figura 1 – Escora de Risco nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. VE: ventrículo esquerdo.

Artigo Original

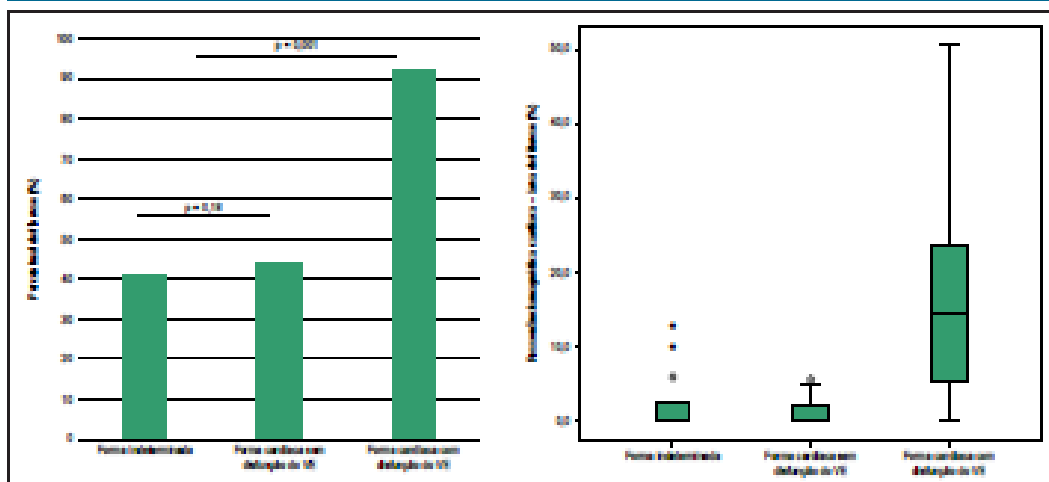


Figura 2 – fibrose mioárdica nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. VE: ventrículo esquerdo.

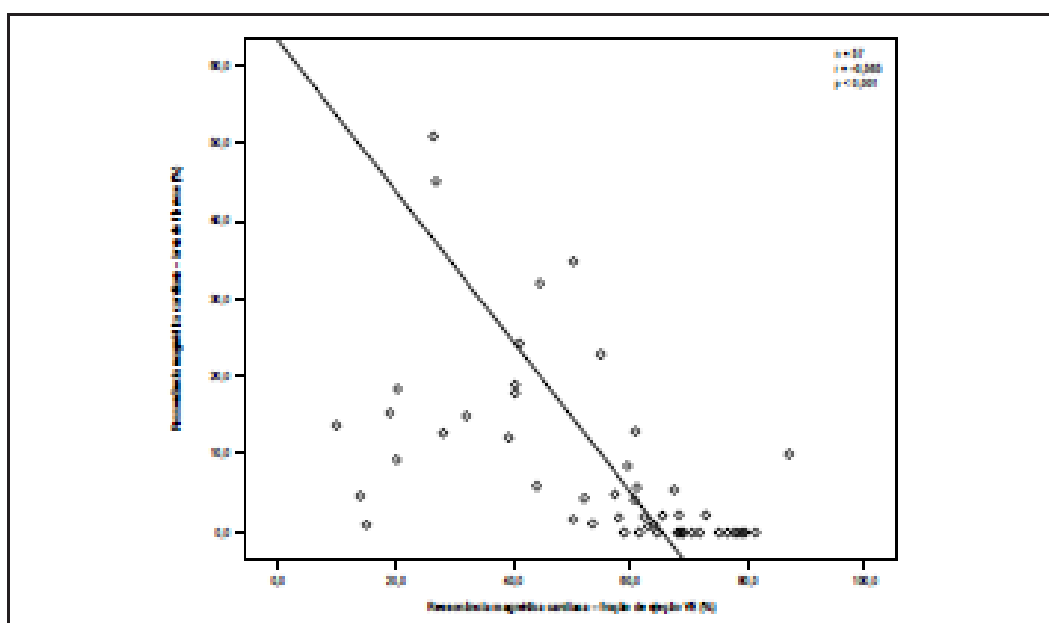


Figura 3 – Análise de regressão linear: influência da fibrose na fração de ejeção do ventrículo esquerdo. VE: ventrículo esquerdo.

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

Discussão

O presente trabalho evidenciou fibrose mioárdica em pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas, em frequência e extensão semelhantes ao grupo classificado como forma cardíaca sem disfunção ventricular. Adicionalmente,

Tabela 2 – Características da forma indeterminada versus cardíaca sem disfunção do ventrículo esquerdo

Variável	Forma indeterminada (n = 17)	Forma cardíaca sem disfunção ventricular (n = 16)	valor de p
Escore de Rami	3 (0 – 3)	6 (1 – 8)	0,30§
Área de fibras à RMC (%)	4,1 (2,1 – 10,7)	2,3 (1 – 5)	0,16§
Fração de ejeção do VE (%)	72 ± 8	67 ± 5	0,09§
Taquicardia ventricular (%)	–	20	0,007*
METS	10 ± 3	8,4 ± 2	0,60§
VO ₂ máximo	36 ± 10	33 ± 7	0,47§
NT-ProBNP (pg/mL)	126 (34 – 108)	171 (73 – 188)	0,61§
PCR ultrasensível (ng/L)	1,7 (0,36 – 6,5)	1,2 (0,51 – 4,7)	0,40§
Troponina I (ng/mL)	0,012 (0,0 – 0,012)	0,012 (0,012 – 0,028)	0,31§
IL-2 (pg/mL)	0,21 (0,03 – 0,68)	0,27 (0,03 – 0,98)	0,14§
IL-4 (pg/mL)	0,62 (0,00 – 1,6)	0,37 (0,2 – 2,2)	0,80§
IL-6 (pg/mL)	2,26 (1,39 – 4,26)	3,98 (2,01 – 6,22)	0,50§
IL-10 (pg/mL)	0,44 (0,19 – 1,06)	0,63 (0,50 – 1,61)	1,47§
TNF- α (pg/mL)	0,48 (0,14 – 1,15)	0,72 (0,58 – 2,71)	1,16§
IFN- γ (pg/mL)	2,07 (1,30 – 4,26)	2,15 (1,69 – 6,73)	0,61§

RMC: ressonância magnética cardíaca; VE: ventrículo esquerdo; METS: metabolismo equivalente at work; VO₂ máximo: volume de oxigênio máximo; NT-ProBNP: N-terminal pro B-type natriuretic peptide. *teste exato de Fisher; §teste t de Student; §teste de Mann-Whitney. Dados expressos em média ± desvio-padrão ou percentual (%) para variáveis discretas e mediana e intervalo interquartil para variáveis contínuas com distribuição não normal.

demonstrou-se que a função ventricular e os parâmetros clínicos são semelhantes entre essas duas formas.

A RMC é utilizada há décadas com a finalidade de avaliação anatômica e funcional do coração. A sua importância deriva das características de ser não invasiva, não usar radiação ionizante e sua alta resolução, que permite múltiplos estudos da anatomia cardíaca, função e caracterização tecidual com a técnica de realce tardio.^{19,21}

Estudos anteriores validaram a quantificação de fibras miocárdicas pela RMC na população portadora de doença de Chagas.^{22,23} Rochitte et al.,²² em 2005, avaliaram a RMC, com o uso da técnica de realce tardio, em 51 pacientes com cardiopatia chagásica, descobrindo fibras em 68,6% de todos os indivíduos avaliados e em 100% naqueles com taquicardia ventricular.²² Enquanto Rajueiro et al.,²³ relatam fibras em 7,4% na forma indeterminada, 15,8% na forma cardíaca sem disfunção ventricular e 52,4% naqueles com disfunção ventricular, em pacientes que vivem fora da zona endêmica da doença. Não encontramos percentual de acometimento de fibras similar ao estudo anterior (64%), evidenciando também progressivo acometimento nos pacientes com disfunção do VE (92%).²² Entretanto, adicionalmente a pesquisas anteriores, nossos dados demonstram prevalência de realce, assim como o percentual de área acometida por fibras, similar entre a forma indeterminada e a forma sem disfunção do VE. Não encontramos diferença quanto à localização subendocárdica e transmural de fibras.

A descrição das alterações ultraestruturais cardíacas que ocorrem na fase indeterminada da doença de Chagas foram inicialmente relatadas em indivíduos com sorologia positiva durante necropsia após morte acidental.¹²

No entanto, a designação como forma indeterminada ficou prejudicada visto a impossibilidade da análise de alterações eletrocardiográficas. Utilizando modelo canino, em 1997, Andrade et al.,²⁴ interpretaram que a forma indeterminada da doença é caracterizada por ciclo autolimitado de alterações inflamatórias focais, com modulação e supressão de respostas imunes mediadas por células. Assim, consideraram que a forma indeterminada da doença de Chagas caracteriza-se pelo equilíbrio hospedeiro-parasita em vez de um processo de dano progressivo.²⁴ Já em 1978, Andrade et al.,¹¹ relataram que as lesões de miocárdio chagásico crônicas não são distribuídas aleatoriamente pelo sistema de condução atrioventricular, havendo claramente uma distribuição preferencial das lesões no sistema de condução. Atualmente, sabemos que uma grande percentagem de pacientes na forma indeterminada tem evidências de envolvimento cardíaco na avaliação não invasiva mais detalhada.²⁵ Os dados do presente estudo demonstram que o uso da RMC não é capaz de diferenciar a forma indeterminada da forma clínica sem disfunção do VE, visto que o percentual de fibras foi similar entre as duas formas clínicas. Neste estudo o percentual de acometimento de fibras na forma indeterminada (41,2%) foi semelhante ao percentual na forma cardíaca sem disfunção do VE (48,8%), dado esse não relatado previamente.

Algumas limitações do estudo devem ser reconhecidas. Não foram realizados testes anatómicos visando afastar em definitivo a etiologia isquêmica como causa de fibras miocárdicas. Para minimizar essa possibilidade foi feito teste ergométrico em todos os indivíduos, além de ser como critério de exclusão a presença de fatores de risco para aterosclerose. Embora reconheça-se que para descartar definitivamente a doença arterial coronariana seria necessária uma angiografia

Artigo Original

coronária, o valor preditivo negativo do teste de esforço, nessas circunstâncias, é muito alto. A doença arterial coronariana foi excluída sem a realização de uma angiografia coronária para evitar radiação e complicações decorrentes do procedimento.

Conclusão

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

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Rabelo MMR, Macedo CT, Larocca T, Soares MBR, Correia LCL; Obtenção de dados: Rabelo MMR, Macedo CT, Larocca T, Machado A, Paschoa T; Análise e interpretação dos dados e Análise estatística: Rabelo MMR, Correia LCL; Obtenção de financiamento: Rabelo MMR, Larocca T, Soares MBR; Redação do manuscrito: Rabelo MMR, Macedo CT, Soares MBR, Correia LCL; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante:

Rabelo MMR, Macedo CT, Souza BSF, Soares MBR, Ribeiro-dos-Santos R, Correia LCL; Interpretação dos dados de ressonância magnética: Toméio J.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte da tese de Doutorado de Marcia Maria Noya-Rabelo pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Aprovação Ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Rafael sob o número de protocolo N° 41/10. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

Referências

- World Health Organization. WHO Expert Committee on the control of Chagas Disease. Geneva, 2002. (WHO Technical Report Series, 909).
- Marín-Nieto JA, Rassi A Jr. Update on Chagas heart disease: on the first centenary of its discovery. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(11):1211-6. doi: 10.1016/S1888-2867(09)73346-8.
- Nunes MC, Dantas W, Morillo CA, Brindis J, Ribeiro AL. Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(3):767-76. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.046.
- Ben C. Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2015;373(2):426-36. doi: 10.1056/NEJMa1410150.
- Bocchi EA, Arias A, Vendejo H, Díez M, Gómez E, Castro P. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol.* 2015;62(11):545-50. doi: 10.1016/j.jacc.2013.06.013.
- Andrade JF, Marín-Nieto JA, Paoli AA, Vias-Isoa F, Oliveira GM, Bazal E et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. II Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy I. *Arq Bras Cardiol.* 2011;87(2 Suppl 3):1-40. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2011001600001.
- Le Loup G, Pflieger G, Lesavoy FX. Update in treatment of Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24(1):428-34. doi: 10.1097/QCO.0b013e31819a667e.
- Lazanja PS, Díaz E, Nobrega C, Miranda A. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* 1966;146A:1035-40. doi: https://doi.org/10.1161/01.CIR.14.6.1035.
- Rassi A Jr, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2001;76(1):86-96. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2001000100008.
- Tassi EM, Corfincino MA, Nascimento BM, Pereira BD, Pedrosa RC. Relationship between fibrosis and ventricular arrhythmias in Chagas heart disease without ventricular dysfunction. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(5):456-64. doi: http://dx.doi.org/10.5934/abc.20140062.
- Marín-Nieto JA, Cunha-Nieto E, Masci JC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;116(2):109-23. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624256.
- Lopes DE, Chagasdino E, Andrade ZA, Almeida HD, Rocha A. (Pathological anatomy of hearts from asymptomatic Chagas disease patients dying in a violent manner). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;76(2):183-87. PMID: 6017025.
- Andrade ZA, Andrade SC, Oliveira GB, Alonso DR. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. *Am Heart J.* 1978;95(2):316-24. PMID: 414610.
- Mady C, Ianni BM, Artigas E, Monteiro GS, Catilini BG, Andrade G, et al. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *Am J Cardiol.* 1999;84(3):354-56. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149(99)00256-7.
- Klein C, Nekolla SG, Bengel PM, Henning M, Sammer A, Haas P, et al. Assessment of myocardial viability with contrast-enhanced magnetic resonance imaging: comparison with positron emission tomography. *Circulation.* 2000;102(2):162-7. doi: http://dx.doi.org/10.1161/hci000.102123.
- Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen EL, Parkes MA, Simonetti O, et al. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med.* 2008;354(26):1494-503. doi: 10.1056/NEJM00011163430003.
- Rochitte CE, Oliveira PR, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Avila LP, 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(6):1055-6. doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.067.

18. Kazi AJ, Kazi A, Little WC, Xavier SS, Kazi SC, Kazi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006;355(6):739-48a. doi: 10.1056/NEJMoa053241.
19. Scottam U, Mahrholdt H, Vogelsberg H. Cardiac magnetic resonance in myocardial disease. *Heart*. 2007;93(12):1620-7. doi: 10.1136/hrt.2006.067366.
20. Asanwalli BG, Prasad SK, Lynn J, Smith G, Barman EQ, Khan M, et al. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(10):1377-85. doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.045.
21. Bagan PM, Dejeandris B, Good E, Gupta S, Crawford T, Oral H, et al. Delayed-enhanced magnetic resonance imaging in nonischemic cardiomyopathy: utility for identifying the nonbacterial embolism substrate. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(13):1136-45. doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.052.
22. Escherle CE, Nacif MS, de Oliveira Júnior AC, Siqueira-Silva RL, Marchioni E, Uiedendahi M, et al. Cardiomagnético-resonance in Chagas' disease. *Artigo Original*. 2007;51(4):459-67. doi: 10.1111/j.1522-1694.2007.00373.x.
23. Roguero A, García-Álvarez A, Siles M, Ortiz-Pérez JT, De Caralt MT, Pinazo AJ, et al. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. *Int J Cardiol*. 2015;165(1):107-112. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.07.093.
24. Andrade ZA, Andrade SG, Sedigantky M, Wenthold RJ, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57(2):328-36. PMID: 9311646.
25. de Oliveira Júnior W, Salazar LE, Malta J, Assi N. Critical analysis of the indeterminate form of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. 1996;47(6):513-6. PMID: 9129556.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição pelo Creative Commons