

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Isabela Cristina Magalhães

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS E SUAS
RELAÇÕES COM MARCADORES DE REMODELAMENTO
CARDÍACO E DA FIBROSE MIOCÁRDICA NA CARDIOPATIA
CHAGÁSICA CRÔNICA

Belo Horizonte

2020

ISABELA CRISTINA MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS E SUAS
RELAÇÕES COM MARCADORES DE REMODELAMENTO
CARDÍACO E DA FIBROSE MIOCÁRDICA NA CARDIOPATIA
CHAGÁSICA CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: doença de Chagas - Patogênese Geral, Imunopatogênese, Clínica, Morbidade, Tratamento e Prognóstico

Orientadores:

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha
(Orientador)

Profa. Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes (Co-orientadora)

Profa. Dra. Ana Thereza Chaves (Co-orientadora)

Belo Horizonte

2020

Magalhães, Isabela Cristina.

M188a Avaliação de biomarcadores séricos e suas relações com Marcadores de Remodelamento Cardíaco e da Fibrose Miocárdica na Cardiopatia Chagásica Crônica [recursos eletrônicos]. / Isabela Cristina Magalhães. - - Belo Horizonte: 2020.

101f.: il. Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Cristiane Alves da Silva Menezes.

Coorientador (a): Ana Thereza Chaves.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

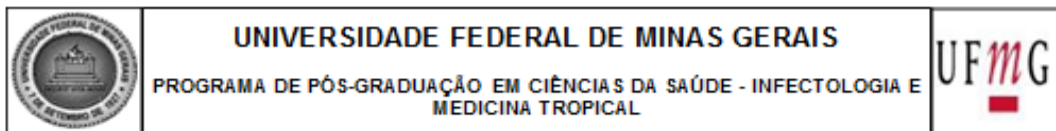
1. Doença de Chagas. 2. Cardiomiopatia Chagásica. 3. Fibrose. 4. Biomarcadores. 5. Dissertação Acadêmica. I. Menezes, Cristiane Alves da Silva. II. Chaves, Ana Thereza. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 705

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
GERAIS FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA ISABELA CRISTINA MAGALHÃES

Realizou-se, no dia 21 de maio de 2020, às 14:00 horas, com transmissão eletrônica de videoconferência através da plataforma ConferênciaWeb, pela Universidade Federal de Minas Gerais, a 371ª defesa de dissertação, intitulada "AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS E SUAS RELAÇÕES COM O REMODELAMENTO CARDÍACO E COM A FIBROSE MIOCÁRDICA NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA", apresentada por ISABELA CRISTINA MAGALHÃES, número de registro 2018656079, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes - Coorientadora (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves - Coorientadora (UFMG), Dra. Andrea Teixeira de Carvalho (FIOCRUZ), Dra. Luisa Mourão Dias Magalhães (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

☒ (X) Aprovada

☐ () Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 21 de maio de 2020.

Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes

Profa. Luisa Mourão Dias Magalhães

Dra. Ana Thereza Chaves

Profa. Andrea Teixeira de Carvalho

Atesto, para os devidos fins, que a defesa de dissertação da aluna **ISABELA CRISTINA MAGALHÃES**, intitulada "AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS E SUAS RELAÇÕES COM O REMODELAMENTO CARDÍACO E COM A FIBROSE MIOCÁRDICA NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA", defendida em 21 de maio de 2020, foi composta pela seguinte Comissão Examinadora: Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes - Coorientadora (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves - Coorientadora (UFMG), Profa. Andrea Teixeira de Carvalho (FIOCRUZ), Dra. Luisa Mourão Dias Magalhães (UFMG).

Belo Horizonte, 04 de novembro de 2021.

EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho**, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 02/02/2022, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1162259** e o código CRC **64469392**.

Dedico este trabalho a Santa Teresinha do menino Jesus e a São José que intercederam por mim a cada momento.

Aos meus pais, Hélio e Débora, que sempre me incentivaram a buscar sempre mais o conhecimento.

Aos meus irmãos Camila e Rafael por todas as orações e inspirações.

Ao João, meu namorado, que me apoiou, rezou e me deu suporte para que pudesse concluir as etapas desta jornada.

AGRADECIMENTOS

“Eu sou a videira e vós, os ramos. Aquele que permanece em mim, como eu nele, esse dá muito fruto; pois sem mim nada podeis fazer.” (Jo 15, 5).

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida, por guiar meus caminhos e confortar meu coração nos momentos difíceis. Tudo pertence a Ele, e sem Ele nada seria possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, por aceitar me orientar, por sua sabedoria e por me fazer enxergar os desafios de uma verdadeira pesquisa científica.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes, a qual foi responsável por “abrir as portas” ao mestrado. Por sempre estar disponível, pela confiança, carinho e atenção. Obrigada por todas as oportunidades que você me proporcionou.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Thereza Chaves, por ter me acolhido, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada pela paciência e por todos ensinamentos.

Aos meus companheiros de pesquisa: Augusto César Parreiras de Jesus, Ana Laura Grossi de Oliveira e Ygor Gabriel Fonseca, pela disposição em ajudar nos experimentos, por fazer os dias na UFMG mais leves, sem vocês não teria conseguido.

Aos meus colegas de trabalho do Grupo São Marcos Laboratório e do Grupo de Pesquisa ELSA Brasil, pela flexibilidade de horários e por entenderem o quanto importante era a realização deste trabalho.

As pessoas com doença de Chagas que contribuíram para essa pesquisa e me concederam o termo de consentimento para que fosse possível obter meus resultados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, e também ao CNPq pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Aos meus pais, por tudo que fizeram e fazem por mim. Pelo apoio, amor e confiança. E por serem, para mim, um exemplo de vida.

À minha irmã Camila, obrigada pelas orações, incentivos, bons exemplos e carinho, mesmo estando longe.

Ao meu irmão Rafael pela amizade, afeto, conselhos e companheirismo.

Ao João, pelas orações, alegria e paciência, por ter compreendido minhas dificuldades e por ter incentivado em todos os momentos. E a família Ribeiro Barbosa, pelo carinho e incentivo à pesquisa.

Aos meus avós, por estarem ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos da Paróquia SMMA, da Comunidade do Caminho Novo e as Carmelitas pelas orações, fraternidade, alegria e por fazerem desse caminho mais agradável.

Não confies em ti mesmo, mas põe em Deus tua esperança.

Imitação de Cristo

Nada é pequeno se feito com amor.

Santa Teresinha do Menino Jesus

RESUMO

Introdução: A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é responsável pela maior morbidade e pelo pior prognóstico da doença de Chagas, além de ser a mais fibrosante das cardiopatias. Na doença de Chagas, prever quais fatores se correlacionam com progressão da doença, morbidade e mortalidade constitui um desafio. Existe a necessidade de dispor de biomarcadores de risco simples, quantitativos e econômicos, que agreguem valor adicional aos métodos convencionais, auxiliando no diagnóstico e prognóstico de pacientes com CCC. **Objetivos:** Neste estudo, avaliamos os biomarcadores séricos – galectina-3 (Gal-3), metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2) e seus respectivos inibidores (TIMP-1 e TIMP-2), peptídeos C-terminal do colágeno (PICP e CTXI) e correlacionamos esses biomarcadores com o remodelamento cardíaco e com a fibrose miocárdica na CCC5, através de variáveis ecocardiográficas (VED, FEVE e relação E/e'). **Métodos:** Amostras de sangue de pacientes chagásicos nas formas indeterminada (FCI) e cardiomiopatia chagásica grau 5 (CCC5) e de indivíduos não infectados (NI) pelo *T. cruzi* foram utilizadas. A dosagem dos marcadores foi realizada pela técnica Luminex™ Xmap e por ELISA usando o kit Quantibody®. Para as análises de correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r) onde foi medido o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. **Resultados:** Os resultados mostraram maior concentração de MMP-9 entre FCI ($p < 0,001$) e CCC ($p < 0,05$) comparado a NI. Para TIMP-1, verificou-se maior concentração em FCI ($p < 0,05$) e CCC ($p < 0,05$) comparados a NI. Constatou-se maior concentração de MMP-2 confrontando CCC com FCI ($p < 0,01$). Igualmente, houve maior concentração de TIMP-2 em relação a CCC com FCI ($p < 0,001$). Não foi observada diferença estatística quanto à concentração de PICP e CTXI. E quanto à Gal-3, houve maior concentração em CCC5 ($n=50$) confrontados com FCI ($n=61$) ($p < 0,001$). Os dados também demonstraram uma correlação positiva entre MMP-2 e TIMP-2 ($r=0,7283$ e $p < 0,0001$) no grupo CCC5, uma correlação inversamente proporcional entre Gal-3 e FEVE ($r=-0,5961$ e $p < 0,01$) e correlação diretamente proporcional em pacientes com CCC5 ($r=0,6656$ e $p < 0,01$). **Conclusão:** Deste modo, nosso estudo concluiu que entre as moléculas avaliadas, a Gal-3 é um potencial marcador de remodelamento cardíaco e fibrose miocárdica na CCC5.

Palavras-chave: doença de chagas; cardiopatia chagásica crônica; remodelamento cardíaco; fibrose; biomarcadores.

ABSTRACT

Background: Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) is responsible for the highest morbidity and the worst prognosis for Chagas disease, in addition to being the most fibrous of heart diseases. In Chagas' disease, predicting which factors correlate with disease progression, morbidity and mortality is a challenge. There is a need to have simple, quantitative and economic risk biomarkers, which add additional value to conventional methods, assisting in the diagnosis and prognosis of patients with CCC.

Objectives: In this study, we evaluated serum biomarkers - galectin-3 (Gal-3), metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and their respective inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2), C-terminal collagen peptides (PICP and CTXI) and correlated these biomarkers with cardiac remodeling and myocardial fibrosis in CCC 5, through echocardiographic variables (VED, LVEF and E / e 'ratio). **Methods:** Blood samples from chagasic patients in the indeterminate form (FCI) and grade 5 chronic Chagas cardiomyopathy (CCC5) and from individuals not infected (NI) by *T. cruzi* were used. The dosage of the markers was performed by the Luminex TM Xmap technique and by ELISA using the Quantibody® kit. For correlation analysis, Pearson's correlation coefficient (r) was used where the degree of linear correlation between two quantitative variables was measured. **Results:** The results showed a higher concentration of MMP-9 between FCI (p <0.001) and CCC5 (p <0.05) compared to NI. For TIMP-1, there was a higher concentration in FCI (p <0.05) and CCC5 (p <0.05) compared to NI. A higher concentration of MMP-2 was found confronting CCC with FCI (p <0.01). Likewise, there was a higher concentration of TIMP-2 in relation to CCC5 with FCI (p <0.001). There was no statistical difference regarding the concentration of PICP and CTXI. As for Gal-3, there was a higher concentration in CCC (n = 50) compared to FCI (n = 61) (p <0.001). The data also demonstrated a positive correlation between MMP-2 and TIMP-2 (r = 0.7283 and p <0.0001) in the CCC5 group, an inversely proportional correlation between Gal-3 and LVEF (r = -0.5961 and p < 0.01) and directly proportional correlation in patients with CCC5 (r = 0.6656 and p <0.01). **Conclusion:** Thus, our study concluded that among the evaluated molecules, Gal-3 is a potential marker of cardiac remodeling and myocardial fibrosis in CCC 5.

Keywords: chagas disease; chronic chagasic heart disease; cardiac remodeling; fibrosis; biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Correlação fisiológica de marcadores envolvidos na formação de fibrose, dosados no soro neste estudo.	30
Figura 2	Correlação esperada entre os marcadores envolvidos no remodelamento cardíaco e a intensidade de fibrose miocárdica.	44
Gráfico 1	Concentração de MMP-2 e TIMP-2 em indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas Crônica.	58
Gráfico 2	Concentração de MMP-9 e TIMP-1 em indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas Crônica.	59
Gráfico 3	Correlação entre a concentração de MMP-2 e TIMP-2 em pacientes com cardiopatia chagásica crônica.	60
Gráfico 4	Concentração de PICP e CTXI em indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas Crônica.	61
Gráfico 5	Concentração de Gal-3 em indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas Crônica.	62
Gráfico 6	Correlação entre a concentração de Gal-3, FEVE e VEd em pacientes com cardiopatia chagásica crônica.	63
Gráfico 7	Correlação entre a concentração de PICP e EIE em pacientes com cardiopatia chagásica crônica.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação clínica das fases crônicas: indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.	23
Tabela 2	Características gerais dos estudos incluídos na revisão sistemática.	39
Tabela 3	Principais resultados dos estudos que avaliaram galectina-3 e fibrose miocárdica na cardiomiopatia chagásica crônica em humanos e camundongos.	40
Tabela 4	Definição das variáveis do estudo.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTXI	Telopectídeo C-terminal do colágeno tipo I
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
C-	Carbono
CCC	Cardiopatia chagásica crônica
CDI	Cardiodesfibrador implantável
CTR-DIP	Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas aguda
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiograma de repouso
EIE	Relação E/e'
ELFA	Teste fluorescente ligado a enzimas
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (teste de imunoabsorção enzimático)
<i>et al.</i>	<i>Et alia</i> , expressão em latim para “e outros/as”
FCCD	Forma clínica cardiodigestiva
FCD	Forma clínica digestiva
FCI	Forma clínica indeterminada
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico básico
FOXP3	Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras
g/ g/dL	Gramas/ gramas por decilitro
Gal-3	Galectina-3
Gli	Glicina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
Hyp	Hidroxirolina
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
MEC	Matriz extracelular
mL/ μ L	Mililitro/microlitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMP-1	Metaloproteinase tipo 1
MMP-2	Metaloproteinase tipo 2

MMP-3	Metaloproteinase tipo 3
MMP-7	Metaloproteinase tipo 7
MMP-8	Metaloproteinase tipo 8
MMP-9	Metaloproteinase tipo 9
MMP-10	Metaloproteinase tipo 10
MMP-12	Metaloproteinase tipo 12
MMP-13	Metaloproteinase tipo 13
MMP-14	Metaloproteinase tipo 14
MMP-15	Metaloproteinase tipo 15
MMP-16	Metaloproteinase tipo 16
MMP-17	Metaloproteinase tipo 17
MMPs	Metaloproteinases
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Ministério da Saúde
N-	Nitrogênio
NI	Não infectado
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
O.D.	Densidade ótica
°C	Graus celsius
OMS/ WHO	Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization
PICP	Propeptídeo C-terminal do colágeno tipo I
PIIICP	Propeptídeo C-terminal do colágeno tipo III
PINP	Propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo I
Pro	Prolina
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa quantitativa, seguida de PCR
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
T4	Tiroxina
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TIMP-1	Inibidor tecidual tipo 1 de metaloproteinase
TIMP-2	Inibidor tecidual tipo 2 de metaloproteinase
TIMP-3	Inibidor tecidual tipo 3 de metaloproteinase
TIMP-4	Inibidor tecidual tipo 4 de metaloproteinase
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Fator de necrose tumoral)
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEd	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 <i>Trypanosoma cruzi: biologia e transmissão</i>	19
2.2 <i>A doença de Chagas</i>	21
2.2.1 <i>Cardiopatia chagásica crônica</i>	24
2.3 <i>Remodelamento cardíaco e Fibrose miocárdica</i>	25
2.3.1 <i>Elementos fibrilares da matriz extracelular</i>	25
2.3.2 <i>Remodelamento da matriz extracelular cardíaca</i>	26
2.4 <i>Marcadores de fibrose cardíaca</i>	28
2.4.1 <i>Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs)</i>	30
2.4.2 <i>Peptídeos de síntese e degradação do colágeno tipo 1</i>	33
2.4.3 <i>Galectina-3</i>	36
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 <i>Objetivo geral</i>	46
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	46
4. MÉTODOS.....	48
4.1 <i>Delineamento do estudo</i>	48
4.2 <i>Considerações éticas</i>	48
4.3 <i>População estudada</i>	48
4.4 <i>Dosagem dos marcadores</i>	51
4.4.1 <i>Dosagem da Gal-3 e PICP</i>	51
4.4.2 <i>Dosagem de CTXI</i>	52
4.4.3 <i>Dosagem de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-1</i>	53
4.5 <i>Variáveis clínicas e ecocardiográficas</i>	54
4.6 <i>Cálculo amostral e análises estatísticas</i>	56
5. RESULTADOS	58
<i>PARTE I. Dosagem das concentrações de MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, PICP, CTXI e Gal-3 no soro dos grupos NI, FCI E CCC5</i>	58
<i>PARTE II. Análise de correlação de causa-efeito entre os marcadores sorológicos MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, PICP, CTXI e Gal-3 e os marcadores ecocardiográficos VEd, FEVE E EIE</i>	63
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÃO	74
9. REFERÊNCIAS	75
10. ANEXOS	87
11. APÊNDICE	98

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é, ainda hoje, um dos principais problemas médico-sociais do Brasil. Entre seus aspectos mais intrigantes, destaca-se a evolução clínica variável em indivíduos cronicamente infectados. Enquanto a grande maioria dos pacientes na fase crônica permanece assintomática, por longos períodos, cerca de um terço dos pacientes infectados desenvolve alterações cardíacas, caracterizadas por lesões teciduais de intensidade variável no coração e especialmente associadas à morbidade e mortalidade da doença.

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) apresenta diversas peculiaridades que a distinguem das demais miocardites, de etiologias diversas. Dentre elas, ressaltam-se o pior prognóstico, a maior expressão e complexidade das arritmias, a elevada incidência de fenômenos tromboembólicos, assim como de morte súbita, seu caráter inflamatório e fibrosante contínuo e progressivo e a vulnerabilidade e fragilidade da população mais acometida por ela.

Além de sua importância médico-social, a CCC constitui modelo importante para estudo da fibrogênese e alterações da matriz extracelular, do remodelamento cardíaco, da gênese e controle das arritmias cardíacas, para estratificação de risco de morte súbita, escolha racional de candidatos a implante de marca-passo e desfibriladores e para otimização do tratamento da insuficiência cardíaca e anticoagulação.

A expectativa é que este trabalho permita esclarecer aspectos importantes a partir do estudo de biomarcadores séricos associados à fibrogênese e alterações da matriz extracelular e do remodelamento cardíaco na CCC.

A disfunção cardíaca é a principal implicação do processo de remodelamento, que constitui um substrato fisiopatológico para o aparecimento e para a progressão da disfunção ventricular. Essa interação inicia-se com alterações genéticas em resposta a uma agressão ao coração, com reexpressão de genes do período fetal.

Consequentemente, surgem alterações celulares e moleculares cardíacas, que resultam em perda progressiva da função ventricular, em princípio assintomática, evoluindo posteriormente com os sinais e sintomas característicos da insuficiência cardíaca.

Apesar do consenso de que a remodelagem ventricular resulta em deterioração da função ventricular, os mecanismos para esse fenômeno ainda não estão completamente esclarecidos.

A proposição central deste trabalho é avaliar o nível dos biomarcadores séricos relacionados com o processo de fibrogênese tais como: galectina-3, peptídeos marcadores do metabolismo do colágeno, derivados tanto da sua síntese (propeptídeo C-terminal do colágeno tipo I [PICP],) quanto de sua degradação (telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I [CTXI]), metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 e seus respectivos inibidores, TIMP-1 e TIMP-2, em pacientes com a forma crônica indeterminada (FCI) e com cardiopatia chagásica grau 5 (CCC5) assim como em indivíduos não infectados pelo *T. cruzi* (NI). Além disso, pretende-se avaliar a associação entre níveis séricos desses biomarcadores com variáveis ecocardiográficas de disfunção ventricular sistólica (VEd e FEVE) e disfunção diastólica (relação E/e'), relacionadas ao processo de remodelamento cardíaco e de fibrose miocárdica nos pacientes com a FCI e CCC.

Sabe-se que a CCC é a miocardite mais fibrosante de todas as cardiopatias conhecidas e que a extensão da fibrose correlaciona-se diretamente com o estágio de evolução da doença e com a classe funcional. Assim, a hipótese deste estudo é que os biomarcadores sorológicos (MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, PICP, CTXI e Gal-3), que estão envolvidos com o remodelamento cardíaco e com a fibrose miocárdica, correlacionam-se diretamente com a extensão de fibrose na doença e que sejam relacionados com os marcadores ecocardiográficos, já utilizados na clínica médica.

A definição de marcadores não invasivos para pior prognóstico poderá possibilitar a identificação de subgrupos de pacientes que mereçam atenção médica especial, adotando-se condutas médico-trabalhistas e terapêuticas específicas, visando prevenir ou retardar a evolução clínica desfavorável desses pacientes. Isto só será possível devido às características translacionais deste estudo.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Trypanosoma cruzi*: biologia e transmissão

Descoberta em 1909, pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, a doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, de natureza endêmica e evolução crônica. Carlos Chagas foi protagonista de um fato inédito na medicina mundial, já que ele foi o responsável por descrever todo o ciclo da doença, agente infeccioso, reservatórios naturais e inseto transmissor.

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela contendo DNA e localizada na mitocôndria (BRENER, 1973).

O *T. cruzi* não se caracteriza por uma população homogênea, sendo constituído por diferentes cepas que circulam, na natureza, entre o homem, vetores, animais domésticos e reservatórios silvestres (BRENER, 1973).

O ciclo biológico do *T. cruzi* inicia-se no hospedeiro invertebrado quando a forma tripomastigota sanguínea é ingerida pelo triatomíneo no momento do seu repasto sanguíneo. No trato digestivo, as formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas que se multiplicam por fissão binária e se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, na porção posterior do tubo digestivo. Essas formas, quando liberadas junto às fezes, infectam o hospedeiro vertebrado através de mucosas íntegras ou lesões na pele. Posteriormente, as tripomastigotas metacíclicas penetram por endocitose em vários tipos de células, tanto nas fagocitárias quanto nas não fagocitárias. Em seguida, modificam-se em amastigotas, que conseguem escapar do vacúolo parasitóforo, para o citoplasma das células hospedeiras. Após cerca de 35 horas, inicia-se um processo de divisão binária que pode durar vários dias, dependendo da característica da cepa de *T. cruzi* e da célula parasitada. Em torno de cinco dias, começa um processo no qual as formas amastigotas se transformam em tripomastigotas e rompem a célula hospedeira, podendo infectar novas células ou permanecer na corrente sanguínea, e iniciam novo ciclo biológico, quando ingeridas pelo vetor (BRENER, 1973).

As formas de transmissão da doença de Chagas para o homem são: a vetorial, a transfusional, a transplacentária (congenita) e, a transmissão pela via oral, ou seja, pela ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*. Mecanismos de transmissão menos

comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos e aleitamento materno (COURA, 2015).

Segundo o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, no Brasil (2019) predominam os casos crônicos. Estima-se que existam entre dois e três milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda tem sido observada em diferentes estados, em especial na região da Amazônia Legal, principalmente, em decorrência da transmissão oral.

A transmissão vetorial é o mecanismo primário de difusão da doença de Chagas. São mais de cem espécies de vetores responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi*. A maioria das espécies de vetores conhecidas vive no meio silvestre, associadas a uma diversidade de fauna e flora. No entanto, uma espécie hoje considerada exclusivamente silvestre, pode tornar-se domiciliada se as condições em que vive forem alteradas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Outra importante via de propagação da doença nos centros urbanos é a transmissão transfusional, sendo considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (Canadá, Espanha, Estados Unidos e outros) e em países latino-americanos que estejam em processo de controle da transmissão vetorial. No Brasil, devido à efetividade do controle dos serviços de hemoterapia e, conseqüentemente, maior qualidade do sangue para transfusão, tem-se alcançado significativo controle da transmissão transfusional do *T. cruzi* (COURA, 2015).

A via de transmissão transplacentária pode ocorrer em qualquer fase da doença materna: aguda ou crônica. A transmissão também pode se dar em qualquer época da gestação, sendo mais provável no último trimestre, ou ocorrer na passagem no canal do parto, pelo contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A transmissão do *T. cruzi* por via oral dá-se por meio da ingestão de alimentos contaminados acidentalmente com o parasito, seja o triatomíneo ou suas fezes. Também pode ocorrer por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida de caça ou alimentos contaminados pela secreção das glândulas anais de marsupiais infectados. Ocorre em locais definidos, em um determinado tempo, por diferentes tipos de alimentos, geralmente, encontrando-se vetores ou reservatórios infectados nas imediações da área de produção, manuseio ou utilização do alimento contaminado. Em grande parte dos casos, tem como possível fundamentação o consumo de alimentos contaminados pela

não adoção de boas práticas de higiene na manipulação dos alimentos e pela invasão humana de habitat silvestres (COURA, 2015).

2.2 A doença de Chagas

Mais de cem anos após a grande descoberta de Carlos Chagas, a doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, permanece como um importante problema de saúde pública, sustentando elevados índices de morbidade e mortalidade na América Latina (MARIN-NETO *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente oito milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 mortes por ano (WHO, 2019). No Brasil, atualmente, predominam os casos crônicos decorrentes de infecção por via vetorial, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada em diferentes estados, em especial, na região da Amazônia Legal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Com base nas características do quadro clínico do hospedeiro infectado, a DC pode apresentar as fases aguda e crônica. A fase aguda se estabelece logo após a infecção e geralmente, se caracteriza por apresentar elevados níveis de parasitemia e parasitismo tissular (GOMES *et al.*, 2009). Clinicamente, na maioria dos casos os sintomas são ausentes ou leves e inespecíficos. Em menos de 50% das pessoas infectadas por um inseto triatomíneo, os primeiros sinais visíveis característicos do hospedeiro podem ser uma lesão cutânea ou um inchaço das pálpebras dos olhos. Além disso, podem apresentar febre, dor de cabeça, glândulas linfáticas aumentadas, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica (WHO, 2019). Nesta fase, os sinais e sintomas podem desaparecer espontaneamente evoluindo para a fase crônica ou progredir para formas agudas graves que podem levar ao óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A fase crônica que acompanha a resolução da infecção aguda é caracterizada por níveis de parasitas circulantes muito baixos (CAMARGO & TAKEDA, 1979; BRENER, 1980; FRASH & REYS, 1990), os quais são detectáveis através de exames laboratoriais mais complexos. Os indivíduos na fase crônica podem ser classificados como pertencentes às formas clínicas: indeterminada (FCI), cardíaca (CCC), digestiva (FCD) ou cardiodigestiva (FCCD). Os pacientes com FCI correspondem a cerca de 60-70% dos indivíduos infectados, sendo assim classificados por apresentarem exames

parasitológicos e imunológicos positivos para o *T. cruzi*, sem quadro sintomatológico próprio da doença, e com resultados de eletrocardiograma de repouso (ECG), estudos radiológicos de tórax, esôfago e cólon normais (RIBEIRO E ROCHA, 1998). No entanto, exames adicionais e mais sensíveis para demonstração de acometimento cardíaco (ecocardiograma, teste ergométrico, Holter) podem evidenciar nesses pacientes algumas alterações e anormalidades, geralmente discretas, que podem significar tanto um processo evolutivo em marcha como apenas resquícios de processo agudo ou crônico inicial já cicatrizado e sem progressão clínica ou anatômica (ROCHA, RIBEIRO E TEIXEIRA, 2003). Acredita-se que cerca de 2 a 5% dos pacientes apresentando a FCI irão desenvolver a forma clínica cardíaca a cada ano, enquanto um menor percentual irá apresentar a forma clínica digestiva (megacólon e/ou megaesôfago) (DIAS, 1989). Aproximadamente 20% - 30% dos pacientes podem apresentar a forma clínica cardíaca, que inclui amplo espectro de manifestações, desde a presença de anormalidades subclínicas, registradas apenas em exames complementares sofisticados, até formas graves, como a insuficiência cardíaca refratária, tromboembolismo, arritmias complexas e morte súbita. O fator prognóstico mais importante na CCC é a disfunção sistólica global do ventrículo esquerdo. Uma nova classificação para insuficiência cardíaca, considerando-se a função sistólica ventricular esquerda, obtida através do ecocardiograma, foi adotada nos Consensos Brasileiro e Latinoamericano de Insuficiência Cardíaca. Essa classificação mostrou-se de grande utilidade quando aplicada à CCC, permitindo a identificação de subgrupos distintos do ponto de vista prognóstico e terapêuticos (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

A classificação clínica publicada por ROCHA *et al.* (2005) baseia-se na verificação do grau de acometimento cardíaco por intermédio de técnicas padrão (ECG e radiografia do tórax) e técnicas mais sensíveis (ecocardiográfica Doppler, Holter, teste ergométrico e cintilografia miocárdica). A infecção chagásica pode, ainda, gerar em 5 a 10% dos pacientes, alterações anatômicas e funcionais do trato gastrointestinal, como denervação da musculatura lisa da parede do tubo digestório, dificuldades na deglutição e defecação, além de processos de dilatação de estruturas esofagianas e intestinais (megas), caracterizando a forma clínica digestiva (KOBBERLE, 1968; MACEDO, 1982; DEFARIA, REZENDE E RASSI, 1988). Finalmente, à forma clínica cardiodigestiva, associam-se alterações dos sistemas digestório e cardiovascular (MACEDO *et al.*, 1982; DIAS, 1989; RASSI E MARIN-NETO, 2010) (Tabela 1).

TABELA 1 - Classificação clínica das fases crônicas: indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

Grupo clínico	Caracterização
FCI	Assintomático, sem alterações significantes ao exame físico, ECG, radiografia de tórax, esofagograma e enema baritado. Sem alterações na avaliação por técnicas mais sensíveis (ecocardiograma, teste ergométrico e holter).
CCC1	Assintomático, sem alterações significantes ao exame físico, ECG, radiografia de tórax, esofagograma e enema baritado. Técnicas sensíveis são capazes de detectar anormalidades cardíacas de gravidade variável: Holter (extrassístolia ventricular complexa ou isolada frequente, bloqueios AV e IV intermitentes); teste ergométrico (extrassístolia ventricular esforço induzida, queda na pressão arterial); ecocardiograma (aneurisma, disfunção diastólica, hipocontratilidade segmentar ou global, aumento das cavidades).
CCC2	Pacientes sem manifestação de insuficiência cardíaca ou em classe funcional II de NYHA e sem aumento da silhueta cardíaca. Apresentam alterações eletrocardiográficas leves como transtornos da condução intraventricular do estímulo, HBAE, alterações difusas da repolarização ventricular.
CCC3	Pacientes sem manifestação de insuficiência cardíaca ou em classe funcional II de NYHA e sem aumento da silhueta cardíaca. Podem ter distúrbios de condução avançados, como BCRD, associado ou não a HBAE, BCRE, BAV do segundo grau Mobitz tipo I ou II, BAVT, além de ondas Q anormais, ondas T simétricas difusamente negativas, podendo haver associação com extrassístolia ventricular leve a moderada. Os transtornos de condução de estímulo dominam a apresentação clínica.
CCC4	Como no grupo anterior, pacientes não mostram sinais de aumento cardíaco. Porém, os desse grupo exibem extrassístoles ventriculares frequentes, complexas, que dominam a apresentação clínica.
CCC5	Pacientes com sinais clínicos radiológicos e, principalmente, ecocardiográficos de aumento cardíaco, com disfunção da contratilidade ventricular global, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca.

Legenda: AV atrioventricular; BAV: Bloqueio atrioventricular; BAVT: Bloqueio atrioventricular total; BCRD: Bloqueio completo de ramo direito; BCRE: Bloqueio completo de ramo esquerdo; HBAE: Hemibloqueio anterior esquerdo; IV: Intraventricular; NYHA: *New York Heart Association* Fonte: ROCHA, RIBEIRO e TEIXEIRA (2003).

2.2.1 *Cardiopatía chagásica crônica*

A CCC é a forma clínica mais importante da doença de Chagas, em virtude de sua alta morbidade e mortalidade e, conseqüentemente, de seu elevado impacto social e médico (ROCHA *et al.*, 2003, ANDRADE *et al.*, 2011, RIBEIRO *et al.*, 2012, NUNES *et al.*, 2013). A CCC apresenta curso evolutivo caracteristicamente lento e progressivo, embora às vezes possa ter evolução rápida. Suas manifestações clínicas variam desde quadros assintomáticos até apresentações graves com insuficiência cardíaca, arritmias de tipos e gravidades variáveis, bloqueios de condução do estímulo elétrico, tromboembolismo, acidente vascular isquêmico e morte súbita que, eventualmente, pode constituir sua primeira manifestação (CHAGAS *et al.*, 1922, PRATA *et al.*, 1986, RASSI *et al.*, 2001, ROCHA *et al.*, 2003, ROCHA *et al.*, 2007, RIBEIRO *et al.*, 2012, NUNES *et al.*, 2013).

A cardiomiopatia chagásica, que implica na presença de dilatação e disfunção ventricular global, é a que mais frequentemente leva à morte súbita, à remodelagem miocárdica e à falência ventricular mais grave, quando comparada com outras cardiopatias (BESTETTI *et al.*, 1997). A morte súbita é responsável por 50% a 65% dos óbitos por DC, a insuficiência cardíaca por 25% a 30% e os fenômenos tromboembólicos por 10% a 15% (RASSI *et al.*, 2001).

A fisiopatologia da CCC e conseqüente insuficiência cardíaca não parecem diferenciar-se das formas de miocardiopatia idiopática ou isquêmica, sob os aspectos hemodinâmicos, neuro-hormonais e inflamatórios (BESTETTI *et al.*, 1997, HIGUCHI *et al.*, 2003). Normalmente, julga-se que, com base nessas premissas, os resultados dos grandes ensaios clínicos em insuficiência cardíaca podem ser extrapolados a todos aqueles portadores de miocardiopatia, inclusive os chagásicos. Ainda assim, mesmo que se admita semelhança fisiopatológica entre a miocardiopatia chagásica com as outras formas de miocardiopatia, sabe-se que a forma cardíaca da DC apresenta peculiaridades patogênicas. Dentre elas, observa-se intensa e extensa inflamação e fibrose, disfunção autonômica com várias formas de bloqueio átrio-ventricular e intraventricular, autoimunidade com produção de anticorpos dirigidos a miócitos, receptores beta-adrenérgicos e neurônios, tornando-a singular e merecedora de análise particularizada (BOGLIOLO, 1976).

A CCC é a miocardite mais comum em todo mundo (FELDMAN *et al.*, 2003). É também a mais fibrosante das miocardites conhecidas, apresentando especificidades

importantes e caracterizando-se por intensidade variável de inflamação focal, composta de células linfomononucleares, desarranjo estrutural, hipertrofia, dilatação e intensa fibrose reativa e reparativa (BOGLIOLO, 1976).

Um dos substratos arritmogênicos no pacientes com CCC é a presença de lesões necróticas e fibróticas, provocadas pelo processo inflamatório do miocárdio. As lesões também se associam à deficiência de fluxo sanguíneo, secundária às lesões microvasculares ou alterações autonômicas que regulam a perfusão sanguínea do miocárdio lesado (BESTETTI *et al.*, 1997). As lesões ocasionadas pelo processo inflamatório causam diminuição nas junções comunicantes intercelulares que, associadas às alterações dos potenciais elétricos, comprometem a condução do estímulo entre as células. Essas alterações geram um desacoplamento elétrico, que resulta em condução lenta do estímulo e bloqueio unidirecional que, associados às áreas fibróticas, formam o circuito de reentrada para a gênese das arritmias ventriculares (DE CARVALHO *et al.*, 1992, MARIN-NETO *et al.*, 1992).

2.3 Remodelamento cardíaco e fibrose

2.3.1 Elementos fibrilares da matriz extracelular

O tecido conjuntivo é uma estrutura biológica complexa, constituído por células e uma rica matriz extracelular formada por uma variedade de componentes químicos que confere a característica funcional do tecido. As células podem ser “nativas” (como fibroblastos, condrócitos, osteócitos) ou relacionadas às atividades inflamatória e imunológica (como leucócitos, macrófagos, mastócitos). Os principais componentes da matriz extracelular são moléculas de colágeno (na sua forma fibrilar e não fibrilar), proteoglicanos, ácido hialurônico, fibras do sistema elástico, glicoproteínas adesivas, além de água de solvatação e minerais (PARRY E CRAIG, 1988).

A matriz extracelular foi considerada, por muito tempo, como uma rede fibrosa inerte. No entanto, além de fornecer o suporte estrutural para os órgãos a matriz constitui importante meio pelo qual transitam informações entre as células, participando direta ou indiretamente de uma série de processos que incluem morfogênese, diferenciação e migração celulares. A matriz extracelular não só promove a organização adequada e a integridade dos tecidos, mas também facilita suas funções básicas e modula a resposta frente a estímulos patológicos (BOWERS *et al.*, 2010).

O tecido conjuntivo também participa ativamente nos processos de reparo e fibrose, nos quais ocorrem interações dinâmicas e complexas entre os elementos matriciais. As diversas concentrações e associações dos componentes da matriz extracelular resultam em adaptações específicas às necessidades funcionais em cada órgão e cada componente participa na construção de uma matriz perfeitamente talhada para as necessidades individuais de determinado órgão, permitindo a manutenção da homeostase, a diferenciação em cada estágio do desenvolvimento e adaptações frente a novos estímulos (MONTES, 1996).

No caso do coração, a eficiência mecânica do miocárdio depende das propriedades contráteis dos cardiomiócitos envolvidos por uma matriz extracelular que possui características próprias de resistência mecânica e resiliência (WILSON E SPINALE, 2001).

Os principais componentes da matriz extracelular cardíaca são: 1) proteínas estruturais, como colágeno tipos I e III (predominantes), elastina, fibrilina; 2) proteínas adesivas como colágeno IV e VI, laminina, fibronectina; 3) proteoglicanos.

A habilidade de sintetizar os componentes da matriz extracelular difere entre as células do coração: cardiomiócitos e células endoteliais produzem colágenos tipos IV e VI, laminina e perlecan, enquanto fibroblastos produzem colágenos tipos I e III, fibronectina, proteoglicanos, metaloproteinases e seus inibidores (CORDA *et al.*, 2000; JANICKI E BROWER, 2002).

Os fibroblastos, responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular, são as células mais prevalentes do coração, enquanto que os cardiomiócitos (que são as células mais importantes do ponto de vista funcional) representam apenas um terço do número total das células.

2.3.2 Remodelamento da matriz extracelular cardíaca

A fibrose no miocárdio, devido à deposição exagerada de fibras de colágeno tipos I e III, é achado reconhecido na hipertrofia cardíaca hipertensiva. Este tipo de fibrose resulta de alterações complexas nos mecanismos que controlam o metabolismo do colágeno em fibroblastos e em miofibroblastos sob a influência de fatores profibróticos (MISHRA, 2013).

A fibrose desempenha papel duplo no remodelamento cardíaco após lesão. Por um lado, é pré-requisito para o reparo de danos teciduais, por outro, contribui para a dilatação ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Em um órgão que

sofreu lesão, os *debris*, restos celulares, são substituídos por células do mesmo tipo (regeneração) ou por células do parênquima. Em mamíferos adultos, a regeneração cardíaca geralmente é insuficiente, pois os cardiomiócitos são células com capacidade de proliferação reduzida. Em consequência, o miocárdio não sofre regeneração funcional, ocorrendo formação de cicatriz. Estabelecido este quadro, o processo de cicatrização acaba se tornando prejudicial em longo prazo. A baixa capacidade regenerativa das células musculares em situações de demanda aumentada e/ou perda celular é compensada, em parte, pelo aumento global da dimensão e estrutura do órgão, resultando em disfunção progressiva e falência do coração. Além disso, na fibrose cardíaca, o colágeno fibrilar ocupa o espaço das células perdidas, servindo como tecido de substituição. Além da deposição de colágeno como resposta de cicatrização (fibrose reparativa), também ocorre aumento na deposição de colágeno na área de lesão como, por exemplo, um infarto, levando à fibrose reativa (KANIA *et al.*, 2000).

A fibrose também exerce impacto desfavorável nas propriedades elétricas cardíacas, além de efeitos sobre as propriedades mecânicas do miocárdio. Primeiramente, o aumento do conteúdo da matriz extracelular cardíaca resulta em maior rigidez mecânica e contribui para a disfunção diastólica. O aumento progressivo na fibrose pode causar disfunção sistólica e hipertrofia ventricular esquerda. Em segundo lugar, o aumento de colágeno interrompe a conectividade entre cardiomiócitos e fornece um substrato de re-entrada para a arritmogênese. E por fim, a fibrose perivascular ao redor das arteríolas intracoronárias prejudica o aporte de oxigênio e reduz a reserva coronária, exacerbando a isquemia. Nesse contexto, a insuficiência cardíaca caracteriza-se pela heterogeneidade na gravidade e progressão da doença, mesmo em casos com a mesma etiologia, o que por conjectura reflete em influências ambientais e de polimorfismo genético individual dos pacientes.

Na CCC, assim como em outras cardiopatias inflamatórias dilatadas, a fibrose ocorre em consequência da infiltração maciça e constante de células inflamatórias no miocárdio (MARIN-NETO *et al.*, 2007; CUNHA-NETO E CHEVILLARD, 2014). Este processo é mediado por citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento que regulam a migração, proliferação e diferenciação celular, assim como a produção e degradação de diferentes componentes de matriz extracelular.

A produção da citocina fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) em áreas próximas a lesões pode contribuir para a hipertrofia de miócitos e para a deposição de matriz extracelular (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2008). Também foi observado papel

importante da interleucina 1 beta (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na insuficiência cardíaca, por promover a hipertrofia do miocárdio e induzir a apoptose dos cardiomiócitos, possivelmente por seu envolvimento na inflamação e na indução de metaloproteinases (MMPs) (BUJAK E FRANGOIANNIS, 2009).

2.4 Marcadores de remodelamento cardíaco e fibrose

Os biomarcadores são moléculas que podem ser mensuradas de forma objetiva e fazem parte de um processo biológico ou patológico. Para serem usados na prática clínica, os biomarcadores devem atender a três critérios básicos: dosagens de boa acurácia, preço aceitável e ampla disponibilidade. Eles devem ser capazes de acrescentar informações úteis ao exame clínico detalhado e ajudar no processo de decisão clínica (YILMAZ *et al.*, 2011).

Atualmente, existem muitas pesquisas a procura de biomarcadores de prognóstico e de estratificação de risco ideais para a insuficiência cardíaca. Por exemplo, o aumento do peptídeo natriurético cerebral (BNP) relaciona-se com maior gravidade da insuficiência cardíaca, sendo que diversos estudos mostraram que níveis elevados desse peptídeo se relacionam com prognóstico adverso (BRAUNWALD, 2008).

Na DC, entretanto, pouco se sabe sobre marcadores que podem auxiliar na determinação do prognóstico de pacientes com CCC e que sejam de riscos simples, quantitativos e econômicos, que agreguem valor adicional aos métodos convencionais.

Na CCC, assim como em outras formas de cardiopatia, algumas variáveis, como a classe funcional, disfunção ventricular direita, o diâmetro ventricular, a FEVE, a relação E/e', a medida direta do consumo de oxigênio (VO₂), o tempo de exercício e nível do BNP, podem afetar o prognóstico (NUNES *et al.*, 2010, SILVA *et al.*, 2008, VIOTTI *et al.*, 2005, BESTETTI *et al.*, 1997).

Ademais, para o diagnóstico precoce da CCC, um dos principais métodos utilizados é a ressonância magnética cardíaca, que pela detecção de áreas de realce tardio indicativos de fibrose, permite a estratificação mais precisa dos estágios de gravidade (ROCHITTE *et al.*, 2005). A extensão da fibrose correlaciona-se diretamente com o estágio de evolução da doença e com a classe funcional e, inversamente, com a FEVE, contribuindo para a estratificação prognóstica na CCC (ROCHITTE *et al.*, 2005). Também se emprega, no estabelecimento de prognóstico, a avaliação da função biventricular pela angiocardiografia nuclear, a eletrocardiografia dinâmica (Holter) e os

testes ergométrico e cardiopulmonar, que embora tenha uma utilidade limitada para o esclarecimento de dor torácica no paciente chagásico, são úteis para a detecção e o prognóstico de arritmias induzidas por esforço dos pacientes com CCC (VIOTTI *et al.*, 2006, PEDROSA *et al.*, 2004).

Devido à pouca disponibilidade desses métodos diagnósticos e os seus custos elevados, têm-se buscado novos marcadores de risco, mais baratos, pouco invasivos e de fácil realização. Observações clínicas e experimentais sugerem que marcadores sorológicos bioquímicos do metabolismo de colágeno correlacionam-se significativamente com fibrose miocárdica (Figura 1). Assim, concentrações séricas desses marcadores poderiam ser empregadas como marcadoras da formação e degradação da fibrose miocárdica (SCHWARTZKOPFF *et al.*, 2002; TIMONEN *et al.*, 2008).

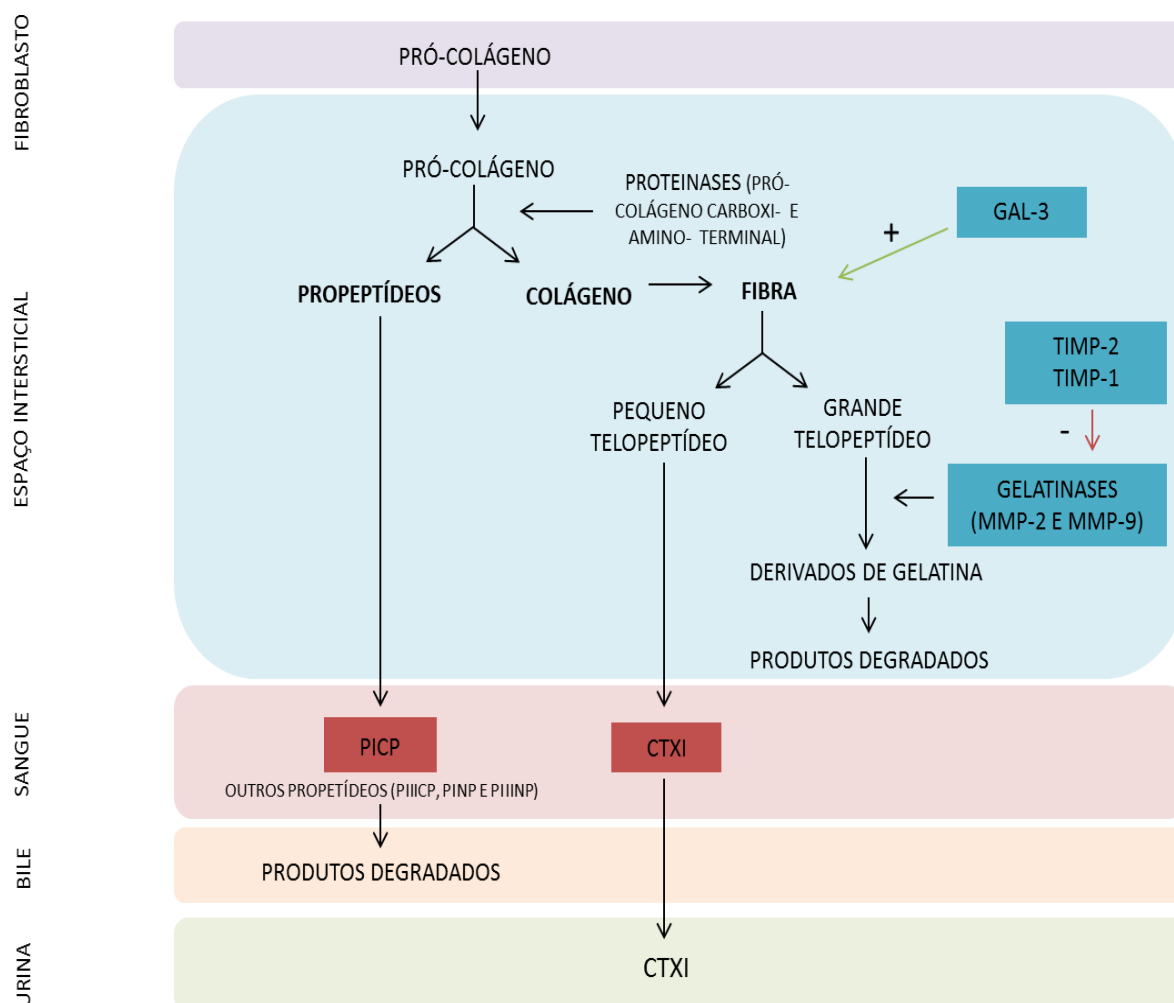


Figura 1: Correlação fisiológica de marcadores envolvidos no remodelamento cardíaco. PICP, propeptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I; CTXI, telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I; MMP-2, metaloproteinase tipo 2; MMP-9, metaloproteinase tipo 9; TIMP-2 e TIMP-1, inibidores específicos de metaloproteinases; Gal-3, galectina-3. Adaptado de Chalikias e Tziakas, 2015.

2.4.1 Metaloproteinases da Matriz Extracelular

a. Metaloproteinases e suas funções no remodelamento cardíaco

As metaloproteinases (MMPs) são uma grande família de proteinases (24) secretadas por fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, macrófagos, leucócitos, células musculares e epiteliais, etc. Sua atividade é dependente de zinco e sua função é catalizar a degradação dos componentes da matriz extracelular, assim como ativar fatores de crescimento latentes, receptores de membrana e moléculas de adesão.

A degradação regulada da matriz extracelular está envolvida em muitos processos, tais como cicatrização, remodelamento tecidual, angiogênese e desenvolvimento embrionário. Por outro lado, o excesso de atividade de MMP está presente em diversas doenças, como a artrite reumatóide, osteoartrite, câncer, doenças autoimunes e cardiovasculares.

Estão incluídas nesta família de proteínas as collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), as estromelisinases (MMP-3, MMP-10), as gelatinases (MMP-2, MMP-9), matrilisina (MMP-7), as MMP de macrófagos (MMP-12) e as MMPs de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17).

Essas enzimas são reguladas por outra classe de proteínas denominadas inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (ASHWORTH *et al.*, 1999).

Algumas MMPs, como MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-13 têm atividade elastolítica (REYNOLDS e MEIKLE, 1997) e, com exceção da MMP-9, degradam também as microfibrilas associadas à elastina (ASHWORTH *et al.*, 1999).

A matriz extracelular cardíaca é uma estrutura dinâmica cujos componentes protéicos são mantidos por um delicado controle homeostático que preserva a geometria e a integridade cardíacas. Assim sendo, diferentes MMPs que estimulam ou inibem a degradação da matriz desempenham importante papel no remodelamento cardíaco em condições normais e patológicas (CHAKRABORTY E EGHBALI, 1989).

Há diversos mecanismos teciduais desencadeantes da atividade das MMPs e TIMPs no coração: efetores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, fatores de crescimento como IGF, TGF- β e FGF-2 e citocinas, como TNF-alfa (FEDAK *et al.*, 2005, SPINALE, 2007).

Diferentes MMPs desempenham importante papel no remodelamento cardíaco em condições normais e patológicas (CHAKRABORTY E EGHBALI, 1989). Assim sendo, o desenvolvimento de fibrose cardíaca está associado a mudanças na concentração e estado de ativação de MMPs.

O desequilíbrio entre MMPs e TIMPs na insuficiência cardíaca favorece a degradação do colágeno estável e contribui para a perda de tônus e dilatação da parede ventricular. Além disso, o estímulo para a degradação da matriz desestabiliza as vias de sinalização mediadas por integrinas, comprometendo a função dos cardiomiócitos.

As MMPs são capazes de degradar componentes protéicos da matriz extracelular cardíaca e, por isso, participam de uma variedade de processos fisiológicos como angiogênese, reparação tecidual, morfogênese, mobilização de células tronco e

cicatrização de feridas (NAGASE *et al.*, 2006; GEURTS *et al.*, 2012). Durante esses processos fisiológicos, a atividade das MMPs está sob um estreito controle combinando ativação e inibição. Os níveis de expressão das MMPs são precisamente regulados por fatores genéticos e epigenéticos, bem como no nível pós-transcricional por hormônios, fatores de crescimento, citocinas e interações célula-célula e célula-matriz, podendo ser reguladas, também, por inibidores fisiológicos endógenos (KUPAI *et al.*, 2010; GEURTS *et al.*, 2012).

O aumento de colágeno sintetizado resultante do remodelamento promove um aumento da rigidez do miocárdio. Levando-se em consideração a relação estreita e a interação entre o colágeno e as células musculares cardíacas, o acúmulo de colágeno aumenta a carga das células musculares. Quando em excesso, o colágeno impede que as forças de tração alcancem adequadamente os cardiomiócitos envolvidos pelo tecido fibrótico, o que promove a atrofia celular. Este pode ser um dos mecanismos que explicam a insuficiência cardíaca relacionada à fibrose miocárdica (JALIL *et al.*, 1989).

O aumento relativo da concentração de colágeno do tipo I também contribui para a diminuição da capacidade elástica do coração, uma vez que o colágeno III, que normalmente prevalece ao redor dos cardiomiócitos no endomísio, forma fibras mais finas, mais flexíveis (fibras reticulares) e com maior interação com os proteoglicanos, proporcionando grande parte das propriedades mecânicas do coração normal (SOUZA, 2002).

b. *Papel das metaloproteinases da matriz extracelular na doença de Chagas*

As MMPs exercem papel importante nas doenças causadas por protozoários (GEURTS *et al.*, 2012). GUTIERREZ *et al.*, (2008) mostraram que camundongos infectados pelo *T. cruzi* tratados com inibidores de MMP-2 e MMP-9 apresentam decréscimo significativo na inflamação cardíaca e aumento da sobrevida, além de níveis reduzidos de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico (NO). Esses autores sugerem que as MMP-2 e 9 seriam importantes na indução da miocardiopatia na infecção pelo *T. cruzi*, possivelmente devido à migração de células inflamatórias para o coração.

Apesar de a infecção pelo *T. cruzi* induzir uma redução das formas latentes e ativas da MMP-9 em hepatócitos *in vitro*, tanto MMP-2 como MMP-9 são induzidas pelo *T. cruzi* em culturas de cardiomiócitos (GEURTS *et al.*, 2012).

FARES *et al.*, (2013) demonstraram que níveis séricos de MMP-9 associam-se com a morbidade cardíaca na doença de Chagas. O rompimento da arquitetura da matriz extracelular, com o deslocamento de células inflamatórias para o foco inflamatório, tem sido apontado como principal mecanismo pelo qual MMP-2 e MMP-9 contribuem para a patogênese da miocardite chagásica (GUTIERREZ *et al.*, 2008). Entretanto, esse mecanismo não está totalmente esclarecido. Diante do exposto, parece que as MMPs exercem importante papel patogênico nas doenças do miocárdio, embora poucos sejam os estudos *in vivo* que correlacionem a atividade dessas enzimas com a disfunção cardíaca na DC.

2.4.2 Peptídeos de síntese e degradação do colágeno tipo 1

a. Sistema Colágênico

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas bem características, encontradas em todos os organismos multicelulares. São as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo cerca de 20% - 30% do total de proteínas corporais (ZEUGOLIS e RAGHUNATH, 2011) sendo, portanto, o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados (SENARATNE, PARK e KIM, 2006; UITTO, CHU, GALLO e EISEN, 2008; GELSE, PÖSCHL e AIGNER, 2003; CHUNG e UITTO, 2010).

As fibrilas de colágeno são formadas pela polimerização de unidades moleculares alongadas denominadas tropocolágeno, consistindo em três subunidades (cadeias polipeptídicas) arranjadas em tríplice hélice (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013), unidas por pontes de hidrogênio (GELSE, PÖSCHL e AINGER, 2003; FERREIRA, GENTILE, CHIONO e CIARDELLI, 2012).

Até o presente momento, foram identificados 29 tipos genéticos distintos de colágeno, muitos dos quais com características únicas e alguns com características inter-relacionadas. Nove deles são frequentemente disponíveis, incluindo os colágenos dos tipos I, II, III, IV, V, VII, IX, XI e XII (FAUZI, LOKANATHAN, AMINUDDIN, RUSZYMAH e CHOWDHURY, 2016) e podem ser divididos em tipos fibrilares e colágenos não fibrilares. Os tipos fibrilares I, II e III são os colágenos mais abundantes (AN, LIN e BRODSKY, 2016).

O colágeno tipo I, o mais comum entre os colágenos, forma fibrilas grossas (com diâmetro médio de 75nm) que se associam formando fibras de 2 a 10 µm, conhecidas

como “fibras colágenas”. Estão presentes no tecido conjuntivo propriamente dito, nos ossos, dentina, tendões, cápsulas de órgãos, córnea, vasos sanguíneos e derme. O colágeno tipo I desempenha um papel importante na morfogênese e no metabolismo celular de novos tecidos, conferindo propriedades mecânicas e bioquímicas (MYLLYHARJU & KIVIRIKKO, 2004; SÖDERHÄLL *et al.*, 2007; UITTO, CHU, GALLO e EISEN, 2008; CHUNG & UITTO, 2010; ZEUGOLIS & RAGHUNATH, 2011; FERREIRA, GENTILE, CHIONO & CIARDELLI, 2012; MAKAREEVA e LEIKIN, 2014). Além disso, o colágeno tipo I é responsável pela estruturação do interstício e do espaço perivascular. As modificações da arquitetura cardíaca presentes na hipertrofia ventricular estão relacionadas com concentrações maiores de colágeno tipo I.

O processo de formação do colágeno ocorre principalmente durante o preparo da regeneração e do desenvolvimento do tecido embrionário. As moléculas de colágeno são secretadas pelos fibroblastos na forma de procolágeno solúvel, que é ladeado por duas estruturas globulares de peptídeos contendo nitrogênio (N-) e carbono (C-) terminais (CANTY e KADLER, 2005). O procolágeno é secretado dentro das vesículas, formado no aparelho de Golgi e, em sequência, é secretado para a matriz extracelular. Na matriz extracelular, ocorre a ação das C- e N-peptidases, para clivar as duas estruturas globulares ligadas às extremidades do procolágeno. A ação dessas enzimas é necessária para iniciar o processo de fibrilogênese (produção de colágeno) (DAMODARAN *et al.*, 2010).

b. Propeptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I

Como descrito anteriormente, os colágenos fibrilares tipo I e III são derivados das moléculas precursoras, procolágenos, que, durante sua expressão e secreção celular, são montadas na forma trimérica e depois clivados em locais N e C-terminais específicos por endopeptidases específicas, gerando três fragmentos: o propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo I (PINP), o colágeno tipo I e propeptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP). Enquanto o colágeno tipo I amadurecido polimeriza em fibrilas extracelulares de colágeno, PINP e PICP são liberados na circulação. Portanto, esses peptídeos podem refletir a síntese do colágeno e também representam uma ferramenta muito mais útil para lidar com as alterações da matriz extracelular cardíaca (CHALIKIAS e TZIAKAS, 2015). O PICP está estequiometricamente relacionado à

quantidade de colágeno tipo I sintetizado. Já o PINP é instável no soro (SEO, KIM e BAEK *et al.*, 2017).

Além disso, foi observado que, no cenário da produção em estado estacionário por fontes extracardíacas, o PICP detectado no sangue periférico de pacientes com cardiopatia hipertensiva é, principalmente, de origem cardíaca. (LOPEZ, CONZALEZ e DIEZ, 2010; QUEREJETA, LOPEZ & GONZALEZ, 2004).

c. Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTXI)

A degradação das fibras de colágeno é mediada pelas metaloproteinases que podem ser inibidas pela interação direta de seus inibidores (TIMP-1 a TIMP-4), que ocorrem naturalmente (MALEMUD, 2006).

A collagenase intersticial (MMP-1), a collagenase de neutrófilos (MMP-8) e a collagenase-3 (MMP-13) iniciam a digestão dos colágenos hidrolisando a ligação peptídica após um resíduo de glicina localizado a uma distância de três quartos da molécula de colágeno do comprimento extremo amino-terminal (LOPEZ, CONZALEZ e DIEZ, 2010).

O pequeno telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I resultante de um quarto liberado pela ação da MMP-1 (CTXI, 12 kDa) é encontrado em uma forma imunoquimicamente intacta no sangue (LOPEZ, CONZALEZ e DIEZ, 2010). Existe uma razão estequiométrica de 1: 1 entre o número de moléculas de colágeno tipo I degradadas e de moléculas de CTXI liberadas, e a quantidade de CTXI que atinge a circulação é proporcional à quantidade de colágeno fibrilar degradado (RISTELI, 1995). Portanto, o CTXI poderia ser utilizado como um índice de degradação do colágeno tipo I dependente de MMP-1. Ademais, deve-se ressaltar a possibilidade de que, durante a degradação do colágeno, os peptídeos (PINP, PIIINP e PIIICP) produzidos durante a síntese possam ser liberados na circulação, pois esses peptídeos podem ter sido clivados incompletamente do procolágeno.

O telopeptídeo aminoterminal do fragmento de três quartos resultante liberado pela MMP-1 a partir da molécula de colágeno é ainda degradado pelas MMP-2 e MMP-9. Os peptídeos da matriz fragmentada final ou matricinas liberados pela ação dessas enzimas têm atividades biológicas na regulação do metabolismo do colágeno e na angiogênese (LOPEZ, CONZALEZ e DIEZ, 2010). No entanto, a estequiometria dessas

matricinas em relação à degradação do telopeptídeo maior de colágeno tipo I é desconhecida (LOPEZ, CONZALEZ e DIEZ, 2010).

Níveis séricos elevados de CTXI são observados em pacientes com insuficiência cardíaca de várias etiologias. Klappacher *et al.* (1995) observaram aumento dos níveis séricos de CTXI em pacientes com cardiomiopatia dilatada, em comparação com controles saudáveis. Em pacientes com cardiomiopatia dilatada, os níveis aumentados de CTXI podem refletir uma quebra maior do colágeno devido à dilatação dos ventrículos (DE JONG *et al.*, 2011). No entanto, no mesmo estudo, os níveis de CTXI também se correlacionaram significativamente com os níveis miocárdicos de colágeno tipo I. Esta é uma observação contraditória porque se pensa que o CTXI reflete a degradação do colágeno tipo I. Além disso, em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica (LOMBARDI *et al.*, 2003), em pacientes com cardiomiopatia hipertensiva (PLAKSEJ *et al.*, 2009) e em pacientes com insuficiência cardíaca com disfunção diastólica (MARTOS *et al.*, 2007; BARASCH *et al.*, 2009), os níveis de CTXI também são elevados, sugerindo uma mudança no equilíbrio do colágeno em direção à quebra do colágeno tipo I.

Essa também é uma observação notável, porque essas cardiomiopatias geralmente mostram um aumento na rigidez do miocárdio como consequência da deposição de colágeno (RISTELI, 1993).

2.4.3 Galectina-3

a. Papel da galectina-3 na inflamação crônica e na fibrogênese cardíaca

A galectina-3 (Gal-3) é uma proteína multifuncional da família das lectinas. Apresenta capacidade de ligação à superfície celular e glicanos da matriz extracelular cardíaca, exercendo papel importante na proliferação celular, adesão, diferenciação, apoptose e angiogênese. (DE BOER, YU E VELDHUISEN, 2010).

A Gal-3 exerce efeito pró-inflamatório por meio da ativação de macrófagos e pela mediação da proliferação de células produtoras de matriz extracelular cardíaca (MACKINNON *et al.*, 2008, LI *et al.*, 2014). Muitos estudos sugerem que a Gal-3 possa regular a resposta inflamatória por meio de suas funções na ativação e migração celulares e da regulação da apoptose de células do sistema imunológico. Na inflamação aguda, a Gal-3 parece exercer um papel pró-inflamatório e protetor enquanto que, após

a transição para um estado inflamatório crônico, ela desempenharia mais um papel fibrogênico, visando à reparação das lesões, resultando na formação de fibrose e desarranjo arquitetural dos órgãos. Um estudo mais detalhado sobre o papel da Gal-3 na remodelação cardíaca revelou que ela estava localizada nos próprios locais de fibrose, com fibroblastos e macrófagos, mas não com cardiomiócitos (SHARMA *et al.*, 2004).

O papel da Gal-3, *in vivo*, depende do tipo de estímulo agressor e do contexto de dano. Assim, a compreensão de sua função na regulação de diferentes processos fisiopatológicos exige o emprego de estudos específicos para diferentes doenças (HENDERSON *et al.*, 2009).

Diversos estudos sugerem que a Gal-3, além de exercer papel importante na fibrogênese cardíaca, pode constituir um marcador de prognóstico de fibrose miocárdica e que esteja associada com risco aumentado de insuficiência cardíaca e mortalidade (SHARMA *et al.*, 2004, de DE BOER *et al.*, 2009, LOPEZ-ANDRES *et al.*, 2012).

A maioria dos biomarcadores de doença cardíaca, como troponina, proteína C reativa e BNP, são liberados na circulação como resultados do processo patogênico. Como representam o resultado e não a causa do dano, eles podem ser considerados biomarcadores "espectadores". A Gal-3 extracelular desempenha papel causal no processo do remodelamento e sua inibição parece bloquear ou reverter o processo. Assim, ela pode ser considerada um biomarcador "culpado", sendo que sua medição e análise podem possibilitar o desenvolvimento de terapias modificadoras da doença, pela inibição da remodelação e interrupção ou retardo da progressão da insuficiência cardíaca (DE BOER *et al.*, 2009).

Contudo, alguns autores consideram que a importância da Gal-3 como marcadora de fibrose cardíaca e preditora de desfechos clínicos de insuficiência cardíaca é ainda controversa, demandando a realização de mais estudos (LI *et al.*, 2014).

b. Papel da galectina-3 na doença de Chagas

Uma revisão sistemática realizada por nosso grupo e ainda não publicada avaliou o papel da Gal-3 como um marcador da presença ou intensidade de fibrose na doença de Chagas. Esta revisão compreendeu análise de sete trabalhos (três em humanos e quatro em modelo animal) (tabela 2). Nos estudos com modelo animal, 75% apresentaram correlação positiva entre Gal-3 e a fibrose miocárdica, ou seja, eles fornecem evidências expressivas para um papel pró-inflamatório da Gal-3 na doença de Chagas, indicativo

de sua capacidade de promover inflamação tecidual, infiltração celular e dano cardíaco. Apesar de os dados experimentais em camundongos indicarem correlação entre a expressão de Gal-3 e a fibrose na CCC, as análises com dados clínicos de pacientes não mostraram relação direta entre a quantidade de fibrose miocárdica e a concentração plasmática de Gal-3 (80% dos trabalhos). Apenas um estudo, de Echeverría *et al.* (2017), apresenta associação positiva entre fibrose no coração e a concentração de Gal-3 (tabela 3). O assunto ainda é controverso e há falta de evidência sobre a associação da Gal-3 com o remodelamento do tecido conjuntivo cardíaco na CCC, para que se defina o potencial uso dessa molécula como biomarcador de fibrose na CCC em associação ou não com outros biomarcadores.

TABELA 2 - Características gerais dos estudos incluídos na revisão sistemática - *Influence of galectin-3 as a biomarker of fibrosis intensity in chronic chagasic cardiomyopathy: a systematic review.*

	Autores / ano de publicação / Local de condução do estudo	Veículo de publicação	Fator de impacto	Humano ou animal/ Se animal, qual?	n	sexo	Média de idade	Método utilizado para detecção de fibrose	Método utilizado para detecção de Gal-3
1	Cruz et al., 2015, Brasil	Arquivo Brasileiro de Cardiologia	1.318	Humano	55	23 Homens / 32 Mulheres	58 anos	Imagem de ressonância magnética	RT-PCR
2	Noya- Rabelo et al., 2017, Brasil	Cardiology - Karger	1.714	Humano	61	25 Homens / 36 Mulheres	58 anos	Imagem de ressonância magnética	ELISA
3	Echeverría et al., 2017, Colombia	International Journal of Cardiology	4.034	Humano	100	55 Homens / 45 Mulheres	54 anos	FEVE	ELFA
4	Ferrer et al., 2014, Argentina	Parasitology - Cambridge University Press	2.511	Animal/ camundongo	15	15 macho	21 dias	RT-PCR/ Histopatologia	RT-PCR /Imunohistoquímica
5	Pineda et al., 2015, Espanha	The Journal of Infectious Diseases - Oxford University Press	5.186	Animal/ camundongo	10	Sem dados	6-8 semanas	Histopatologia/RT- PCR	Histopatologia/RT- PCR
6	Souza et al., 2017, Brasil	The American Journal of Pathology - Elsevier	4.069	Animal/ camundongo	29	29 femea	6-8 semanas	Análise morfométrica	Imunofluorescência
7	Souza et al., 2017, Brasil	Stem Cells International - Hindawi	3.989	Animal/ camundongo			6-8 semanas	Análise morfométrica /RT- PCR	Imunofluorescência

Fonte: *Influence of galectin-3 as a biomarker of fibrosis intensity in chronic chagasic cardiomyopathy: a systematic review* (revisão sistemática em fase de correção).

TABELA 3 - Principais resultados dos estudos que avaliaram galectina-3 e fibrose miocárdica na cardiomiopatia chagásica crônica em humanos e camundongos.

	Descrição da população	Evento comparativo	Análise estatística	Principais resultados de Gal-3 e fibrose	Conclusão (relação entre Gal-3 e fibrose)
1	Todos os sujeitos n=55 Forma indeterminada n=16 Forma cardíaca n=39	Porcentagem mediana de fibrose miocárdica de pacientes com e sem polimorfismo para Gal-3 e a porcentagem de fibrose miocárdica em sujeitos com os genótipos AA, AC e CC para as variantes genéticas em dois sítios de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene Gal-3 (rs4644 e rs4652).	Porcentagem mediana de fibrose miocárdica Mann-Whitney Porcentagem de fibrose miocárdica em indivíduos Kruskal-Wallis	Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem mediana de fibrose miocárdica entre indivíduos com e sem a presença de qualquer um dos genótipos SNPs rs4644 e rs4652. A porcentagem média de fibrose miocárdica não foi estatisticamente diferente entre os genótipos AA, AC e CC ($p = 0,508$), ou entre SNP rs4644 e SNP rs4652 ($p = 0,903$).	Não
2	Todos os sujeitos n=61 Forma indeterminada n=17 Forma cardíaca sem disfunção ventricular n=16 Forma cardíaca com disfunção ventricular n=28	Porcentagem de fibrose miocárdica e a concentração plasmática de Gal-3.	Área fibrótica do miocárdio Kruskal-Wallis Concentração plasmática de Gal-3 Kruskal-Wallis Correlação entre Gal-3 e Fibrose Spearman's	Área fibrótica do miocárdio Todos os sujeitos = 9,4% (2,4 - 18,4) Forma indeterminada = 4,1% (2,1 - 10,7) Forma cardíaca sem disfunção ventricular = 2,3% (1,0 - 5,0) Forma cardíaca com disfunção ventricular = 15,2% (7,8 - 25) $p = 0,004$ Concentração plasmática de Gal-3 Todos os sujeitos = 12,1 ng / mL (9,4 - 14,4) Forma indeterminada = 12,1 ng / mL (8,8 - 18,3) Forma cardíaca sem disfunção ventricular = 12,0 ng / mL (11,0 - 14,8) Forma cardíaca com disfunção ventricular = 12,0 ng / mL (11,0 - 14,8) $p = 0,90$	Não

4	camundongos infectados com cepas de <i>T. cruzi</i> Ac (Ac) n = 5	mRNA pró-colágeno I.		Histologia do coração inoculado com Hc e Ac. Foi observado um aumento na matriz de colágeno em amostras de animais infectados com Hc e Ac. A remodelação do MEC foi menos intensa em amostras de camundongos inoculados com Hc em comparação com camundongos inoculados com Ac. Expressão do antígeno Gal-3 em corações de animais infectados com mock, Hc ou Ac. Níveis de Gal-3 significativamente aumentados em amostras de camundongos infectados com Ac comparado aos controles simulados ($P < 0,01$). Coloração imuno-histoquímica do antígeno Gal-3 em corações de animais infectados com mock, Hc ou Ac. O antígeno Gal-3 foi detectado principalmente nas células localizadas no interstício, sendo também maior nas áreas fibróticas.
5	Todos os sujeitos n=10 camundongos controle n=5 camundongos deficientes em Gal-3 n=5	Expressão de colágenos I, III e IV e laminina em amostras de tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 e Gal-3 ^{-/-} com 28 e 60 dias de infecção por <i>T. cruzi</i> .	New-man-Keuls	Expressão reduzida de colágenos I, III, IV e laminina no coração de animais infectados com Gal-3^{-/-} em comparação ao grupo controle. Sim (positiva)

6	Todos os sujeitos n = 29 camundongos não infectados por <i>T. cruzi</i> (Naive) n = 8 camundongos com tempos de infecção de 30dpi (30dpi) n = 5 camundongos com tempos de infecção de 90dpi (90dpi) n = 5 camundongos com tempos de infecção de 180dpi (180dpi) n = 11	Porcentagem da área de expressão de Gal-3, com a porcentagem da área de fibrose em secções cardíacas de camundongos em diferentes momentos da infecção (30dpi, 90dpi e 180dpi) por tripomastigotas da cepa colombiana de <i>T. cruzi</i>.	Bonferroni	Aumentou a expressão de células Gal-3 + no miocárdio em comparação com controles naïve, por microscopia confocal. A expressão cardíaca de Gal-3 atingiu um pico em 1 mpi, mas permaneceu elevada durante a fase crônica da infecção, quando comparada a camundongos <i>naive</i>. Mas diminuiu com o tempo. Em relação ao tempo de 30dpi para o naïve p < 0,01 e 30dpi para 180dpi p < 0,01. A porcentagem de fibrose aumentou com o tempo. Em relação ao tempo de 180 dpi para 30 dpi p < 0,01 e ao tempo de 180dpi para 90 dpi p < 0,05.	Sim (positiva)
7	modelo de mouse do CCC Camundongos não infectados por <i>T. cruzi</i> (Naive). Camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> com solução salina (solução salina). Camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> com células estromais mesenquimais controles (MSC-WT). Camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> com stent mesenquimal Nocaute Gal-3 (MSC-Gal3KD).	Porcentagem da área de fibrose analisadas em secções cardíacas e expressão gênica do colágeno tipo I (Col1a1) no tecido cardíaco de camundongos infectado com <i>T. cruzi</i> com solução de salina, animais infectados com <i>T. cruzi</i> células estromais mesenquimais controles (MSC-WT) e animais infectados com <i>T. cruzi</i> células estromais mesenquimais Knockdown de Gal-3 (MSC-Gal3KD).	Bonferroni	A análise das secções cardíacas em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> mostrou extensas áreas de fibrose. Enquanto o conteúdo de fibrose no coração não foi alterado entre os grupos, a síntese de colágeno, medida pela expressão gênica do colágeno tipo I (Col1a1), foi reduzida com MSC do tipo selvagem, mas não com MSC knockdown Gal-3.	Não

Fonte: *Influence of galectin-3 as a biomarker of fibrosis intensity in chronic chagasic cardiomyopathy: a systematic review* (revisão sistemática em fase de correção). Link de acesso:

https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42019119309

Perante o exposto, esperamos que neste estudo os níveis séricos das seguintes moléculas: metaloproteinases, MMP-2 e MMP-9, e seus respectivos inibidores, TIMP-2 e TIMP-1; propeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (PICP), telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTXI) e a galectina-3 relacionam-se diretamente com a extensão do remodelamento cardíaco e com a fibrose miocárdica na doença de Chagas. E a partir disso, que eles possam ser usados como marcadores que auxiliem na conduta e no atendimento clínico diário.

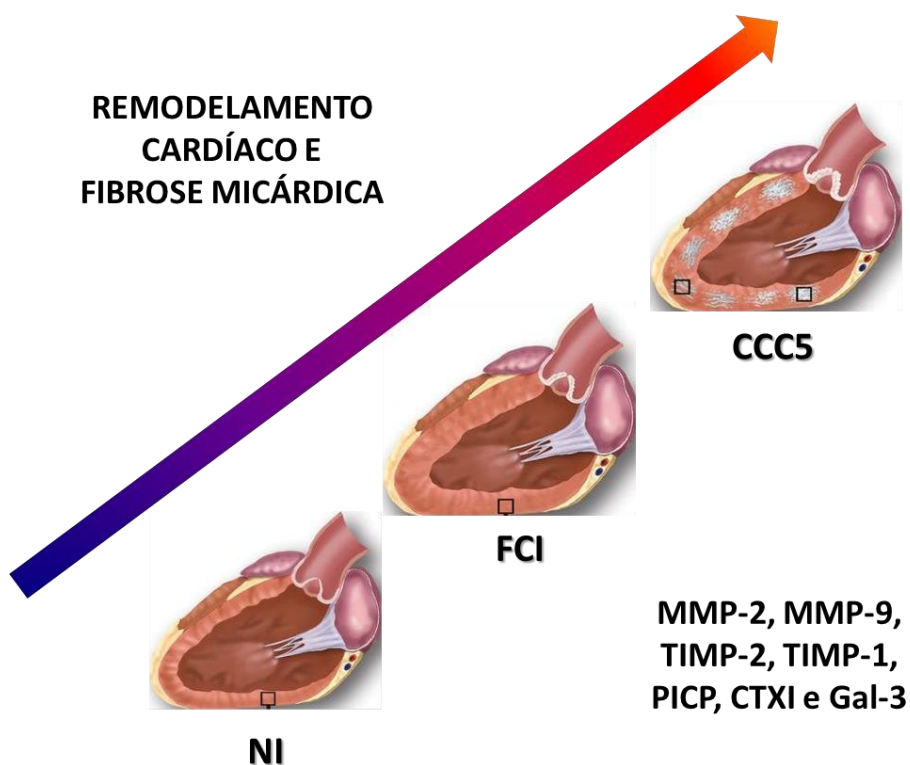


Figura 2: Correlação esperada entre os marcadores envolvidos no remodelamento cardíaco e a intensidade de fibrose miocárdica. MMP-2, metaloproteinase tipo 2; MMP-9, metaloproteinase tipo 9; TIMP-2 e TIMP-1, inibidores específicos de metaloproteinases; .PICP, propeptídeo carboxiterminal do procólágeno tipo I; CTXI, telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I; Gal-3, galectina-3. NI, não infectado; FCI, forma crônica indeterminada; CCC5, cardiopatia chagásica crônica grau cinco.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar biomarcadores séricos e suas relações com o remodelamento cardíaco e com a fibrose miocárdica na cardiopatia chagásica crônica.

3.2 *Objetivos específicos*

- a. Dosar os níveis séricos de Gal-3 em pacientes com FCI e com CCC5 e em indivíduos NI.
- b. Dosar os níveis séricos de peptídeos marcadores do metabolismo do colágeno, derivados tanto da sua síntese (propeptídeo C-terminal do colágeno tipo I [PICP],) quanto de sua degradação (telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I [CTXI]) em pacientes com FCI e com CCC5 e em indivíduos NI.
- c. Dosar os níveis séricos das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 e seus respectivos inibidores, TIMP-1 e TIMP-2, em pacientes com a FCI e com CCC5 e em indivíduos NI.
- d. Analisar as relações entre níveis séricos destes marcadores sorológicos e marcadores ecocardiográficos de disfunção ventricular sistólica (VEd e FEVE) e disfunção diastólica (relação E/e'), considerados, respectivamente, marcadores substitutos de remodelamento cardíaco e fibrose miocárdica, nos pacientes com CCC5.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal descritivo, analítico e comparativo, com coletas de dados entre 2016 a 2019.

4.2 Considerações éticas

O presente estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos preconizados pela Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (48354315.8.0000.5149). Todos os pacientes foram convidados para participação voluntária no estudo, após esclarecimento e assinatura de termo de consentimento livre esclarecido. Os pacientes foram tratados de acordo com as diretrizes do Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do HC-UFMG e pela equipe médica assistente.

4.3 População estudada

Este estudo foi executado no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) “Orestes Diniz”, convênio entre o a Prefeitura de Belo Horizonte, gestora local do Sistema Único de Saúde, e o Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) e no Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do HC-UFMG. O Ambulatório foi transformado em centro de referência de atendimento ao paciente chagásico em Minas Gerais em 1991, recebendo pacientes encaminhados por serviços de hemoterapia e postos de Saúde de Minas Gerais. Os pacientes chagásicos selecionados para participação nas pesquisas estão sendo atendidos no Ambulatório desde janeiro de 1991. Desde então, à medida que comparecem às consultas médicas rotineiras, realizam-se anotações de cada caso, em fichas individuais, incluindo identificação, estado sorológico para doença de Chagas, manifestações clínicas, exames complementares e forma clínica da doença. Pela análise destas fichas, vão sendo selecionados os pacientes, chagásicos ou não, na faixa de 18 a 75 anos, que preenchem os critérios de inclusão e exclusão.

Foi realizada avaliação criteriosa de todos os pacientes através de anamnese e exame físico, dando-se ênfase à ausculta cardíaca, com duração de dois minutos, para detecção de extrassístolia em repouso, à caracterização do *ictus cordis* e à pesquisa de sinais de congestão periférica e visceral. Os pacientes foram classificados de acordo

com a classe funcional da *New York Heart Association* e com a classificação clínica da CCC, adotada no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas (ROCHA *et al.*, 2003). Os exames complementares relacionados à seleção e classificação dos pacientes em grupos foram feitos conforme rotina do Ambulatório, nos diversos setores do HC-UFG, incluindo realização de hemograma completo, dosagem bioquímica de creatinina, ureia, glicemia de jejum, potássio, sódio, dosagem de TSH e exames sorológicos para detecção de infecção pelo *T. cruzi* por pelo menos dois métodos diferentes, que foram realizados no Laboratório Central do HC-UFG.

Foram considerados chagásicos os indivíduos que apresentaram positividade sorológica para *T. cruzi* em duas ou mais técnicas diferentes, incluindo as reações de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta e ELISA, em exames realizados no Laboratório Central do HC-UFG ou no Laboratório da Fundação Ezequiel Dias. Foram considerados não chagásicos indivíduos que não apresentaram positividade em qualquer uma das reações sorológicas.

Procedimentos cardiológicos específicos foram realizados no Serviço de Cardiologia do HC-UFG (eletrocardiograma convencional, eletrocardiografia dinâmica, ergometria, ecocardiografia). Os experimentos de dosagens de biomarcadores de metabolismo colágeno foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFG.

Foram considerados critérios de inclusão:

- Diagnóstico sorológico de infecção por *T. cruzi*, confirmado por dois métodos diferentes (ELISA, imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta) (BRASIL, 2005).
- Idade entre 18 e 75 anos.
- Pacientes chagásicos com FCI, definidos como: indivíduos assintomáticos, sem disfagia ou constipação intestinal, com eletrocardiograma, radiografia do tórax e ecocardiograma normais.
- Pacientes chagásico com cardiomiopatia dilatada (CCC5), definidos como indivíduos com sinais clínicos, radiológicos e, principalmente, ecocardiográficos de aumento da área cardíaca, com disfunção da contratilidade global, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca.

- Indivíduos sadios não chagásicos, definidos como: sujeitos que apresentam sorologia negativa para *T. cruzi* em qualquer uma das reações sorológicas: IFI, hemaglutinação indireta, ELISA e que não apresentam qualquer um dos critérios de exclusão, com características demográficas semelhantes às dos pacientes chagásicos.
- Consentimento, voluntário e por escrito, para participação dos estudos realizados após esclarecimento de suas finalidades.

Foram considerados critérios de exclusão:

- Impossibilidade ou indisponibilidade para a realização dos exames propostos.
- Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial - medida durante o exame físico - de 140/90 mmHg, em mais de uma oportunidade.
- História compatível com doença arterial coronariana, conforme anamnese dirigida.
- Disfunção tireoidiana manifestada por níveis anormais de hormônio estimulante da tireoide (TSH) e da tiroxina (T4) livre, associados ou não a quadro clínico sugestivo de hiper ou hipotireoidismo.
- Diabetes *mellitus* ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e, se necessário, prova de tolerância oral à glicose (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).
- Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda.
- Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas.
- Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol - média diária acima de 60 g de etanol (SKINNER *et al.*, 1984).
- Uso de drogas anti-inflamatórias.
- Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ou ergométricas de cardiopatia isquêmica.
- Gravidez definida por critérios laboratoriais.
- História ou sinais sugestivos de cardiopatias valvar, congênita, hipertensiva, isquêmica ou idiopática.

- Qualquer outra doença cardiológica ou sistêmica significativa, crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados das provas específicas.
- Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina abaixo de 10 g/dL.
- Distúrbios hidroeletrolíticos, mais especificamente níveis séricos anormais de potássio e sódio.
- Diabetes *mellitus* ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e, se necessário, prova de tolerância oral à glicose.
- Disfunção tireoidiana, manifestada por níveis anormais de hormônio estimulante da tireóide (TSH) e da tiroxina (T4) livre, associados ou não a quadro clínico sugestivo de hiper ou hipotireoidismo.
- Insuficiência renal definida pelo aumento dos níveis de creatinina e uréia plasmáticas, associadas ou não às manifestações clássicas de uremia.
- Uso de marcapasso intracardíaco ou cardiodesfibrador implantável (CDI).

O grupo de indivíduos não infectados pelo *T. cruzi* é composto de pessoas saudáveis, dentre eles estudantes e funcionários da UFMG.

4.4 Dosagem dos marcadores sorológicos

Foram coletados 8 mL de sangue em tubos *vacutainer*, sem anticoagulante, (BECTON DICKINSON, CA, USA) para a separação de amostras de soro, obtidas após centrifugação dos tubos de coleta por 10 minutos a 3000rpm, em temperatura ambiente.

O soro foi separado, aliquoteado em tubos tipo eppendorf e armazenados a -80°C. Para a análise, as alíquotas foram deixadas em temperatura ambiente até o descongelamento.

4.4.1 Dosagem da Gal-3 e PICP

Para dosagem da Gal-3 foi utilizado o Kit comercial *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Galectin 3 (GAL3) – ELISA Clound-Clone Corp.* Para dosagem do propéptido C-terminal do colágeno tipo I foi utilizado o Kit comercial *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Procollagen I C-Terminal Propeptide (PICP) – Clound-Clone Corp.*

Todos os reagentes, amostras e padrões foram preparados de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante. Determinaram-se e prepararam-se os poços para padrão, branco e amostra.

Foram adicionados 100µL de cada uma das diluições de padrão, branco e amostras nos poços apropriados. As placas foram cobertas com selador e incubadas por uma hora a 37°C. O líquido de cada poço foi removido e foram adicionados 100µL da solução de trabalho do reagente de detecção A, em cada poço, e novamente, os poços foram cobertos com o vedante de placa e incubados durante uma hora a 37°C. Aspirou-se a solução e lavou-se com 350µL de solução de lavagem uma vez para cada poço usando uma pipeta multicanal e deixou-se descansar por um a dois minutos. O líquido restante foi removido de todos os poços, completamente, encaixando a placa no papel absorvente. Lavou-se três vezes. Após a última lavagem, foram removidos o tampão de lavagem restante, aspirando-se. Inverteu-se a placa e limpou-a contra papel absorvente. Adicionou-se 100µL da solução de trabalho do reagente de detecção B a cada poço e cobriram-se os poços com o vedante de placa, incubando-a durante 30 minutos a 37°C. Repetiu-se o processo de aspiração e lavagem por cinco vezes, conforme realizado anteriormente. Após, foram adicionados 90µL de solução de substrato a cada poço. Cobriu-se com um novo selador de placa. Incubou-se por 10 a 20 minutos a 37°C (sem exceder 30 minutos). Protegeu-se da luz. O líquido ficou azul pela adição da Solução Substrato. Adicionou-se 50µL de Solução de Parada a cada poço. O líquido ficou amarelo pela adição da solução Stop. Misturou-se o líquido tocando no lado da placa e realizou-se a leitura de microplacas em 450nm.

A média das leituras duplicadas para cada padrão, controle e amostras foram subtraídas da densidade ótica (O.D.) média padrão zero.

Construiu-se uma curva padrão, traçando a média O.D. e concentração para cada padrão e desenhou-se uma curva de melhor ajuste através dos pontos no gráfico com concentração do marcador no eixo y e absorbância no eixo x. Por meio *software* Excel 2010. Determinou-se assim, a concentração de cada amostra.

4.4.2 Dosagem de CTXI

Para dosagem do telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I foi utilizado o Kit comercial *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Cross Linked C-Telopeptide Of Type I Collagen (CTXI) – Clound-Clone Corp.*

Prepararam-se todos os reagentes e amostras e padrões de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante. Determinaram-se os poços para padrão, branco e amostra. Foram preparados sete poços por padrão, um poço para branco. Foram adicionados 50µL de cada uma das diluições de padrão, branco e amostras nos

poços apropriados. Depois, adicionou-se 50µL da solução de trabalho do reagente de detecção A a cada poço, e cobriu-se os poços com o vedante de placa e incubou durante uma hora a 37°C. Aspirou-se a solução e lavou com 350µL de Solução de Lavagem uma vez para cada poço usando uma pipeta multicanal e deixou descansar por um a dois minutos. Removeu-se o líquido restante de todos os poços completamente, encaixando a placa no papel absorvente. Lavou-se totalmente três vezes. Após a última lavagem, removeu-se qualquer Tampão de Lavagem restante, aspirando. Inverteu-se a placa e limpou-a contra papel absorvente. Adicionou-se 100µL da solução de trabalho do reagente de detecção B a cada poço e cobriu os poços com o vedante de placa e incubando-a durante 30 minutos a 37°C. Repetiu-se o processo de aspiração e lavagem por cinco vezes, conforme realizado anteriormente. Após, adicionou 90µL de solução de substrato a cada poço. Cobriu com um novo selador de placa. Incubou-se por 10 a 20 minutos a 37°C (sem exceder 30 minutos). Protegeu-se da luz. O líquido ficou azul devido adição da Solução Substrato. Adicionou-se 50µL de Solução de Parada a cada poço e o líquido ficou amarelo. Misturou-se o líquido tocando no lado da placa e realizou-se a leitura de microplacas em 450nm.

A média das leituras duplicadas para cada padrão, controle e amostras foram subtraídas da densidade ótica (O.D.) média padrão zero.

Construiu-se uma curva padrão, traçando a média O.D. e concentração para cada padrão e desenhou-se uma curva de melhor ajuste através dos pontos no gráfico com concentração do marcador no eixo y e absorbância no eixo x. Por meio *software* Excel 2010. Determinou-se assim, a concentração de cada amostra.

4.4.3. Dosagem de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-1

Para dosagem das metaloproteinases 2 e 9 foram utilizados os Kits comerciais Milliplex - kit Cat # HMMP2MAG-55K-02 (MMP2 e MMP9) - Lote: 2948800- Exp. 22/02/2018 - Fornecedor Millipore (St Charles-Missouri-USA). E para a dosagem de TIMP-2 e TIMP-1 foram usados os Kits comerciais Milliplex - kit Cat # HTMP1MAG54K-01 (TIMP2 e TIMP1) - Lote: 2948801- Exp. 31/07/2018 - Fornecedor Millipore (St Charles-Missouri-USA).

A metodologia usada para o ensaio desses marcadores foi a Luminex™ xMAP. A Tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma

assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex.

Os kits Milliplex foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada amostra estão imobilizados as microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que a amostra se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas.

O equipamento utilizado foi o Luminex 200 - Software xPonent/Analyst versão 4.2, o qual movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

As dosagens de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-1 foram realizadas no Laboratório Especializado em Análises Científicas – LeacLab. (Charles-Missouri-USA). Conforme o procedimento da bula, as amostras foram diluídas em 1:50 e a concentração exata foi calculada.

4.5. Variáveis clínicas e ecocardiográficas

Para o cálculo das variáveis clínicas foram realizados eletrocardiograma em repouso. Empregou-se aparelho do modelo PAGE WRITER 300 P1, fabricante PHILIPS. Realizou-se o exame nas 12 derivações habituais, após repouso em decúbito dorsal e interpretado de acordo com as normas da New York Heart Association (NYHA, 1979), analisando-se o ritmo e calculando-se a frequência cardíaca. Foram medidos os intervalos PR, onda P, complexo QRS e determinado o eixo cardíaco. Analisaram-se rotineiramente as alterações morfológicas do traçado eletrocardiográfico, com especial caracterização dos distúrbios de condução do estímulo elétrico intraventricular. Utilizou-se o Código de Minnesota modificado para a doença de Chagas (MAGUIRE *et al.*, 1982), para interpretação do eletrocardiograma.

Para a medição das variáveis ecocardiográficas, os pacientes foram submetidos à avaliação ecocardiográfica, realizada segundo a rotina do Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital das Clínicas da UFMG.

Os estudos ecocardiográficos foram realizados por ecocardiografistas experientes, com pelo menos dez anos de prática no exame de pacientes chagásicos, utilizando o aparelho ATL PHILIPS HDI 5000, com transdutores de 2,5 e 3,0 MHz para obtenção dos diversos parâmetros avaliados, descritos a seguir. Empregaram-se técnicas de ecocardiografia uni e bidimensional, Doppler pulsado e contínuo guiados por mapeamento do fluxo em cores. Os estudos ao modo M foram guiados pela imagem bidimensional para obtenção das dimensões diastólica e sistólica finais do ventrículo esquerdo e diâmetros do átrio esquerdo e aorta. Todas as medidas foram feitas conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN *et al.*, 1978). Ao ecocardiograma bidimensional foram obtidos cortes padronizados, paraesternal, longitudinal e transversal, além dos cortes apicais em duas, três, quatro e cinco câmaras. Foram feitos cortes intermediários, quando necessário, para avaliação da região apical do ventrículo esquerdo. Foram descritas a morfologia das câmaras cardíacas, textura miocárdica, contratilidade das paredes e possíveis achados de trombos e aneurisma. A contratilidade segmentar foi avaliada por meio do espessamento endocárdico e motilidade das paredes, definindo-se as alterações conforme a observação de hipocinesia, acinesia, discinesia ou aneurisma.

As variáveis ecocardiográficas estabelecidas para correlação clínica e funcional cardiocirculatórias foram as seguintes: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, relação E/e' , função sistólica ventricular esquerda a partir do cálculo da fração de ejeção pelo método de Simpson (LANG *et al.*, 2005). A relação E/e' constitui marcador acurado das pressões de enchimento, com valor prognóstico estabelecido em várias doenças cardíacas. O acometimento cardíaco foi definido pelo diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo maior que 55 mm (BAKER *et al.*, 1984) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo igual ou inferior a 55% pelo método de Simpson. A descrição das variáveis estudadas pode ser observada na TABELA 4.

TABELA 4 - Definição das variáveis do estudo.

Variáveis clínicas	Categoria	Descrição
Idade	Contínua	Anos
Sexo	Categórica	Masculino, feminino
Classificação clínica	Categórica	NI, FCI, CCC 5
<i>New York Heart Association</i> (NYHA)	Categórica	I, II, III e IV
Variáveis ecocardiográficas	Categoria	Descrição
Fração de ejeção ventricular esquerda	Contínua	Percentual
Diâmetro diastólico final ventricular esquerdo	Contínua	Milímetros
Relação E/e'	Contínua	Contagem
Variáveis sorológicas	Categoria	Descrição
MMP-2	Contínua	pg/mL
MMP-9	Contínua	pg/mL
TIMP-1	Contínua	pg/mL
TIMP-2	Contínua	pg/mL
PICP	Contínua	pg/mL
CTXI	Contínua	pg/mL
Gal-3	Contínua	pg/mL

* pg/mL: picograma por mililitro.

4.6. Cálculo amostral e análises estatísticas

Para este estudo foi utilizada amostra de conveniência. Os resultados obtidos na primeira parte do trabalho foram representados em gráficos de dispersão vertical, como mediana com intervalo interquartil e foram analisados utilizando o teste estatístico de Kruskal-Wallis. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando o $p < 0,05$. Na segunda parte do trabalho, a fim de determinar a existência de diferenças significativas entre os grupos analisados, utilizou-se o teste estatístico de Pearson, para medir o grau da correlação linear entre duas variáveis estudadas, através dos coeficientes (r), assim como, os valores de p constantes das matrizes de correlação. As associações foram consideradas fortes quando $r > 0,7$ e associações foram moderadas quando $r > 0,5$, entre as variáveis, os perfis dos resultados foram apresentados na forma de gráficos. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prim 3.0 (SAN DIEGO, CA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

PARTE I. Dosagem das concentrações de MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, PICP, CTXI e Gal-3 no soro dos grupos NI, FCI E CCC5.

Os resultados das concentrações séricas de MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, PICP, CTXI e Gal-3 dosadas em indivíduos NI, pacientes com FCI e pacientes com CCC5 serão apresentados em forma de gráficos.

5.1 Dosagem da concentração sérica de metaloproteinase tipo 2 (MMP-2) e de seu inibidor (TIMP-2) em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Em relação à concentração de MMP-2 e TIMP-2 observou-se que pacientes com CCC5 apresentam níveis mais altos de MMP-2 ($p = 0,0342$) e TIMP-2 ($p < 0,0001$) do que pacientes com FCI.

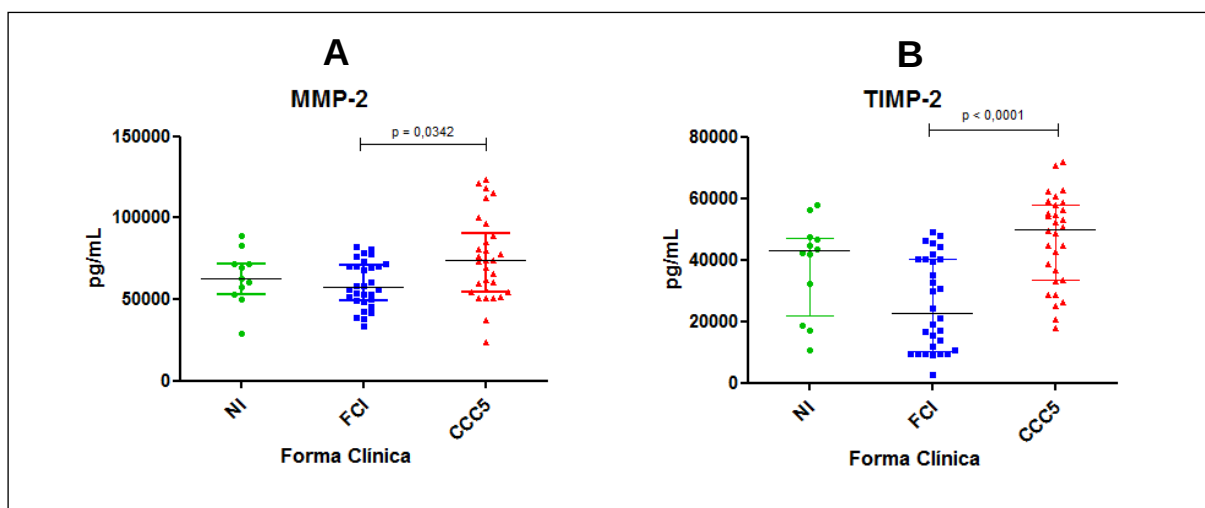


Gráfico 1: Concentração de MMP-2 e TIMP-2 em indivíduos NI e pacientes com doença de Chagas crônica. **A.** Concentração de MMP-2 em pg/mL em indivíduos NI (n=12), com FCI (n=30) e com CCC5 (n=30). **B.** Concentração de TIMP-2 em pg/mL em indivíduos NI (n=12), com FCI (n=30) e com CCC5 (n=30). Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão vertical, como mediana com intervalo interquartil. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

5.2 Dosagem da concentração sérica de metaloproteinase tipo 9 (MMP-9) e de seu inibidor (TIMP-1) de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Quanto à concentração de MMP-9 e TIMP-1 notou-se maior concentração de MMP-9 e TIMP-1 em pacientes com FCI e com CCC quando comparados aos indivíduos NI.

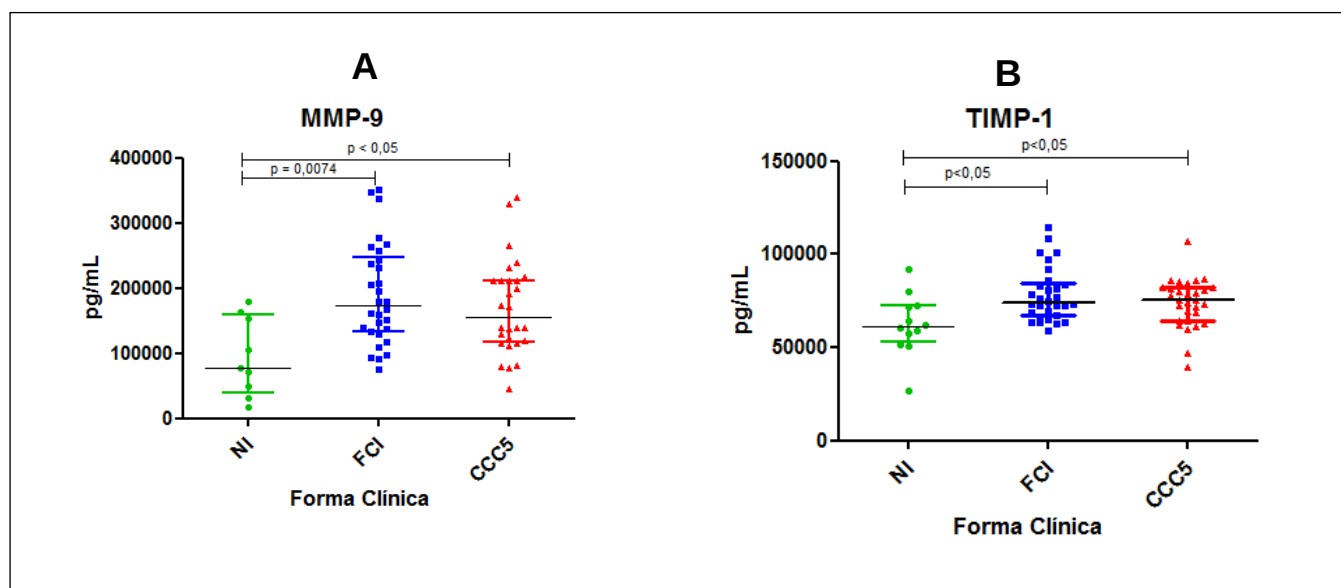


Gráfico 2: Concentração de MMP-9 e TIMP-1 em indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas crônica. **A.** Concentração de MMP-9 em pg/mL em indivíduos NI (n=12), com FCI (n=30) e com CCC5 (n=30). **B.** Concentração de TIMP-1 em pg/ mL em indivíduos NI (n=12), com FCI (n=30) e com CCC5 (n=30). Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão vertical, como mediana com intervalo interquartil. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

Para testar a hipótese de que existiria relação entre as metaloproteinases e seus respectivos inibidores, foram usadas a correlação de *Pearson* para obtenção dos coeficientes (r), assim como, os valores de p constantes das matrizes de correlação. Desta forma, após identificar fortes associações ($r > 0,7$) e associações moderadas ($r > 0,5$), entre as variáveis, os perfis dos resultados foram apresentados na forma de gráficos.

5.3 Correlação entre a concentração sérica de metaloproteinase tipo 2 (MMP-2) e de seu inibidor (TIMP-2) de pacientes com cardiopatia chagásica crônica.

Quanto à relação entre a concentração de MMP-2 e TIMP-2 observou-se correlação forte diretamente proporcional em pacientes com CCC5 ($p < 0,0001$ e $r > 0,07$).

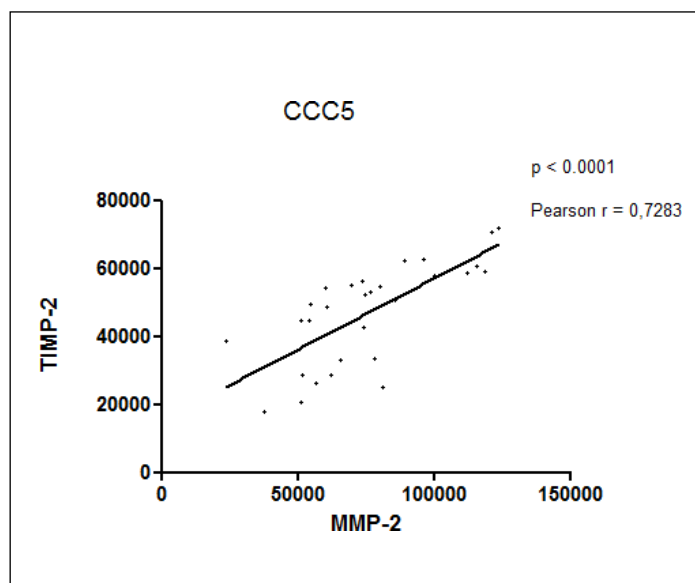


Gráfico 3: Correlação entre as concentrações de MMP-2 e TIMP-2 no grupo CCC5. Correlação da concentração de MMP-2 e TIMP-2 em pg/mL em pacientes com CCC5 ($n=30$). Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão, com r de Pearson e valor de p .

Não observou-se correlação entre as concentrações de MMP-9 e TIMP-1 no grupo CCC5.

5.4 Dosagem da concentração sérica do propéptido C-terminal do colágeno tipo I (PICP) e do telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTXI) de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Em relação à concentração de PICP e CTXI não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

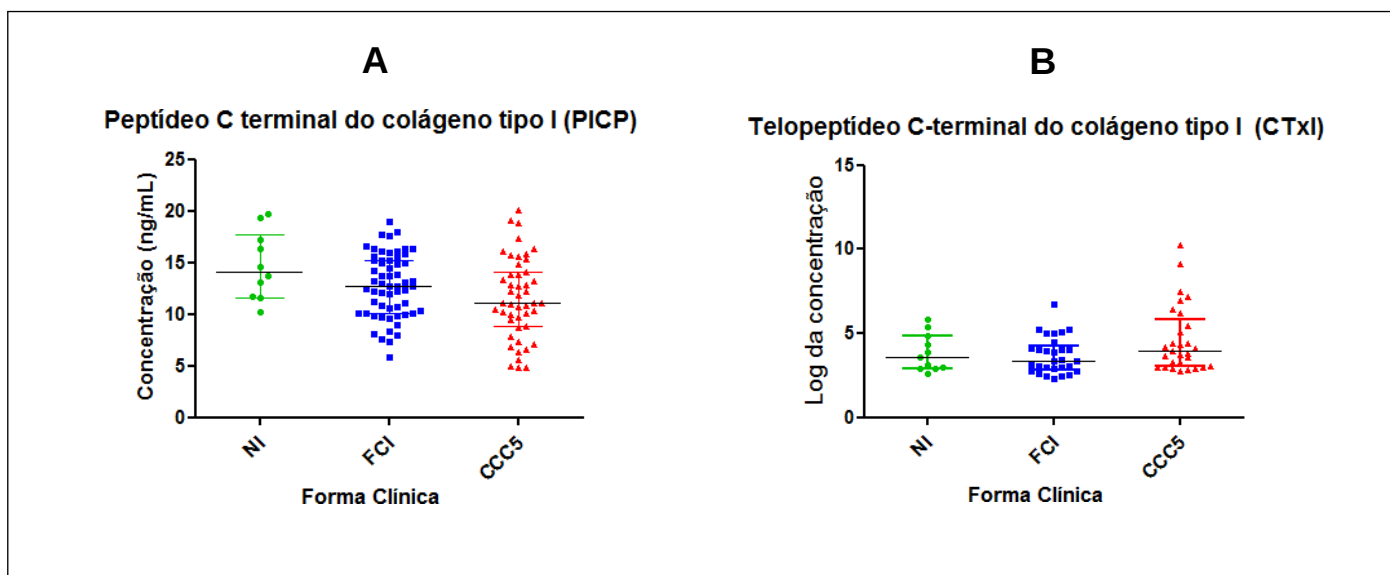


Gráfico 4: Concentração de PICP e CTXI em indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas crônica. **A.** Concentração de PICP em ng/mL em indivíduos não infectados (NI, n=12), com FCI (n=61) e com CCC5 (n=49). **B.** Concentração de CTXI em Log da concentração em indivíduos NI (n=12), com FCI (n=30) e com CCC5 (n=30). Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão vertical, como mediana com intervalo interquartil. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

5.5 Dosagem da concentração sérica de galectina-3 (Gal-3) em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Quanto à concentração de Gal-3 notou-se que pacientes com CCC apresentam níveis mais altos de Gal-3 ($p < 0,001$) do que aqueles com FCI.

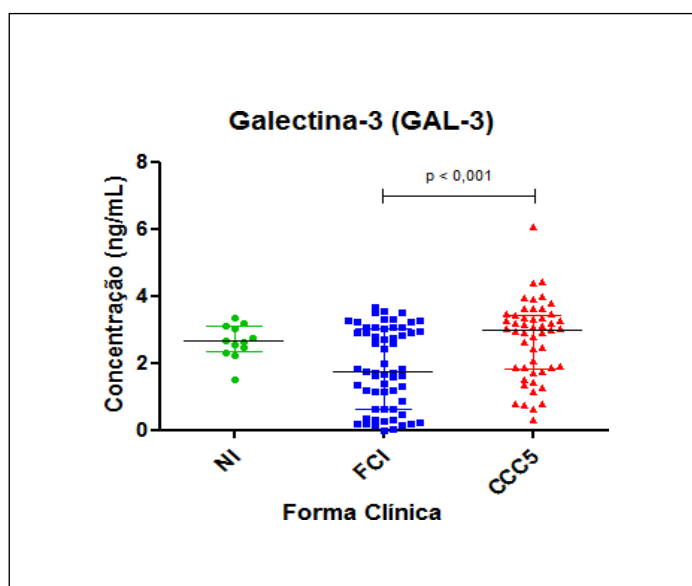


Gráfico 5: Concentração de Gal-3 em indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas crônica. Concentração de MMP-2 em ng/mL em indivíduos NI ($n=12$), com FCI ($n=61$) e com CCC5 ($n=50$). Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão vertical, como mediana com intervalo interquartil. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

PARTE II. Análise de correlação entre os marcadores sorológicos MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, PICP, CTXI e Gal-3 e os marcadores ecocardiográficos VEd, FEVE e E/e'.

Para testar a hipótese de que existiria relação entre os marcadores sorológicos e marcadores ecocardiográficos de disfunção ventricular sistólica (VEd e FEVE) e disfunção diastólica (relação E/e'), considerados, respectivamente, marcadores substitutos de remodelamento cardíaco e fibrose miocárdica, nos pacientes com CCC5, utilizou-se a correlação de *Pearson* para obtenção dos coeficientes (r), assim como, os valores de p constantes das matrizes de correlação. Assim, após identificar fortes associações ($r > 0,7$) e associações moderadas ($r > 0,5$), entre as variáveis, os perfis dos resultados foram apresentados na forma de gráficos.

5.6 Correlação entre a concentração sérica de galectina-3 (Gal-3), a FEVE e VEd de pacientes com CCC5.

Quanto à relação entre a concentração de Gal-3 e FEVE observou-se relação moderada inversamente proporcional em pacientes com CCC5 ($p < 0,01$ e $r > 0,05$). Entretanto não houve correlação entre a concentração de Gal-3 e VEd em pacientes com CCC5.

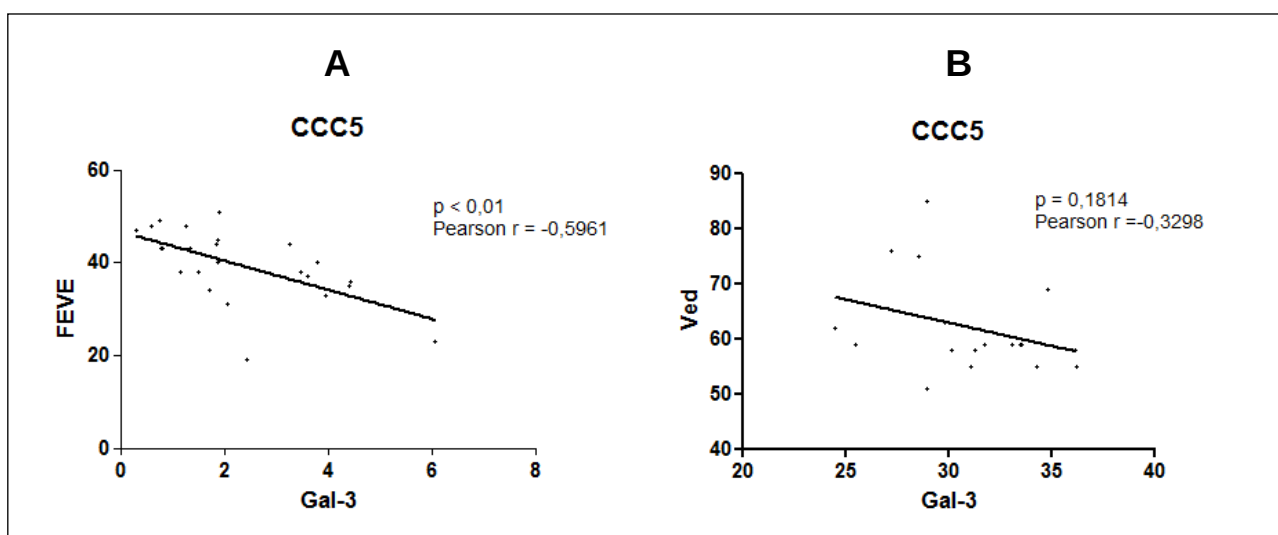


Gráfico 6: Correlação entre a concentração de Gal-3 e FEVE e entre Gal-3 e VEd em pacientes com cardiopatia chagásica crônica. **A.** Correlação da concentração de Gal-3 em ng/mL e de FEVE em porcentagem, no grupo CCC5 (n=24). **B.** Correlação da

concentração de *Gal-3* em ng/mL e de VEd em ml/m², no grupo CCC5 (n=24). Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão, com r de Pearson e valor de p.

5.7 Correlação entre a concentração sérica do propéptido C-terminal do colágeno tipo I (PICP) e da relação E/e' (EIE) de pacientes com cardiopatia chagásica crônica.

Quanto à relação entre a concentração de PICP e a relação E/e', observou-se relação moderada diretamente proporcional em pacientes com CCC5 ($p < 0,01$ e $r > 0,05$).

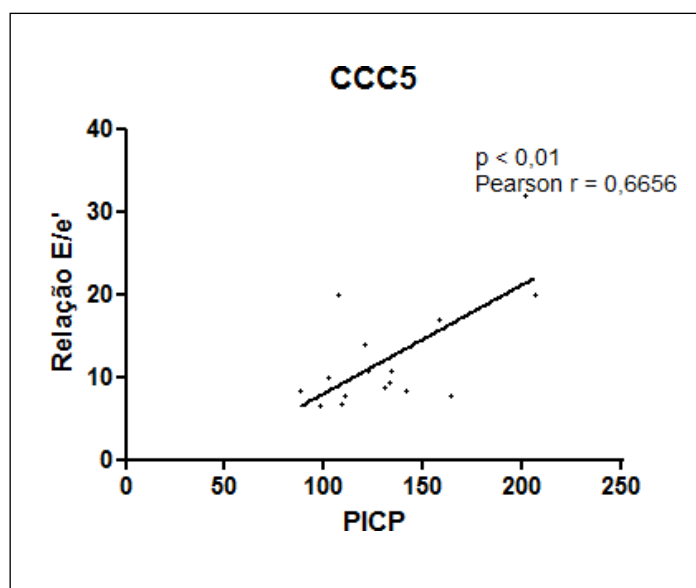


Gráfico 7: Correlação entre a concentração de PICP e E/e' em pacientes com cardiopatia chagásica crônica. Correlação da concentração de PICP em ng/mL e de relação E/e', em porcentagem, no grupo CCC5 (n=16). Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão, com r de Pearson e valor de p.

Não observou-se correlações entre os marcadores sorológicos MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, PICP, CTXI e os marcadores ecocardiográficos VEd, FEVE. E entre *Gal-3* e E/e', também não se obteve relação estatisticamente significativa de causa-efeito.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados testaram a hipótese de que biomarcadores séricos: metaloproteinases e seus inibidores (MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-1), peptídeos relacionados ao metabolismo colágeno (PICP e CTXI) e a galectina-3 correlacionam-se com o remodelamento cardíaco e a fibrose miocárdica na cardiopatia chagásica crônica.

Este trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira etapa do estudo compreendeu a dosagem de marcadores séricos possivelmente envolvidos, diretamente ou indiretamente, no processo de remodelamento cardíaco e de formação de fibrose miocárdica, em pacientes com formas clínicas polares da doença de Chagas. Os grupos de estudo consistiram de indivíduos não infectados pelo *T. cruzi* (NI), de pacientes com doença de chagas na FCI e com cardiomiopatia dilatada (CCC 5). E a segunda etapa deste trabalho foi avaliar se esses possíveis marcadores séricos possuem relação de causa-efeito com os marcadores ecocardiográficos de disfunção ventricular sistólica (VEd e FEVE) e disfunção diastólica (relação E/e'), considerados, respectivamente, marcadores substitutos de remodelamento cardíaco e fibrose miocárdica, os quais foram avaliados nos pacientes com CCC5.

Primeiramente, foi avaliado o perfil sérico de metaloproteinases e seus inibidores. A metaloproteinase tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) e dos inibidores teciduais de metaloproteinase tipo 2 e 1 (TIMP-2 e TIMP-1).

A participação de MMP-2 e MMP-9 em várias doenças cardíacas estão bem estabelecidas. POLYAKOVA *et al.*, (2011) mostraram que a expressão elevada de MMP-2 e MMP-9 está associada à maturação de colágeno na insuficiência cardíaca, demonstrando um papel importante dessas enzimas na fibrose através da configuração, ativação e deposição de colágeno. Em modelos experimentais da doença de Chagas, alta atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 foi descrita, o que sugere um papel importante das MMPs na miocardite aguda induzida por *T. cruzi* (GUTIERREZ *et al.*, 2008).

Os principais inibidores endógenos das MMPs são os TIMPs (LAMBERT *et al.*, 2004; KUPAI *et al.*, 2010). Os TIMPs se ligam às MMPs através da proporção molar estequiométrica 1:1, formando um sistema importante para o controle da atividade endógena das MMPs *in vivo* (SPINALE *et al.*, 2000). Quatro TIMPs inibem todas as MMPs com alguma seletividade. Além do TIMP-1 com afinidade com a MMP-9, o

TIMP-2 e o TIMP-4 bloqueiam preferencialmente a MMP-2, mas o TIMP-3 não possui especificidade de MMPs relatada. Ademais, todos os quatro TIMPs podem desempenhar um papel fundamental no reparo cardíaco e, portanto, podem influenciar a cicatrização de feridas, independentemente de suas ações inibitórias das MMPs. Os TIMPs podem estimular a proliferação de fibroblastos cardíacos e a diferenciação fenotípica em miofibroblastos no local da lesão tecidual, contribuindo assim para a formação de uma matriz de colágeno qualitativa e madura (VANHOUTTE, *et al.*, 2006; CAMELLITI *et al.*, 2005). Também, o aumento da expressão de TIMP-2 poderia contribuir para a cicatrização de feridas cardíacas, estimulando diretamente a síntese de colágeno no microambiente do coração lesionado (VANHOUTTE e HEYMANS, 2010). Segundo SPINALE (2007), TIMP-1 e TIMP-2 aumentam duas vezes em pacientes com sobrecarga de pressão em longo prazo sem disfunção sistólica e estão relacionados ao grau de fibrose. Concordantemente, THOMAS *et al.*, (1998) revelaram que as proteínas TIMP-1 e -2 foram profundamente aumentadas na cardiomiopatia dilatada humana em estágio terminal.

Como descrito anteriormente, a CCC é a miocardite mais fibrosante das miocardites conhecidas (BOGLIOLO, 1976) e julga-se que os resultados dos grandes ensaios clínicos em insuficiência cardíaca podem ser extrapolados a todos aqueles portadores de cardiomiopatia, inclusive os chagásicos. A hipótese desse estudo, em relação à expressão de MMP-2 e MMP-9, que estão associadas à maturação de colágeno na insuficiência cardíaca e por demonstrarem um papel importante na fibrose através da configuração, ativação e deposição de colágeno, tenham níveis mais elevados no soro de pacientes CCC5 comparados aos grupos FCI, e o grupo FCI tenham níveis elevados no soro em relação à NI. Da mesma forma, esperamos que isto ocorra com seus respectivos inibidores TIMP-2 e TIMP-1, ou seja, que seus níveis se elevem no soro, nos grupos NI, FCI e CCC 5, de forma crescente, respectivamente.

Neste estudo, pacientes com CCC5 apresentam níveis mais altos de MMP-2 e TIMP-2 do que aqueles com FCI e não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com doença de Chagas e os indivíduos não infectados (Gráfico 1). Isso sugere que devido às características de síntese e deposição de colágeno de MMP-2 e TIMP-2, esses marcadores estão com níveis mais elevados nos pacientes com maior intensidade de fibrose. Entretanto, o grupo NI apresentou um comportamento diferente do esperado. Provavelmente, em consequência das características clínicas não notificadas por este grupo ou pelo número amostral pequeno.

Em relação aos níveis séricos de MMP-9 e seu inibidor, observou-se que a infecção por *T. cruzi* produz níveis mais elevados de MMP-9 e TIMP-1, uma vez que esses marcadores estão elevados nos grupos de pacientes com doença de Chagas quando comparados ao grupo saudável. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas para categorizar os grupos CCC5 e FCI (Gráfico 2). Isto sugere que tanto MMP-9 e TIMP-1, possuem níveis no soro elevados de pacientes infectados com *T. cruzi*, porém não se correlacionam com a intensidade de fibrose.

Os resultados em relação às metaloproteinases e aos seus inibidores teciduais confirmam os dados de MEDEIROS *et al.* (2019). Por meio da dosagem de níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9, em grupos de indivíduos saudáveis, com FCI e com CCC5, que a MMP-2 não mostrou sensibilidade e especificidade suficientes para segregar grupos infectados (FCI e CCC 5) do grupo NI. No entanto, a MMP-2 mostrou-se capaz de isolar o grupo FCI do grupo CCC 5 com alta sensibilidade e especificidade. Quanto à MMP-9, pacientes infectados crônicos foram segregados, independentemente de sua forma clínica, do grupo NI. Não foram observadas diferenças significativas entre sensibilidade e especificidade para separar os grupos FCI do CCC5.

Também observamos uma correlação forte diretamente proporcional entre MMP-2 e TIMP-2 no grupo CCC5 (Gráfico 3), confirmando a preferência de bloqueio de TIMP-2 por MMP-2 e sugerindo a possibilidade de um mecanismo de compensação entre as MMPs e seus inibidores. Porém, não observamos correlação estatisticamente significativa entre MMP-9 e TIMP-1 no grupo CCC 5, o que pode sugerir que os níveis de TIMP-1 não sejam suficientes para regular a MMP-9 no grupo CCC 5, enquanto que os níveis de TIMP-2, que se apresentaram significativamente maiores no grupo CCC 5, poderiam controlar eficientemente a MMP-2.

Em conjunto, os resultados aqui descritos sugerem que MMP-2 e TIMP-2 poderiam ser candidatos a biomarcadores úteis de remodelamento cardíaco na doença de Chagas, uma vez que seus níveis são diferentes entre as formas indeterminada e cardíaca. No entanto, a MMP-9 e o TIMP-1, não teriam esse mesmo papel na doença de Chagas crônica.

Também foram avaliados os níveis séricos de peptídeos relacionados ao metabolismo colágeno: o propetídeo C-terminal do colágeno tipo I (PICP) e o telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTXI). Observou-se que tanto o PICP, quanto o CTXI não apresentaram diferenças entre os grupos estudados (Gráfico 4). Esses resultados diferem do esperado no estudo.

O PICP é um marcador da síntese do colágeno tipo I e é completamente clivado do procolágeno, de maneira estequiométrica 1:1, ou seja, no sangue são indicadores diretos da síntese contínua de colágeno tipo I (RISTELI, 1990). Ele também é uma molécula circulante derivado de colágeno que mostrou estar associado à fibrose miocárdica (LOPEZ *et al.*, 2015). Assim, esperávamos que os níveis séricos de PICP estivessem mais altos em CCC 5 em comparação aos pacientes com FCI e ao grupo de indivíduos saudáveis. Esses resultados podem ser explicados pelos seguintes motivos. Primeiro, a alteração na concentração sérica desse biomarcador em pacientes com CCC 5 pode representar anormalidades integradas do colágeno cardiovascular (por exemplo, um excesso de colágeno tipos I e III está presente na parede arterial dos pacientes com CCC 5). Segundo, a origem de seus tecidos e órgãos ainda não está clara (LOPÉZ, *et al.*, 2015). E finalmente, a utilidade diagnóstica desse biomarcador pode variar entre as doenças cardíacas. Em pacientes com insuficiência cardíaca (IC), tem sido observado um nível sérico mais alto de PICP em comparação com indivíduos saudáveis (LIJNEN *et al.*, 2012). Foi demonstrado que o PICP sérico e o PICP coronariano estão positivamente correlacionados com o conteúdo de colágeno do miocárdio (QUEREJETA *et al.*, 2004 e LOPEZ *et al.*, 2004). Entretanto, LOMBARDI *et al.* (2003) e SCHARTZKOPFF *et al.* (2002) não encontraram diferença no PICP sérico em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica e cardiomiopatia dilatada, em comparação aos controles, respectivamente.

O CTXI é um marcador de degradação do colágeno tipo I e é clivado pela collagenase, de maneira estequiométrica 1:1, durante o processo de decomposição de fibrilas de colágeno tipo I. Da mesma maneira, que PICP, esperávamos que os níveis séricos de CTXI estivessem mais altos em CCC 5 em comparação aos pacientes com FCI e ao grupo de indivíduos saudáveis, pois níveis séricos elevados de CTXI são observados em pacientes com insuficiência cardíaca de várias etiologias (CHALIKIAS e TZIAKAS, 2015). KLAPPACHER *et al.* (1995) observaram níveis séricos elevados de CTXI em pacientes com cardiomiopatia dilatada, em comparação com controles saudáveis. Em pacientes com cardiomiopatia dilatada, os níveis aumentados de CTXI podem refletir uma quebra maior do colágeno devido à dilatação dos ventrículos (DE JONG *et al.*, 2011). No entanto, no mesmo estudo, os níveis de CTXI também se correlacionaram significativamente com os níveis miocárdicos de colágeno tipo I. Além disso, em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica (LOMBARDI *et al.*, 2003), em pacientes com cardiomiopatia hipertensiva (PLAKSEJ *et al.*, 2009) e em pacientes com

insuficiência cardíaca com disfunção diastólica (MARTOS *et al.*, 2007; BARASCH *et al.*, 2009), os níveis de CTXI também são elevados, sugerindo uma mudança no equilíbrio do colágeno em direção à quebra do colágeno tipo I. Essa também é uma observação notável, porque essas cardiomiopatias geralmente mostram um aumento na rigidez do miocárdio como consequência da deposição de colágeno, assim como na CCC 5. Ademais, foi demonstrado que a fibrose miocárdica deve ser acompanhada por degradação do colágeno e ativação da metaloproteinase, sugerindo que a degradação do colágeno é um pré-requisito para a síntese, acúmulo do colágeno (JUGDUTT, 2003). Algumas explicações são propostas a fim de elucidar as observações encontradas neste trabalho. A origem de seus tecidos e órgãos também ainda não está clara. E a metodologia utilizada pode ter sido inadequada, pois em testes diagnósticos de outras patologias que utilizam CTXI, como na avaliação da absorção óssea, recomenda-se que ele seja dosado apenas no plasma e ainda pode ser influenciadas pelo ritmo circadiano, devendo ser colhido duas horas após o paciente ter acordado, pela manhã (BERGMANN *et al.*, 2009).

Os níveis séricos de galectina-3 também foram avaliados. Sabe-se que a Gal-3 possui um papel fibrogênico, visando à reparação das lesões, resultando na formação de fibrose e desarranjo arquitetural dos órgãos (SHARMA *et al.*, 2004). Além disso, alguns trabalhos sugerem que a Gal-3, além de exercer papel importante na fibrogênese cardíaca, constitua marcador prognóstico de fibrose miocárdica e esteja associada com risco aumentado de insuficiência cardíaca e mortalidade (SHARMA *et al.*, 2004, DE BOER *et al.*, 2009, LOPEZ-ANDRES *et al.*, 2012). Com isso, a expectativa seria de encontrarmos níveis mais elevados de Gal-3 em pacientes com CCC 5 em comparação a FCI e a NI.

Os resultados da concentração de Gal-3 foi maior no grupo CCC5 que no de FCI. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com doença de Chagas e os indivíduos não infectados (Gráfico 5). Estes dados sugerem que devido ao papel fibrogênico da Gal-3, esse marcador apresenta níveis mais elevados nos pacientes com maior intensidade de fibrose. Entretanto, o grupo NI apresentou um comportamento diferente do esperado. Provavelmente, em consequência das características clínicas não notificadas por este grupo ou pelo número amostral pequeno.

Na segunda etapa do estudo, avaliamos se esses possíveis marcadores séricos possuem relação de causa-efeito com os marcadores ecocardiográficos de disfunção ventricular sistólica (VEd e FEVE) e disfunção diastólica (relação E/e'), considerados,

respectivamente, marcadores substitutos de remodelamento cardíaco e fibrose miocárdica, nos pacientes com CCC 5.

Sabe-se que a extensão da fibrose correlaciona-se diretamente com o estágio de evolução da doença e com a classe funcional, com o VEd e a realação E/e' , e inversamente, com a FEVE, contribuindo para a estratificação prognóstica na CCC. Desta forma, com o intuito de verificar se realmente os marcadores sorológicos aqui estudados têm uma relação com o remodelamento cardíaco e a fibrose miocárdica nos pacientes com CCC 5, correlacionamos os mesmos com marcadores ecocardiográficos já conhecidos e utilizados na clínica médica.

Correlacionamos todos os marcadores avaliados neste trabalho, porém, apenas a Gal-3 e PICP tiveram relação com os marcadores ecocardiográficos.

Em realação à Gal-3, observou-se correlação moderada inversamente proporcional entre a Gal-3 e a FEVE, ou seja, à medida que a concentração de Gal-3 aumenta, diretamente proporcional ao aumento de remodelamento cardíaco e da fibrose miocárdica, a fração de ejeção do coração diminui (Gráfico 6). Este resultado está em acordo com o que esperávamos, pois ele confirma a possibilidade de atuação da Gal-3 como um marcador sorológico de remodelamento cardíaco ou de fibrose miocárdica. E também foram semelhantes aos de Echeverría *et al.* (2017), que correlacionaram a concentração de Gal-3 por ensaio imunoenzimático por fluorescência (ELFA), com a FEVE, em pacientes com fibrose miocárdica e com doença de Chagas. Os resultados descritos pelos autores revelaram correlação positiva diretamente proporcional entre a FEVE e a concentração de Gal-3. Dados experimentais também mostraram que a concentração de Gal-3 está associada a maior porcentagem de fibrose e colágenos em amostras de miocárdio e camundongos após dias de infecção por *T. cruzi* (PINEDA *et al.*, 2015, SOUZA *et al.*, 2017 e FERRER *et al.*, 2014).

Entretanto, não houve correlação entre a concentração de Gal-3 e VEd em pacientes com CCC 5 (Gráfico 6). Resultado que pode ser explicado pelas características ambulatoriais dos pacientes estudados, já que os valores de VEd dos mesmos são muito próximos e o diâmetro ventricular pouco aumentados.

Quanto à PICP, observou-se relação moderada diretamente proporcional em pacientes com CCC 5, ou seja, à medida que a concentração de PICP aumenta, diretamente proporcional ao aumento da fibrose miocárdica, aumenta-se a disfunção diastólica deste grupo de pacientes (Gráfico 7). Este resultado é relevante e está de acordo com a expectativa. Todavia, a relação é moderada e não observamos correlação

entre a concentração de PICP com os outros marcadores ecocardiográficos (VEd e FEVE), em pacientes com CCC 5, o que pode ser explicado pelas características ambulatoriais dos pacientes estudados. Logo, esses resultados sugerem que PICP é um candidato a marcador de fibrose miocárdica na CCC 5, contudo é necessário uma investigação mais aprofundada para fins de validação de um biomarcador sorológico.

Acreditamos que os resultados obtidos neste trabalho foram afetados pela a metodologia, utilização de amostra de conveniência que foram coletadas e estocadas previamente e o custo, o que impossibilitou a realização das dosagens dos marcadores sorológicos logo após a realização da coleta, o que diminuiria a perda de estabilidade das amostras e proporcionaria um resultado mais fidedigno.

Portanto, este estudo possibilitou a confirmação de resultados já obtidos como de MEDEIROS et al., (2019), em relação às metaloproteinases e seus inibidores teciduais, em que foram utilizados os mesmos grupos de pacientes ambulatoriais, confirmando a exatidão das nossas amostras. Também permitiu a identificação de futuros marcadores relacionadas ao processo de remodelamento cardíaco e de fibrose miocárdica nos pacientes com a FCI e CCC. A partir desta seleção, podemos aprofundar o estudo de Gal-3 e PICP e utiliza-los na clínica como sinalizador de subgrupos de pacientes que mereçam atenção médica especial, adotando-se condutas médico-trabalhistas e terapêuticas específicas, visando prevenir ou retardar a evolução clínica desfavorável desses pacientes.

Outro ponto relevante deste trabalho foi a possibilidade de realização de um estudo translacional, o qual abrange três aspectos: a aceleração de transmissão de conhecimentos de pesquisa básica à aplicação clínica; o aprofundamento de observações clínicas, em busca de melhor entendimento fisiopatológico pela interação com ciência básica; e a aplicação à população geral de conhecimentos básicos e conceitos oriundos de pesquisas clínicas. Assim, no geral, a medicina translacional procura acelerar a transmissão de conhecimento gerado em pesquisa, transformando tais conhecimentos em instrumentos práticos de investigação diagnóstica e/ou tratamentos. Este é um ponto muito importante e que justifica todo o trabalho que foi desenvolvido. Principalmente porque temos uma população bem caracterizada e acompanhada por vários anos. Logo, a ideia central partiu de várias observações e necessidades por observações clínicas no CTRDIP.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Este estudo identificou biomarcadores séricos relacionados com variáveis indicadoras de remodelamento cardíaco e fibrose miocárdica em pacientes com cardiopatia chagásica crônica. A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

1. Há relação entre MMP-2 e TIMP-2 e o remodelamento cardíaco.
2. A MMP-9 e o TIMP-1 não parecem exercer o mesmo papel, que MMP-2 e TIMP-2 na doença de Chagas crônica.
3. PICP é um candidato a marcador de fibrose miocárdica na CCC 5, contudo é necessário uma investigação mais aprofundada.
4. A Gal-3 é o principal potencial marcador de remodelamento cardíaco e fibrose miocárdica na CCC, podendo constituir um marcador de morbidade e prognóstico.

9. REFERÊNCIAS

- ALLA, F.; KEARNEY-SCHWARTZ, A.; RADAUCEANU, A.; DAS DORES, S.; DOUSSET, B.; ZANNAD, F. Early changes in serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in patients with uncomplicated hypertension and type II diabetes. **Eur. J. Heart Fail.**, 2006, 8, 147-153.
- AMBALE-VENKATESH, B.; LIMA, J.A.C. Cardiac MRI: a central prognostic tool in myocardial fibrosis. *Nature reviews. Cardiology*, January 2015, Vol.12(1), pp.18-29.
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes -2010. **Diabetes Care** 2010 Jan; 33(Supplement 1): S11-S61.
- AN, B., LIN, Y-S. & BRODSKY, B. Collagen interactions: Drug design and deliver. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016, 97: 69-84.
- ANDRADE, C.M.; CÂMARA, A.C.J.; NUNES, D. F.; GUEDES, P.M.M; PEREIRA, W.; OLIVEIRA, C.; DINIZ, R.V.Z., & GALVÃO, L.M.C. Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2015, 48(6), 706-715.
- ANDRADE, J.P.; MARIN-NETO, J.A.; PAOLA, A.A.V.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G.M.M.; BACAL, F.; BOCCHI, E.A.; ALMEIDA, D.R.; FRAGATA FILHO, A.A.; MOREIRA, M.D.C.V.; XAVIER, S S; OLIVEIRA JUNIOR. I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 2011, Vol.97(2 Suppl 3), pp.1-48
- ARAÚJO-JORGE T.C; WAGHABI M.C.; SOEIRO M.N.C., KERAMIDAS M.; BAILLY S.; FEIGE J.J. Pivotal role for TGF- β in infectious heart disease: the case of *Trypanosoma cruzi* infection and its consequent chagasic cardiomyopathy. **Cytok Growth Factors Rev**, 2008, 19: 405-413.
- ASHWORTH J.L.; MURPHY G.; ROCK M.J.; SHERRATT M.J.; SHAPIRO S.D.; SHUTTLEWORTH C.A.; KIELTY C.M. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. **Biochem J.** 1999; 340 (Pt1): 171-81.
- BARASCH, E.; GOTTDIENER, J.S.; AURIGEMMA, G.; KITZMAN, D.W.; HAN, J.; KOP, W.J.; TRACY, R.P. Association between elevated fibrosis markers and heart failure in the elderly: the cardiovascular health study. *Circ. Heart Fail.*, 2009, 2, 303-310.
- BERGMANN P, BODY JJ, BOONEN S, BOUTSEN Y, DEVOGELAER JP, GOEMAERE S. Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers os bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of theBelgian bone Club. **Int J clin Pract** 2009; 63(1): 19-26
- BESTETTI R.B., MUCCILLO G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology.** 1997;60:187-93.

BOGLIOLO, L. Anatomie causes of cardiac insufficiency in chronic chagasic cardiopathy (myocarditis) studied in comparison to anatomic causes of cardiac insufficiency in other cardiopathies. Part I. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 1976;29:419-24.

BONNANS, C. CHOU1, J. WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2014 December ; 15(12): 786–801. doi:10.1038/nrm3904.

BOWERS, STEPHANIE L.K ; BANERJEE, INDRONEAL ; BAUDINO, TROY A. The extracellular matrix: At the center of it all. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 2010, Vol.48(3), pp.474-482

BRAUNWALD, E. Biomarkers in Heart Failure. **The New England Journal of Medicine**, 15 May 2008, Vol.358(20), pp.2148-2159.

BRAZ, J. **Med Biol Res**. 1992; 25(10): 975-82.

BRAZILIAN CONSENSUS ON CHAGAS DISEASE. Consenso brasileiro em doença de chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol.38, pp.7-29, 2005.

BRENER, Z. Biology of Trypanosoma Cruzi. **Annual Reviews in Microbiology**, 1973, Vol.27(1), p.347-382

BUJAK, M; FRANGOIANNIS, N. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 2009, Vol.57(3), pp.165-176.

CANTY, E. G. AND KADLER, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **Journal of Cell Science** 118, 1341-1353, 2005.

CHAGAS C, VILLELA E. Forma cardiaca da Trypanosomiasse Americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1922; 14:5-61.

CHAKRABORTY, A.; EGHBALI, M. Collagenase activity in the normal rat myocardium. An immunohistochemical method. **Histochemistry**. 1989; 92(5): 391-6.

CHALIKIAS, G.K; TZIAKAS, D.N; Biomarkers of the extracellular matrix and of collagen fragments. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, 04 Jul 2014, 443:39-47.

CHUNG, H. J. & UITTO, J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic EpidermolysisBullosa. **Dermatologic Clinics**, 2010; 28(1): 93-105.

CORDA. S.; SAMUEL, J.L.; RAPPAPORT, L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. **Heart Fail Rev**. 2000; 5(2): 119-30.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.3, p.277-282, 2015.

CRUZ, G. S.; ANGELO, A. L. D.; LAROCCA, T. F.; MACEDO, C.T.; NOYARABELO, M.; CORREIA, L.C.L.; TORREÃO, J. A.; SOUZA, B. S. F.; SANTOS, R.R.D.; SOARES, M. B. P. Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 01 August 2015, Vol.105(5), pp.472-478.

CUNHA-NETO, E. CHEVILLARD, C. Chagas Disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics.(Report). **Mediators of Inflammation**, 2014.

DABOOR, S.M., BUDGE, S.M., GHALY, A.E., BROOKS, M.S. & DAVE, D. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 2010; 6: 239-263.

DAMODARAN S, PARKIN KL, FENNEMA OR. Química de alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre -RS: **Artmed**, 2010.

DE BOER RA, VOORS AA, MUNTENDAM P, VAN GILST WH, VAN VELDHUISEN DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. **European Journal of Heart Failure**. 2009;11:811-7.

DE CARVALHO AC, TANOWITZ HB, WITTNER M, DERMIETZEL R, ROY C, HERTZBERG EL, SPRAY DC. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. **Circ Res**. 1992 Apr;70(4):733-42.

DE JONG, S.; VAN VEEN, T.A.B.; DE BAKKER, J.M.T.; VOS, M.A.; VAN RIJEN, H.V.M. Biomarkers of myocardial fibrosis. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 2011, 57, 522-535.

DE FARIA, C R ; DE REZENDE, J M ; RASSI, A. Peripheral denervation in the various clinical forms of Chagas' disease. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, September, Vol.46(3), pp.225-37, 1988.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p. **ISBN 85-85676-31-0**. Available from SciELO Books.

DIAS, J.C.P; FEITOSA, VR ; FERRAZ, AN ; RODRIGUES, VLC ; DEALENCAR, SA ; SESSA, PA. Feeding and vectorial capacity of *triatoma-vitticeps* (stal, 1859) in relation with human chagas-disease in espirito-santo state, brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.84 Suppl 4, pp.165-173, 1989.
doi:10.1242/jcs.01731

ECHEVERRÍA, L E ; ROJAS, L Z ; CALVO, L S ; ROA, Z M ; RUEDA-OCHOA, O L ; MORILLO, C A ; MUKA, T ; FRANCO, O H. Profiles of cardiovascular

biomarkers according to severity stages of Chagas cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, 15 January 2017, Vol.227, pp.577-582

EGHBALI, M.; CZAJA, M.J.; ZEYDEL, M.; WEINER, FR.; ZERN, M.A.; SEIFTER, S.; BLUMENFEED, O.O. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 1988, 20, 267-276.

FARES RC, GOMES JDEA, GARZONI LR, WAGHABI MC, SARAIVA RM, MEDEIROS NI, OLIVEIRA-PRADO R, SANGENIS LH, CHAMBELA MDA C, DE ARAÚJO FF, TEIXEIRA-CARVALHO A, DAMÁSIO MP, VALENTE VA, FERREIRA KS, SOUSA GR, ROCHA MO, CORREA-OLIVEIRA R. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. **Infect Immun.** 2013 Oct;81(10):3600-8.

FAUZI, M.B., LOKANATHAN, Y., AMINUDDIN, B.S., RUSZYMAH, B.H.I. & CHOWDHURY, R.S. Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thinfilms for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, 2016, 68:163–171.

FEDAK PW, VERMA S, WEISEL RD, SKRTIC M, LI RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). **Cardiovasc Pathol.** 2005; 14: 109-19.

FELDMAN, A.M ; COMBES, A; WAGNER, D; KADAKOMI, T; KUBOTA, T; YOU L, YUN; MCTIERNAN, C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, 01 March 2000, Vol.35(3), pp.537-544.

FELDMAN, L ; REQUEJO, A ; JAIMOVICH, G ; MILOVIC, V ; LISTELLO, V ; RIVAS, MM ; PUENTE, D ; ALTCLAS, J. Bone marrow transplantation (BMT) and Chagas disease. **Blood**, 2003 Nov 16, Vol.102(11), pp.442B-443B

FERREIRA, A.M., GENTILE, P., CHIONO, V. & CIARDELLI, G. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, 2012, 8: 3191-3200.

FERRER, M.F ; PASCUALE, C. A ; GOMEZ, R.M ; LEGUIZAMÓN, M.S. FONTANA V, SILVA PS, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Metaloproteinases da matriz circulante e seus inibidores na hipertensão. **Clin. Chim. Acta** , 413 (, 2012) , pp. 656 – 662.

FERRER, M., PASCUALE, C., GOMEZ, R., & LEGUIZAMÓN, M.. Os isolados de DTU I do Trypanosoma cruzi induzem a regulação positiva da Galectina-3 na miocardite e fibrose murinas. **Parasitology**, 2014 141 (6), 849-858. doi: 10.1017 / S0031182013002254.

GELSE, K., PÖSCHL, E. & AIGNER, T. Collagens–structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2003, 55:1531-1546.

GEURTS N, OPDENAKKER G, VAN DEN STEEN PE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacol Ther.** 2012 Mar;133(3):257-79.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p.115-121, 2009.

GONZALEZ, A.; LOPEZ, B.; QUEREJETA, R.; ZUBILLAGA, E.; ECHEVERRIA, T.; DIEZ, J. Filling pressures and collagen metabolism in hypertensive patients with heart failure and normal ejection fraction. **Hypertension**, 2010, 55, 1418-1424.

GUTIERREZ FR, LALU MM, MARIANO FS, MILANEZI CM, CENA J, GERLACH RF, SANTOS JE, TORRES-DUEÑAS D, CUNHA FQ, SCHULZ R, SILVA JS. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Infect Dis**. 2008 May 15;197(10):1468-76.

GUTIERREZ FR, LALU MM, MARIANO FS, MILANEZI CM, CENA J, GERLACH RF, SANTOS JE, TORRES-DUEÑAS D, CUNHA FQ, SCHULZ R, SILVA JS. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Infect Dis**. 2008 May 15;197(10):1468-76.

HENDERSON NC, SETHI T. The regulation of inflammation by galectin-3. **Immunological Reviews**. 2009;230:160-71.

HIGUCHI MDE L, BENVENUTI LA, MARTINS REIS M, METZGER M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**. 2003;60:96-107.

Influence of galectin-3 as a biomarker of fibrosis intensity in chronic chagasic cardiomyopathy: a systematic review (revisão sistemática em fase de correção). https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42019119309.

IZAWA H, MUROHARA T, NAGATA K, ISOBE S, ASANO H, AMANO T, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: A pilot study. **Circulation**. 2005;112:2940-5.

JALIL JE, DOERING CW, JANICKI JS, et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circ Res**. 1989; 64: 1041-50.

JANICKI JS, BROWER GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. **J Card Fail**. 2002; (6S): S319-25.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. (2013). **Histologia básica**. Rio de Janeiro, Brasil.

KANIA, A., JOHNSON, R.L., AND JESSELL, T.M. Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of References motor axons in the vertebrate limb. **Cell** 102, 161–173, 2000.

KLAPPACHER, G.; FRANZEN, P.; HAAB, D.; MEHRABI, M.; BINDER, M.; PLESCH, K.; PACHER, R.; GRIMM, M.; PRIBILL, I.; EICHLER, H.G.. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. **Am. J. Cardiol.**, 1995, 75, 913-918.

KÖBERLE, F. Neurological aspects of Chagas disease. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. Vol.25(3), pp.159-174, 01 September 1968.

KUPAI K, SZUCS G, CSEH S, HAJDU I, CSONKA C, CSONT T, FERDINANDY P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **J Pharmacol Toxicol Methods**. 2010 Mar-Apr;61(2):205-9.

LAMBERT, ELISE & DASSÉ, EMILIE & HAYE, BERNARD & PETITFRÈRE, EMMANUELLE. TIMPs as multifacial proteins. **Critical reviews in oncology/hematology**. 2004. 49. 187-98. 10.1016/j.critrevonc.2003.09.008.

LANNES-VIEIRA, JOSELI NUNES; et al. TNF-a and TNFR in Chagas Disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.691, p.221-230, 2011.

LI LC, LI J, GAO J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2014;351:336-43.

LIJNEN, P.J. MAHARANI,T. FINAHARI, N. PRIHADI, J. S. Serum Collagen Markers and Heart Failure. **Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets**, 2012, 12, 51-55.

LINDEN G, LORIENT D. New ingredients in food processing: biochemistry and agriculture. **Boca Raton (FL): CRC Press**; 2000.

LOMBARDI, R.; BETOCCHI, S., LOSI, M.A.; TOCCHETTI, C.G.; AVERSA, M.; MIRANDA, M.; D’ALESSANDRO, G.; CACACA, A.; CHIAMPPI, Q.; CHIARELLO, M. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation**, 2003,108, 1455-1460.

LOPEZ, B.; QUEREJETA, R.; GONZALEZ, A.; SANCHEZ, E.; LARMAN, M.; DIEZ J. Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, 2004, 43, 2028-2035.

LOPEZ-ANDRÈS N, ROSSIGNOL P, IRAQI W, FAY R, NUÉE J, GHIO S, CLELAND JG, ZANNAD F, AND LACOLLEY P. Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. **Eur J Heart Fail** 2012; 14:74–81.

MACÊDO, V ; PRATA, A ; DA SILVA, G R ; CASTILHO, E. Prevalence of electrocardiographic changes in Chagas' disease patients (preliminary information about the National Electrocardiographic survey. **Arquivos brasileiros de cardiologia**. Vol.38(4), pp.261-4, April 1982.

MACKINNON AC, FARNWORTH SL, HODKINSON PS, HENDERSON NC, ATKINSON KM, LEFFLER H, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. **Journal of Immunology**. 2008;180:2650-8.

MAKAREEVA, E. & LEIKIN, S. Collagen Structure, Folding and Function. In Shapiro, J.R., Byers, P.H., Glorieux, F.H., Sponseller, P.D. (Eds). **Osteogenesis Imperfecta: A Translational Approach to Brittle Bone Disease**, 2014; (pp. 71-83). New York: Elsevier.

MALEMUD CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. **Front Biosci**. 2006 May 1;11:1696-701.

MARIN-NETO JA, MARZULLO P, MARCASSA C, GALLO JUNIOR L, MACIEL BC, BELLINA CR, et al. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. **The American Journal of Cardiology**. 1992;69:780-4.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMÕES, M.V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**, v.9, n.115, p.1109-1123, 2007.

MARTOS, R.; BAUGH, J.; LEDWIDGE, M.; O'LOUGHLIN, C.; CONLON, C.; PATLE, A.; DONELLY, S.C.; MCDONALD, K. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. **Circulation**, 2007, 115, 888-895.

MEDEIROS NI, GOMES JAS, FIUZA JA, SOUSA GR, ALMEIDA EF, NOVAES RO, ROCHA VLS, CHAVES AT, DUTRA WO, ROCHA MOC, CORREA-OLIVEIRA R. MMP-2 and MMP-9 plasma levels are potential biomarkers for indeterminate and cardiac clinical forms progression in chronic Chagas disease. **Sci Rep**. 2019 Oct 2;9(1):14170. doi: 10.1038/s41598-019-50791-z. PMID: 31578449; PMCID: PMC6775161.

MENEZES C, COSTA GC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug Dev Res**. 2011;72(6):471-479. doi:10.1002/ddr.20454.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 1. ed. Brasília – DF. cap. 8, p. 505-528. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **ISSN 2358-9450**: Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil, v. 46, n. 21, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília – DF. Caderno 10, p. 1-18. 2009.

MISHRA, A. The effect of fulvic acid on pre- and postaggregation state of A beta 17-42: Molecular dynamics simulation studies. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics**, 2013 Dec, Vol.1834(12), pp.2869-2869.

MONTES GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, January 1996, Vol.20(1), pp.15-27

MYLLYHARJU, J. & KIVIRIKKO, K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **Trends in Genetics**, 2004; 20: 33-43.

NAGASE H, VISSE R, MURPHY G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**. 2006 Feb 15;69(3):562-73.

NEKLYUDOV, A. Nutritive Fibers of Animal Origin: Collagen and Its Fractions as Essential Components of New and Useful Food Products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2003, Vol.39(3), pp.229-238.

NOYA-RABELO, M M. LAROCCA T F. MACÊDO, C T. TORREÃO, J A. SOUZA, B S F S. VASCONCELOS, J F. SOUZA, L E. SILVA, A M. DOS SANTOS, R R. CORREIA, L C L. SOARES, M B P. Evaluation of Galectin-3 as a Novel Biomarker for Chagas Cardiomyopathy. **Cardiology**, 2017;136:33–39.

NUNES MC, DONES W, MORILLO CA, ENCINA JJ, RIBEIRO AL, Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of C. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**. 2013;62:767-76.

NUNES MCP, BARBOSA MM, RIBEIRO ALP, FENELON LMA, ROCHA MOC. Predictors of mortality in patients with dilated cardiomyopathy: relevance of Chagas disease as an etiological factor. **Rev Esp Cardiol**. 2010; 63 (7): 788-97.

PARRY DAD, CRAIG AS. Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: **Nomni ME. Collagen**. Vol II. Roca-Raton, CRC Press, 1-23, 1988.

PEDROSA RC, CAMPOS MC. Teste ergométrico e Holter 24 horas na detecção de arritmias ventriculares complexas em diferentes estágios da cardiopatia chagásica crônica. **Rev Bras Med Trop**. 2004;37(5):376-83.

PINEDA, MIGUEL A ; CUERVO, HENAR ; FRESNO, MANUEL ; SOTO, MANUEL ; BONAY, PEDRO. Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective Immune Responses in a Murine Model of Trypanosoma cruzi Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 2015, Vol. 212(7), pp.1160-1171.

PLAKSEJ, R.; KOSMALA, W.; FRANTZ, S.; HERRMANN, S.; NIEMANN, M.; STÖRK, S.; WACHTER, R.; ANGERMANN, C.E.; ERTL, G.; BIJNENS, B.; WEIDERMANN, F. Relation of circulating markers of fibrosis and progression of left and right ventricular dysfunction in hypertensive patients with heart failure. **J. Hypertens.**, 2009, 27, 2483-2491.

POLYAKOVA V, LOEFFLER I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, Risteli J, Schaper J, Kostin S. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. **Int J Cardiol.** 2011 Aug 18;151(1):18-33.

PRATA A, LOPES ER, CHAPADEIRO E. Characteristics of unexpected sudden death in Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 1986;19:9-12.

PRATA A, LOPES ER, CHAPADEIRO E. Characteristics of unexpected sudden death in Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1986;19:9-12. Prestes, R.C. (2013). Collagen and Its Derivatives: Characteristics and Applications in Meat Products. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, 15(1): 65-74.

QUEREJETA, R.; LOPEZ, B.; GONZALEZ, A.; SANCHEZ, E.; LARMAN, M.; UBAGO, J.L.M.; DIEZ J. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. **Circulation**, 2004, 110, 1263-1268.

RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO JA. CHAGAS DISEASE. **LANCET** 2010; 375:1388–402. 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.

RASSI A, JR., RASSI SG, RASSI A. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** 2001;76:75-96.

RASSI, A ; MARIN-NETO, J A . Chagas disease. **The Lancet**, Vol.375(9723), pp.1388-1402, 2010.

RIBEIRO AL, NUNES MP, TEIXEIRA MM, ROCHA MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology.** 2012;9:576-89.

RIBEIRO AL, SABINO EC, MARCOLINO MS, SALEMI VMC, IANNI BM, et al. Electrocardiographic Abnormalities in Trypanosoma cruzi Seropositive and Seronegative Former Blood Donors. **PLoS Negl Trop Dis**, 2013, 7(2): e2078. doi:10.1371/journal.pntd.0002078.

RIBEIRO, A.L. ; ROCHA, M.O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, May-Jun, Vol.31(3), pp.301-314, 1998.

RIBEIRO, A.L.P. ; REIS, A.M. ; TEIXEIRA, M.M. ; ROCHA, M.O.C. Brain natriuretic peptide in Chagas' disease: Further insights. **Lancet**. Vol.362(9380), p.333, 26 July 2003.

RISTELI L. RISTELI J. Biochemical Markers of Bone Metabolism. **Annals of Medicine**, 1993, 25: 4, 385-393, DOI: 10.3109 / 07853899309147301.

ROCHA MO, RIBEIRO AL, TEIXEIRA MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Frontiers in Bioscience**. 2003;8:e44-54.

ROCHA MO, TEIXEIRA MM, RIBEIRO AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. 2007;5:727-43.

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. **Journal of the American College of Cardiology**. 2005;46:1553-8.

SCHARTZKOPFF, B.; FASSBACH, M.; PELZER, B.; BREHM, M.; STRAUER, B.E. Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eu. J. Heart Fail.*, 2002, 4, 439-404.

SENARATNE, L.S., PARK, P.J. & KIM, S.K. Isolation and characterization of collagen from brownbacked toadfish (*Lagocephalusgloveri*) skin. **Bioresource Technology**, 2006; 97:191-197.

SHARMA UC, POKHAREL S, VAN BRAKEL TJ, VAN BERLO JH, CLEUTJENS JP, SCHROEN B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. **Circulation**. 2004;110:3121-8.

Silva RM, Tavora MZ, Gondim FA, Metha N, Hara VM, Paola AA. Predictive value of clinical and electrophysiological variables in patients with chronic chagasic cardiomyopathy and nonsustained ventricular tachycardia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2008;75:33-47.

SILVEIRA, AC ; DIAS, JCP. The control of vectorial transmission. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, 2011, Vol.44 Suppl 2, pp.52-63.

SÖDERHÄLL, C., MARENHOLZ, I., KERSCHER. T., RUSCHENDORF, F., ESPARZA-GORDILLO, J., WORM, M., GRUBER, C., MAYR, G., ALBRECHT, M., ROHDE, K., SCHULZ, H., WAHN, U., HUBNER, N. & LEE, Y. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. **PLOS Biology**, 2007, 5:1952-1961.

SOUZA BSF, SILVA DN, CARVALHO RH, SAMPAIO GLA, PAREDES BD, ARAGÃO FRANÇA L, AZEVEDO CM, VASCONCELOS JF, MEIRA CS, NETO PC, MACAMBIRA SG, DA SILVA KN, ALLAHADADI KJ, TAVORA F, DE SOUZA NETO JD, DOS SANTOS RR, SOARES MBP. Association of Cardiac Galectin-3 Expression, Myocarditis, and Fibrosis in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Am J Pathol**. 2017 May;187(5):1134-1146. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.01.016.

SOUZA RR. Aging of myocardial collagen. **Biogerontology**. 2002; 3: 325-35.

SOUZA, BSF ; SILVA, KN ; SILVA, DN; ROCHA, VPC ; PAREDES, BD; AZEVEDO, CM; NONAKA, CK; CARVALHO, GB; VASCONCELOS, J F; SANTOS, RR; SOARES, MBP, LUC. Galectin-3 Knockdown Impairs Survival,

Migration, and Immunomodulatory Actions of Mesenchymal Stromal Cells in a Mouse Model of Chagas Disease Cardiomyopathy Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. **Physiol Rev.** 2007; 87: 1285-342.

TZIAKAS, D ; CHALIKIAS, G ; KARELI, D ; TSIGALOU, C ; RISGITS, A ; KIKAS, P ; MAKRYGIANNIS, D ; CHATZIKYRIAKOU, S ; KAMPOUROMITI, G ; SYMEONIDIS, D ; VOUDRIS, V ; KONSTANTINIDES, S. Spot urine albumin to creatinine ratio outperforms novel acute kidney injury biomarkers in patients with acute myocardial infarction. **International Journal Of Cardiology**, 2015 Oct 15, Vol.197, pp.48-55

UITTO, J., CHU, M.L., GALLO, R. & EISEN, A.Z. Collagen, elastic fibers, and extracellular matrix of the dermis, In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ (Ed). **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 2008. 7th ed. New York: McGraw-Hill.

VARGAS, DEISI & AUDÍ, L & CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 1997, 43. 10.1590/S0104-42301997000400016.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B..PETTI, M. BERTOCCHI, G. ÁLVAREZ, M G ; ARMENTI, A. Indicadores clínicos de progresión de la miocarditis chagásica crónica. **Revista Española de Cardiología**, 2005, Vol.58(9), pp.1037-1044.

WEBER KT, BRILLA CG. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. **Clin Cardiol**. 1993; 16(5 Suppl 2):II10-4.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

WILSON EM, SPINALE FG. Myocardial remodeling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. **Ann Med**. 2001; 33: 623-34.

WYNN TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**. 2008 Jan;214(2):199-210.

YILMAZ, Y; EREN, F. REPLY TO AYDIN et al: To what extent is it right to measure serum vaspin, obestatin, and apelin-36 levels without a protease inhibitor in nonalcoholic fatty liver disease? **Metabolism**, 2011, Vol.60(7), pp.e2-e2.

ZAITSEVA, O. V. SHANDRENKO, S. G. VELIKY, M. M. Biochemical markers of bone collagen type I metabolismo. Ukr. **Biochem. J.**, 2015, Vol. 87, N 1.

ZEUGOLIS, D.I. & RAGHUNATH, M. Collagen: Materials Analysis and Implant Uses. In: P. Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D. Grainger, C. Kirkpatrick (Eds.). **Comprehensive Biomaterials** (pp. 261-278). Ed. **Elsevier**, 2011.

ZILE, M.R.; DESANTIS, S.M.; BAICA, C.F.; STROUD, R.E.; THOMPSON, S.B.; MCCLURE, C.D.; MEHURG, S.M.; SPINALE, F.G. Plasma biomarkers that reflect

determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. **Circ. Heart Fail.**, 2011, 4, 246-256.

ZIPES DP, CAMM AJ, BORGGREFE M, BUXTON AE, CHAITMAN B, FROMER M, et al; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. **Circulation**. 2006;114(10):e385-484.

10. ANEXOS

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP – Plataforma Brasil.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: FATORES DETERMINANTES DE PROGNÓSTICO E MORBIDADE NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA - FASE III

Pesquisador: Manoel Otávio da Costa Rocha

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 48354315.8.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Minas Gerais

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.980.507

Apresentação do Projeto:

Emenda solicita atualização do projeto que já está na FATORES DETERMINANTES DE PROGNÓSTICO E MORBIDADE NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA - FASE III - Fibrose miocárdica e arritmogenicidade cardíaca. Também solicita atualização dos objetivos específicos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: analisar a relação entre o grau de fibrose cardíaca e a intensidade e complexidade da extrassístolia ventricular em pacientes com cardiomiopatias chagásica e idiopática.

Objetivos específicos atualizados: 1) Verificar e comparar o grau e distribuição da fibrose miocárdica nas cardiomiopatias dilatadas (MCD) chagásica e idiopática; 2) Verificar e comparar a intensidade e complexidade da extrassístolia ventricular nas MCD chagásica e idiopática; 3) Analisar a relação entre o grau e distribuição da fibrose miocárdica e arritmogenicidade ventricular nos pacientes com MCD chagásica e idiopática; 4) Estudar, comparativamente, o potencial da dispersão mecânica pelo strain bidimensional na detecção de anormalidades relativas à contração e expansão longitudinal regional do ventrículo esquerdo entre pacientes chagásicos e não chagásicos com e sem arritmia ventricular maligna; 6) Comparar o grau de fibrose miocárdica, avaliada pela ressonância magnética cardíaca, e a dispersão mecânica pelo strain bidimensional. 5) Analisar, pelo strain bidimensional, o comportamento funcional dos diversos segmentos das

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.980.507

paredes do ventrículo esquerdo, visando detectar presença de heterogeneidade segmentar em relação à contração e expansão longitudinal

nos dois grupos, comparando os achados com o padrão contrátil e grau de fibrose encontrados pela ressonância magnética cardíaca. 6) analisar a relação entre níveis séricos de galectina-3 e dos peptídeos (propeptídeo C-terminal do colágeno tipo I [CICP] e (telopectídeo C-terminal do colágeno tipo I [CITP] com o grau de fibrose miocárdica e a arritmogenicidade ventricular nos pacientes com MCD chagásica e idiopática; 7) verificar a associação dos níveis séricos das citocinas (IFN-g, TGF-, TNF- IL-1b, IL-6 e IL-13) e das quimiocinas (MCP-1/CCL2) com o grau de fibrose miocárdica nas MCD chagásica (natureza infecciosa) e idiopática; 8) verificar a associação entre os níveis séricos de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 com o grau de fibrose miocárdica nas MCD chagásica e idiopática.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram descritos na Plataforma Brasil:

"Riscos: Serão realizados avaliação cardíaca por ressonância magnética, antes do implante do CDI, o que pode ocasionar desconforto em pessoas que não se sentem bem em ambientes fechados ou devido à punção de veia do braço e injeção de produto chamado gadolínio, necessária para realização do exame. Este procedimento não oferece maior risco à saúde dos pacientes e não oferece risco de radiação. O exame de cintilografia para pesquisa de inervação cardíaca com 123-Iodo- metaiodobenzilguanidina e a cintilografia de perfusão miocárdica estresse/repouso serão realizados no setor de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas do HC-UFMG por equipe de enfermagem e por Médicos Nucleares. Requer a administração de material radioativo por via venosa (não é contraste) e não tem efeitos colaterais e, em seguida, da aquisição de imagens em equipamento denominado gama-câmara. Este equipamento é aberto, não causando sensação de falta de ar. É possível permanecer com o seu acompanhante na sala de exame. A radiação que o paciente recebe ao se submeter a este estudo é aproximadamente a mesma recebida quando realiza um estudo radiológico contrastado (ex: urografia excretora). A introdução da agulha poderá causar uma discreta dor no local, podendo ou não formar um pequeno hematoma (inchaço e vermelhidão local). Poderá ocorrer elevação da sua pressão arterial, para sua segurança a pressão arterial será mensurada (medida) antes e após a injeção do material e este será infundido lentamente conforme definido na literatura. Todo procedimento será acompanhado por um médico. As medidas a serem tomadas para controle de seu tratamento serão as habituais incluindo a realização de exame laboratoriais periódicos para o que serão feitas punções de veia

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.980.507

do braço por pessoa treinada para isso. As vezes o paciente poderá sentir um pouco de dor no local da punção ou apresentar um pequeno hematoma local, de desaparecimento espontâneo.

Benefícios: Os resultados destes estudos podem contribuir para o melhor conhecimento do papel da resposta imune na patogênese da cardiopatia chagásica, especialmente no que se refere à evolução clínica, remodelagem cardíaca e arritmogenicidade, assim como para o refinamento da estratificação de risco dos pacientes candidatos a implante de CDI e adoção de medidas terapêuticas visando à otimização do emprego desta importante, mas dispendiosa e complexa, forma de terapia"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador:

O projeto em análise é Projeto de Pesquisa - PQ, referente a bolsa de produtividade CNPq do Prof Manoel Otávio da Costa Rocha. São bolsas destinadas aos pesquisadores que se destaquem entre seus pares, valorizando sua produção científica segundo critérios normativos, estabelecidos pelo CNPq. Os subprojetos listados apresentam diferentes aspectos metodológicos, tendo em comum várias características: 1) são estudos clínicos, de desenho transversal (na avaliação da morbidade e no reconhecimento dos determinantes fisiopatogenéticos) ou longitudinal – estudo de coorte (quando desenhados para avaliar o prognóstico); 2) são desenvolvidos em estratégia integrada, com dados coletados de pacientes em acompanhamento no Hospital das Clínicas da UFMG, com otimização dos recursos diagnósticos e procurando-se limitar do desconforto dos sujeitos da pesquisa; 3) os critérios de seleção e rotinas de realização de exames complementares estão padronizados nos serviços e laboratórios envolvidos no projeto, com variações decorrentes apenas das especificidades de cada subprojeto.

Segundo a descrição da metodologia na Plataforma Brasil, a população deste estudo se mantém a mesma da versão 2 apreciada no Parecer 1.420.935 deste Comitê. A amostra é composta por 390 pacientes em acompanhamento do CTR-DIP e 80 pacientes do Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG. Essa população é dividida da seguinte forma: 100 pacientes com FCI, 250 com cardiomiopatia dilatada chagásica (CCC5), 80 com cardiomiopatia dilatada idiopática (CMI) e 40 indivíduos saudáveis, controles.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não foram adicionados documentos diferentes dos apresentados na versão 2, Fase 2 do projeto, apreciada no Parecer 1.420.935 deste Comitê. Desta forma, não houve alteração documentos, não houve alteração dos riscos, nem dos TCLE's.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 2.980.507

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou favorável à aprovação da emenda fase 3 e da alteração dos objetivos específicos, uma vez que a alteração dos objetivos específicos alterará apenas a análise dos dados coletados com relação a fase 2, e não haverá alteração da metodologia da coleta dos dados, assim como não haverá alteração nos TCLE's, e nos riscos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_730961 E1.pdf	02/10/2018 15:07:31		Aceito
Outros	ParecerRelator2018.pdf	02/10/2018 14:42:05	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Documento3.pdf	10/01/2016 23:29:27	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Documento2.pdf	10/01/2016 23:28:50	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Outros	Documento1.pdf	10/01/2016 23:26:49	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RM 12082015.doc	12/08/2015 15:39:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Cintilografia 12082015.doc	12/08/2015 15:38:55		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE projeto Produtividade 12082015.doc	12/08/2015 15:38:16		Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 2.980.507

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.CNPq.2013.Final.doc	06/07/2015 17:01:51		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.jpg	06/07/2015 16:52:35		Aceito
Outros	Aprovação Dep Clínica Médica Proj. Chagas.pdf	06/05/2015 14:52:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Subprojeto 1.pdf	24/03/2015 15:21:45		Aceito
Parecer Anterior	Comitê de Ética em Pesquisa _ UFMG Subprojeto 1.pdf	24/03/2015 15:02:13		Aceito
Outros	Parecer Projeto Chagas _ .jpg	23/03/2015 16:01:43		Aceito
Parecer Anterior	Aprovação COEP Subprojeto 1.doc	23/03/2015 15:57:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 24 de Outubro de 2018

Assinado por:
Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pessoas com chagas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CASO – CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

Projeto de Pesquisa

TÍTULO: Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

Descrição da Pesquisa:

OBJETIVOS: O estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos presentes em pacientes chagásicos, auxiliando na compreensão do aparecimento das lesões e da evolução da doença e, consequentemente, no manejo clínico dos pacientes.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Será colhida pequena amostra de sangue (20mL) em tubos estéreis. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença.

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos não chagásicos saudáveis que constituirão o grupo controle.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá

cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – 3409-9547

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31.270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592, ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Ass. do paciente ou responsável: _____

Ass. da testemunha: _____

Ass. do orientando _____

Ass. do pesquisador responsável (orientador) _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE 1 –
CARDIOMIOPATIA DILATADA IDIOPÁTICA

Projeto de Pesquisa

TÍTULO: Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

Descrição da Pesquisa:

OBJETIVOS: O estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos presentes em pacientes chagásicos e com cardiopatia dilatada idiopática, auxiliando na compreensão do aparecimento das lesões e da evolução da doença e, conseqüentemente, no manejo clínico dos pacientes.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Será colhida pequena amostra de sangue (20mL) em tubos estéreis. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença.

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos não chagásicos saudáveis que constituirão o grupo controle.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá

cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – 3409-9547

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31.270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592, ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Ass. do paciente ou responsável: _____

Ass. da testemunha: _____

Ass. do orientando _____

Ass. do pesquisador responsável (orientador) _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE 2 –
INDIVÍDUO SAUDÁVEL

Projeto de Pesquisa

TÍTULO: Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

Descrição da Pesquisa:

OBJETIVOS: O estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos presentes em pacientes chagásicos, auxiliando na compreensão do aparecimento das lesões e da evolução da doença e, conseqüentemente, no manejo clínico dos pacientes.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Será colhida pequena amostra de sangue (20ml) em tubos estéreis. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença. No seu caso, em particular, você faz parte do chamado “grupo controle”, isto é, paciente sem história de ter contraído doença de Chagas e com exame de sangue negativo para essa doença.

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os dos indivíduos não chagásicos saudáveis que constituirão o grupo controle.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – 3409-9547

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31.270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592, ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Ass. do paciente ou responsável: _____

Ass. da testemunha: _____

Ass. do orientando _____

Ass. do pesquisador responsável (orientador) _____

11. APÊNDICE

Consolidado das características gerais, clínicas e sorológicas dos grupos de indivíduos com cardiopatia chagásica crônica grau 5 (CCC5), com forma crônica indeterminada (FCI) e não infectados por *Trypanosoma cruzi* (NI), atendidos no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) “Orestes Diniz”, entre os anos 2014 e 2019.

Grupo CCC5

	N	GÊNERO	IDADE	Ved	FEVE	EIE	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	PICP	CTIX	GAL 3
	1	1	49	-	-	-	80185	264725	81923	54817	10,09367	4,135309	2,946288
	2	2	46	55	47	8,25	96142	210698	59573	62850	8,775368	3,821722	3,112164
	3	1	57	75	33	8,75	78017	114728	73760	33456	13,0425	4,14892	2,8594
	4	1	44	58	44	7,78	65507	239300	85715	33059	16,33825	3,292811	3,617694
	5	1	43	-	-	-	50751	170782	46914	36777	9,798785	5,425956	3,522907
	6	1	65	-	-	-	118538	329438	68637	59081	12,86904	3,29642	3,009479
	7	2	40	59	46	14,00	115251	48942	72205	60552	12,00173	2,922254	2,551343
	8	2	-	51	48	6,58	100208	38463	79777	57711	9,764094	6,401824	2,898894
	9	2	58	-	-	-	74288	119090	62016	52095	15,60971	6,957533	1,729858
	10	2	55	63	48	17,00	73624	45091	85120	56376	15,81787	3,645902	2,985782
	11	2	59	59	45	8,41	56357	80832	75325	26384	14,1353	2,291486	3,309637
	12	1	57	59	45	9,25	23460	173842	71801	38670	13,268	7,197825	3,35703
	13	1	44	-	-	-	76269	217255	86540	52937	10,16305	3,063177	3,909953
	14	1	73	-	-	-	74067	212323	64379	42758	16,11275	10,25287	4,004739
	15	1	74	69	31	32,00	121035	129554	82008	70822	20,13703	9,09906	3,483412
	16	1	62	-	-	-	123518	138468	84590	71965	11,03036	2,951202	3,183254
	17	1	49	85	21	-	112133	212323	69205	58607	15,2281	4,43559	2,898894
	18	1	63	58	51	6,71	61803	339879	78972	28775	10,87424	2,796989	3,017377
	19	2	49	-	-	-	54548	111469	78850	49380	11,84562	4,38247	2,796209
	20	2	70	55	50	10,81	54184	78667	64379	44665	12,24458	2,96416	3,625592
	21	2	50	59	38	20,00	50999	116100	81360	20474	20,62272	3,759447	3,349131
	22	1	56	55	50	10,81	37348	137275	39463	18061	13,33738	2,941521	3,42812
	23	1	57	59	38	20,00	60631	78190	77996	48831	10,73547	2,865205	3,175356
	24	1	68	-	-	-	88900	210777	80578	62225	9,417172	3,551311	3,056872
	25	1	70	62	42	7,67	51739	140180	85984	28605	11,08239	6,208472	2,448657
	26	2	68	-	-	-	81048	191321	106900	25068	14,84649	7,454577	3,270142
	27	1	43	-	-	-	69376	199948	75325	55044	19,84215	2,736385	3,49921
	28	2	49	76	38	10,00	50751	123796	73421	44665	10,1804	5,042034	2,725118
	29	2	62	-	-	-	59925	232002	61355	54136	13,84042	4,358535	3,017377
	30	1	63	58	48	-	85319	138438	62631	50672	18,80139	3,979782	3,127962
	31	1	61	-	-	-	0	0	0	0	5,577647	0	3,334109
	32	1	60	-	43	-	0	0	0	0	10,38588	0	0,793023
	33	1	44	-	48	-	0	0	0	0	12,69176	0	1,270543
	34	2	53	-	19	-	0	0	0	0	7,065882	0	2,437209
	35	2	52	-	45	-	0	0	0	0	7,895294	0	1,881395
	36	1	50	-	51	-	0	0	0	0	15,68118	0	1,914729
	37	1	51	-	36	-	0	0	0	0	6,374118	0	4,437209
	38	1	66	-	38	-	0	0	0	0	4,811765	0	1,495349
	39	1	44	-	40	-	0	0	0	0	7,332941	0	3,803101
	40	1	38	-	47	-	0	0	0	0	6,890588	0	0,306202
	41	2	69	-	23	-	0	0	0	0	19,05294	0	6,065116
	42	2	43	-	43	-	0	0	0	0	1,98	0	1,356589
	43	2	58	-	31	-	0	0	0	0	15,32588	0	2,075194
	44	2	60	-	49	-	0	0	0	0	8,738824	0	0,75969
	45	1	64	-	44	-	0	0	0	0	11,08471	0	1,86124
	46	1	48	-	35	-	0	0	0	0	13,89294	0	4,400775
	47	1	46	-	-	-	0	0	0	0	3,057647	0	2,622481
	48	1	54	-	38	-	0	0	0	0	9,935294	0	3,472093
	49	1	54	-	37	-	0	0	0	0	10,77647	0	3,624031
	50	1	40	-	48	-	0	0	0	0	10,98353	0	0,608527

Legenda: Gênero: 1. Masculino, 2.Feminino; Idade: anos; Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (Ved): mL/m²; Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e relação E/e'(EIE): porcentagem; Metaloproteinase tipo 2 e tipo 9(MMP-2 e -9) e Inibidor tecidual tipo 1 e tipo 2 de metaloproteinase (TIMP-1 e -2): pg/mL; Propetideo C-terminal do colágeno tipo I (PICP) e Galectina-3 (Gal-3): ng/mL; Telopectideo C-terminal do colágeno tipo I (CTXI): log da concentração.

Grupo FCI

FCI	N	GÊNERO	IDADE	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	PICP	CTIX	GAL 3
	1	1	60	112133	179861	86224	46216	12,76496	3,049786	3,680885
	2	2	68	59925	267837	100872	2805	13,19861	2,7484	1,396899
	3	2	-	76269	276957	72773	11827	9,816132	5,187683	3,522907
	4	1	52	73624	351603	67081	29720	12,20989	3,046447	2,701422
	5	1	44	123518	180215	64873	40165	16,70251	2,890421	1,147287
	6	2	60	69376	91875	63575	9489	10,8222	2,733389	2,740916
	7	2	64	23460	150343	76076	17070	2,860364	6,7179	2,946288
	8	2	43	56357	337015	68416	13749	11,15178	3,459174	3,562401
	9	1	54	74288	237136	63091	9489	12,76496	2,63347	2,922591
	10	1	70	88900	262666	59359	41949	12,45273	3,365739	2,567141
	11	1	67	121035	244115	73333	20875	13,85776	2,296511	2,906793
	12	1	51	54548	129152	91858	35237	13,35473	3,863811	1,167442
	13	1	59	51739	257666	63737	40100	15,81787	3,000089	2,78831
	14	1	52	81048	194852	81725	30477	18,94016	4,103725	3,033175
	15	1	63	74067	93650	78459	32628	16,06071	5,031002	3,49921
	16	1	49	85319	208256	97585	44213	11,915	2,973916	1,811628
	17	1	-	100208	346721	66740	47862	16,30356	3,314522	2,598736
	18	1	66	50999	74546	74646	15396	12,69558	5,233339	3,293839
	19	1	59	60631	160204	72144	45441	16,30356	3,127591	2,772512
	20	2	57	50751	139518	69647	9261	15,21075	5,025494	2,914692
	21	2	61	61803	108886	101073	24405	10,11101	2,436437	3,301738
	22	2	48	37348	133703	72304	10699	16,06071	3,923516	3,270142
	23	2	58	78017	117616	114163	9626	17,58716	2,509566	2,819905
	24	2	76	118538	161453	77085	9489	10,71813	3,997256	3,080569
	25	2	53	50751	230562	82949	18961	13,12923	4,05014	2,424961
	26	2	44	96142	204826	80453	49122	16,00867	2,43377	3,246445
	27	2	45	80185	167927	108210	39353	12,99046	4,010412	3,262243
	28	1	63	65507	97914	73384	40295	11,13443	5,04756	3,07267
	29	2	65	115251	137871	83497	9535	7,578491	4,440451	3,056872
	30	1	40	54184	146875	63640	16840	13,28534	13,00372	1,985271
	31	1	54	0	0	0	0	17,64824	0	1,664341
	32	1	43	0	0	0	0	13,73647	0	0,625581
	33	2	45	0	0	0	0	15,84235	0	1,315504
	34	1	51	0	0	0	0	8,025883	0	0,15969
	35	1	53	0	0	0	0	15,52588	0	0,86124
	36	2	44	0	0	0	0	14,91177	0	1,630233
	37	2	42	0	0	0	0	15,24941	0	1,841085
	38	2	45	0	0	0	0	10,61529	0	0
	39	2	47	0	0	0	0	16,28941	0	1,341085
	40	2	79	0	0	0	0	11,96706	0	3,228682
	41	2	49	0	0	0	0	10,02353	0	1,596124
	42	2	42	0	0	0	0	14,16118	0	1,72093
	43	2	46	0	0	0	0	10,03765	0	0,306977
	44	2	55	0	0	0	0	16,59529	0	1,700775
	45	1	55	0	0	0	0	9,732942	0	0,285659
	46	1	60	0	0	0	0	9,831765	0	0,24031
	47	2	55	0	0	0	0	5,884706	0	0,174419
	48	2	44	0	0	0	0	12,37059	0	0,641085
	49	2	65	0	0	0	0	15,17765	0	1,148837
	50	2	50	0	0	0	0	15,40706	0	0,289923
	51	2	62	0	0	0	0	3,972941	0	0,196899
	52	2	52	0	0	0	0	14,84706	0	0,362791
	53	2	78	0	0	0	0	12,20235	0	0,037209
	54	2	40	0	0	0	0	13,20353	0	0,195349
	55	2	40	0	0	0	0	10,01176	0	0,482171
	56	1	69	0	0	0	0	9,001177	0	1,610853
	57	1	61	0	0	0	0	13,64824	0	0,632558
	58	1	47	0	0	0	0	10,32588	0	3,08062
	59	2	47	0	0	0	0	9,588235	0	0,134109
	60	2	47	0	0	0	0	14,92706	0	1,751163
	61	2	45	0	0	0	0	13,17176	0	1,187597

Legenda: Gênero: 1. Masculino, 2.Feminino; Idade: anos; Metaloproteinase tipo 2 e tipo 9(MMP-2 e -9) e Inibidor tecidual tipo 1 e tipo 2 de metaloproteinase (TIMP-1 e -2): pg/mL; Propetideo C-terminal do colágeno tipo I (PICP) e Galectina-3 (Gal-3): ng/mL; Telopectideo C-terminal do colágeno tipo I (CTIX): log da concentração.

Grupo NI

NI	N	GÊNERO	IDADE	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	PICP	CTIX	GAL 3
	1	2	26	103426	30425	26384	56441	11,58543	5,349244	1,516588
	2	1	42	71398	214598	91761	18662	19,35646	2,899934	2,448657
	3	1	39	83192	178378	72835	57808	17,24024	2,922254	3,033175
	4	1	37	49758	163039	58815	42337	14,60364	4,315782	2,661927
	5	1	29	71621	18288	50562	44536	19,66869	5,84551	3,120063
	6	2	44	60866	48370	64172	46474	16,3209	3,562999	2,756714
	7	1	24	53210	71285	51858	32230	23,34605	2,977175	3,35703
	8	2	27	69601	374773	60432	17262	11,65481	9,717113	2,64613
	9	1	32	29022	617904	71837	43599	10,23244	4,884399	3,191153
	10	1	31	62735	78002	57739	10699	13,05984	3,127591	2,306477
	11	2	38	57554	153767	79729	47313	13,64961	3,851136	2,543444
	12	2	26	88691	105079	61985	41722	27,83868	2,619088	2,21169

Legenda: Gênero: 1. Masculino, 2.Feminino; Idade: anos; Metaloproteinase tipo 2 e tipo 9 (MMP-2 e -9) e Inibidor tecidual tipo 1 e tipo 2 de metaloproteinase (TIMP-1 e -2): pg/mL; Propetideo C-terminal do colágeno tipo I (PICP) e Galectina-3 (Gal-3): ng/mL; Telopectideo C-terminal do colágeno tipo I (CTXI): log da concentração.