



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação dos níveis séricos de syndecan-4 e das variáveis preditoras de mortalidade na doença de Chagas crônica

Alexandre Schaer Carvalho da Silva

Salvador (Bahia)

Dezembro, 2014

UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

Silva, Alexandre Schaer Carvalho da
S586 Avaliação dos níveis séricos de syndecan -4 e das variáveis
preditoras de mortalidade na doença de Chagas crônica /
Alexandre Schaer Carvalho da Silva. Salvador: AFSC, da
Silva, 2014.
VII. 25 fls. : il. [fig. tab.].
Anexos.
Professor orientador: Prof. André Castro Lyra.
Monografia como exigência parcial e obrigatória para
Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da
Bahia (FMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).
1. Doença de Chagas. 2. Syndecan-4. 3. Mortalidade. I.
Lyra, André Castro. II. Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU: 616.937



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação dos níveis séricos de syndecan-4 e das variáveis preditoras de mortalidade na doença de Chagas crônica

Alexandre Schaer Carvalho da Silva

Professor orientador: **André Castro Lyra**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2014.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Dezembro, 2014

Monografia: *Avaliação dos níveis séricos de syndecan-4 e das variáveis preditoras de mortalidade na doença de Chagas crônica*, de **Alexandre Schaer Carvalho da Silva**.

Professor orientador: **André Castro Lyra**

COMISSÃO REVISORA:

- **André Castro Lyra**, Professor do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Edmundo José Nassri Câmara**, Professor do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Simone Garcia Macambira**, Professora do Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Lucas Frederico de Almeida**, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VIII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2014.

Aos Meus Pais, **Elise e Cláudio.**

EQUIPE

- **Alexandre Schaer Carvalho da Silva**, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: alexandre.schaer@gmail.com;
- Ticiania Ferreira Larocca; Hospital São Rafael/Centro de Biotecnologia e Terapia Celular;
- André Castro Lyra; Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA; e
- Milena Botelho Pereira Soares; Hospital São Rafael/Centro de Biotecnologia e Terapia Celular.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Instituto de Ciências da Saúde (ICS)

HOSPITAL SÃO RAFAEL

- Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC)

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Recursos próprios.

AGRADECIMENTOS

- ◆ À Doutora **Ticiano Ferreira Larooca**, minha orientadora de iniciação científica, pelas numerosas orientações acadêmicas e à minha vida profissional de futuro médico.
- ◆ À Doutora **Simone Garcia Macambira**, por todas as oportunidades que me foram oferecidas, pela presença constante e enorme boa vontade para ajudar seus estudantes.
- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **André Castro Lyra**, por toda a ajuda concebida durante a realização deste projeto.
- ◆ À Doutora **Milena Botelho Pereira Soares**, por todas as oportunidades que me foram oferecidas e pelas orientações concebidas.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	2
I. RESUMO	3
II. OBJETIVOS	4
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
IV. METODOLOGIA	7
V. RESULTADOS	10
VI. DISCUSSÃO	15
VII. CONCLUSÕES	18
VIII. SUMMARY	19
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
X. ANEXOS	
• ANEXO I: Parecer de aprovação do CEP	23

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

FIGURA I. Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem...	12
FIGURA II. Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem...	13
FIGURA III. Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem...	13
FIGURA IV. Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem...	14
FIGURA V. Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem...	14

TABELAS

TABELA I. Características demográficas da população estudada	10
TABELA II. Características clínicas e comorbidades da população estudada	11
TABELA III. Concentração de syndecan-4 nos diferentes grupos de pacientes	11

I. RESUMO

CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE SYNDECAN-4 E VARIÁVEIS PREDITORAS DE MORTALIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA. Introdução:

O syndecan-4 é uma molécula que participa nos processos de adesão, controle do citoesqueleto e migração celular, presente nas membranas celulares de células endoteliais, cardiomiócitos e outras células. Já foi relatado que há um aumento da concentração sérica do syndecan-4 em casos de insuficiência cardíaca crônica, lesão da parede vascular e infarto do miocárdio, porém não há estudos verificando a ocorrência desse aumento em pacientes com doença de chagas. **Objetivo:** Avaliar a correlação entre os níveis séricos de syndecan-4 e a presença das seguintes variáveis preditoras de mortalidade em pacientes com doença de Chagas: classe funcional III ou IV da NYHA, cardiomegalia, anormalidades segmentares ou globais da movimentação da parede, taquicardia ventricular não sustentada, baixa voltagem de QRS e sexo masculino. **Metodologia:** Foram incluídos 61 pacientes do ambulatório de doença de Chagas do Hospital São Rafael, em Salvador, Bahia. A análise foi feita comparando-se as concentrações séricas médias de syndecan-4 entre os grupos formados pela presença ou não de cada uma das variáveis. **Resultados:** Observou-se um aumento significativo da concentração sérica de syndecan-4 apenas nos pacientes com anormalidades da movimentação da parede cardíaca, nos quais os valores encontrados foram $1,72 \pm 0,56$ ng/mL, enquanto nos pacientes que não apresentaram essa alteração o valor foi $1,23 \pm 0,51$ ng/mL. Nesse estudo, nenhum paciente apresentou uma das variáveis nele incluídas, a baixa voltagem de complexo QRS no ECG. **Discussão:** Houve elevação da concentração de syndecan-4 apenas no grupo de uma variável que envolve isquemia miocárdica, o que já havia sido demonstrado em estudos prévios em IC não chagásica. **Conclusões:** Os resultados deste estudo não permitem classificar o syndecan-4 como um possível biomarcador de gravidade em portadores de doença de Chagas. Eles também indicam a necessidade da realização de outros estudos sobre o tema, como estudos experimentais *in vivo* que avaliem se o dano miocárdico causado pela resposta ao parasita, em uma situação em que se exclua o dano por isquemia, leva a um aumento de concentração sanguínea dessa proteína.

Palavras chaves: 1. Doença de Chagas . 2. Syndecan-4. 3. Mortalidade.

II. OBJETIVOS

Geral: avaliar os níveis séricos de syndecan-4 em pacientes portadores de doença de Chagas, estratificados de acordo com as variáveis preditoras de mortalidade pré-definidas.

Específicos: avaliar os níveis séricos de syndecan-4 em subgrupos de pacientes chagásicos de acordo com:

- a) Classe funcional da New York Heart Association (NYHA);
- b) Presença de cardiomegalia na radiografia de tórax;
- c) Presença de anormalidades da movimentação da parede no ecocardiograma;
- d) Presença de taquicardia ventricular não sustentada no Holter;
- e) Presença de baixa voltagem de QRS;
- f) Gênero.

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Estima-se que a doença de Chagas afete entre 16 e 18 milhões de pessoas no mundo¹. No Brasil, não há estimativas de sua prevalência, mas sabe-se através de dados do SIM (Sistema de informação de mortalidade) que ela foi a causa primária de 172.066 mortes entre 1979 e 2009, o que caracteriza uma taxa de mortalidade anual de 3,61/100.000 habitantes no período². Apesar da taxa de mortalidade anual por doença de Chagas estar em declínio, ela ainda é uma doença negligenciada, colocando em risco de infecção aproximadamente 120.000 pessoas³.

A patogênese da doença começa com a infecção pelo agente *Trypanosoma cruzi*, cujo principal vetor é o artrópodo do gênero *Triatoma*. O relato de contato com o vetor e de moradia tipo “casa de taipa” (*habitat* do vetor em ambiente rural) são variáveis epidemiológicas conhecidamente relacionadas com a maior chance de infecção. A maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática na forma aguda da doença, gerando uma dificuldade no diagnóstico. Na fase crônica, 20-30% desenvolvem a forma cardíaca da doença, 10% desenvolvem a forma digestiva e menos de 5% desenvolvem a forma neurológica da doença⁴. A forma cardíaca da doença ainda pode ser dividida como forma cardíaca sem disfunção ventricular (ou forma arritmica), onde o paciente apresenta apenas arritmias e distúrbios de condução sem apresentar disfunção ventricular e congestão, e a forma cardíaca com disfunção ventricular quando arritmias e congestão estão presentes⁵.

Duas teorias explicam o dano tecidual miocárdico causado pelo parasita: uma relacionada à resposta imune ao *T. cruzi* e outra relacionada a reações auto-imunes que se desenvolvem com a infecção⁶. Evidências apontam que a denervação cardíaca e distúrbios da microvasculatura também contribuem para a patogênese⁷. Fatores como uma resposta imune onde prevalece a produção de TNF- α e IFN- γ sobre IL-10, a linhagem do parasita, a carga parasitária e a genética do hospedeiro podem influenciar no desenvolvimento da forma cardíaca da doença⁸.

A forma cardíaca é caracterizada por uma série de alterações macroscópicas e funcionais. Há aumento da área cardíaca, anormalidades da condução elétrica, aneurismas ventriculares (podendo haver formação de trombos devido a essas duas últimas), disautonomia e, na forma cardíaca com disfunção, contração ventricular torna-se prejudicada, havendo redução da fração de ejeção, e ocorrem sinais e sintomas típicos de insuficiência cardíaca como dispneia, edema de membros inferiores, hepatomegalia, dentre outros^{5,9}. A classificação funcional da New York Heart Association permite dividir os pacientes em 4 grupos: classe I, na qual os pacientes apresentam-se

sem sintomas durante o esforço ou com limitações ao esforço semelhantes a indivíduos normais; classe II, quando há dispneia aos esforços extra-habituais; classe III, quando há dispneia aos esforços habituais; classe IV quando há dispneia até durante o repouso¹⁰.

Syndecan-4 é uma proteína carreadora de sulfato de heparina presente nas membranas celulares que participa dos processos de adesão celular atuando de forma sinérgica com as integrinas¹¹, além do controle do citoesqueleto e da migração¹². Ela é expressa em vários tipos de células, como células endoteliais, músculo liso e cardiomiócitos. Foi relatado que em casos de lesão da parede vascular, insuficiência cardíaca crônica e infarto do miocárdio a sua expressão é aumentada¹³⁻¹⁵. O TNF- α parece ser o fator indutor do aumento da expressão nesses casos¹⁵. Já foi demonstrado em alguns estudos que a concentração sérica de syndecan-4 apresentou correlação negativa com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, e positiva com índice de massa, volume diastólico final, volume sistólico final e diâmetro do ventrículo esquerdo em pacientes com insuficiência cardíaca^{14,16}, o que mostra que syndecan-4 tem um potencial como biomarcador para determinar o prognóstico dessa doença. Estudos experimentais demonstraram uma diminuição na expressão gênica de syndecan-4 em cardiomiócitos de camundongos chagásicos tratados com células da medula óssea¹⁷. Entretanto, não há estudos avaliando os níveis de syndecan-4 em pacientes com cardiomiopatia chagásica.

Nesse estudo, foram avaliados os níveis séricos de syndecan-4 em pacientes chagásicos estratificados de acordo com variáveis de determinação prognóstica doença de Chagas, nas formas indeterminada, cardíaca sem disfunção e cardíaca com disfunção. As variáveis selecionadas foram: classe funcional III ou IV da NYHA, cardiomegalia à radiografia de tórax, anormalidades globais ou segmentares da movimentação da parede cardíaca ao ecocardiograma, taquicardia ventricular não sustentada detectada no holter, baixa voltagem de QRS e sexo masculino. Todas essas variáveis são mencionadas na literatura como sendo preditoras de mortalidade independente na doença de Chagas¹⁸⁻²².

IV. METODOLOGIA

O estudo foi observacional do tipo corte transversal. Os dados foram coletados de um banco de dados de pacientes utilizado em outros estudos do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael.

Variáveis do estudo:

Independente:

1. Concentração sérica de syndecan-4 (variável contínua);

Dependentes:

1. Classificação funcional III ou IV da NYHA;
2. Cardiomegalia detectada na radiografia de tórax;
3. Anormalidades da movimentação da parede detectadas por ecocardiograma;
4. Taquicardia ventricular não sustentada detectada por Holter;
5. Baixa voltagem de QRS;
6. Sexo masculino.

Todas as variáveis dependentes são variáveis categóricas dicotômicas. As dosagens de syndecan-4 foram feitas com uso de kits de ELISA sanduiche segundo as instruções do fabricante R&D systems. Os pacientes foram divididos em grupos quanto à presença ou não de cada uma das variáveis dependentes para a realização da análise dos resultados.

Os indivíduos incluídos no estudo foram pacientes atendidos no ambulatório de doença de Chagas do Hospital São Rafael diagnosticados com doença de Chagas nas formas indeterminada, cardíaca sem disfunção e cardíaca com disfunção. A amostra foi composta por 61 pacientes.

Critérios de Inclusão:

- a. Doença de Chagas confirmada por 2 sorologias diferentes.
- b. Terapêutica farmacológica otimizada.
- c. Forma indeterminada ou forma cardíaca (com ou sem disfunção ventricular).

Critérios de Exclusão:

- a. Doença valvar significativa definida como estenose aórtica com gradiente VE/Ao > 50 mmHg, estenose mitral com área valvar inferior a 1,5 cm² ou regurgitações aórtica e/ou mitral superiores a moderadas.
- b. Doença arterial coronariana diagnosticada.
- c. Uso crônico de agentes imunossupressores.
- d. Insuficiência renal terminal em tratamento dialítico.
- e. Febre nas últimas 48 horas ou evidência de infecção sistêmica em atividade de acordo com a definição de sepsis do ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine).
- f. Uso abusivo de álcool ou drogas ilícitas em curso (Baseado no DSM IV).
- g. Qualquer comorbidade com impacto na sobrevida em 2 anos.
- h. Doença hepática em atividade.
- i. DPOC em uso contínuo de esteroides.
- j. Doenças hematológicas, neoplásicas, ósseas ou distúrbios da hemostasia.
- k. Doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas.

Foram feitas análises comparando-se o nível sérico de syndecan-4 em cada um dos grupos formados pela presença ou não de cada uma das variáveis dependentes do estudo. Syndecan-4, nesse estudo, foi identificado como uma variável que seguiu a distribuição normal, logo, foi realizado teste paramétrico (Teste t de Student) para a comparação de médias entre os dois grupos definidos pela variável em questão. Foram considerados estatisticamente significantes os dados que apresentaram valores de $p < 5\%$. Para a realização da análise estatística, foi utilizado o software do SPSS Statistics 17.0.

Aspectos Éticos:

Esse estudo foi submetido à apreciação do Conselho de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael e obteve sua aprovação (vide anexo), estando disponível para avaliação na plataforma Brasil sob o número de parecer 397.457 e CAAE 20028113.7.0000.0048. Todos os participantes foram submetidos à aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido. Em nenhum momento foi divulgada qualquer informação pessoal dos participantes. Este estudo foi desenvolvido sob boas práticas em pesquisa clínica, respeitando a declaração de Helsinki, o Documento das Américas e a Resolução 196/96 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde.

V. RESULTADOS

Um total de 61 pacientes foi incluído no estudo. Houve uma predominância de indivíduos do sexo feminino (59%) e a média de idade foi de 58 anos (variando entre 36 e 77 anos). Cerca de 28% dos pacientes apresentavam a forma indeterminada da doença, 26,2% a forma cardíaca sem disfunção ventricular e 45,9% a forma cardíaca com disfunção ventricular. A maioria dos pacientes era morador de área urbana, relatou ter morado em “casa de taipa” no passado e ter tido contato com o triatomíneo. Dispneia aos esforços e palpitações foram relatados pela maioria dos pacientes (ambos na frequência de 65,6%). Dispneia em repouso foi relatada por 18%, dispneia paroxística noturna por 21,3% e edema de MMII por 41%. A fração de ejeção média dos pacientes foi 53,42%, com um desvio padrão de 15,7. Nos grupos formados pelas formas indeterminada, cardíaca sem disfunção e cardíaca com disfunção, as frações de ejeção foram, respectivamente, 66,06%, 64,69% e 38,50%. Apenas 8 pacientes (13,1%) realizaram tratamento etiológico da doença de Chagas. Os dados clínicos e epidemiológicos estão sumarizados nas tabelas 1 e 2.

Dentre os 61 pacientes incluídos, todos se submeteram à coleta de sangue para a dosagem de syndecan-4. Entretanto, não foram obtidos os resultados de 2 deles devido a perda de material. A média dos valores obtidos de concentração sérica de syndecan-4 foi 1,29 ng/mL, e os valores variaram entre 0,29 e 2,36 ng/mL. O desvio padrão foi de 0,53.

Não houveram pacientes incluídos no estudo com baixa voltagem de complexo QRS observado no eletrocardiograma, assim não foi possível avaliar a correlação de syndecan-4 com essa variável. Dessa forma, foram feitas as análises com as outras 5 variáveis. Aproximadamente 26% dos pacientes foram classificados como classe III ou IV da NYHA, 49% apresentaram cardiomegalia na radiografia de tórax, 11,5% demonstraram anormalidades de movimentação da

Tabela 1 – Características demográficas da população estudada

Característica	n = 61
Idade (anos)	58,1 ± 8,6
Gênero masculino	25 (41,0)
Procedência rural	11 (18,0)
História de moradia tipo “casa de taipa”	50 (82,0)
História de contato com o inseto vetor	44 (72,1)

Dados expressos como média ± desvio padrão para variáveis contínuas ou número (%) para variáveis discretas.

Tabela 2 – Características clínicas e comorbidades da população estudada

Característica	n = 61	
Forma clínica da doença de Chagas	Forma indeterminada (%)	17 (27,9)
	Forma cardíaca sem disfunção de VE (%)	16 (26,2)
	Forma cardíaca com disfunção de VE (%)	28 (45,9)
Fração de ejeção do ventrículo esquerdo	Forma indeterminada	66,06 ± 4,8
	Forma cardíaca sem disfunção de VE	64,69 ± 3,9
	Forma cardíaca com disfunção de VE	38,50 ± 11,6
	Total	53,42 ± 15,7
Dispneia aos esforços (%)	40 (65,6)	
Dispneia em repouso (%)	11 (18,0)	
Dispneia paroxística noturna (%)	13 (21,3)	
Edema de membros inferiores (%)	25 (41,0)	
Palpitações (%)	40 (65,6)	
Hipertensão arterial sistêmica (%)	44 (72,1)	
Diabetes mellitus (%)	9 (14,8)	
Dislipidemia (%)	27 (44,3)	
História de acidente vascular cerebral (%)	7 (11,5)	
Tratamento etiológico prévio (%)	8 (13,1)	

Dados expressos como média ± desvio padrão para variáveis contínuas ou número (%) para variáveis discretas.

Tabela 3 – Concentração de syndecan-4 nos diferentes grupos de pacientes

Grupo		Frequência relativa (%)	Concentração média (ng/mL)	Valor de p
Classificação III ou IV da NYHA	Não	73,8	1,31 ± 0,54	0,503
	Sim	26,2	1,20 ± 0,52	
Cardiomegalia na radiografia de tórax	Não	50,8	1,34 ± 0,55	0,384
	Sim	49,2	1,22 ± 0,51	
Anormalidades da movimentação da parede cardíaca	Não	88,5	1,23 ± 0,51	0,021
	Sim	11,5	1,72 ± 0,56	
TVNS*	Não	68,9	1,36 ± 0,54	0,184
	Sim	27,9	1,15 ± 0,51	
Sexo masculino	Não	59	1,25 ± 0,54	0,532
	Sim	41	1,34 ± 0,53	

*3,3% dos pacientes não realizou o Holter para avaliação de presença de TVNS (Taquicardia ventricular não sustentada).

parede cardíaca detectadas por ecocardiograma, 27,9% apresentaram taquicardia ventricular não sustentada detectada por Holter e 41% dos pacientes eram do sexo masculino. Esses dados, assim como a concentração sérica de syndecan-4 em cada grupo (determinados pela presença ou não de cada uma das variáveis) estão expostos na tabela 3.

Em relação à presença de classe funcional III ou IV da NYHA, observou-se que a concentração sérica de syndecan-4 esteve em geral diminuída nesses pacientes. No grupo que apresentava tal classificação, a média da concentração foi $1,20 \pm 0,52$ ng/mL (variando entre 0,61 e 2,34 ng/mL), enquanto que no grupo sem a classificação observou-se uma média de $1,31 \pm 0,54$ ng/mL (variação de 0,29 a 0,36 ng/mL) (Figura 1). O valor de p da diferença entre as médias foi de 0,503.

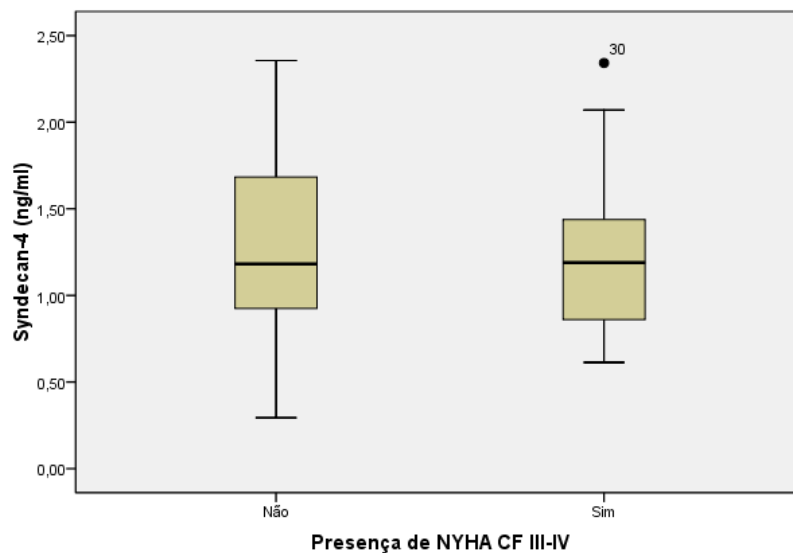


Figura 1 - Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem classificação funcional III ou IV da NYHA. NYHA = New York Heart Association. $p = 0,503$.

Quanto ao aumento da área cardíaca, observou-se que a concentração de syndecan-4 também esteve menor nos pacientes com essa alteração. Nesse grupo, a concentração média foi de $1,22 \pm 0,51$ ng/mL (variando de 0,29 a 0,36 ng/mL) enquanto no grupo sem alteração foi de $1,34 \pm 0,55$ ng/mL (variando entre de 0,50 a 2,30 ng/mL). O valor de p foi 0,384.

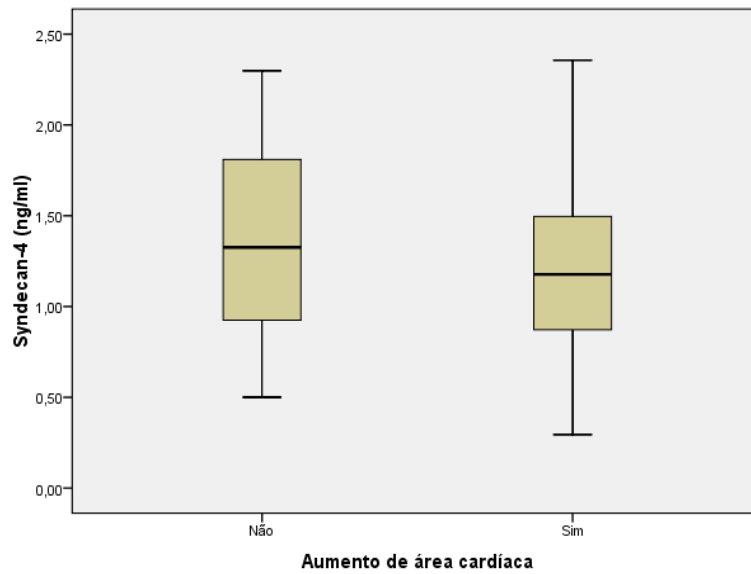


Figura 2 - Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem aumento de área cardíaca à radiografia de tórax. $p = 0,384$.

Observou-se um aumento da concentração sérica de syndecan-4 nos pacientes com alterações de movimentação da parede cardíaca. Nesse grupo, a média foi de $1,72 \pm 0,56$ ng/mL (variando entre 0,86 e 2,34 ng/mL), enquanto no grupo sem essa alteração, a média foi de $1,23 \pm 0,51$ ng/mL (variando entre 0,29 e 2,36 ng/mL) (Figura 3). O valor de p foi 0,021.

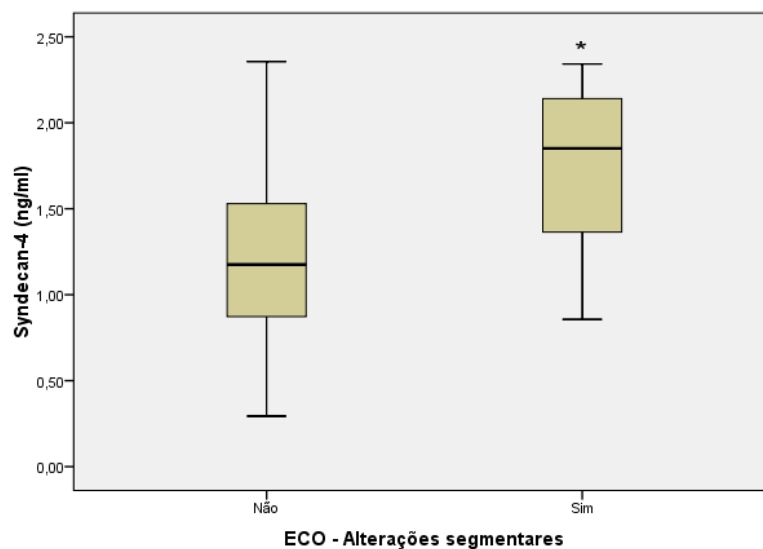


Figura 3 - Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem alterações da movimentação da parede cardíaca ao ECO. ECO = Ecocardiograma transtorácico. $p = 0,021$.

Quanto à presença de taquicardia ventricular não sustentada (TVNS), observou-se que, em média, a concentração de syndecan-4 esteve também reduzida. No grupo em questão, seu valor foi

1,15 ± 0,51 ng/mL (variando entre 0,61 e 2,36 ng/mL) enquanto no grupo sem a presença de TVNS observou-se uma média de 1,36 ± 0,54 ng/mL (variando entre 0,29 e 2,34 ng/mL) (Figura 4). O valor de p foi 0,184.

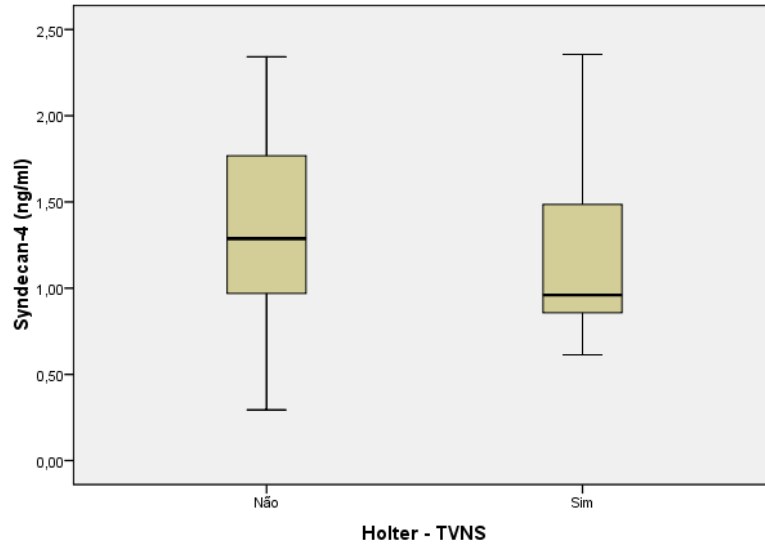


Figura 4 - Concentração sérica de syndecan-4 nos indivíduos com e sem TVNS observada ao Holter. TVNS = taquicardia ventricular não sustentada. $p = 0,184$.

Nos indivíduos do sexo masculino, a concentração sérica estava aumentada. Sua média, nesse grupo, foi 1,34 ± 0,53 ng/mL (variando entre 0,67 a 2,36 ng/mL) e no grupo de indivíduos do sexo feminino foi 1,25 ± 0,54 ng/mL (variando entre 0,29 e 2,30 ng/mL) (Figura 5). O valor de p foi 0,532.

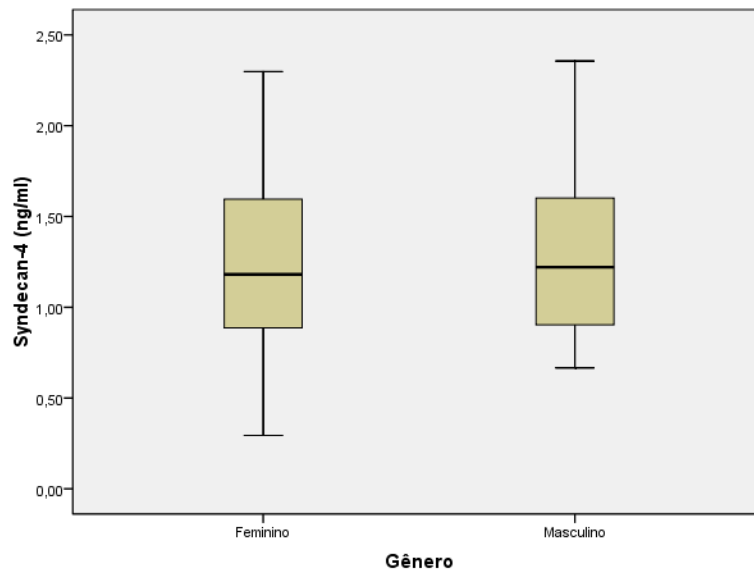


Figura 5 - Concentração sérica de syndecan-4 em pacientes do sexo masculino e feminino. $p = 0,532$.

VI. DISCUSSÃO

Neste estudo, houve diferença nos níveis séricos de syndecan-4, com significância estatística, em apenas uma das variáveis estudadas. A concentração sérica de syndecan-4 foi maior no grupo com presença de anormalidades de movimentação da parede cardíaca. Não foram identificadas diferenças entre os níveis de syndecan-4 nas demais variáveis estudadas.

O valor da concentração sérica de syndecan-4 encontrado nos pacientes desse estudo variou em relação ao encontrado em outros da literatura. Nos dois estudos que avaliaram a concentração de syndecan-4 em pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia não chagásica, observou-se valores maiores que os encontrados neste estudo (concentrações médias de 22,5ng/mL¹⁴ e 4,7ng/mL¹⁶). Isso sugere que pode ter havido diferença de funcionamento entre os kits de ELISA utilizados nos estudos para a mensuração da concentração de syndecan-4 ou, caso isso não tenha acontecido, que o syndecan-4 pode não ser um bom biomarcador para a avaliação prognóstica na insuficiência cardíaca chagásica. As frações de ejeção médias dos dois estudos citados foram, respectivamente, 48,4% e 30,97%. Logo, é improvável que a diferença nas concentrações encontradas em cada estudo (incluindo o presente estudo), seja devido a variações no grau de disfunção cardíaca dos pacientes incluídos em cada estudo, visto que no estudo com maior concentração média, a fração de ejeção média era a maior, o que determina melhor função cardíaca.

Era esperado que, na doença de Chagas, houvesse aumento de concentração sérica de syndecan-4 assim como na insuficiência cardíaca não chagásica, visto que as respostas do miocárdio à lesão em ambos os casos é semelhante e envolve a liberação de fatores relacionados com o aumento de expressão e liberação do syndecan-4, os quais parecem ser o TNF- α , IL-1 β e LPS²³. No caso da miocardiopatia chagásica, como já foi dito, a grande liberação de TNF- α é um dos principais eventos na fisiopatologia da lesão miocárdica. Sabe-se também que há liberação de TNF- α após o infarto do miocárdio e durante a hipertrofia miocárdica, as principais causas de insuficiência cardíaca, e foi demonstrado que nesses casos são esses os fatores relacionados ao aumento da expressão e liberação de syndecan-4^{16, 24}.

Também foram observados valores inesperados de concentração de syndecan-4 em alguns dos subgrupos de pacientes. O nível de expectativa do aumento da concentração sérica de syndecan-4 para cada grupo de pacientes está relacionado com a intensidade da tendência de geração de um estado pró-inflamatório como causa da presença da variável estudada em cada grupo. Assim, ao avaliar um grupo onde a causa da variável analisada envolve a formação de um acentuado estado pró-inflamatório no miocárdio (principalmente se houver secreção de TNF- α), seria esperado

encontrar uma maior concentração sérica de syndecan-4 nesse grupo, em comparação com os outros.

Por essa lógica, no grupo de pacientes com presença de classificação funcional III ou IV da NYHA, era esperado um aumento da concentração sérica de syndecan-4. Sabe-se que a patogênese da progressão da insuficiência cardíaca chagásica deve-se, entre outros fatores, à continuidade da presença do parasita no tecido miocárdico, que leva a uma persistente reação inflamatória⁵ (seja de reação direta contra o parasita ou auto-imune). Assim, nos pacientes com maior gravidade da insuficiência cardíaca, espera-se haver maior intensidade de reação inflamatória do miocárdio, o que deveria corresponder a uma maior concentração de syndecan-4. Isso pode não ter ocorrido devido a prevalência de outros mecanismos que podem levar à IC (que não envolvem a reação inflamatória do miocárdio) em relação ao dano miocárdico na população estudada, como, por exemplo, a dilatação das câmaras cardíacas secundárias à denervação cardíaca (lesão do sistema nervoso intramural cardíaco), um mecanismo que, segundo alguns autores, contribui para a dilatação das câmaras cardíacas⁷.

Seguimos o mesmo raciocínio para a interpretação da análise da concentração de syndecan-4 no grupo com cardiomegalia. Sabe-se que um dos mecanismos que levam à dilatação é o remodelamento das câmaras cardíacas causado pela deposição de fibrose no miocárdio secundária à reação inflamatória em resposta ao parasita⁸. Dessa forma, havendo maior reação inflamatória nos pacientes com cardiomegalia deveria haver maior concentração de syndecan-4, e uma explicação possível para isso não ter ocorrido é o mesmo apresentado anteriormente: a maior influência da denervação cardíaca na patogênese da cardiomegalia em relação ao dano miocárdico direto.

A origem da TVNS em pacientes com doença de Chagas está relacionada com a formação de reentrada na condução do estímulo elétrico pelo miocárdio decorrente formação de fibrose⁵, a qual por sua vez é originada do processo inflamatório desencadeado pela presença do parasita. Há relatos na literatura que sugerem uma relação entre a quantidade de fibrose no miocárdio e uma maior chance de desenvolvimento de arritmias ventriculares em pacientes com doença de Chagas²⁵. Uma maior quantidade de fibrose deve levar a maior probabilidade causar um mecanismo de reentrada no miocárdio. Assim, novamente, era esperado que houvesse diferença entre a concentração de syndecan-4 no grupo com essa alteração e no grupo sem ela.

Outros achados da análise individual de cada grupo foram esperados, como por exemplo, a concentração de syndecan-4 no grupo com alterações da movimentação da parede cardíaca. Essa alteração, seja em pacientes com ou sem doença de Chagas, geralmente resulta de alterações

vasculares, refletindo algum grau de doença arterial coronariana. No caso da cardiopatia chagásica, essa alteração provavelmente advém da isquemia produzida pelas alterações microvasculares citadas anteriormente⁷. Como já foi relatado, isquemia miocárdica é um processo que sabidamente está relacionada com o aumento da concentração de syndecan-4.

Por fim, foi observada uma leve tendência ao aumento da concentração de syndecan-4 em pacientes do sexo masculino. Era esperado que não houvesse diferença, pois não há relatos que no sexo masculino haja uma reação inflamatória mais intensa contra o parasita. O pior prognóstico conferido à população desse gênero pode ser devido a outros fatores como baixa aderência ao tratamento e piores hábitos de vida.

Nesse estudo, nenhum paciente apresentou uma das variáveis nele incluídas, a baixa voltagem de complexo QRS no ECG. Isso ocorreu pois possivelmente essa é uma variável pouco prevalente, apesar de indicar elevada gravidade. Em um grande estudo que analisou a presença das variáveis incluídas no presente estudo, essa foi a que ocorreu com menor frequência¹⁸.

Após essa análise da patogênese de todas as variáveis estudadas, observa-se que houve elevação da concentração de syndecan-4 apenas no grupo de uma variável que envolve isquemia miocárdica. Nos grupos de outras variáveis, que envolviam outras alterações de resposta ao parasita que não a isquemia, não houve diferença estatisticamente significativa. Isso sugere que a resposta inflamatória ao *T. cruzi*, apesar de envolver o perfil de citocinas que supostamente leva à lise de syndecan-4 e sua liberação na corrente sanguínea, por algum motivo não permite que isso aconteça. Caso isso seja confirmado, essa será uma forte evidência de que o syndecan-4 não é um biomarcador adequado para avaliar o prognóstico da doença de Chagas. Isso também sugere que talvez seja interessante avaliar o valor prognóstico de outras proteínas da família dos syndecans, o syndecan-1, o syndecan-2 e o syndecan-3, devido à presença de diferenças funcionais entre elas²⁶, o que pode levar a uma resposta diferente de cada uma delas à reação inflamatória contra o parasita.

O presente estudo apresentou como principal limitação a utilização de um banco de dados de outro estudo que visou a determinação do valor prognóstico de outro biomarcador, a galectina-3. Isso diminui o seu poder estatístico devido à possível inadequação do cálculo amostral. Outra limitação foi a já citada ausência em todos os pacientes de uma das variáveis que se desejava estudar.

VII. CONCLUSÕES

Em geral, não houve associação entre os níveis séricos de syndecan-4 e as variáveis preditoras de prognóstico da doença de Chagas. Os resultados deste estudo não permitem classificar o syndecan-4 como um possível biomarcador de gravidade em portadores de doença de Chagas. Eles também indicam a necessidade da realização de outros estudos sobre o tema, como estudos experimentais *in vivo* que avaliem se o dano miocárdico causado pela resposta ao parasita leva a um aumento de concentração sanguínea dessa proteína, excluindo-se o dano causado por isquemia, além de estudos que avaliem também outras proteínas da família dos syndecans.

VIII. SUMMARY

CORRELATION BETWEEN THE SERUM LEVELS OF SYNDECAN-4 AND MORTALITY PREDICTION VARIABLES IN CHRONIC CHAGAS DISEASE.

Background: Syndecan-4 is a molecule that participates in the processes of adhesion, cytoskeleton control and cellular migration and can be found on the cellular membranes of endothelial cells, cardiomyocytes and other cells. Data from the literature shows that the serum concentration of syndecan-4 in patients with chronic heart failure, vascular wall lesion and myocardial infarction is higher than on healthy patients. However, there are not any studies that verify the occurrence of this in patients with Chagas disease. **Objective:** To assess the correlation between the serum levels of syndecan-4 and the presence of the following mortality prediction variables for patients with Chagas disease: NYHA functional class III or IV, cardiomegaly, segmental or global myocardium wall movement abnormalities, non-sustained ventricular tachycardia, low QRS voltage e male gender. **Methods:** 61 patients were included from the Chagas disease clinic of São Rafael Hospital, in Salvador, Bahia. The analysis was made by comparing the average serum concentrations of syndecan-4 between the groups formed by the presence or absence of each one of the variables. **Results:** A significant raise of serum concentration of Syndecan-4 was only observed on the patients with myocardium wall movement abnormalities, in which the values observed were $1,72 \pm 0,56$ ng/mL, while on the patients without this alteration the value was $1,23 \pm 0,51$ ng/mL. In this study, there weren't any patient with one of the chosen variables, low QRS voltage on the ECG. **Discussion:** A higher concentration of syndecan-4 was only observed on a group with a variable that involves myocardium ischemia. This finding has already been demonstrated on previous studies on non-chagasic heart failures. **Conclusions:** The results of this study don't allow classifying the syndecan-4 as a possible biomarker of worse prognosis for patients with Chagas disease. They also indicate the need of other studies to analyze his potential as a biomarker on Chagas disease, such as experimental studies *in vivo* which evaluate if the myocardium damage caused by the immune response to the parasite, in a situation in which there is no damage done by ischemia, leads to a higher serum concentration of this protein.

Key words: 1. Chagas disease. 2. Syndecan-4. 3. Mortality.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Control of Chagas' disease: second report of the WHO Expert Committee. *Technical report series 905*. Geneva: World Health Organization, 2002.
2. Martins-melo FR, Novaes A, Jr R, Alencar CH. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: Trends and regional differences. *J Infect Dev Ctries*. 2012 Nov 26;6(11):817-24.
3. Utzinger J, Becker SL, Knopp S, Blum J, Neumayr AL, Keiser J, et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly*. 2012 Jan; 142:w13727.
4. Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Gómez i Prat J, Herrera RN, et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 Feb;26(2):99–106.
5. Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AAV, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal FB, et al. I diretriz latino-americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97.
6. Gironès N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends parasitol*. 2003 Jan;19(1):19–22.
7. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007 Mar 6;115(9):1109–23.
8. Dutra W, Gollob K. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. Jun 2008; 21(3): 287–292.
9. Nunes MCP, Dones W, Morillo C a, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Aug 27;62(9):767–76.
10. The Criteria Committee of the New York Heart Association. *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels*. (9th ed.). Boston: Little, Brown & Co. 1994; pp. 253–256.
11. Woods A, Couchman JR. Syndecans : synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol*. 1998 May;8(5):189–92.
12. Longley RL, Woods A, Fleetwood A, Cowling GJ, Gallagher JT, Couchman JR. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci*. 1999 Oct;112 (Pt 20):3421-31.
13. Nikkari ST, Järveläinen HT, Wight TN, Ferguson M, Clowes a W. Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol*. 1994 Jun;144(6):1348-56.

14. Takahashi R, Negishi K, Watanabe A, Arai M, Naganuma F, Ohyama Y, et al. Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol* 2011 May;57(3):325–32.
15. Zhang Y. Myocyte-dependent Regulation of Endothelial Cell Syndecan-4 Expression. Role of TNF-alpha. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14786–90.
16. Bielecka-Dabrowa A, von Haehling S, Aronow WS, Ahmed MI, Rysz J, Banach M. Heart failure biomarkers in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 3;168(3):2404-10
17. Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. *Cell Cycle*. 2011 May 1;10(9):1448-55.
18. Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG., Rassi GG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006 Aug 24;355(8):799-808.
19. Theodoropoulos TD, Bestetti RB, Otaviano AP, Cordeiro J, Rodrigues VC, & Silva AC. Predictors of all-cause mortality in chronic Chagas' heart disease in the current era of heart failure therapy. *Int J Cardiol*. 2008 Aug 1;128(1):22-9.
20. Nunes MC, Carmo AA, Rocha MO, Ribeiro AL. Mortality prediction in Chagas heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012 Sep;10(9):1173-84.
21. Rodriguez-Salas LA, Klein E, Acquatella H, Cataliotti F, Davalos V, Gomez-Mancebo JR, et al. Echocardiographic and Clinical Predictors of Mortality in Chronic Chagas' Disease. *Echocardiography*. 1998 Apr;15(3):271-278.
22. Bestetti RB, Dalbo CM, Freitas OC, Teno LA, Castilho OT, Oliveira JS. Noninvasive predictors of mortality for patients with Chagas' heart disease: a multivariate stepwise logistic regression study. *Cardiology*. 1994;84(4-5):261-7.
23. Strand ME, Herum KM, Rana Z a, Skrbic B, Askevold ET, Dahl CP, et al. Innate immune signaling induces expression and shedding of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-4 in cardiac fibroblasts and myocytes, affecting inflammation in the pressure-overloaded heart. *FEBS J*. 2013 May;280(10):2228–47.
24. Finsen A V, Lunde IG, Sjaastad I, Østli EK, Lyngra M, Jarstadmarken HO, et al. Syndecan-4 is essential for development of concentric myocardial hypertrophy via stretch-induced activation of the calcineurin-NFAT pathway. *PLoS One*. 2011 Jan;6(12):e28302.
25. Tassi EM, Continentino MA, Nascimento EM Do, Pereira BDB, Pedrosa RC. Relationship between Fibrosis and Ventricular Arrhythmias in Chagas Heart Disease Without Ventricular Dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2014 May;102(5):456-64.

26. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*. 2005 Mar 18;96(5):488–500.

X. ANEXOS

- ANEXO I: Parecer de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de syndecan-4 como biomarcador para a determinação prognóstica de portadores de doença de Chagas

Pesquisador: Milena Botelho Pereira Soares

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 20028113.7.0000.0048

Instituição Proponente: Hospital São Rafael/Monte Tabor-BA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 397.457

Data da Relatoria: 27/08/2013

Apresentação do Projeto:

Será estudada uma população portadora de doença de Chagas (forma indeterminada e crônica), clinicamente bem caracterizada, avaliando o valor prognóstico da dosagem sérica de syndecan-4, associada outros marcadores de gravidade, como a classe funcional e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, visando aumentar a capacidade de identificação de pacientes com maior morbi-mortalidade. Serão avaliados 60 pacientes portadores de doença de Chagas (20 na forma indeterminada, 20 com classe funcional II e 20 na classe funcional III ou IV), acompanhados no Ambulatório de Chagas no Hospital São Rafael.

Os pacientes serão submetidos a avaliações clínica e laboratorial, além de avaliação morfológica, funcional e estrutural cardíaca, através da realização de eletrocardiograma de doze derivações, ecocardiograma transtorácico, ressonância nuclear magnética, Holter 24h e teste ergométrico. Serão determinados os níveis séricos de syndecan-4, para estabelecermos as correlações com o quadro clínico (classe funcional e qualidade de vida), com a função ventricular e com demais marcadores prognósticos da CCC.

As dosagens de troponina de alta sensibilidade e de NT ProBNP serão feitas através de

Endereço: Av. São Rafael 2152, 6º andar
Bairro: São Marcos **CEP:** 41.256-900
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3281-6484 **Fax:** (71)3281-6855 **E-mail:** cep@hsr.com.br

MONTE TABOR - HOSPITAL
SÃO RAFAEL HSR



Continuação do Parecer: 397.457

eletroquimioluminescência e ELFA, respectivamente. As dosagens de citocinas e syndecan-4 no soro dos pacientes serão feitas utilizando kits de ELISA sanduíche, de acordo com as instruções dos fabricantes. Este protocolo está sendo submetido ao CEP do Hospital São Rafael, e todos os pacientes assinarão termo de consentimento livre e esclarecido.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar o papel da syndecan-4 como biomarcador no prognóstico de evolução da doença cardíaca em portadores da doença de Chagas.

Específicos:

- Correlacionar, em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, os níveis séricos de syndecan-4 com o percentual de componente fibrótico no coração, a capacidade funcional, a função ventricular e os níveis séricos de BNP, troponina, citocinas e quimiocinas inflamatórias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios: Espera-se demonstrar o potencial de utilização da análise de syndecan-4 no diagnóstico e prognóstico na cardiomiopatia chagásica crônica, visando futuramente melhor adequação do tratamento e identificação dos pacientes com pior prognóstico a médio e longo prazo.

Riscos: Frente à metodologia apresentada não há riscos inerentes à Pesquisa, pois toda intervenção proposta no desenho do Estudo já é validada pela prática assistencial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Aguarda-se avanços nas conclusões desse Estudo para a população de Risco considerável e prognósticos reservado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE com padrão adequado orientado pelas BPCs.

Recomendações:

Que seja divulgado na comunidade médica e instrumentos de publicação midiática os resultados dessa pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto sucinto, conciso e consistente no seu desenho.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. São Rafael 2152, 6º andar
 Bairro: São Marcos CEP: 41.256-900
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3281-6484 Fax: (71)3281-6855 E-mail: cep@hsr.com.br

MONTE TABOR - HOSPITAL
SÃO RAFAEL HSR



Continuação do Parecer: 307.457

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP ratifica as considerações feitas pelo Relator.

SALVADOR, 17 de Setembro de 2013

Assinador por:
Regina Maria Pereira Oliveira
(Coordenador)

Endereço: Av. São Rafael 2152, 6º andar

Bairro: São Marcos

CEP: 41.256-900

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3281-6484

Fax: (71)3281-6855

E-mail: cep@fhr.com.br