Carlos Henrique Valente Moreira

**Associação da galectina-3 com desfechos clínicos e mortalidade em coorte de
pacientes com doença de Chagas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

**São Paulo
2021**

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Carlos Henrique Valente
Associação da galectina-3 com desfechos clínicos e
mortalidade em coorte de pacientes com doença de
Chagas / Carlos Henrique Valente Moreira. -- São
Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Ester Cerdeira Sabino.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Biomarcadores
3.Óbito 4.Evolução de doença

USP/FM/DBD-075/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

`A minha Família

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, **no hay camino,**
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar.*

"Proverbios y cantares" em *Campos de Castilla*, 1912
Antonio Machado (1875-1939), poeta modernista espanhol

Agradeço...

Aos pacientes, que seguem enfrentando as muitas faces desta Doença: incerteza, escassez de opções terapêuticas, estigma e negligência.

Aos meus pais, Antônio e Graça, pela vida, caráter, caminhos e exemplo.

`A Renata, por Joaquim e Francisco, pela vida que seguíamos a dois no início desta tese e a finalizo com quatro. Obrigado pela sabedoria, ensinamentos, suporte e, até pelas discussões.

Ao Joaquim e Francisco, que, junto com Renata me mostraram e têm provado que: “...a vida não cabe no Lattes...”

`A minha orientadora, Professora Dra. Ester Cerdeira Sabino, pelas oportunidades, pensamento científico e possibilidades.

Ao meu Co-orientador Professor Dr. Fabio Fernandes, pelas ideias, amizade, parceria e indicações.

Ao Prof. Dr. Ângelo Lindoso, por me ensinar A Medicina Tropical, suas nuances e me trazer aos pacientes. Ainda agradeço o exemplo de resiliência, oportunidades e confiança.

A Dra. Lea Oliveira, pelo exemplo, organização das ideias e paciência.

`A Profa. Ana Bierrenbach, por me ensinar a usar o “do-list”, pelos códigos iniciais.

`A Erika Manulli, também pela paciência, pela perseverança, determinação e superação

Aos amigos Fabio Guilhardi e Antonio Charlys, pela amizade, “insights” e conversas.

Ao amigo Lucas Moyses, pelas parcerias, conversas e risadas.

Ao Dr. Waldo Hoffmann, pela luz e racionalidade.

A todos os colegas do Instituto de Medicina Tropical, especialmente LIM-46 que, desde 2014 os vi ingressando, aprendendo, e finalmente construindo e seguindo seus próprios caminhos.

A todo o grupo do SaMi-Trop, em especial Dra. Ariella Motta, pela excelência em fazer ciência, pela parceria e por tornarem esta coorte possível, almejando trazer luz aos ainda múltiplos enigmas da doença.

Aos Profs. e monitores da Universidade da Califórnia, São Francisco por terem me auxiliado na aplicação do que venho aprendendo neste e em outros estudos.

A Deus, por nos capacitar com inteligência para compreendermos racionalmente a natureza pela ciência.

Índice

<i>Lista de figuras</i>	8
<i>Lista de tabelas</i>	9
<i>1.1 Histórico</i>	13
1.2 O agente:	13
1.3 O vetor:	14
1.4 Transmissão	14
1.5 Epidemiologia:	15
1.6 Formas Clínicas	16
<i>2. História natural e patogênese</i>	17
2.1 Fisiopatogenia da fibrose cardíaca.....	18
<i>3. Biomarcadores</i>	18
<i>4. Galectina - 3</i>	19
<i>5. Hipótese:</i>	20
<i>6. Justificativa:</i>	21
<i>7. Objetivo geral:</i>	21
7.1 Objetivos específicos:	21
<i>8. Material e métodos</i>	21
<i>8.1 Desenho do estudo:</i>	21
8.1.1. Tipo de estudo:	21
8.1.2. Período do estudo:	21
8.1.3. Caracterização do local de estudo:	21
Figura 1: Mapa com municípios onde foi realizado o estudo	22
8.1.4. População de estudo e seleção da casuística:	22
8.1.5 Critérios de inclusão:	23
8.1.6 Critérios de exclusão:	23
2a visita de seguimento	24
Inclusão no estudo	24
Criterios de elegibilidade para tese	24
Figura 2: Fluxograma Fluxograma coorte SaMi-Trop e deste estudo	24
<i>9. Medidas</i>	25
9.1 Sociodemográficos e clínicos.....	25
9.2 Eletrocardiograma	25
9.3 Ecocardiograma.....	25
<i>9.4 Coleta de material biológico:</i>	26

9.4.1 Galectina-3.....	26
9.4.2 NT-proBNP.....	26
9.4.3 Sorologia.....	26
10. Definição de desfechos:	27
10.1 Variável de desfecho:	27
10.1.2 Primária:	27
10.1.3 Secundária:	27
10.1.3.1 Variáveis que definem progressão de doença:	27
10.1.3.2 Definição de subgrupos (classificação por disfunção):	27
11. Análise estatística	27
11.1 Variáveis de confusão:	28
Figure 3: Proposta de DAG (Gráfico Direcionado Acíclico, em livre tradução) obtido de "www.dagitty.net" ⁷² possível para delineamento de relações entre Gal-3 como preditor 1º e desfecho óbito por todas as causas com demais variáveis.	29
11.2 Imputação de variáveis sem mensuração	29
12. Aspectos éticos:.....	30
13. Resultados	30
13.1 Primeira visita (inclusão):	30
Tabela A: Características sociodemográficas e clínicas entre grupo de alto risco e não alto risco de Galectina-3	31
Tabela B: Características basais conforme grupos de risco Gal-3 para: NYHA, NT-proBNP ajustado para idade e alterações ao ECG (Minor ou Major).....	33
13.2 Segunda visita	34
Tabela C: Segunda visita - Características de pacientes em 2ª visita conforme grupos de risco Gal-3 para: NYHA, NT-proBNP ajustado para idade e alterações ao ECG (Minor ou Major).....	35
Tabela D: Evolução de doença por progressão de NYHA, NT-proBNP ajustado para idade, alterações eletrocardiográficas conforme grupo de risco Gal-3.	36
Tabela E: Reclassificação em subgrupos realizada em 2ª visita, conforme presença de cardiomiopatia e disfunção – dados demográficos, Galectina-3, NT-proBNP.....	37
13.3 Descrição de evento óbito	38
Figura 4: Proporção de eventos (óbito) conforme grupos de risco Galectina-3 e NT-proBNP ajustado para idade alterado.	39
Tabela F: Características sociodemográficas, clínicas, ECG basal por desfecho óbito.	40
Tabela G: Classe funcional, Gal-3, NT-proBNP, alterações ao ECG e associações ao desfecho óbito.	42
Tabela H: Riscos proporcionais de Cox brutos e com ajuste para Galectina-3, NT-proBNP ajustado para idade, e alterações ao ECG.	44
Figuras 5 – 10: Kaplan-Meier / Nelson-Aalen demonstrando tempo-evento (óbito) conforme variáveis em modelo.....	46
14. Discussão	51
15. Limitações	54
16. Conclusões	56
17. Referências:	58

Lista de figuras

Figura 1: Mapa com municípios onde foi realizado o estudo

Figura 2: Fluxograma coorte SaMi-Trop e deste estudo

Figure 3: Proposta de DAG (Gráfico Direcionado Acíclico, em livre tradução) obtido de "www.dagitty.net"⁷² possível para delineamento de relações entre Gal-3 como preditor 1º e desfecho óbito por todas as causas com demais variáveis.

Figura 4: Proporção de eventos (óbito) conforme grupos de risco Galectina-3 e NT-proBNP ajustado para idade alterado.

Figuras 5 - 10: Kaplan-Meier / Nelson-Aalen demonstrando tempo-evento (óbito) conforme variáveis em modelo

Lista de tabelas

Tabela A: Características sociodemográficas e clínicas entre grupo de alto risco e não alto risco de Galectina-3

Tabela B: Primeira visita, características basais conforme grupos de risco Gal-3 para: NYHA, NT-proBNP ajustado para idade e alterações ao ECG (Minor ou Major)

Tabela C: Segunda visita - Características de pacientes em 2ª visita conforme grupos de risco Gal-3 para: NYHA, NT-proBNP ajustado para idade e alterações ao ECG (Minor ou Major)

Tabela D: Evolução de doença por progressão de NYHA, NT-proBNP ajustado para idade, alterações eletrocardiográficas conforme grupo de risco Gal-3.

Tabela E: Reclassificação em subgrupos realizada em 2ª visita, conforme presença de cardiomiopatia e disfunção – dados demográficos, Galectina-3, NT-proBNP.

Tabela F: Características sociodemográficas, clínicas, ECG basal e classificação funcional por desfecho óbito.

Tabela G: Classe funcional, Gal-3, NT-proBNP, alterações ao ECG e associações ao desfecho óbito.

Tabela H: Riscos proporcionais de Cox brutos e com ajuste para Galectina-3, NT-proBNP ajustado para idade, e alterações ao ECG.

Resumo

Moreira CHV. *Associação da galectina-3 com desfechos clínicos e mortalidade em coorte de pacientes com doença de Chagas* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Contexto: Cardiomiopatia por Chagas e a causa predominante de miocardite infecciosa e apresenta alta morbimortalidade, aproximadamente 14.000 ao ano. A doença evolui em múltiplas vias, levando à inflamação, remodelamento cardíaco, fibrose e hipertrofia. Galectina-3 (Gal-3) pode traduzir potencial para fibrogênese sob certo estímulo e agir como biomarcador para estratificação daqueles em forma indeterminada ou cardíaca leve que irão progredir para doença cardíaca ou morte. Métodos: analisamos dados secundários de base da coorte SaMi-Trop cujos pacientes provinham de área com alta endemicidade no Brasil e transmissão vetorial controlada, bem como sem uso prévio de Benzonidazol (Bz). Da primeira visita estudamos dados referentes às características sócio demográficas e clínicas, Gal-3, NT-proBNP, títulos sorológicos, alterações ao ECG Minor ou Major e classe funcional (NYHA). A coorte foi seguida por um tempo cuja mediana foi 2.5 anos e, reavaliamos pacientes em segunda visita para verificar mudanças em: NT-proBNP ajustado para idade (adjNT-proBNP), alterações ao ECG, progressão de classe funcional e morte por todas as causas. Analisamos dados transversais das visitas, assim como tempo-evento por regressão de Cox e Kaplan-Meier para Gal-3 e outros preditores, ajustados para: idade, sexo, doença renal crônica, IAM prévio e diabetes. Reportamos HRs para óbito por todas as causas. Resultados: Analisamos dados de 1313 pacientes cuja média de idade era 59.8 ($\pm$ 12.5) anos, maioria mulheres (n=884; 67%), com alta prevalência de comorbidades (HAS, 64.5%; dislipidemia, 41.2%; diabetes, 10.1%), NYHA I-II, 57.2%. Alterações ao ECG de base foram frequentes, Minor, 23.3% e Major, 60.1%. No geral, estrato mais alto de Gal-3 (>25.9 ng/mL)-“AR-Gal-3” foi associado com mais marcadores de gravidade e carga de doença em ambas as visitas, além de morte por todas as causas. Cem (8.2%) pacientes faleceram durante o seguimento. Gal-3 foi maior entre os falecidos, 19.9 ($\pm$ 8.7) ng/mL, comparado aos sobreviventes, 17.5 ($\pm$ 6.2) ng/mL; $p < 0.001$. Para AR-Gal-3, modelo de Cox ajustado resultou em HR 2.07 [IC95%: 1.21-3.52]; para subgrupo com AR-Gal-3 e Major-ECG, encontramos HR 6.85 [CI95%: 3.10-15.10]; enquanto para AR-Gal-3 e adjNT-proBNP alterado, HR 7.93 [CI95%: 3.88-16.21]. Progressão de doença (evolução de alterações ao ECG, surgimento de adjNT-proBNP alterado e piora de classe funcional) não foi associada à AR-Gal-3. Conclusões: entre pacientes infectados por *T. cruzi* e sem uso prévio de Bz em área endêmica do Brasil, encontramos associação entre Gal-3 >25.9 ng/mL e mais que duas vezes a taxa de mortalidade daqueles com Gal-3 ≤ 25.9 ng/mL. Quando associado a Major-ECG, resultou em quase sete vezes a taxa

de mortalidade comparado àqueles não pertencentes ao grupo AR-Gal-3 e não Major-ECG. Logo, o biomarcador pôde definir pacientes com maior chance para evolução ao óbito por todas as causas, apesar de não ter sido evidenciado sua associação com progressão para marcadores de doença.

Descritores: Doença de Chagas; Biomarcadores; Óbito; Evolução de doença.

Abstract

Moreira CHV. Relationship of galectin-3 with clinical outcomes and mortality in a cohort of Chagas disease patients in Brazil [thesis] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Background: Chagas heart disease is the leading cause of infectious myocarditis worldwide, has a significant yearly mortality burden of ~ 14,000 deaths. The disease evolves in multiple pathways leading to inflammation, cardiac remodeling, fibrosis, hypertrophy. Galectin-3 (GAL-3), by proxy, can translate fibrogenesis potential under certain stimuli may act as a biomarker to stratify who will evolve to cardiac disease spectrum or all-cause death. Hence, we evaluate if GAL-3 high-risk level is associated with disease progression, cardiomyopathy onset, or all-cause death. **Methods:** We analyzed data of a no Benznidazole-experienced patients' subset of the SaMi-Trop cohort study from a vectorial controlled transmission and highly endemic Brazilian region. We analyzed baseline sociodemographic and clinical data, Gal-3, NT-proBNP, serology titres, ECG minor or major abnormalities, and functional class (NYHA). The cohort was followed-up for a median of 2.5 years, and we reassessed changes in: age-adjusted NT-proBNP, ECG categorized abnormalities, NYHA progression, and all-cause mortality. We ran Cox regression with Gal-3 and other predictors, adjusted for age, sex, chronic renal disease, previous myocardial infarction, and diabetes, to check the HRs for all-cause death. **Results:** We studied 1313 patients with **59.8 (± 12.5) years** old, mostly female (n=884; 67%), with high comorbidities prevalence (hypertension, 64.5%; dyslipidemia, 41.2%; diabetes, 10.1%), NYHA I-II, 57.2%. ECG abnormalities at baseline were frequent: Minor, 23.3%, and major, 60.1%. Overall, a higher Gal-3 stratum (>25.9 ng/mL) was associated with more disease severity markers in both visits and deaths. One-hundred, 8.2% of patients died during follow-up. Gal-3 was higher among deceased 19.9 (±8.7) ng/mL, comparing with survivor's levels, 17.5 (±6.2) ng/mL; p<0.001. For higher Gal-3 strata, adjusted HR 2.07 [CI95%: 1.21-3.52]; for composite higher Gal-3 strata and Major-ECG abnormalities HR 6.85 [CI95%: 3.10-15.10], while for higher Gal-3 strata and abnormal age-adjusted NT-proBNP HR 7.93 [CI95%: 3.88-16.21]. Disease progression (evolution of ECG, age-adjusted NT-proBNP, NYHA) was not associated with a higher Gal-3 stratum. **Conclusion:** Among no benznidazole experienced *T.cruzi*, infected patients, we found that Gal-3 >25.9ng/mL depicts more than two times the rate of death as those with Gal-3 ≤ 25.9 ng/mL, and when associated with major abnormalities in ECG, resulted in almost seven times the rate of death comparing with those in non-high-risk Gal-3 strata and non-major abnormalities. The biomarker can define a patient that can evolve to all-cause death, although it could not represent disease evolution.

Descriptors: Chagas disease; Biomarkers; Death; Disease progression.

1.1 Histórico

A descrição da tripanossomíase Americana por Carlos Chagas (1879 – 1934) em 1909 ¹ pode ser considerada uma das mais fascinantes e completas descobertas em toda a história da medicina tropical. Enquanto ainda jovem, descreveu o agente etiológico, vetores, principais reservatórios e o mecanismo de infecção, assim como as manifestações clínicas da fase aguda do primeiro caso humano relatado, Berenice ². Porém, a doença de Chagas parece ser uma enfermidade antiga: DNA de *T. cruzi* foi descoberto em espécimes teciduais de múmias do período pré-colombiano em países andinos datando até 9000 anos ³.

Triatomíneos, seus reservatórios e vetores, existem na natureza há milhares de anos. Os tripanosomas primitivos foram parasitas monogenéticos de insetos que não sugavam sangue. Quando insetos adquiriram o hábito hematófago, os tripanosomas sofreram modificações morfológicas e funcionais, desenvolvendo um flagelo e uma membrana ondulante para circular no sangue de vertebrados ⁴.

A doença de Chagas endêmica parece ter tido início em um contexto de desflorestamento causado por ações antropológicas ao longo dos últimos dois a três séculos ^{4,5}.

1.2 O agente:

Trypanosoma cruzi é um protozoário do filo Sarcomastigophora, subfilo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família Trypanosomatidae. Possui quatro estágios de desenvolvimento com diferenças na forma, metabolismo e capacidade replicativa.

Os insetos tornam-se infectados quando sugam o sangue de vertebrados que possuem parasitas circulantes (formas tripomastigotas). No estômago do inseto, a maioria dos parasitas morrem e os remanescentes, se diferenciam em epimastigotas e, em seguida, tripomastigotas metacíclicos na porção final do intestino. Infecção de mamíferos ocorre pelo contato com as formas metacíclicas, eliminadas com as fezes de triatomíneos após repasto sanguíneo. Este contato se dá através por mucosa, injúria cutânea, pré-existente ou resultante da picada do inseto.

Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem o sistema retículo endotelial e células do tecido conjuntivo e se diferenciam em amastigotas que iniciam replicação por divisão binária. Quando a célula está repleta de amastigotas, essas se transformam novamente em tripomastigotas com o crescimento de flagelo. Os tripanosomas lizam as células, invadem tecidos adjacentes e se disseminam pela circulação linfática e sanguínea para sítios distantes como células musculares e ganglionares, onde seguem os ciclos de multiplicação intracelular. E, finalmente, o ciclo se completa quando tripomastigotas circulantes são transmitidos a partir do repasto sanguíneo por vetores ⁶.

1.3 O vetor:

Triatomíneos são insetos pertencentes à ordem hemíptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. É um grupo de aproximadamente 140 espécies, muitas das quais potenciais vetores da Doença de Chagas. As mais epidemiologicamente significantes são aquelas amplamente distribuídas: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus*.

Os vetores adquirem o *T. cruzi* quando repastam mamíferos infectados. Assim, os parasitas se multiplicam no intestino do inseto e então, são eliminados pelas fezes, utilizadas como veículo de transmissão ao próximo vertebrado; na ocasião do repasto, o triatomíneo defeca sob a pele e deposita *T. cruzi* próximo à lesão, permitindo sua penetração na derme.

Triatomíneos existem na natureza há milhões de anos. São conhecidos desde o século XVI⁷, mas sua adaptação ao ambiente doméstico é recente. Inicialmente a Doença de Chagas constituiu-se como uma doença enzoótica, posteriormente transformando-se em antroponose, quando a ação predatória da humanidade, removendo a flora junto com a fauna silvestre, forçou os vetores à invasão de um ecótopo selvagem. A partir de habitações e outras construções que passaram a ser utilizadas como fonte alimentar, foram configurados três ciclos: selvagem, peridoméstico e doméstico⁵. A excelente adaptação dos triatomíneos ao último ciclo, provavelmente em busca de novas fontes de alimento, constituiu-se no maior determinante para o estabelecimento da infecção em humanos.

1.4 Transmissão

A transmissão mais comum acontece a partir do ferimento da picada por triatomas, os populares barbeiros ou “chupões”, como são conhecidos no interior do Brasil. São estritamente hematófagos e contaminam-se com o parasita ao sugarem sangue de mamíferos infectados, seus reservatórios naturais, ou mesmo outros humanos contaminados. Uma vez no tubo digestivo artrópode, o parasita é eliminado nas fezes junto ao ponto da picada na ocasião do repasto sanguíneo. Surge uma sensação de prurido e consequentes escoriações, facilitando a entrada do *T. cruzi* no organismo, o que também pode ocorrer pela mucosa dos olhos, nariz e da boca ou por feridas e cortes recentes na pele⁸.

Além da transmissão vetorial, também estão documentadas a transmissão vertical, por transplantes de órgão, transfusão de sangue, ingestão de comida ou bebida contendo triatomíneos infectados e a exposição laboratorial acidental⁹.

O risco de aquisição da doença de Chagas após transfusão de uma unidade de sangue oscila entre 10-20%, variando conforme o hemocomponente, predominando em derivados plaquetários. A transmissão congênita ocorre em cerca de 5% em pacientes infectados cronicamente em algumas regiões da Bolívia, Chile e Paraguai e, em torno de 1-2% nas outras áreas endêmicas. Essas duas formas parecem ser os modos de transmissão mais comuns em países não endêmicos e zonas urbanas^{10,11}.

Embora novos casos da doença de Chagas tenham sido reduzidos nos últimos 25 anos no Brasil, onde a transmissão vetorial domiciliar foi considerada controlada em 2006 ¹², casos por transmissão oral têm sido frequentemente relatados em países da América Latina, como Venezuela, onde 89 casos foram diagnosticados em escolares em grande surto reportado em 2009 ¹³, assim como diversos estados brasileiros ¹⁴, incluindo Rio Grande do Sul, Amazonas e Santa Catarina ¹⁵. No caso do homem, esta transmissão pode ocorrer de maneira esporádica, através da ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, carne crua) ¹⁴, geralmente associada à maciça carga parasitária e mecanismos permissivos que facilitam a penetração do *T. cruzi* na mucosa do trato gastrointestinal alto, resultando em quadro clínico agudo com elevada mortalidade ¹⁶.

Ainda vale ressaltar que transmissão da DCh na região amazônica tem trazido luz a surtos reportados, principalmente em comunidades ribeirinhas, porém com frequência relativamente baixa de complicações cardiovasculares evidenciados em 33% dos pacientes ao estudarem surtos ocorridos de 2007 até 2015, com 85 casos confirmados ¹⁷.

1.5 Epidemiologia:

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma doença tropical fortemente correlacionada à pobreza, negligenciada pela mídia e políticas públicas e que possui grande impacto na saúde, qualidade de vida e desenvolvimento socioeconômico para países em desenvolvimento ^{15,18}.

Persiste como uma das mais negligenciadas do mundo, acometendo entre seis milhões de pessoas e mais que 70 milhões sob risco. Seu pior espectro é a cardiomiopatia, que ocorre entre 20-40% dos infectados. E com uma incidência anual de aproximadamente 1,85% pessoas-ano ¹⁹⁻²²(16-19). Na América Latina, 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para aquisição da infecção e em 2008 foram reportados 10.000 óbitos correlatos à doença. Segue como doença tipicamente de áreas ruralizadas cujo ambiente favorece a adequação do ciclo ¹⁸.

No Brasil, na década de 1970, cerca de 100.000 novos casos eram reportados por ano. Porém, oficialmente, a transmissão vetorial foi considerada eliminada em 2006 e em 2007 foram notificados 10.000 casos. Ainda possuímos cerca de seis milhões de infectados no país podendo ser uma quantidade ainda maior, uma vez que muitos indivíduos não exibem sintomas e são classificados como portadores da forma indeterminada da doença ²³ e ainda estima-se que ocorram 6000 óbitos anuais relacionados à DCh no país ²⁴.

Com a crescente mobilidade populacional e fluxos migratórios de áreas endêmicas para o restante do mundo, indivíduos têm sido identificados em áreas não endêmicas. Assim, aumentando-se o risco de transmissão do parasita por hemotransfusões ou transplante de órgãos naqueles países onde o rastreamento do agente em sangue e órgãos não é obrigatório, bem como pela ausência de suspeição clínica impedindo o pronto diagnóstico e tratamento dos pacientes ²⁵. Estima-se que nos EUA há 300.000 infectados, assim como prevalências estimadas que variam de milhares até 80 mil na Espanha ²⁶.

1.6 Formas Clínicas

Doença sistêmica com repercussões principalmente no sistema cardiológico, digestório e sistema nervoso central. Pode ser dividida em fase aguda e crônica.

Fase aguda é caracterizada por parasitemia evidente e identificável ao exame direto do sangue. Sintomatologia usualmente é leve ou ausente e a doença aguda é incomum. Naqueles sintomáticos, podem, raramente ser encontrados sinais de porta de entrada (Chagoma de inoculação), febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia e miocardite. Em áreas endêmicas, a maioria dos infectados são crianças onde mortalidade por encefalomielite ou insuficiência cardíaca severa oscila entre 5-10%. Já no contexto de infecções agudas associadas a hemotransfusões ou transplantes, o período de incubação pode ser de até 4 meses e a sintomatologia varia conforme gradação da imunossupressão ^{6,9}.

Manifestações da fase aguda da doença são autolimitadas em até 90% dos casos, mesmo sem tratamento específico.

O curso da forma crônica da doença é variável, com cerca de 60 - 70% dos indivíduos permanecendo com a forma indeterminada (assintomática), caracterizada pela positividade da sorologia para anticorpos contra *T. cruzi*, eletrocardiograma e exames radiográficos do coração, esôfago e cólon normais. Porém, entre 30 – 40% desenvolverão doença crônica que acometerá coração, tubo digestivo (megaesôfago e megacolon) ou ainda uma forma mista, usualmente após 10-30 anos da infecção inicial ⁹.

Ressalta-se ainda que reativação da doença possa ocorrer em pacientes cronicamente infectados que se tornam imunossuprimidos seja por coinfeção com HIV ou pelo uso de fármacos imunossupressores ²⁷.

A forma indeterminada apresenta o melhor prognóstico clínico para pacientes cronicamente infectados, uma vez que, a despeito da demonstração sorológica da presença do parasita, não há “lesão em órgão alvo”, ou seja, acometimento cardíaco ou digestivo, o que pode persistir até o fim da vida. Porém, o maior desafio nesse contexto é a definição, na ausência de um marcador de progressão fidedigno, de quais pacientes desenvolverão as formas clínicas da doença²⁸.

Aproximadamente 20-30% dos casos na forma indeterminada não evoluem para cardiopatia, mas não existe marcador clínico indicando quando essa evolução vai ocorrer ²⁹.

Por seu efeito de coorte, a doença de Chagas representa problema de saúde pública e é uma grande causa de doença cardíaca, acidente vascular cerebral e morte, especialmente em pacientes mais idosos (>60 anos) naquelas regiões onde a doença já é historicamente endêmica ³⁰.

1.7 Diagnóstico

Durante a fase aguda há um alto nível de parasitemia, o que permite um diagnóstico parasitológico direto. A hemocultura tem sua sensibilidade aumentada quando alguns fatores são seguidos: volume coletado de 30 ml, um maior número de amostras, diminuição do tempo entre a coleta e o processamento e maior tempo de observação, preferencialmente analisada durante 180 dias e, quando se observam formas flageladas do *T. cruzi*, é indicativo de positividade ^{28,31}.

Em neonatos, pode-se examinar o sangue do cordão umbilical ou periférico durante o primeiro mês de vida. Se os resultados forem persistentemente negativos ou quando não foram realizados precocemente, pode-se testar para Anti-*T. cruzi* IgG entre os 6-9 meses ^{32,33}.

A forma crônica caracteriza-se por baixo nível de parasitemia e anticorpos detectáveis. Durante essa fase são usadas provas sorológicas (ELISA, hemaglutinação indireta e quimiluminescência) e biologia molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os exames parasitológicos indiretos possibilitam a multiplicação dos parasitas existentes em uma amostra de sangue. A aplicação destes exames para diagnóstico e controle pós terapêutico apresenta limitações pois, embora tenham 100% de especificidade e tenham ocorrido aprimoramentos no diagnóstico parasitológico, apresentam baixa sensibilidade. Indicações para a utilização de PCR: prova confirmatória para diagnóstico em pacientes com provas sorológicas inconclusivas, na detecção do nível de parasitemia em imunodeprimidos visando intervenção terapêutica, pré-emptiva ou profilática precoce ³⁴. Tem ainda utilidade na identificação de falha terapêutica quando existe a detecção do DNA de *T. cruzi* após o fim do tratamento com suposta ação tripanomicida ⁶.

Para o diagnóstico são necessários dois resultados positivos usando-se métodos diferentes ou dois antígenos diferentes no teste ELISA, sempre com respaldo epidemiológico.

2. História natural e patogênese

Apos inoculação, ocorre um período de incubação de 1 a 3 semanas. A fase aguda pode ser assintomática ou apresentar-se com febre, rash, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Em raros casos (<5%), a fase aguda pode apresentar-se com uma miocardite aguda ou meningoencefalite.

Os tripomastigotas podem infectar diferentes linhagens celulares (miócitos cardíacos, miócitos, células endoteliais do sistema nervoso, sistema reticuloendotelial e tecido adiposo).

Após essa fase inicial, o paciente torna-se assintomático e ingressa em uma fase indeterminada, na qual cerca de 50% permanecerão assintomáticos por toda vida. Todavia, em 10 – 20 anos, alguns pacientes podem desenvolver uma forma de cardiomiopatia lentamente progressiva que varia em espectro desde uma forma arritmogênica até formas tromboembólica, dilatada ou silente.

Já é reconhecido que pacientes com cardiomiopatia chagásica apresentam o pior prognóstico comparando-se a outras cardiomiopatias, resultante de uma associação de: arritmias ventriculares, distúrbios de condução evidenciados ao ECG e insuficiência cardíaca ³⁵.

2.1 Fisiopatogenia da fibrose cardíaca

Inflamação aguda e crônica frequentemente desencadeia fibrose, lesando células epiteliais residentes ou endoteliais, liberando mediadores inflamatórios (citocinas, quimioscinas) e recrutamento de amplo espectro de células inflamatórias (linfócitos, polimorfonucleares, leucócitos, eosinófilos, mastócitos), causando ativação de células efectoras, ativando o processo fibrogênico ³⁶.

Mediante o insulto miocárdico pelo *T.cruzi*, há o desencadeamento de um extensivo remodelamento estrutural e funcional em resposta à agressão, tendo como evento chave, a hipertrofia dos miócitos associada à expressiva deposição de matriz extracelular ³⁷.

A fibrose miocárdica pode ser classificada como reativa (ocorrendo em espaço perivascular com similaridade ao processo de fibrogênese dos demais tecidos; ou de reparo, que ocorre em áreas de perda dos miócitos).

Fibroblastos cardíacos, células mais abundantes no miocárdio, são os responsáveis pelo processo de fibrose, diferenciando-se em miofibroblastos, em resposta a alguma injúria, classicamente atuando TGF-Beta, Endotelina-1 e Angiotensina II ³⁸. O processo de fibrose contribui tanto para disfunção sistó-diastólica, como com a perturbação da excitação elétrica, induzindo a efeitos pró-arritmogênicos por produção de septos de colágeno, áreas arritmogênicas por letificarem a condução do processo eletrofisiológico ³⁹. A fibrogênese cardíaca correlaciona-se fortemente com um crescente fenômeno de pro arritmogênese e morte súbita ⁴⁰.

3. Biomarcadores

Avaliação da evolução após o tratamento etiológico é ambígua, uma vez que anticorpos contra *T. cruzi* podem permanecer detectáveis por anos ^{42,41,42} e a imprevisível soroconversão pode ocorrer somente anos após tratamento ^{43,44}. Assim, testes convencionais não são úteis para a monitorização, não permitem o reconhecimento precoce da falha terapêutica a curto e médio prazos ^{45,46}.

Um ponto relevante na doença de Chagas consiste na identificação daqueles pacientes infectados que progredirão para cardiomiopatia ou aqueles que, à despeito de seguirem assintomáticos, possuem uma cardiopatia iminente que requer seguimento rigoroso necessitando uma abordagem diagnóstica e terapêutica mais intensa. Outro ponto é que inexistem marcadores fiéis que possam determinar, com brevidade, quais pacientes apresentam cura após a terapia antiparasitária específica ^{1,2}.

Neste contexto, a busca de biomarcadores de evolução para definição ou progressão de forma clínica, cura espontânea ou pós terapia antiparasitária apresentam-se com grande potencial para suprir essas lacunas, já que somente marcadores sorológicos, bem como de biologia molecular ou parasitários (hemocultura e pesquisa direta) não possuem a sensibilidade tampouco a capacidade de definição necessária para a demanda requerida pela doença nos campos de desenvolvimento de novas drogas e marcadores de progressão ou cura.

Podemos definir biomarcadores como sendo características de um indivíduo ou organismo que podem ser mensuradas objetivamente e que indicam um processo biológico normal, patogênico ou uma resposta a alguma intervenção. Em outras palavras, eles podem representar fatores de risco para uma doença ou desfecho, ou podem representar indicadores de progressão de uma patologia ou mudanças no seu curso com um determinado tratamento ⁴⁷.

Durante um processo inflamatório, mediadores liberados na corrente sanguínea possuem ação direta pró e anti-inflamatória, assim como efeitos indiretos a partir da modulação da liberação de outras substâncias. Tais substâncias precursoras, formas maduras e produtos de degradação de mediadores com e sem atividade biológica penetram no sítio da infecção através da circulação, onde, teoricamente, podem ser mensuradas. Como biomarcadores candidatos, espelham a presença de um processo infeccioso ou, mais acuradamente, a resposta inflamatória ao evento.

Subclassificação de biomarcadores na doença de Chagas foi proposta por Requena-Mendez et al.⁴⁷, em três grupos: marcadores precoces de evolução da doença; marcadores de resposta à terapia antiparasitária; marcadores preditores de não evolução da doença.

O precursor do peptídeo natriurético cerebral (NT-proBNP), está associado à disfunção ventricular, arritmias complexas e insuficiência ventricular em estudos prévios ⁴⁸⁴⁹. Associa-se à pressão de enchimento de câmara cardíaca, denotando alteração remodeladora já em curso. Já foi proposta a mensuração de seus níveis em estágios clínicos precoces da doença, principalmente na forma indeterminada, todavia, concomitância de alterações ecocardiográficas de ventrículo esquerdo parece estar presentes junto à alteração do marcador sérico ⁴⁷⁴⁸, já alterado, impossibilitando seu uso na diferenciação precoce daqueles em que há alguma disfunção ainda incipiente.

O fato de pacientes acometidos por doença de Chagas sem disfunção cardíaca já apresentarem níveis elevados de peptídeos natriuréticos sugere que a avaliação de seus níveis possa ser usada como marcador de doença de Chagas assintomática sem disfunção ventricular, a fim de identificar aqueles que se beneficiariam de terapia precoce para insuficiência cardíaca, postergando progressão da cardiomiopatia⁵⁰, mas talvez já fora de janela oportuna para quaisquer intervenções que possam mudar o curso da doença.

4. Galectina - 3

Galectina-3 (Gal-3), um beta galactosídeo ligante à lectina, é secretado por macrófagos ativados e tem sido envolvido em mecanismos de fibrogênese. Existem 15 membros identificados da família das galectinas em mamíferos. As galectinas podem ser expressas tanto intracelular como extracelular e associada ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca, gradação de sua gravidade e letalidade ⁵¹m. Gal-3 é também um potente mediador pro inflamatório que pode reconhecer glicanos presentes em diversos patógenos. Em um modelo experimental de DCh, Pineda et al.⁵² Observaram que a Gal-3 promoveu infiltração celular no coração e subsequente deposição de colágeno e fibrose cardíaca. Atua ainda na hiperregulação do ciclo celular, assim como na apoptose, sendo produzida em periócitos locais, mastócitos e macrófagos, induzindo no tecido

miocárdico, associado ao TGF-Beta, fibroblastos residentes e miofibroblastos à produção de procolágeno, culminando em fibrose cardíaca¹ e, em um contínuo, progressão de disfunção miocárdica, essencialmente ventricular esquerda⁵⁶.

Também foi demonstrado que Gal-3 se liga à laminina de membranas basais, interagindo como ponte entre *T.cruzi* e células musculares, facilitando ainda o recrutamento na matriz extracelular e adesão à laminina, consequentemente, facilitando invasão celular^{14,57}.

Galecitina-3 está envolvida em múltiplos outros processos atuando em resposta inflamatória aguda, essencialmente na ativação neutrófila e adesão.

Logo, de certa forma, parece atuar como um marcador constitucional traduzindo o “potencial fibrogênico” do paciente mediante um insulto ao miocárdio, em nosso contexto, *T.cruzi*, tanto por seu dano direto, mimetismo ou autoimunidade, todos tangendo à via de inflamação e fibrose⁵⁸.

Neste contexto, prevalecem a incerteza e escassez de melhores opções terapêuticas. A ausência de biomarcadores mensuráveis e fidedignos para definição de quem irá evoluir em direção a determinado espectro clínico, assim como para acessar sucesso terapêutico ou critério de cura, como alternativa à morosa soroconversão e até mesmo dúvidas quanto ao seu real significado na progressão da doença. Logo, desencoraja e torna inviável qualquer empreitada em novos ensaios clínicos para testagem de novos componentes. Consequentemente, um círculo vicioso de escassez de novas alternativas nos levou a ancorar a maioria das novas abordagens farmacológicas ao “reposicionamento” de drogas durante as últimas décadas^{23,27,59}. Valendo ressaltar que toda a carga terapêutica tripanomicida na DCh pende apenas ao Bz.

Assim, a necessidade de busca de marcadores confiáveis, reprodutíveis para definir progressão de doença, resposta à terapêutica e cura exige uma abordagem intensiva com desenhos de estudo voltados para coortes prospectivas, as quais podem trazer luz a padrões ou tendências de biomarcadores candidatos que sejam substitutos para progressão de doença e soroconversão. Gal-3 que, por sua aparente estabilidade “constitucional”, pode habilitá-la ao uso para definição prognóstica e seleção daqueles em alto risco, sejam em forma indeterminada ou em miocardiopatia iminente, possibilitando que, em uma janela oportuna, possa haver uma abordagem mais precoce, intensiva e personalizada.

5. Hipótese:

Os níveis de galecitina-3 nos pacientes infectados por *T.cruzi* apresentam relação com o desfecho clínico óbito por todas as causas e associação com progressão de alterações eletrocardiográficas, alterações em NT-proBNP ajustado para idade e piora de classificação funcional NYHA

6. Justificativa:

Permitir estratificação de risco através da análise de biomarcadores almejando uma medicina personalizada na avaliação de marcadores de risco para desenvolvimento de miocardiopatia chagásica e evolução para óbito.

7. Objetivo geral:

Analisar associação de níveis elevados de Gal-3 (>25.9 ng/mL) como biomarcador para desfecho óbito por todas as causas e relação com forma e desfechos clínicos.

7.1 *Objetivos específicos:*

- Verificar associação de níveis elevados de Gal-3 e óbito por todas as causas
- Verificar associação de níveis elevados de Gal-3 com características demográficas, clínicas, eletrocardiográficas e NT-proBNP
- Verificar associação de níveis elevados de Gal-3 com progressão de alterações ao ECG, NT-proBNP ajustado para idade e classe funcional

8. Material e métodos

8.1 *Desenho do estudo:*

8.1.1. *Tipo de estudo:*

Transversal e Coorte prospectiva com seguimento de 2 anos, incluindo visita de base e seguimento em 24 meses.

8.1.2. *Período do estudo:*

- Recrutamento / inclusão: 12 de junho de 2013 ate 19 de agosto de 2014.
- Visita de seguimento: 27 de agosto de 2015 ate 30 de agostos de 2017.

8.1.3. *Caracterização do local de estudo:*

Vinte e um municípios em região no norte de MG, **Figura 1**.

Figura 1: Mapa com municípios onde foi realizado o estudo .

8.1.4. População de estudo e seleção da casuística:

A população acessível para o estudo foi derivada de coorte já estabelecida e já descrita em outras publicações: “Centro de Pesquisa em Medicina Tropical São Paulo- Minas Gerais – SaMi-Trop”, criada em 2011 e formada por rede colaborativa de cientistas de São Paulo e Minas gerais almejando conduzir e desenvolver pesquisa para endereçar lacunas em doença de Chagas, como descoberta de biomarcadores de evolução, desenho de novas abordagens para modificar progressão de doença ⁶⁰.

Os dados secundários analisados nesta tese derivaram originalmente de um serviço de telessaúde desenhado para assistir e dar suporte `a atenção primária no estado de Minas Gerais através de análise e resultados de ECG em tempo hábil para auxílio em conduta de médico assistente da rede publica. Consistia em exames de ECG solicitados entre 2011 e 2012, na atenção primaria que os pedia conforme avaliação e conduta médica. Dados clínicos, incluindo

medicamentos em uso, índices antropométricos e presença de doença de Chagas auto referida ou diagnosticada na ocasião eram também enviados para auxiliar médico em confecção do laudo do ECG remotamente. Este, por sua vez, se encontrava na unidade de Telessaúde do Estado de Minas Gerais, a qual 'e vinculada 'a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A partir dessa base de dados, selecionamos região delimitada por 21 cidades do Nordeste de MG, a qual apresentava uma suposta alta prevalência de cardiomiopatia por DCh e transmissão vetorial controlada.

Os pacientes foram convidados a participar do estudo indo ate unidade básica de saúde onde eram assistidos. Ali os pesquisadores permaneciam durante dois a três dias para avaliação de elegibilidade e inclusão.

8.1.5 Critérios de inclusão:

1. Exame ECG realizado entre 2011 e 2012 e disponível em banco de dados do Telessaúde-UFMG
2. Doença de Chagas auto referida e, posteriormente, confirmada por duas sorologias.
3. Idade maior ou igual a 19 anos

8.1.6 Critérios de exclusão:

1. Gravidez ou amamentação
2. Quaisquer pacientes com comorbidades ou condição debilitante cuja expectativa de vida fosse inferior 'a dois anos, **Figura 2**.

Em seguida, eram submetidos 'a coleta de sangue para sorologia Anti-T.cruzi que utilizou dois ensaios sorológicos (imunoensaio de enzimas lizadas "EIA" e imunoensaio enzimático recombinante - Wigner Lab.) (54). Equipe do estudo realizava exame eletrocardiográficos e aplicação de questionário para coleta de dados sociodemograficos e clínicos.

A **população alvo** para estudo nesta tese almejando endereçar os objetivos propostos foi composta por 2168 pacientes recrutados, excluindo 202 (9.3%) cuja sorologia era negativa, sente (0.3%) que desistiram do estudo. Logo 1959 (90.3%) pacientes com DCh confirmada por sorologia foram avaliados e seguidos. Exluímos 497 (22.7%) com uso reportado ou ignorado de Benzonidazol a qualquer momento antes da visita; também retiramos do estudo sete (0.3%) pacientes em que não foi possível mensurar níveis de Gal-3 por qualidade inadequada das amostras. Como resultado final, iniciamos análise com 1313 (60.5%) pacientes.

A coorte original foi desenhada e seu tamanho de amostra calculado para que tivessem ao menos uma visita de seguimento após 24 meses de visita inicial ou ate desenvolvimento de desfecho primário ou perda de seguimento. Assim, foram excluídos da análise de segunda visita 279 (21.2%) pacientes; 179 (64.1%) que não retornaram 'a pesquisa e 100 (35.8%) por óbito. Logo, 1034 (78.7%) foram avaliados nesta visita.

Figura 2: Fluxograma Fluxograma coorte SaMi-Trop e deste estudo
 *Porcentagens relativas aos 1313 pacientes incluídos neste estudo.

9. Medidas

9.1 Sociodemográficos e clínicos

Entrevistamos os pacientes em questionário padronizado onde foram obtidas características Sociodemográficos, hábitos, comorbidades e fármacos concomitantes, sintomas cardiovasculares e classe funcional segundo *New York Heart Association* (NYHA) ⁶¹ – I, paciente assintomático em suas atividades físicas; II – assintomático em repouso, sintomas não desencadeadas pela atividade física habitual; III – assintomático em repouso, atividade menor que a habitual causa sintoma; IV – Paciente com sintomas (dispneia, palpitações e fadiga), ocorrendo nas menores atividades físicas e mesmo em repouso.

9.2 Eletrocardiograma

Voluntários foram submetidos a exame eletrocardiográfico de 12 derivações por ECG PC (TEB, São Paulo, Brasil). Os exames foram enviados eletronicamente para o sistema de Telessaúde-UFMG (57) e a leitura efetuada por cardiologista treinado. Posteriormente, o laudo do ECG era entregue ao médico assistente. Ainda para fins de pesquisa, os ECGs foram classificados utilizando software matriz de mensuração da Universidade de Glasgow (v28.5; Janeiro, 2014) e classificado conforme código de Minnesota com as variáveis derivadas (58,59).

As alterações eletrocardiográficas foram agrupadas em Minor ou Major-ECG, conforme já descritas ^{62,63}:

-Major: possível infarto antigo (onda Q com anormalidade de onda ou Minor Q com anormalidade de onda e alterações concomitante de segmento ST ou onda T); bloqueio intraventricular completo (direito, esquerdo ou inespecífico); frequentes batimentos prematuros supraventriculares ou ventriculares prematuros; anormalidade isolada de segmento ST ou de onda T; fibrilação atrial ou flutter ou taquicardia supraventricular ou outras arritmias maiores; anormalidades de condução atrioventricular ou uso de marcapasso; ou onda QT prolongada (QT index > 115%); hipertrofia ventricular esquerda ou direita.

-Minor: bloqueio átrio-ventricular de 1º ou 2º grau; excitação ventricular prolongada; repolarização ventricular prolongada; alterações menores e isoladas em onda Q e anormalidades em segmento ST ou onda T; hipertrofia ventricular sem anormalidade de segmento ST ou T; dilatação de átrio esquerdo; frequentes batimentos prematuros atriais ou ventriculares; bloqueios fasciculares.

-Normal: sem nenhuma das alterações acima citadas.

Finalmente os códigos dos ECGs e medidas foram revisados por um segundo cardiologista que era cego para resultado de sorologia e informação clínica dos pacientes.

9.3 Ecocardiograma

Somente durante 2ª visita do estudo foi possível realização de ecocardiograma com doppler em campo. Foi utilizado aparelho Sequoia™ 512 ultrasound machine (Acuson,

Mountain View, CA), seguindo guia da Sociedade Americana de Ecocardiografia ^{64,65}. Os estudos foram gravados em formato digital, e todas as medidas foram feitas em “loops digitais” utilizando Digisonics estacao de analise offline (version 3.2 software; Digisonics, Houston, TX) por um cardiologista cego para o diagnostic de DCh. Nesta tese, utilizamos variavel fracão de ejeção (%) de ventriculo esquerdo (FEVE).

9.4 Coleta de material biológico:

Amostras de sangue foram coletadas (30 mL) utilizando-se tubos separadores de soro (TSS), que, após centrifugação e acondicionamento em gelo seco no próprio local, enviados espécimes para laboratório central do estudo em São Paulo (Instituto de Medicina Tropical, LIM-46-Laboratório de Parasitologia – FMUSP).

9.4.1 *Galectina-3*

Biomarcador foi analisado em soro coletado na 1ª visita. VIDAS® Galectin-3, teste automatizado que mensurou quantitativamente a galectina-3 no soro ou plasma humano, utilizando a técnica de ELFA (ensaio fluorescente ligado a enzima). Utilizou-se 200 uL de soro proveniente de amostra basal dos pacientes. Valores de corte foram definidos de acordo com orientações técnicas do fabricante⁶⁶ (≤ 17.8 ng/mL “Baixo risco”; $17.8 - 25.9$ ng/mL “Risco intermediário”; > 25.9 ng/mL “Alto risco”). Nesta tese, optamos por dicotomizar Gal-3 em alto risco (AR-Gal-3), cujos valores seriam >25.9 ng/mL e “não alto risco” (NAR-Gal-3), em que $\text{Gal-3} \leq 25.9$ ng/mL.

9.4.2 *NT-proBNP*

Nas duas visitas foram analisados *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide* (NT-proBNP) mensurados por kits (Roche Diagnostics), valores foram apresentados em valores absolutos, assim como categorizados conforme cut-offs para idade e doença cardíaca. Valores de corte do NT-ProBNP ajustado conforme faixa etária (adjNT-proBNP): <50 anos=NT-ProBNP >450 pg/ml; $50-75$ anos =NT-ProBNP >900 pg/ml; >75 anos=NT-ProBNP ≤ 1800 pg/ml^{67,68}

9.4.3 *Sorologia*

Para confirmação de resultados autoreportados de ChD, analizamos todas as amostras dos pacientes recrutados para pesquisa de anticorpos Anti-T.cruzi através de imunoensaio com micropartículas quimioluminescentes (Architect Chagas, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany). Ainda, todos os resultados negativos foram confirmados com dois estudos sorológicos adicionais através de imunoensaio enzimático (EIA com antígenos diferentes (Chagatest v.4, Wiener and Chagas, Diasorin) ⁶⁹.

10. Definição de desfechos:

10.1 Variável de desfecho:

10.1.2 Primária:

Óbito: mortalidade por todas as causas durante os dois anos iniciais de seguimento. Foram identificados os óbitos a partir de análise de declarações de óbito obtidas da Secretaria de Saúde de Minas Gerais ou de autoridades municipais, onde havia informação sobre local e data do óbito.

Todavia, entre 2010 e 2016, foi estimado uma cobertura nacional de 82.7% quanto à confecção de atestado de óbito. Logo, para aqueles que não compareceram em 2ª visita tampouco constavam em declarações de óbito ou registros oficiais, também acessamos sobrevivência através de contato com familiares ou agentes de saúde comunitários de saúde (ACS), os quais reportaram óbito do paciente e data de óbito para os remanescentes, exceto para oito pacientes

10.1.3 Secundária:

10.1.3.1 Variáveis que definem progressão de doença:

1. *Mudança de categoria NYHA (aumento de classe) entre as visitas*
2. *Piora de padrão de ECG (normal → menor ou maior; menor → maior).*
3. *Mudança de adjNT-proBNP (não alterado → alterado)*

10.1.3.2 Definição de subgrupos (classificação por disfunção):

Para dados disponíveis em 2ª visita, na qual medidas ecocardiográficas estavam disponíveis (FEVE), classificamos pacientes quanto à presença de cardiomiopatia e disfunção definida por FEVE < 50%. Ausência de cardiomiopatia (NC) foi definida por ECG normal e FEVE ≥ 50%; ECG com alterações menores ou maiores e FEVE ≥ 50% definiram cardiomiopatia sem disfunção (CnD); já quaisquer alterações ao ECG e FEVE < 50% definiram cardiomiopatia com disfunção (CD).

11. Análise estatística

Dois desenhos para análise de dados foram feitos nesta tese a partir dos dados secundários de coorte original (acima descrito). Desenho transversal, em que avaliamos associação entre estratos de risco de Gal-3 e variáveis sociodemográficas, clínicas, NT-proBNP, alterações ao ECG obtidas em 1ª e 2ª visita. E desenho de coorte prospectiva utilizando óbito por todas as causas como desfecho.

Estatística descritiva reportando medidas de tendência central e dispersão, assim como tabelas de frequência para variáveis qualitativas foram reportadas. Testes para verificar a normalidade das distribuições de variáveis contínuas foram utilizados, assim como análise gráfica visual de normalidade de preditores (Shapiro-Wilk; Q-Q plot; densidade de Kernel). Para associação de dados contínuos agrupados, Teste-t de Student foi realizado; já para variáveis

categóricas, qui-quadrado de Pearson para avaliação de frequências entre os grupos.

Foram testadas a distribuição, o comportamento das variáveis em teste e suas obediências às premissas para prosseguirmos regressão de Cox e análise de sobrevivência (riscos proporcionais, linearidade e pontos influencias). Testes de interação também foram realizados para verificar modificação de efeito de AR-Gal-3 sob óbito com adição de variáveis com termos de interação.

Modelo linear geral por Poisson foi utilizado para reportar razão de risco para verificar associação de AR-Gal-3 às variáveis elegidas para traduzir progressão de doença.

Para análise de sobrevida, os pacientes foram categorizados conforme valores de Gal-3 (dicotomicamente, ponto de corte = 25.9 ng/mL), sendo reportadas as frequências de eventos, sua incidência e utilizada metodologia de Kaplan-Meier com curvas e teste de Log-rank, para identificar significância estatística.

11.1 Variáveis de confusão:

Na seleção de variáveis para modelo de Cox cujo preditor primário de interesse foi AR-Gal-3, a partir da hierarquização de variáveis ⁷¹, primeiramente tendo em vista plausibilidade biológica.

Confeccionamos DAG (Gráfico Direcionado Acíclico, em livre tradução) em “www.dagitty.net” ⁷² possível para delineamento de relações entre Gal-3 como preditor 1º e desfecho óbito por todas as causas e avaliarmos visualmente para quais variáveis necessitaríamos ajustar para evitar viés de confusão, **Figure 3**. Assim, o “conjunto para ajustamento mínimo suficiente” (MSAS – Minimal sufficient adjustment sets) proposto foi: sexo, idade, doença renal crônica, IAM prévio e diabetes. Em seguida, para avaliarmos numericamente MSAS sugerido, prosseguimos com seleção de outras possíveis variáveis para inclusão em modelo, aqui denominaremos “Lista A” (sexo, idade, DRC, IAM prévio), em que constam variáveis que devem estar no modelo inicial, cuja influência em desfecho deve ser considerada; e “Lista B”, composta por fatores cuja influência em óbito pode ocorrer, mas sujeitas a outros fatores de confusão (diabetes, hipertensão arterial sistêmica, inatividade física, tabagismo e analfabetismo).

Sequencialmente, retiramos variáveis de “Lista B” ajustando aqueles modelos cujas variáveis presentes acarretavam mudança <10% em coeficiente de preditor primário (AR-Gal-3), retirando referida variável e prosseguindo modelo com exclusão sequencial de variáveis com as menores mudanças até resultarmos com modelo cuja sugestão de ajuste foi incluído diabetes, resultando em sugestão de ajuste para: idade, sexo, doença renal crônica, IAM prévio e diabetes. Logo, essas foram as variáveis utilizadas para ajuste.

Foram reportadas razões de risco brutas e ajustadas para variáveis que definiam piora clínica e medidas em ambas as visitas.

Figure 3: Proposta de DAG (Gráfico Direcionado Acíclico, em livre tradução) obtido de "www.dagitty.net"⁷² possível para delineamento de relações entre Gal-3 como preditor 1º e desfecho óbito por todas as causas com demais variáveis.

11.2 Imputação de variáveis sem mensuração

Para análise de dados faltantes, estratégia de imputação foi utilizada somente para tempo de sobrevida, nos quais havia indicação do desfecho óbito, todavia, sem data precisa do evento. Optamos por estratégia conservadora em que imputamos mediana de tempo de sobrevida dos demais pacientes (n=92) aos oito em que o dado estava ausente. Foi realizada análise de sensibilidade para avaliar as inferências sem esses pacientes.

Nesta análise, consideramos os dados faltantes ao acaso (“Missing at random”).

Para os demais dados faltantes, optamos por exclusão do paciente em momento que avaliamos variável ausente.

Gráficos e análise estatística foram desenvolvidos com o auxílio dos seguintes programas de computação: Microsoft Excel 2013,, Stata SE v.16 e RStudio Version 1.3.1093.

Um nível de significância menor que 5% para o erro alfa, bicaudal foi considerado e intervalo de confiança de 95%, reportado.

12. Aspectos éticos:

Este projeto é um sub-estudo do São Paulo - Minas Gerais Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (SaMi-Trop), estabelecido em área endêmica para doença de Chagas no Brasil (57). O protocolo do estudo base oi aprovado pelo CONEP, número 179.685/2012 e CEP FMUSP reg. 3.371.654. Todos os procedimentos do estudo somente foram iniciados após aceitação e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes. Manutenção do sigilo, assim como segurança a informação e acesso foram garantidas durante todo o decorrer do estudo.

13. Resultados

13.1 Primeira visita (inclusão):

13.1.2 Características sociodemográficas, hábitos e clínica dos pacientes

Da coorte original de 2168 pacientes, dos quais 1813 (92.5%) apresentavam Anti-*T.cruzi* reagente, incluímos 1313 (60.8%) após aplicação dos critérios de seleção já citados.

Pacientes apresentavam média de idade 59,8 (± 12.5) anos, maior prevalência de mulheres 884 (67.3%). Tabagismo foi reportado por somente 95 (7.2%), enquanto inatividade física foi frequente 1035 (79.1%). Comorbidades mais comuns foram: hipertensão, 847 (64.5%); dislipidemia 525 (41.2%) e diabetes, 133 (10.1%), **Tabela A**.

Medicamentos em uso mais comumente reportados, condizentes `as comorbidades e DCh, foram: inibidores de enzima conversora de angiotensina (IECA), 378 (28.8%); bloqueadores do receptor de angiotensina (BRAs), 372 (28.3%); beta-bloqueadores, 362 (27.9%). O diurético mais utilizado foi hidroclorotiazida, 346 (26.7%), seguido por furosemida, 272 (21%) e espironolactona, 235 (18.1%).

Tabela A: Características sociodemográficas e clínicas entre grupo de alto risco e não alto risco de Galectina-3

		Grupo de risco Gal-3		
	Disponibilidade do dado / medidas	≤ 25.9 ng/mL	> 25.9 ng/mL	Valor de p
Total - n(%)	1313	1205 (92.8)	108 (8.2)	
Idade, Média (DP)	59.8 (±12.5)	59.0 (±12.4)	68.4 (±11.0)	<0.001
Sexo feminino -n(%)	884/1313 (67.3)	807 (67.0)	77 (71.3)	0.36
Tabagismo -n(%)	1307/1313 (99.5%)			
Atual	95 (7.2%)	91 (7.6%)	4 (3.7%)	0.40
Abandonou	340 (25.9%)	309 (25.6%)	31 (28.7%)	
Nunca	872 (66.4%)	799 (66.3%)	73 (67.6%)	
Inatividade física - n(%)	1035/1308 (79.1%)	945 (78.8%)	90 (83.3%)	0.26
Analfabetismo - n(%)	598/1307 (45.7%)	532 (44.4%)	66 (61.1%)	<0.001
Comorbidades- n(%)				
Hipertensão	847/1313 (64.5%)	759 (63.0%)	88 (81.5%)	<0.001
Dislipidemia	525/1275 (41.2%)	473 (39.3%)	52 (48.1%)	0.069
Diabetes	133/1313 (10.1%)	110 (9.1%)	23 (21.3%)	<0.001
Tireoidopatias	109/1313 (8.3%)	91 (7.6%)	18 (16.7%)	0.001
Doença renal crônica	93/1313 (7.1%)	85 (7.1%)	8 (7.4%)	0.89
Infarto agudo do miocárdio	61/1313 (4.6%)	51 (4.2%)	10 (9.3%)	0.017
Medicação – n(%)				
Inibidores da enzima conversora de angiotensina	378/1296 (28.8%)	340 (28.2%)	38 (35.2%)	0.25
Bloqueadores do receptor de angiotensina	372/1297 (28.3%)	332 (27.6%)	40 (37.0%)	0.082
Bloqueadores dos canais de cálcio	58/1297 (4.4%)	54 (4.5%)	4 (3.7%)	0.77
Furosemida	272/1296 (21.0%)	233 (19.6%)	39 (36.8%)	<0.001
Espironolactona	235/1297 (18.1%)	197 (16.5%)	38 (35.8%)	<0.001
Hidroclorotiazida	346/1294 (26.7%)	312 (26.3%)	34 (32.1%)	0.20
Digoxina	100/1301 (7.6%)	87 (7.2%)	13 (12.0%)	0.10

<i>Beta-bloqueadores</i>	362/1297 (27.9%)	325 (27.3%)	37 (34.9%)	0.094
<i>Amiodarona</i>	323/1277 (24.6%)	289 (24.0%)	34 (31.5%)	0.28
<i>Warfarina</i>	7/1298 (0.5%)	6 (0.5%)	1 (0.9%)	0.65
<i>Acido Acetilsalicílico</i>	371/1298 (28.3%)	335 (27.8%)	36 (33.3%)	0.34

Dados são representados em média e desvio padrão quando contínuos; números absolutos e porcentagens, quando categóricos.

Comparações entre os grupos foram feitas com teste Qui-quadrado de Pearson e teste T de Student, cujos valores de p estão representados.

Maioria dos pacientes foram classificados como NYHA I-II, 757 (57.6%) e apresentavam média (DP) dos níveis de NT-proBNP de 603 (± 1717) pg/mL, enquanto frequência de adjNT-proBNP alterados, 172 (13.1%), **Tabela B.**

Deste subgrupo, havia disponível 1282 (97.7%) exames eletrocardiográficos, já que 31 (2.3%) pacientes não o realizaram. Somente 213 (16.6%) apresentavam ECG sem alterações, enquanto 299 (23.3%), Minor-ECG; e 770 (60.1%), Major-ECG.

Quando reagrupamos ECG e adjNT-proBNP, estratificando dicotomicamente ECG em grupo Major-ECG (conforme a presença de alterações maiores), e agrupando ao adjNT-proBNP, maioria foi classificada em Major-ECG e adjNT-proBNP não alterado, 611 (47.7%); já Não Major-ECG e adjNT-proBNP não alterado foram encontrados em 501 (39.1%). Somente 11(0.9%) pacientes apresentavam Não Major-ECG e adjNT-proBNP alterado.

Tabela B: Características basais conforme grupos de risco Gal-3 para: NYHA, NT-proBNP ajustado para idade e alterações ao ECG (Minor ou Major)

	Disponibilidade do dado / medidas	≤ 25.9 ng/mL	> 25.9 ng/mL	valor-p
Total	1313	1205	108	
Sorologia, Média (DP)	11.9 (±2.3)	11.8 (±2.3)	12.2 (±2.3)	0.13
NYHA na 1a visita	1300 / 1313 (99%)			
I-II	757 (57.6%)	711 (59.6%)	46 (42.6%)	
III-IV	543 (41.4%)	481 (40.3%)	62 (57.4%)	<0.001
NT-proBNP níveis pg/mL, Média (DP)	603.9 (±1717.9)	525.7 (±1484.2)	1476.1 (±3244.3)	<0.001
AdjNT-proBNP alterado 1a visita -n(%)	172/1313 (13.1%)	143 (11.9%)	29 (26.9%)	<0.001
ECG alterações 1a visita	1282/1313 (97.6%)			
Normal	213 (16.6%)	201 (17.1%)	12 (11.1%)	
Minor	299 (23.3%)	282 (24.0%)	17 (15.7%)	0.015
Major	770 (60.1%)	691 (58.9%)	79 (73.1%)	
Alterações Major-ECG por AdjNT-proBNP	1282/1313 (97.6%)			
Não Major-ECG & Normal adjNT-proBNP	501 (39.1%)	474 (40.4%)	27 (25.0%)	
Não Major-ECG & AdjNT-proBNP alterado	11 (0.9%)	9 (0.8%)	2 (1.9%)	<0.001
Major-ECG & Normal adjNT-proBNP	611 (47.7%)	559 (47.6%)	52 (48.1%)	
Major-ECG & AdjNT-proBNP alterado	159 (12.4%)	132 (11.2%)	27 (25.0%)	

Dados são representados em média e desvio padrão quando contínuos; números absolutos e porcentagens, quando categóricos.

Comparações entre os grupos foram feitas com teste Qui-quadrado de Pearson e teste T de Student, cujos valores de p estão representados.

13.1.3 Características sociodemográficas, hábitos e clínica dos pacientes por grupos de risco Gal-3

Pacientes do grupo AR-Gal-3 eram mais idosos que os NAR-Gal-3, 68.4 (±11), 59 (±12.4) anos; p<0.001. Média de Gal-3 foram similares entre mulheres e homens, 17.9 (± 6.12) e 17.2 (± 7.1) ng/mL. Em AR-Gal-3 somente 4 (3.7%) referiam tabagismo atual, enquanto 90 (83.3%), inatividade física.

Quanto às comorbidades, em AR-Gal-3 foram todas mais frequentes, apresentando significância estatística, com exceção de doença renal crônica (p=0.89) e dislipidemia (p=0.07).

Medicamentos foram utilizados em maior proporção entre pacientes do grupo AR-Gal-3, destacando espironolactona e furosemida, utilizadas respectivamente por 38 (35.8%) e 39 (36.8%), apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparada ao uso em NAR-Gal-3; ambas com p<0.001.

13.1.4 Classificação funcional, alterações eletrocardiográficas e NT-proBNP por grupos de risco Gal-3

Títulos sorológicos foram similares entre os grupos de risco Gal-3. No grupo AR-Gal-3, observamos maioria com NYHA I-II, 62(57.4%); $p<0.001$; pouco mais de um quarto dos pacientes desse grupo, 29(26.9%) apresentavam adjNT-proBNP alterado; $p<0.001$. A média deste marcador foi quase 1.000 unidades maior em AR-Gal-3, comparado ao NAR-Gal-3; $p<0.001$.

Alterações ao ECG foram encontradas em aproximadamente nove a cada dez pacientes no grupo AR-Gal-3 e somente 12 (11.1%) possuíam ECG normal. Alterações maiores (Major-ECG) foram vistas em 79 (73.1%) daqueles em AR-Gal-3, já em 691 (58.9%) em NAR-Gal-3; $p=0.015$.

No grupo AR-Gal-3 um quarto dos pacientes apresentavam Major-ECG e adjNT-proBNP, e igual frequência no estrato com ambas as variáveis normais, 27(25%). Essas subclassificações apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de risco Gal-3, $p<0.001$.

13.2 Segunda visita

13.2.1 Progressão de NYHA, NT-proBNP e de alterações ao ECG

Durante visita de seguimento, aproximadamente 24 meses após a primeira (detalhes em seção seguinte), avaliamos mudanças no padrão de adjNT-proBNP, classe funcional (NYHA) e evolução de anormalidades ao ECG, os comparando `as medidas basais. Ainda nesta visita, foi possível realização de ecocardiograma com doppler, o qual analisamos para esta tese exclusivamente valor de FEVE.

Nesta fase, não avaliamos 279 (21.2%) pacientes, 100 (33.9%) por óbito e 179 (64.1%) por não comparecimento, apesar de sabidamente vivos. Portanto, nesta fase avaliamos 1034 (78.7%), dos quais, 968 (93.6%) representando grupo NAR-Gal-3, já 66 (6.4%), o grupo AR-Gal-3, **Tabela C**.

Classe funcional NYHA III-IV representou 397 (39.1%) dos pacientes; em NAR-Gal-3 e AR-Gal-3, 360 (37.8%) e 37 (56.9%), respectivamente; $p=0.003$. Já adjNT-proBNP foi anormal em 152 (15.1%), sendo que 133 (14.1%) entre NAR-Gal-3 e 19 (29.7%) em AR-Gal-3; $p<0.001$. Ao compararmos `as mudanças entre visitas, houve progressão de classe funcional em 424 (42.2%), já 73 (7.3%) piora em adjNT-proBNP, o qual se tornou alterado, porem, não houve diferença com significância estatística entre os grupos de risco Gal-3. Quanto `as alterações ao ECG, houve maior frequência de Major-ECG, 601 (60.6%), em AR-Gal-3, foi observado em 44 (69.8%), enquanto 557 (60%) dos NAR-Gal-3; $p=0.14$. A progressão de alterações ao ECG, sejam surgimento de quaisquer alterações (normal para Minor ou Major-ECG), ou mudança de Minor-ECG para Major-ECG entre as visitas ocorreu em 135 (10.3%), porem também sem diferenças relevantes entre os grupos de risco Gal-3; $p=0.071$. Quando definimos progressão somente para aqueles que, entre as visitas, migraram para Major-ECG, independente do ECG basal (Normal ou Minor), a observamos em 8 (9.1%), e somente em 3 (4.8%) daqueles em AR-Gal-3, também não havendo diferenças relevantes; $p=0.215$.

Fração de ejeção (%) apresentou média (DP) de 58.8 (± 11.4), sendo que 58 (± 11.2) em NAR-Gal-3 e 56.5 (± 14) no AR-Gal-3, $p=0.11$. Quando FEVE dicotomizada com ponto de corte

≥ 50%, evidenciamos 149 (16.4%) com FEVE reduzida, 15 (26.3%) no grupo AR-Gal-3 apresentava FEVE<50%, enquanto 134 (15.7%) em NAR-Gal-3, p=0.036.

Tabela C: Segunda visita - Características de pacientes em 2a visita conforme grupos de risco Gal-3 para: NYHA, NT-proBNP ajustado para idade e alterações ao ECG (Minor ou Major)

	Disponibilidade do dado / medidas	≤ 25.9 ng/mL	> 25.9 ng/mL	valor-p
Total	1034/1313 (78.7%)	968 (93.6%)	66 (6.4%)	
NYHA na 2a visita	1017/1034 (98.3%)			
I-II	620 (60.9%)	592 (62.2%)	28 (43.1%)	0.003
III-IV	397 (39.1%)	360 (37.8%)	37 (56.9%)	
NYHA evolução entre 1a & 2a visitas	1006/1034 (97.3%)			
Não progressão	582 (57.8%)	550 (58.4%)	32 (49.2%)	0.146
progressão	424 (42.2%)	391 (41.5%)	33 (50.8%)	
NT-proBNP níveis, Média (DP) 2a visita	1005/1034 (97.2%)			
	637.8 (±1692.3)	584.9 (±1590.1)	1415.4 (±2694.1)	<0.001
AdjNT-proBNP 2a visita	1005/1034 (97.2%)			
Normal	853 (84.9%)	808 (85.9%)	45 (70.3%)	<0.001
Alterado	152 (15.1%)	133 (14.1%)	19 (29.7%)	
AdjNT-proBNP Evolução entre 1a & 2a visitas	1005/1034 (97.2%)			
Não Piorou	932 (92.7%)	876 (93.1%)	56 (87.5%)	0.95
Piorou	73 (7.3%)	65 (6.9%)	8 (12.5%)	
ECG alterações 2a visita*	992/1034 (95.9%)			
Normal	186 (18.8%)	174 (18.7%)	12 (19.0%)	0.14
Minor	205 (20.7%)	198 (21.3%)	7 (11.1%)	
Major	601 (60.6%)	557 (60.0%)	44 (69.8%)	
Progressão de quaisquer alterações ao ECG	966/1034 (93.4%)			
Não progrediu	831 (63.3%)	772 (85.5%)	59 (93.5%)	0.071
Progrediu	135 (10.3%)	131 (14.5%)	4 (6.3%)	
Alterações Major-ECG - 2a visita	992/1034 (95.9%)			
Não Major-ECG	391 (39.4%)	372 (40%)	19 (30.2%)	0.12

	<i>Major</i>	601 (60.6%)	557 (60.0%)	44 (69.8%)	
Progressão de Normal ou Minor-ECG para Major-ECG		966/1034 (93.4%)			
<i>Não progressão</i>		878 (90.9%)	818 (90.6%)	60 (95.2%)	0.215
<i>Progressão</i>		88 (9.1%)	85 (9.4%)	3 (4.8%)	
Fração de ejeção - 2a visita – Média (DP)		910/1034 (88%)			
		58.8 (±11.4)	58.9 (±11.2)	56.5 (±14.0)	0.11
Fração de ejeção (FEVE)		910/1034 (88%)			
≥ 50%		761 (83.6%)	719 (84.3%)	42 (73.7%)	0.036
< 50%		149 (16.4%)	134 (15.7%)	15 (26.3%)	

Dados são representados em média e desvio padrão quando contínuos; números absolutos e porcentagens, quando categóricos. Comparações entre os grupos foram feitas com teste Qui-quadrado de Pearson e teste T de Student, cujos valores de p estão representados.

Conforme já mencionado, a progressão entre visitas com piora de classificação para: classe funcional, adjNT-proBNP e alterações ao ECG não apresentaram quaisquer associações com significância estatística entre os grupos de risco de Gal-3, mesmo quando ajustadas para sexo, idade, presença em 1ª visita de diabetes, doença renal crônica ou IAM prévio. Expusemos razões de risco para análise univariada e multivariada, **Tabela D**.

Tabela D: Evolução de doença por progressão de NYHA, NT-proBNP ajustado para idade, alterações eletrocardiográficas conforme grupo de risco Gal-3.

Evolução de doença	n(%)	Grupo de risco Gal-3		Razão de risco (IC 95%)*	
		Gal-3 ≤ 25.9	Gal-3 > 25.9	Univariada	Multivariada**
Progressão de NYHA	424/1006 (42.1%)	391/941 (41.5%)	33/65 (50.8%)	1.22 (0.95-1.57)	1.23 (0.94-1.59)
AdjNT-proBNP se tornou alterado	73/1005 (7.3%)	65/941 (6.9%)	8/64 (12.5%)	1.80 (0.90-3.60)	1.42 (0.67-2.99)
Progressão para Major-ECG	88/966 (9.1%)	85/903 (9.4%)	3/63 (4.8%)	0.50 (0.16-1.55)	0.49 (0.16-1.51)
Progressão de Normal ou Minor-ECG para Major-ECG	135/966 (14%)	131 (14.5%)	4/63 (6.3%)	0.43 (0.16-1.13)	0.40 (0.15-1.05)

*Modelo linear geral por Poisson em análise reportando razão de risco para respectivos grupos de referência.

**Modelo ajustado para sexo, idade, doença renal crônica, IAM prévio e diabetes.

13.2.2 Classificação por disfunção:

Reclassificamos os pacientes quanto presença de cardiomiopatia e disfunção conforme definições citadas metodologia. Conforme disponibilidade de ambos resultados ECG e FEVE, ambos obtidos em 2ª visita, analisamos 872 (84.3%), resultando em: 152 (17.4%) ausência de cardiomiopatia (NC); 582 (66.8%) com cardiomiopatia e sem disfunção (CnD); e 138 (15.8%) apresentando cardiomiopatia com disfunção (CD), **Tabela E**.

Títulos sorológicos obtidos em primeira visita apresentaram diferença e tendência de aumento conforme evolução de gravidade desses grupos; $p < 0.001$. Pacientes de NC eram mais jovens quando comparados aos outros dois grupos; $p = 0.007$. Mulheres predominaram nos grupos sem cardiomiopatia ou disfunção, NC e CnD, 119 (78.3%) e 407 (69.9%), respectivamente. Já em CD, proporção foi invertida, predominando sexo masculino 77 (55.8%); $p < 0.001$. Níveis absolutos de Gal-3 (ng/mL) medidos em 1ª visita apresentaram níveis crescentes conforme progressão da classificação: NC 16 (± 5); CnD 17.2 (± 5.5), e CD 18.4 (± 7.7); $p = 0.003$. Valores absolutos de NT-proBNP (pg/mL) foram: NC 114.1 (± 113.5); CnD 327.5 (± 639.8); e para CD 2402.3 (± 3640.9); $p < 0.001$. Quando avaliado adjNT-proBNP entre os subgrupos, não foram encontrados valores alterados em NC, e somente 46 (8.1%) em CnD, porem, em CD, 78 (57.4%) apresentavam elevação; $p < 0.001$.

Finalmente, FEVE (%), a qual foi utilizada para esta reclassificação, apresentou nesta sub-amostra média ($\pm DP$) 58.8 (± 11.4). Valores similares foram observados em NC e CnD: 64.1 (± 3.6) e 62.9 (± 5.1), respectivamente. Já no grupo CD, 37.1 (± 9.9).

Tabela E: Reclassificação em subgrupos realizada em 2ª visita, conforme presença de cardiomiopatia e disfunção – dados demográficos, Galecina-3, NT-proBNP.

Classificação por presença de cardiomiopatia ou disfunção					
	Disponibilidade e dados / medidas	Não cardiomiopatia	Cardiomiopatia sem disfunção	Cardiomiopatia com disfunção	Valor de p
Sub-grupos	872/1034 (84.3%)	152 (17.4)	582 (66.8)	138 (15.8)	
Títulos de sorologia, Média (DP)*	11.8 (± 2.3)	11.4 (± 2.7)	11.8 (± 2.3)	12.4 (± 1.8)	0.001
Idade, Média (DP)	58.9 (± 12)	56.2 (± 12.6)	59.5 (± 11.9)	59.6 (± 11.4)	0.007
Sexo feminino -n(%)	587 (67.3%)	119 (78.3%)	407 (69.9%)	61 (44.2%)	<0.001
Galectin-3 níveis ng/mL, Média (DP)	17.7 (± 6.5)	16.0 (± 5.0)	17.2 (± 5.5)	18.4 (± 7.7)	0.003
Grupo de risco Gal-3	872				
≤ 25.9 ng/mL	818 (93.8%)	143 (94.1%)	550 (94.5%)	125 (90.6%)	0.23
> 25.9 ng/mL	54 (6.2%)	9 (5.9%)	32 (5.5%)	13 (9.4%)	
NT-proBNP níveis, Média (DP)	399.9 (± 1044.4)	114.1 (± 113.5)	327.5 (± 639.8)	2402.3 (± 3640.9)	<0.001
AdjNT-proBNP 2a visita	849/872 (97.4%)				

<i>Normal</i>	725 (85.4%)	147 (100.0%)	520 (91.9%)	58 (42.6%)	<0.001
<i>Alterado</i>	124(14.6%)	0 (0.0%)	41 (8.1%)	75 (57.4%)	
Fração de ejeção – 2ª visita por Ecocardiograma, Média (DP)**	58.8 (±11.4)	64.1 (±3.6)	62.9 (±5.1)	37.1 (±9.9)	<0.001
ECG alterações 2a visita					
<i>Normal</i>	157 (18%)	152 (100%)	157 (18%)	152 (100%)	
<i>Minor</i>	582 (66.7%)	0	582 (66.7%)	0	
<i>Major</i>	138 (15.8%)	0	138 (15.8%)	0	

Dados são representados em média e desvio padrão quando contínuos; números absolutos e porcentagens, quando categóricos.

Comparações entre os grupos foram feitas com teste Qui-quadrado de Pearson e teste T de Student, cujos valores de p estão representados.

13.3 Descrição de evento óbito

13.3.1 Características sociodemográficas e clínicas basais conforme sobrevivência

Ocorreram 100 (7.6%) óbitos entre as visitas, dos quais, 81 (6.7%) pertenciam ao NAR-Gal-3, e 19/108 (17.6%) ao AR-Gal-3. Quando comparados aos sobreviventes, foram em geral, mais idosos, apresentaram idade média mais avançada, 65.5 (±13.6) e 59.3 (±12.3) anos; $p<0.001$. Eram maioria mulheres, 57 (57%), enquanto 827 (68.2%) entre os sobreviventes; $p=0.022$. Analfabetismo foi mais frequente entre os óbitos, 56 (57.1%) que entre os sobreviventes, 542 (44.8%); $p=0.019$. Inatividade física foi reportada por 87 (87%) entre os que evoluíram para óbito, já entre os que sobreviveram, por 948(78.5%); $p=0.044$. Tabagismo atual, apresentou frequências reportadas similares entre ambos os grupos, **Tabela F e Figura 4**.

Comorbidades entre os grupos apresentaram frequências comparáveis, com exceção de infarto agudo do miocárdio prévio (IAM), 14 (14%) entre os óbitos e 47 (3.9%) entre sobreviventes; $p<0.001$. Hipertensão foi a doença associada mais comum naqueles que faleceram, 73 (73%); seguida por dislipidemia, 32(32%) e IAM, enquanto somente 7 (7%) referiam diabetes.

Medicamentos utilizados, foram condizentes às comorbidades reportadas em 1ª visita. O uso de betabloqueadores, amiodarona e furosemida foram comuns entre os óbitos, e reportados por: 50(50%), 49(49%) e 49(49%), respectivamente. Ainda entre os óbitos, anti-hipertensivos que atuam no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), BRAs e IECAs, assim como espironolactona, foram reportados por 45(45%) e 28(28%), respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa entre fármacos reportados, sendo mais frequente o uso entre os óbitos: BRAs, betabloqueadores, amiodarona, furosemida e espironolactona, todos apresentando $p<0.001$. Além desses, também houve diferença relevante em frequência de uso para digoxina, $p=0.010$; e ácido acetilsalicílico; $p=0.009$ entre os óbitos.

Figura 4: Proporção de eventos (óbito) conforme grupos de risco Galectina-3 e NT-proBNP ajustado para idade alterado.

Tabela F: Características sociodemográficas, clínicas, ECG basal por desfecho óbito.

	Sobrevivência – n(%)			
	Disponibilidade e dados / medidas	Vivos	Óbitos	Valor de p
Idade, Média ($\pm$DP)	1313	1213 (92.4)	100 (7.6)	
	59.8 ($\pm$ 12.5)	59.3 ($\pm$ 12.3)	65.5 ($\pm$ 13.6)	<0.001
Sexo -n(%)	1313			
	Feminino 884 (67.3%)	827 (68.2)	57 (57)	0.022
Analfabetismo	1307/1313 (99.5%)			
	598 (45.8%)	542 (44.8%)	56 (57.1%)	0.019
Tabagismo	1307/1313 (99.5%)			0.203
	Atual 95/1307 (7.2%)	88 (7.3%)	7 (7.0%)	
	Abandonou 340/1307 (25.9%)	306 (25.2%)	34 (34.0%)	
	Nunca 872 (66.4%)	814 (67.1%)	58 (58.0%)	
Inatividade física	1308/1313 (99.5%)			
	1035/1308 (79.1%)	948 (78.5%)	87 (87.0%)	0.044
Comorbidades				
	Hipertensão 847/1313 (64.5%)	774 (63.8%)	73 (73.0%)	0.065
	Diabetes 133/1313 (10.1%)	126 (10.4%)	7 (7.0%)	0.28
	Dislipidemia 525/1275 (41.2%)	493 (40.7%)	32 (32.0%)	0.089
	IAM prévio 61/1313 (4.6%)	47 (3.9%)	14 (14.0%)	<0.001
	Tireoidopatia 109/1313 (8.3%)	101 (8.3%)	8 (8.0%)	0.91
	Doença renal crônica 93/1313 (7.1%)	84 (6.9%)	9 (9.0%)	0.44
Medicamentos				
	IECA* 1296/1313 (98.7%)			0.47
	378 (28.8%)	350 (28.9%)	28 (28.0%)	
Bloqueador dos receptores de angiotensina	1297/1313 (98.7%)			<0.001
	925 (70.4%)	327 (27.0%)	45 (45.0%)	
Bloqueadores dos canais de cálcio	1297/1313 (98.7%)			0.49
	58 (4.4%)	53 (4.4%)	5 (5.0%)	
Furosemda	1296/1313 (98.7%)			<0.001
	272 (21%)	223 (18.6%)	49 (49.0%)	
Espironolactona	1297/1313 (98.7%)			<0.001
	235 (18.1%)	201 (16.8%)	34 (34.0%)	

Hidroclorotiazida	1294/1313 (98.6%)			0.069
	346 (26.7%)	327 (27.4%)	19 (19.0%)	
Digoxina	1301/1313 (99.1%)			0.010
	100 (7.6%)	85 (7.0%)	15 (15.0%)	
Beta-bloqueador	1297/1313 (98.7%)			<0.001
	362 (27.9%)	312 (26.1%)	50 (50.0%)	
Amiodarona	1277/1313 (97.2%)			<0.001
	323 (24.6%)	274 (22.6%)	49 (49.0%)	
Warfarina	1298/1313 (98.7%)			0.43
	7 (0.5%)	6 (0.5%)	1 (1.0%)	
Acido acetilsalicílico	1298/1313 (98.7%)			0.009
	371 (28.3%)	330 (27.2%)	41 (41.0%)	

* Inibidor da enzima conversora de angiotensina

Porcentagens consideraram “não sabiam” para cada variável.

Dados são representados em média e desvio padrão quando contínuos; números absolutos e porcentagens, quando categóricos.

Comparações entre os grupos foram feitas com teste Qui-quadrado de Pearson e teste T de Student, cujos valores de p estão representados.

13.3.2 Alterações ao ECG e biomarcadores basais e sobrevivência

Sobreviventes apresentaram em 1ª visita NYHA I-II em maior frequência, 721 (60%), que entre os óbitos, 36 (36.4%); $p < 0.001$; também possuíam menores médias de Gal-3 (ng/mL), 17.5 (± 6.2) e 19.9 (± 8.7); $p < 0.001$. Títulos sorológicos Anti-*T.cruzi*, foram mais elevados entre os óbitos, que entre os sobreviventes: 12.6(± 1.7) e 11.8(± 2.3), $p < 0.001$; assim como NT-proBNP (pg/mL): 2830 (± 4641.5) e 420 (± 994.5); $p < 0.001$. Pouco mais da metade dos pacientes que faleceram apresentavam adjNT-proBNP alterado 52 (52%); $p < 0.001$; enquanto Gal-3 > 25.9 ng/mL, foi encontrada em 19 (19%); $p < 0.001$.

Eletrocardiograma foi normal em somente 1(1%) dos óbitos, já entre os sobreviventes, 212 (17.9%); $p < 0.001$. Major-ECG foi observado com elevada frequência entre os óbitos, 83 (86.5%) e 687(57.9%) entre aqueles que sobreviveram; $p < 0.001$.

Quando agrupamos dicotomicamente por presença de Major-ECG e adjNT-proBNP anormal, observamos que 49 (51%) dos óbitos apresentavam ambos alterados, pouco maior que cinco vezes a frequência observada entre os sobreviventes, 110(9.3%); $p < 0.001$. Já em outra recategorização também binária para Gal-3>25ng/mL e Major-ECG, encontramos, ambos presentes, 17(17%), naqueles que faleceram, já entre os que sobreviveram, 62 (5.2%); $p < 0.001$. A combinação de classe funcional I-II ou III-IV `a Gal-3>25ng/mL resultou entre os óbitos, 14 (14%) com estrato mais elevado de ambos (III-IV); $p < 0.001$. **Tabela G.**

Tabela G: Classe funcional, Gal-3, NT-proBNP, alterações ao ECG e associações ao desfecho óbito.

	Sobrevivência			
	Disponibilidade do dado/ medidas	Vivos	Óbitos	valor-p
<i>N</i>				
Classe funcional (NYHA)	1300/1313 (99%)	1213 (91.8%)	100 (8.2%)	
I-II	757 (58.2%)	721 (60%)	36 (36.4%)	<0.001
III-IV	543 (41.8%)	480 (40%)	63 (63.6%)	
Galectina-3 níveis ng/mL, Média (DP)	17.6 (±6.4)	17.5 (±6.2)	19.9 (±8.7)	<0.001
Gal-3 > 25.9 ng/mL	1313			
≤ 25.9 ng/mL	1205 (91.8%)	1124 (92.7%)	81 (81.0%)	<0.001
> 25.9 ng/mL	108 (8.2%)	89 (7.3%)	19 (19.0%)	
NT-proBNP níveis pg/mL, Média (DP)	1313	420.4 (±994.5)	2830.1 (±4641.5)	<0.001
AdjNT-proBNP	1313			
Normal	1141 (86.9%)	1093 (90.1)	48 (48)	<0.001
Alterada	172 (13.1%)	120 (9.9)	52 (52)	
Títulos sorológicos, Média (DP)	1313			
	11.9 (±2.3)	11.8 (±2.3)	12.6 (±1.7)	<0.001
ECG alterações 1ª visita	1282			
Normal	213 (16.6%)	212 (17.9%)	1 (1.0%)	<0.001
Minor	299 (23.3%)	287 (24.2%)	12 (12.5%)	
Major	770 (60.1%)	687 (57.9%)	83 (86.5%)	
Alterações Major-ECG e adjNT-proBNP	1282/1313 (97.2%)			
Não Major-ECG & Normal NT-proBNP	501 (39.1%)	489 (41.2%)	12 (12.5%)	<0.001
Não Major-ECG & AdjNT-proBNP alterado	11 (0.9%)	10 (0.8%)	1 (1.0%)	
Major-ECG & Normal NT-proBNP	611 (47.7%)	577 (48.7%)	34 (35.4%)	
Major-ECG & AdjNT-proBNP alterado	159 (12.4%)	110 (9.3%)	49 (51.0%)	
Alterações Major-ECG por Alto risco Grupo de risco Gal-3	1282/1313 (97.6%)			
Não Major-ECG & Não-Alto risco Gal-3	483 (37.7%)	472 (39.8%)	11 (11.46%)	<0.001
Não Major-ECG & Alto risco Gal-3	29 (2.3%)	27 (2.3%)	2 (2.1%)	
Major & Não-Alto risco Gal-3	691 (53.9%)	625 (52.7%)	66 (68.7%)	
Major & Alto risco Gal-3	79 (6.2%)	62 (5.2%)	17 (17.7%)	
Alto risco Galectin-3 & Classe funcional	1300 /1313(99%)			
Não alto risco Gal3 x Classe funcional I-II	711 (54.1%)	680 (56%)	31 (31%)	<0.001
Alto risco Gal3 x Classe funcional I-II	46 (3.5%)	41 (3.4%)	5 (5%)	

Não-Alto risco Gal3 x Classe funcional III-IV	481 (36.6%)	432 (35.6%)	49 (49%)	<0.001
Alto risco Gal3 x Classe funcional III-IV	62 (4.72%)	48 (4%)	14 (14%)	

* adjNT-proBNP – NT-proBNP ajustado para idade

Dados são representados em média e desvio padrão quando contínuos; números absolutos e porcentagens, quando categóricos. Comparações entre os grupos foram feitas com teste Qui-quadrado de Pearson e teste T de Student, cujos valores de p estão representados.

13.4 Análise de sobrevivência:

13.4.1 Tempo para evento

Mediana do tempo de seguimento foi de 2.5 anos e IQR [2.3-2.8], ou 30.7 meses, IQR [28.2-34.5]; já intervalos min-máx. foram (0.08-3.2) anos, ou (0.9-39.2) meses. O tempo total sob risco avaliado foram de 3264.8 pessoas-ano. Pela suposição de taxas constantes, encontramos uma taxa média de incidência de 30.6 [95% IC: 25.2-37.3] óbitos por 1000 pessoas-ano para toda a coorte. Enquanto 26.9 [95% IC 21.6-33.4] óbitos por 1000 pessoas-ano em NAR-Gal-3 e 75.1 [95 IC%: 47.9-117.8] óbitos por 1000 pessoas-ano no AR-Gal-3.

A razão de taxa de mortalidade foi de 2.79 [95%IC: 1.60-4.64], enquanto a diferença entre as taxas de mortalidade foi 48.2 [95% CI: 13.9-82.5] óbitos por 1000 pessoas-ano comparando os estratos de risco AR-Gal-3 com NAR-Gal-3. Quando ajustamos por idade, 1.85 [95%IC: 1.60-4.64].

Como ilustração, durante a coorte, para que se alcançasse 5% de óbitos em cada grupo, foram necessários 0.7 ano [95% IC: 0.07-0.82] ou 8.5 meses [95% IC: 0.9-9.9] no grupo AR-Gal-3, enquanto mais que o dobro de tempo para os do grupo NAR-Gal-3: 1.5 ano [95% IC: 1.24-1.96] ou 18.2 meses [95% IC: 14.9-23.6]. Já para que fosse atingindo 15% de óbitos no grupo AR-Gal-3, passaram-se 1.9 anos [95% IC: 0.78 -] ou 22.5 meses [95% IC: 9.40 -]. A proporção de óbitos no grupo NAR-Gal-3 não atingiu 15%.

Pacientes pertencentes ao AR-Gal-3 quando comparados ao NAR-Gal-3 apresentaram HR 2.8 [95%IC: 1.7-4.6]; $p < 0.001$, e para o modelo não ajustado que, quando controlado risco de Gal-3 (referência grupo NAR-Gal-3) para idade, sexo, doença renal crônica, diabetes e IAM prévio, variáveis em que consideramos de confusão para o evento, obtivemos HR 2.07 [IC95%: 1.21-3.52]; $p = 0.007$. Para adjNT-proBNP (referência “normal”), encontramos em modelo sem ajuste, HR 8.66 [IC95%: 5.85-12.83]; $p < 0.001$, já em modelo ajustado, HR 7.55 [IC95%: 4.98-11.45]; $p < 0.001$, **Tabela H**.

Ao avaliarmos associação de alterações ao ECG categorizadas e evento, quando adotamos ECG normal como referência, observamos HR 19.17 [IC95%: 2.66-138.10]; $p = 0.003$. Já quando dicotomizamos Major-ECG, HR 3.69 [IC95%: 2.04-6.67]; $p < 0.001$, cuja base foi ECG não Major-ECG.

Ao agruparmos presença de Major-ECG e grupos de risco Gal-3, cujo grupo referência possuía ambas as variáveis sem alterações, observamos: adjNT-proBNP alterado e Major-ECG,

em modelo ajustado, HR 13.09[IC95%: 6.77-24.97]; $p<0.001$. Já para AR-Gal-3 e Major-ECG, resultou em HR 6.85 [IC95%: 3.10-15.10]; $p<0.001$.

Finalmente, agrupamos AR-Gal-3 e adjNT-proBNP. Classificação em que ambos estão alterados resultou, HR 13.09 [IC95%: 6.71-25.53]; $p<0.001$. Em modelo ajustado, HR 7.93 [IC95%: 3.88-16.21]; $p<0.001$. Já, quando agrupamos adjNT-proBNP alterado e NAR-Gal-3, em modelo ajustado, obtivemos HR 8.42 [IC95%: 5.34-13.26]; $p<0.001$. Avaliamos presença de interação seja estatística ou para modificação de efeito, entre AR-Gal-3 e adjNT-proBNP alterado, que todavia não foi encontrada evidência para tal; $p=0.12$. **Figuras 5-10.**

Tabela H: Riscos proporcionais de Cox brutos e com ajuste para Galectina-3, NT-proBNP ajustado para idade, e alterações ao ECG.

Riscos proporcionais				
<i>Preditor primário</i>	Não ajustado		Modelo ajustado*	
	valor-p	HR (IC95%)	valor-p	HR (IC95%)
<i>Gal-3 > 25.9 ng/mL</i>				
<i>≤ 25.9 ng/mL</i>	referência			
<i>> 25.9 ng/mL</i>	<0.001	2.80 (1.70-4.63)	0.007	2.07 (1.21-3.52)
<i>AdjNT-proBNP**</i>				
<i>Normal</i>	referência			
<i>Alterada</i>	<0.001	8.66 (5.85-12.83)	<0.001	7.55 (4.98-11.45)
<i>ECG alterações 1a visita</i>				
<i>Normal</i>	referência			
<i>Minor</i>	0.041	8.67 (1.12-66.67)	0.046	7.94(1.03-61.16)
<i>Major</i>	0.002	24.19 (3.36-173.80)	0.003	19.17(2.66-138.10)
<i>Alterações Major-ECG 1a visita[†]</i>				
<i>Não-Major</i>	referência			
<i>Major</i>	<0.001	4.43 (2.47-7.96)	<0.001	3.69 (2.04-6.67)
<i>Alterações Major-ECG adjNT-proBNP^{††}</i>				
<i>Não Major-ECG & Normal NT-proBNP</i>	referência			
<i>Não Major-ECG & AdjNT-proBNP alterado</i>	0.180	4.03 (0.52-31.02)	0.208	3.73 (0.48-29.16)
<i>Major-ECG & Normal NT-proBNP</i>	0.011	2.34 (1.21-4.53)	0.026	2.11(1.09-4.09)
<i>Major-ECG & AdjNT-proBNP alterado</i>	<0.001	15.63 (8.31-29.40)	<0.001	13.09(6.77-24.97)

Alterações Major-ECG por Alto risco				
Grupo de risco Gal-3[†]				
Não Major-ECG & Não-Alto risco Gal-3	referência	-		
Não Major-ECG & Alto risco Gal-3	0.142	3.09 (0.68-13.95)	0.238	2.49 (0.54-11.43)
Major & Não-Alto risco Gal-3	<0.001	4.35 (2.29-8.24)	<0.001	3.74 (1.97-7.12)
Major & Alto risco Gal-3	<0.001	10.66 (4.99-22.77)	<0.001	6.85 (3.10-15.10)
Gal-3 Alto risco e adjNTproBNP^π	1313			
Não alto risco Gal3 x Normal NT-proBNP	referência	-	-	-.
Alto risco Gal3 x Normal NT-proBNP	0.008	2.78 (1.30-5.95)	0.041	2.24 (1.03-4.89)
Normal risco Gal3 x AdjNT-proBNP alterado	<0.001	9.07 (5.86-14.03)	<0.001	8.42 (5.34-13.26)
Alto risco Gal3 x AdjNT-proBNP alterado	<0.001	13.09 (6.71-25.53)	<0.001	7.93 (3.88-16.21)
<p>*Modelo ajustado para Sexo, Idade, Doença renal crônica, Infarto prévio do miocárdio e diabetes.</p> <p>** adjNT-proBNP – NT-proBNP ajustado para idade</p> <p>[†]Dados disponíveis 1282/1313 (97.6%); ^{††} 1300/1313 (99%)</p> <p>^π Teste para homogeneidade “Mantel–Haenszel” entre AR-Gal-3 e adjNT-proBNP alterados resultou em, p=0.218</p>				

Figuras 5 – 10: Kaplan-Meier / Nelson-Aalen demonstrando tempo-evento (óbito) conforme variáveis em modelo.

Eventos cumulativos (óbito) Alterações (Major-ECG)

Eventos cumulativos (óbito)

Major-ECG x NT-proBNP ajustado idade (adjNT-proBNP)

Number at risk

Não Major-ECG & adjNT-proBNP Normal	501	500	498	494	489	248	46	0
Não Major-ECG & adjNT-proBNP Alterado	11	11	10	10	10	5	1	0
Major-ECG & adjNT-proBNP Normal	611	607	602	589	580	370	91	0
Major-ECG & adjNT-proBNP Alterado	159	147	132	117	112	66	14	0

- Não Major-ECG & adjNT-proBNP Normal
- Não Major-ECG & adjNT-proBNP Alterado
- Major-ECG & adjNT-proBNP Normal
- Major-ECG & adjNT-proBNP Alterado

Eventos cumulativos (óbito)

Number at risk

Não Major-ECG & Não alto risco Gal-3	483	482	480	476	472	239	43	0	0
Não Major-ECG & Alto risco Gal-3	29	29	28	28	27	14	4	0	0
Major-ECG & Não alto risco Gal-3	691	680	665	641	629	393	98	0	0
Major-ECG & Alto risco Gal-3	79	74	69	65	63	43	7	0	0

— Não Major-ECG & Não alto risco Gal-3

— Não Major-ECG & Alto risco Gal-3

— Major-ECG & Não alto risco Gal-3

— Major-ECG & Alto risco Gal-3

Number at risk

Não alto risco Gal-3 & Normal NT-proBNP	1062	1058	1054	1038	1026	588	130	0
Alto risco Gal-3 & Normal NT-proBNP	79	78	75	73	71	47	11	0
Não alto risco Gal-3 & Alterado NT-proBNP	143	134	120	107	103	61	15	0
Alto risco Gal-3 & Alterado NT-proBNP	29	25	22	20	19	10	0	0

14. Discussão

Nesta coorte de pacientes acometidos por doença de Chagas originados de área endêmica e com seguimento por dois anos, avaliamos prospectivamente dados sociodemográficos, clínicos, medidas basais de ECG, NT-proBNP e os seguimos para avaliação de desfecho óbito por todas as causas e progressão de classe funcional, alterações em ECG e adjNT-proBNP. Inferimos que pacientes pertencentes ao grupo AR-Gal-3 representaram um cenário em que aproximadamente um em cada cinco faleceram (19%), enquanto aqueles no grupo NAR-Gal-3, pouco mais de um a cada 15 pacientes (6.7%). Gal-3 quando > 25 ng/mL representou um fator de risco independente para morte por todas as causas, onde observamos cerca de 2.1 maior chance de que naqueles de NAR-Gal-3, controlando para sexo, idade, DRC, DM e IAM prévio; também em modelo ajustado o subgrupo Major-ECG e AR-Gal-3 apresentou 6.85 maior risco de óbito que grupo não Major-ECG e NAR-Gal-3.

Galectina-3 pareceu ser um biomarcador adicional promissor para um melhor delineamento da evolução de cardiomiopatia chagásica, essencialmente sua evolução para óbito por todas as causas. Aspecto que segue a tendência dos estudos recentes para preenchimento de uma entre tantas lacunas referentes à identificação precoce de pacientes que possam progredir para desfechos clínicos relevantes como morte e cardiomiopatia, ou ainda aqueles que, apesar de assintomáticos, apresentam-se em espectro de doença cardíaca iminente^{35-38,47}. A soroconversão ainda é perseguida como marcador para cura ou resposta aos antiparasitários, porém utilizá-la como parâmetro de desfecho inviabiliza quaisquer estudos clínicos para testagem de novos componentes ou ainda otimização de manejo dos pacientes. Esse desfecho pode ocorrer anos ou décadas após tratamento e ainda há variabilidade quanto possível região de infecção e faixa etária do tratamento⁷³. Portanto, a urgência e necessidade na busca de marcadores substitutos ao padrão ouro, a “imprevisível” soroconversão, confiáveis e reprodutíveis permitindo o avanço de estudos clínicos e otimização de abordagem diagnóstica, terapêutica ou mesmo aconselhamento aos pacientes⁷⁴.

A contribuição aditiva de Gal-3 às informações de anormalidades em ECG, valores de NT-proBNP e classe funcional enfatizam o potencial do marcador em definir aqueles pacientes que irão evoluir em direção ao espectro cardiomiopático da DCh. Apesar de termos encontrado diferença entre estratos de Gal-3 e NT-proBNP em ambas visitas, essa associação não foi a mesma quando avaliados marcadores contínuos (Gal-3 e BNP) e ajustados para sexo e idade, apresentando também fraca correlação em outros estudos^{43,44,75}. Já quanto FEVE, apesar de termos encontrado associação entre grupos de risco Gal-3 e FEVE dicotomizada com ponto de corte 50%, o mesmo não foi observado em estudo de Ho et al.⁷⁵, onde níveis contínuos de Gal-3 foram avaliados em grupos com IC cuja FEVE era reduzida.

Apesar de valores mais elevados para HR de adjNT-proBNP alterado quando comparado aos valores normais em modelos brutos e ajustados, terem sido mais expressivos que os encontrados em grupo AR-Gal-3, aquele, apesar de traduzir fidedignamente pressão de enchimento capilar em câmaras cardíacas, essencialmente ventrículos, não parece ser interessante como um

marcador precoce para os desfechos, pois pode apresentar súbita variação em seus níveis e por vezes inconsistência entre medidas seriadas^{38,47,48,76,77}. No contexto da DCh crônica, traduz uma câmara cardíaca já sob estresse físico, onde o remodelamento já deve estar ocorrendo e, frequentemente já acompanhado por sintomas, logo, quando a janela de intervenção já pode ter sido ultrapassada. Ao contrario, Gal-3 parece ter mínima e desprezível resposta à sobrecarga de volume de câmaras cardíacas e é relativamente estável no tempo, salientando, porem, que sua mudança em medidas seriadas trouxe informação adicional ao analisar piora de desfechos em pacientes IC, apesar de ainda controverso como essa pratica pode ser translacionada em melhora de manejo clinico^{79 80}.

Quando avaliado óbito por todas as causas e comparado HR para AR-Gal-3 cuja referencia era NAR-Gal-3 e ajustado modelo para sexo, idade, DRC, DM, IAM prévio, encontramos valor elevado, assim como descritos em estudo de coorte de Framingham⁷⁵, com idade e frequências de sexo feminino similares, porem não observamos em nosso estudo nenhuma associação com aumento de risco para progressão de alterações eletrocardiográficas ou mudança de adjNT-proBNP, tampouco evolução de classe funcional.

Observamos perda de valor prognostico para óbito na associação de AR-Gal-3 após adição de adjNT-proBNP alterado ao modelo ajustado (idade, sexo, DRC, DM e IAM prévio). Redução de associação também foi observada quando agrupamos AR-Gal-3 e adjNT-proBNP em modelo ajustado para variáveis já citadas, quando houve redução de HR em aproximadamente 6% quando comparado ao modelo com NAR-Gal-3 e adjNT-proBNP alterado, **tabela H**. Foi testada interação para efeito modificador de AR-Gal-3 sob adjNT-proBNP anormal, que todavia não foi corroborada estatisticamente. Logo, adjNTproBNP já apresenta um aumento considerável em risco de morte por todas as causas e a adição de níveis elevados de Gal-3, não pareceu otimizá-lo. Fato que segue em acordo com o observado em outros estudos. Já foi aventado que Gal-3 possa estar mais atrelada ao processo fisiopatológico de fibrogênese que prognóstico, atuando como mediador desse processo, ainda no inicio da via que vai do insulto inflamatório no miocárdio à fibrose, logo, tendo sido sugerido ainda a via metabólica de Gal-3 como alvo terapêutico potencial atuando principalmente em seu bloqueio^{82,83,82}.

Em suas características de base, a coorte foi composta por pacientes com idade avançada, aproximando-se em média aos 60 anos. O grupo AR-Gal-3 eram mais idosos, com quase dez anos de diferença entre a média de NAR-Gal-3. Forte correlação com idade foi reportada por De Boer et al.,⁸⁴, independente da presença de IC basal. Esta associação segue outros biomarcadores como NT-proBNP, que inclusive já apresenta ajuste já bem embasado para idade^{68 85}. Mulheres apresentaram valores maiores de Gal-3, em consonância com outros achados⁸¹. Em mulheres, postula-se ainda um potencial efeito estrogênico protetor ao remodelamento cardíaco, como uma das principais hipóteses que alicerçam a diferença em gravidade de doença cardíaca durante a premenopausa⁸⁶, aqui, porem, praticamente efeito “e “diluído”, pela idade já avançada das mulheres que participaram do estudo, tendendo à convergência dos riscos.

Ainda pacientes do grupo AR-Gal-3 apresentaram maior prevalência de comorbidades comuns e associadas ao aumento de risco cardiovascular, como hipertensão, dislipidemia, diabetes

e IAM prévio. Prevalências de HAS e diabetes foram similares às observadas em Coorte de Bambuí, composta por pacientes com DCh⁸⁷⁸⁸ e também condizentes a achados observados em coorte de Framingham em que Gal-3 foi avaliada como preditora para incidência de IC⁷⁵.

Não encontramos associação, entre estratos de Gal-3 e doença renal crônica, como relatado em outras coortes para estudo de insuficiência cardíaca iminente em população não Chagas⁷⁵. Talvez pelo pequeno número de casos com a característica.

O padrão do uso dos medicamentos reportados em primeira visita e suas significâncias estatísticas traduzem a associação com as respectivas comorbidades e sua relação a Gal-3, ainda pode estar associada ao acúmulo de patologias em pacientes aparentemente com maior carga de doença no grupo AR-Gal-3, uma vez que drogas associadas aos estágios tardios na evolução da cardiomiopatia da DCh como furosemida e espironolactona, foram mais prevalentes nesse grupo, aproximadamente o dobro do uso reportado no grupo de menor risco. Já utilização das demais medicações, principalmente aquelas em que há evidência já consolidada na atuação de SRAA⁸⁹⁹⁰, como IECAs, BRAs e betabloqueadores, apesar de mais prevalentes em grupo AR-Gal-3, não apresentou diferença com significância estatística. Não possuíamos informações quanto sequência de introdução dos fármacos, tópico ainda com divergências e que talvez pudesse trazer mais informações⁹⁰⁹¹. Além disso, algum sinal de que a prescrição de fármacos modificadores de doença tem sido feita em frequência menor que a necessária para o tipo de população, hesitação já evidenciada já desde início de anos 90, mesmo em ensaios clínicos em ambiente controlado, quando notaram <50% uso de IECA naqueles diagnosticados com IC⁹².

Ao excluirmos os pacientes que haviam reportado uso de Bz desta coorte, selecionamos subgrupo de pacientes que, a parte do uso de drogas que agem no eixo SRAA, dentre outras que possam atuar no remodelamento cardíaco, não foi exposto à terapia conhecida Anti-*T.cruzi*, aqui considerado o agente estressor ao miocárdio em um padrão contínuo e sustentado, desencadeando todo o processo de remodelamento cardíaco, à luz das possíveis teorias explanatórias que tangem o paciente ao espectro que o leva à forma cardíaca⁹³. Já foi reportado o papel de redução em velocidade de progressão de alterações ao ECG, apesar de curto tempo de seguimento, que por sua vez, traz algum sinal quanto ao papel do nitroimidazólico, que, quando acionado em tempo e janela terapêutica hábil e oportuna, idealmente, crianças e adultos jovens sem manifestações clínicas ou ao ECG de dano miocárdico, ou seja, em “forma crônica não cardíaca precoce”, a droga pode ter seu papel modificador em curso da doença ao eliminar ou ao menos reduzir carga parasitária e, consequentemente agindo em via do estímulo antigênico e dano direto parasitário, apesar de controvérsias quanto à autoimunidade, já desencadeada em um *continuum* da resposta celular e humoral com a participação de mimecrista molecular e auto anticorpos para tecidos específicos 94959658 9798.

Ao reagruparmos pacientes conforme presença de cardiomiopatia com disfunção, a partir de FEVE e presença de alterações ao ECG obtidos em segunda visita, houve diferença estatisticamente significantes para idade e sexo, aqui, acompanhando achados de outros estudos onde gravidade de doença cardíaca foi mais eminente em sexo masculino e idosos, fatores que podem ser compreendidos, ao menos em parte, por efeito protetor estrogênico em mulheres e, nos

idosos, pelo acúmulo de fatores que os levam à disfunção, além de cardiomiopatia relacionada à idade ⁸⁶. Além desses, valores de NT-proBNP, títulos sorológicos e Gal-3, apresentaram níveis mais elevados conforme progressão de subgrupos quanto às variáveis que os definiram (anormalidades ao ECG e FEVE), sendo maiores no subgrupo de cardiomiopatia com disfunção. Quanto ao adjNT-proBNP, aproximadamente seis a cada dez pacientes no grupo CCD apresentava valores anormais para idade, enquanto nenhum paciente no grupo NC e apenas próximo de um a cada dez, em CnD, enfatizando a alteração do biomarcador em vigência de clínica, alterações ao ECG ⁹⁹, remodelamento ⁴⁸ e disfunção já em vigência ¹⁰⁰¹⁰¹. Títulos sorológicos mais elevados conforme “carga de doença” podem estar relacionados ao contínuo e sustentado estímulo antigênico em tecido miocárdico e já demonstrada correlação de títulos com positividade de PCR para *T.cruzi* e acúmulo de alterações eletrocardiográficas ¹⁰².

As alterações acumuladas que traduzem uma doença mais severa foram evidenciadas quando avaliamos diferenças sociodemográficas e clínicas entre aqueles que faleceram. Utilização de fármacos que denotam gravidade, como digoxina, furosemida e espironolactona, assim como maior frequência de anormalidades ao ECG, essencialmente Major-ECG e praticamente ausente ECG normal entre os que faleceram, reforçam ainda mais que, apesar de intervenções, o desfecho óbito ainda parece não sofrer interferência, talvez pela idade avançada agindo como variável de confusão.

Gal-3 já foi demonstrado como importante papel na patogênese de modelos experimentais de DCh crônica, fomentando inflamação e fibrose ¹⁰³. Seu papel na definição de gravidade, além de prognóstico entre pacientes de população geral, assim como doença de Chagas já foi descrito tanto para desfechos de progressão, de novo ou mesmo morte por todas as causas após IAM ^{84,104,105106} e aqui, também observado, mesmo quando avaliamos sua medida realizada em 1ª visita. A variação dos seus níveis também foi relacionada à predição de IC, doença cardiovascular e mortalidade em um estudo longitudinal ¹⁰⁷.

Todavia, um estudo demonstrou que associação entre fibrose e níveis de Gal-3 coletados de sangue periférico não se correlacionaram com o “ambiente” onde ocorre o processo de inflamação e a fibrose sustentada, mas houve associação com níveis de Gal-3 endomiocárdicos. Porém, em cardiomiopatia inflamatória, curiosamente houve uma correlação inversa entre Gal-3 e níveis de fibrose. Também naquele estudo, foi sugerida melhor avaliação quanto a fibrose provada histologicamente aos níveis plasmáticos do biomarcador ¹⁰⁸.

15. Limitações

Neste estudo, apesar de uma coorte bem delineada e seguida em área endêmica para doença e com aparente manutenção do controle vetorial já reportado desde 2006 ¹², Gal-3 não pôde definir qualquer outro evento de interesse clínico como desfecho além do óbito. Apesar da janela de seguimento deste estudo, cujo desenho inicial foi para seguimento por ao menos 24 meses, ter sido ultrapassada, o período pode ter sido curto para observar a evolução daquelas características. Reconhecemos que evolução da história natural da doença demanda anos ou até décadas para

progressão de características culminando em desfechos ou definição de espectro clínico como forma cardíaca ²¹. Porém, os resultados negativos quanto o potencial de definição do biomarcador para esta progressão pode ter relação com a seleção negativa dos pacientes falecidos, assumindo que possuíam maior carga de doença, antes da segunda visita, quando variáveis não foram aferidas. Talvez, a continuidade do seguimento e novo acesso a mais uma medida em 3ª visita que nosso grupo está finalizando, possam melhor clarear essa evolução, se aproximando da história natural da doença, ancorando as variáveis preditoras, no caso Gal-3, a inferências mais robustas e esclarecedoras dos padrões de evolução.

Por várias vezes e formas, tentamos contato ou obtenção de todas as datas de óbito dos pacientes desta casuística. Porém, necessitamos seguir imputação de dados faltantes para oito datas de óbito. Nossa estratégia de imputação nos pareceu conservadora e tendendo a reduzir possibilidade de vieses de seleção, sendo inclusive afastada mudança em conclusões por análise de sensibilidade que realizamos ao excluirmos esses oito pacientes.

Maioria dos pacientes foram mulheres e idosos, limitando potencial de generalização dos resultados, apesar de simular em parte, o papel de doença “de coorte” cuja evolução crônica e insidiosa é predominante. Porém, pode não ser transponível ao contexto clínico, em que se almeja o seu uso em pacientes adultos e adultos jovens, de preferência quando ainda não tenha havido definição de forma clínica, quando janela para oportunidades de manejo e terapêutica seriam maximizadas.

Salientamos ainda a seleção da casuística deste estudo, resultando em cerca de 72% da amostra original de pacientes com DCh, já que excluimos aqueles em que uso de Bz havia sido reportado. Essa exclusão não parece trazer algum viés de seleção em que nos leve a erro tipo I, em que AR-Gal-3 teria maior associação estatística para desfecho óbito, já que os pacientes excluídos foram os que já apresentavam o benefício adquirido pela exposição ao Bz, risco reduzido para desfecho óbito e demais desfechos compostos, já inclusive demonstrado em publicação do grupo ⁶⁹ e por coorte com mediana de 15 anos de seguimento composta por pacientes crônicos na forma indeterminada, em que observaram redução de eventos cardiovasculares, todavia, sem efeito em mortalidade ¹⁰⁹. Logo, se houver viés, este tenderia a conclusões mais conservadoras quanto a esta associação, já que pacientes com possível benefício pela droga, não foram analisados.

Para fins de foco no desfecho mortalidade e generalização de conclusões, optamos por manter classificação de alterações ao ECG agrupadas em Minor ou Major, em vez de descrição pormenorizada de todas as anormalidades evidenciadas, isso pode ter trazido menor especificidade das conclusões quanto aos achados em ECG específicos ou até “típicos” da DCh. Também não possuíamos dados quanto à implantação de marca-passo ou mesmo transplante, eventos que serão disponibilizados após 3ª visita da coorte.

Foi realizado ecocardiograma em segunda visita, e somente utilizamos fração de ejeção nesta análise, não sendo estudadas medidas importantes como tamanho de câmara ou “strain”, por exemplo, limitando análises mais robustas, assim como mitigando qualquer tentativa de associação do biomarcador para predição de desfechos de evolução funcional e anatômica. Estudo do grupo

está em fase final de escrita, onde ampla análise de parâmetros ecocardiográficos da coorte serão publicados.

A categorização das variáveis preditoras Gal-3 e adjNT-proBNP podem ter trazido redução de precisão nos achados, principalmente para a primeira, e até perda ou supervalorização de alguma inferência significativa. Mas decidimos mantê-las para fins de generalização dos achados.

Finalmente, até esta data, não há estudo com validação de níveis de Gal-3 para população brasileira, respeitando possíveis variações em níveis basais e padrão de normalidade para nossa população, em qualquer estudo similar à “ethnobridging”. Tampouco realizamos validação interna ou mesmo externa para definição de pontos de corte. Decidimos por utilizar valores de corte sugerido por fabricante do ensaio para fins de aumentar validade externa e reprodutibilidade de resultado ¹¹⁰. Não pudemos realizar medidas seriadas do marcador, uma vez que já foi demonstrado potencial aditivo em informação sobre desfechos clínicos, essencialmente após IAM, em duas medidas de Gal-3 ¹⁰⁷.

16. Conclusões

Níveis elevados de Gal-3 foram associados independentemente ao óbito por todas as causas e maior frequência de anormalidades ao ECG, níveis mais altos de NT-proBNP e FEVE <50, denotando no geral pacientes com maior “carga de doença” apesar de não ter tido associação com progressão entre visitas de alterações eletrocardiográficas, de adjNT-proBNP ou NYHA entre os sobreviventes.

Esses resultados trazem luz à Gal-3 como um biomarcador que traduz o “potencial fibrogênico” do tecido cardíaco mediante um insulto (*T.cruzi*) que, em associação com parâmetros clínicos e facilmente acessíveis, como dados demográficos, classe funcional e ECG, podem auxiliar na identificação de um fenótipo que pode evoluir em direção ao espectro cardiomiopático da DCh. Este processo, se precocemente reconhecido, pode ser interceptado.

O delineamento de coortes formadas por pacientes antes mesmo de dano miocárdico já ser evidente clinicamente, possibilitando alcance de melhor resposta e margens de segurança mais elevadas, almejando melhoria do cuidado do paciente com DCh em algo que se aproximaria a uma forma de “medicina personalizada” e permitiria mudar o curso da DCh com o manejo, em tempo oportuno, para otimizar o estadiamento, controle de comorbidades e tratamento farmacológico mais intensivos almejando de algum modo interferir nas variáveis imputadas no processo de inflamação, remodelamento e fibrose. Logo, postergando ou mesmo evitando a continuidade ou progressão àquele espectro culminando em forma cardíaca.

Gal-3 poderia ainda atuar como uma ferramenta para estratificação de risco como critério de inclusão para estudos clínicos, possibilitando talvez, seleção de pacientes mais próximos do limiar para desencadeamento de desfechos cardíacos, sejam das vias de inflamação, remodelamento e fibrose, ou mesmo óbito. Logo, testando intervenções naqueles mais propensos aos benefícios advindos de novas terapias e iminência de desfechos. Consequentemente, autorizaria realização de ensaios clínicos mais factíveis, tanto por redução de amostra, como

atuando na definição de marcadores substitutos e discriminatórios alcançáveis, convertendo o cenário atual da DCh, de escassez e incerteza à esperança, possibilidades e inovação.

17. Referencias:

- (1) Chagas, C. Nova Tripanozomíase Humana. Estudos Sobre a Morfologia e o Cicloevolutivo De *Schizotrypanum cruzi* n. sp., Agente Etiológico de Nova Entidade morbida Do Homem. (New Human Tripanosomiasis. Studies on Morphology And the Life Cycle Of *Schizotrypanum cruzi*, New Genus, New Species, Aetiological Agent of a New Morbid Entity of Man). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **1909**, 1 (1), 159–218.
- (2) Coutinho, M. Ninety Years of Chagas Disease: A Success Story at the Periphery. *Social Studies of Science* **1999**, 29 (4), 519–549.
- (3) Aufderheide, A. C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; Guhl, F.; Arriaza, B.; Renier, C.; Wittmers, L. E.; Fornaciari, G.; Allison, M. A 9,000-Year Record of Chagas' Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101 (7), 2034–2039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307312101>.
- (4) Coura, J. R. Chagas Disease: What Is Known and What Is Needed--a Background Article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2007**, 102 Suppl 1, 113–122. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000900018>.
- (5) Coura, J. R.; Dias, J. C. P. Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas Disease: 100 Years after Its Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104 Suppl 1, 31–40. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900006>.
- (6) Rassi, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet* **2010**, 375 (9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- (7) Lent, H.; Wygodzinsky, P. W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and Their Significance as Vectors of Chagas' Disease. Bulletin of the AMNH ; v. 163, Article 3. *Triatominae* **1979**.
- (8) Rassi, A.; Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am* **2012**, 26 (2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- (9) Ribeiro, A. L.; Nunes, M. P.; Teixeira, M. M.; Rocha, M. O. C. Diagnosis and Management of Chagas Disease and Cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* **2012**, 9 (10), 576–589. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.109>.
- (10) Moreira, O. C.; Ramírez, J. D.; Velázquez, E.; Melo, M. F. A. D.; Lima-Ferreira, C.; Guhl, F.; Sosa-Estani, S.; Marin-Neto, J. A.; Morillo, C. A.; Britto, C. Towards the Establishment of a Consensus Real-Time QPCR to Monitor *Trypanosoma cruzi* Parasitemia in Patients with Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: A Substudy from the BENEFIT Trial. *Acta Trop* **2013**, 125 (1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.020>.
- (11) Ramírez, J. D.; Guhl, F.; Rendón, L. M.; Rosas, F.; Marin-Neto, J. A.; Morillo, C. A. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, 4 (11), e899. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000899>.
- (12) Sanchez, J. D.; <https://www.facebook.com/pahowho>. OPAS/OMS | Información general: Enfermedad de Chagas https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=pt (accessed Sep 13, 2020).
- (13) Alarcón de Noya, B.; Colmenares, C.; Díaz-Bello, Z.; Ruiz-Guevara, R.; Medina, K.; Muñoz-Calderón, A.; Mauriello, L.; Cabrera, E.; Montiel, L.; Losada, S.; Martínez, J.;

- Espinosa, R.; Abate, T. Orally-Transmitted Chagas Disease: Epidemiological, Clinical, Serological and Molecular Outcomes of a School Microepidemic in Chichiriviche de La Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiology and Control* **2016**, *1* (2), 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>.
- (14) Dias, J. P.; Bastos, C.; de Araújo, E. G.; Mascarenhas, A. V.; Netto, E.; Grassi, F.; Silva, M.; Tatto, E.; Mendonça, J.; de Araújo, R. F.; Obara, M. T.; Silva, M. P.; Furuchó, C.; Aras, R. [Outbreak of acute Chagas disease occurred in the state of Bahia, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* **2006**, *39 Suppl 3*, 135–137.
 - (15) Gazin, P.; Melo, G.; Albuquerque, A.; Oliveira, W.; Soula, G.; Audry, P. [Chagas disease in a rural area of Northeast Brazil]. *Bull Soc Pathol Exot* **2004**, *97* (3), 189–192.
 - (16) Pereira, K. S.; Schmidt, F. L.; Guaraldo, A. M. A.; Franco, R. M. B.; Dias, V. L.; Passos, L. A. C. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. *J Food Prot* **2009**, *72* (2), 441–446. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.2.441>.
 - (17) Ortiz, J. V.; Pereira, B. V. M.; Couceiro, K. do N.; Silva, M. R. H. da S. e; Doria, S. S.; Silva, P. R. L. da; Lira, E. da F. de; Guerra, M. das G. V. B.; Guerra, J. A. de O.; Ferreira, J. M. B. B.; Ortiz, J. V.; Pereira, B. V. M.; Couceiro, K. do N.; Silva, M. R. H. da S. e; Doria, S. S.; Silva, P. R. L. da; Lira, E. da F. de; Guerra, M. das G. V. B.; Guerra, J. A. de O.; Ferreira, J. M. B. B. Cardiac Evaluation in the Acute Phase of Chagas' Disease with Post-Treatment Evolution in Patients Attended in the State of Amazonas, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2019**, *112* (3), 240–246. <https://doi.org/10.5935/abc.20190007>.
 - (18) Lee, B. Y.; Bacon, K. M.; Bottazzi, M. E.; Hotez, P. J. Global Economic Burden of Chagas Disease: A Computational Simulation Model. *Lancet Infect Dis* **2013**, *13* (4), 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1).
 - (19) Bern, C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* **2015**, *373* (19), 1882. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1510996>.
 - (20) Marin-Neto, J. A.; Cunha-Neto, E.; Maciel, B. C.; Simões, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation* **2007**, *115* (9), 1109–1123. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>.
 - (21) Sabino Ester C.; Ribeiro Antonio L.; Salemi Vera M.C.; Di Lorenzo Oliveira Claudia; Antunes Andre P.; Menezes Marcia M.; Ianni Barbara M.; Nastari Luciano; Fernandes Fabio; Patavino Giuseppina M.; Sachdev Vandana; Capuani Ligia; de Almeida-Neto Cesar; Carrick Danielle M.; Wright David; Kavounis Katherine; Gonzalez Thelma T.; Carneiro-Proietti Anna Barbara; Custer Brian; Busch Michael P.; Murphy Edward L. Ten-Year Incidence of Chagas Cardiomyopathy Among Asymptomatic Trypanosoma Cruzi-Seropositive Former Blood Donors. *Circulation* **2013**, *127* (10), 1105–1115. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123612>.
 - (22) DIAS, E.; LARANJA, F. S.; MIRANDA, A.; NOBREGA, G. Chagas' Disease; a Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation* **1956**, *14* (6), 1035–1060.
 - (23) Campaigning for Chagas disease | Nature <https://www.nature.com/articles/nature09227> (accessed Feb 24, 2021).
 - (24) Simões, T. C.; Borges, L. F.; Assis, A. C. P. de; Silva, M. V.; Santos, J. dos; Meira, K. C. Chagas Disease Mortality in Brazil: A Bayesian Analysis of Age-Period-Cohort Effects and Forecasts for Two Decades. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2018**, *12* (9), e0006798. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006798>.

- (25) Pérez-Molina, J. A.; Perez, A. M.; Norman, F. F.; Monge-Maillo, B.; López-Vélez, R. Old and New Challenges in Chagas Disease. *Lancet Infect Dis* **2015**, *15* (11), 1347–1356. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00243-1).
- (26) Requena-Méndez, A.; Aldasoro, E.; de Lazzari, E.; Sicuri, E.; Brown, M.; Moore, D. A. J.; Gascon, J.; Muñoz, J. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **2015**, *9* (2), e0003540. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>.
- (27) Braz, L. M. A.; Amato Neto, V.; Okay, T. S. Reactivation of Trypanosoma Cruzi Infection in Immunosuppressed Patients: Contributions for the Laboratorial Diagnosis Standardization. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2008**, *50* (1), 65–66. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652008000100015>.
- (28) Pereira, P. C. M.; Navarro, E. C. Challenges and Perspectives of Chagas Disease: A Review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* **2013**, *19* (1), 34. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-19-34>.
- (29) Coura, J. R.; Borges-Pereira, J. Chronic Phase of Chagas Disease: Why Should It Be Treated? A Comprehensive Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2011**, *106* (6), 641–645. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000600001>.
- (30) Lima-Costa, M. F.; Firmo, J. O. A.; Uchoa, E. Cohort Profile: The Bambui (Brazil) Cohort Study of Ageing. *Int J Epidemiol* **2011**, *40* (4), 862–867. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq143>.
- (31) Portela-Lindoso, A. A.; Shikanai-Yasuda, M. A. [Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction]. *Rev Saude Publica* **2003**, *37* (1), 107–115. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102003000100016>.
- (32) 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? *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, *104 Suppl 1*, 115–121. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900017>.
- (33) Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira de Hipertensão; Sociedade Brasileira de Nefrologia. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol* **2010**, *95* (1 Suppl), 1–51.
- (34) Portela-Lindoso, A. A.; Shikanai-Yasuda, M. A. [Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction]. *Rev Saude Publica* **2003**, *37* (1), 107–115. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102003000100016>.
- (35) Rochitte, C. E.; Nacif, M. S.; de Oliveira Júnior, A. C.; Siqueira-Batista, R.; Marchiori, E.; Uellendahl, M.; de Lourdes Higuchi, M. Cardiac Magnetic Resonance in Chagas' Disease. *Artif Organs* **2007**, *31* (4), 259–267. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2007.00373.x>.
- (36) Wynn, T. A. Fibrotic Disease and the T(H)1/T(H)2 Paradigm. *Nat Rev Immunol* **2004**, *4* (8), 583–594. <https://doi.org/10.1038/nri1412>.
- (37) van Rooij, E.; Olson, E. N. Searching for MiR-Acles in Cardiac Fibrosis. *Circ Res* **2009**, *104* (2), 138–140. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.192492>.
- (38) Burchfield, J. S.; Xie, M.; Hill, J. A. Pathological Ventricular Remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation* **2013**, *128* (4), 388–400. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001878>.

- (39) Spinale, F. G. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol Rev* **2007**, *87* (4), 1285–1342. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2007>.
- (40) Wu, K. C.; Weiss, R. G.; Thiemann, D. R.; Kitagawa, K.; Schmidt, A.; Dalal, D.; Lai, S.; Bluemke, D. A.; Gerstenblith, G.; Marbán, E.; Tomaselli, G. F.; Lima, J. A. C. Late Gadolinium Enhancement by Cardiovascular Magnetic Resonance Heralds an Adverse Prognosis in Nonischemic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **2008**, *51* (25), 2414–2421. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.03.018>.
- (41) Aptamer based, non-PCR, non-serological detection of Chagas disease biomarkers in *Trypanosoma cruzi* infected mice - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24454974/> (accessed Feb 24, 2021).
- (42) Cancado, J. R. Long Term Evaluation of Etiological Treatment of Chagas Disease with Benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2002**, *44* (1), 29–37.
- (43) Pinazo, M.-J.; Muñoz, J.; Posada, E.; López-Chejade, P.; Gállego, M.; Ayala, E.; del Cacho, E.; Soy, D.; Gascon, J. Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, *54* (11), 4896–4899. <https://doi.org/10.1128/AAC.00537-10>.
- (44) Pinazo, M. J.; Cañas, E.; Elizalde, J. I.; García, M.; Gascón, J.; Gimeno, F.; Gomez, J.; Guhl, F.; Ortiz, V.; Posada, E. de J.; Puente, S.; Rezende, J.; Salas, J.; Saravia, J.; Torrico, F.; Torrus, D.; Treviño, B. Diagnosis, Management and Treatment of Chronic Chagas' Gastrointestinal Disease in Areas Where *Trypanosoma Cruzi* Infection Is Not Endemic. *Gastroenterol Hepatol* **2010**, *33* (3), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.07.009>.
- (45) Solari, A.; Ortiz, S.; Soto, A.; Arancibia, C.; Campillay, R.; Contreras, M.; Salinas, P.; Rojas, A.; Schenone, H. Treatment of *Trypanosoma Cruzi*-Infected Children with Nifurtimox: A 3 Year Follow-up by PCR. *J Antimicrob Chemother* **2001**, *48* (4), 515–519. <https://doi.org/10.1093/jac/48.4.515>.
- (46) Cooley, G.; Etheridge, R. D.; Boehlke, C.; Bundy, B.; Weatherly, D. B.; Minning, T.; Haney, M.; Postan, M.; Laucella, S.; Tarleton, R. L. High Throughput Selection of Effective Serodiagnostics for *Trypanosoma Cruzi* Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**, *2* (10), e316. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000316>.
- (47) Requena-Méndez, A.; López, M. C.; Angheben, A.; Izquierdo, L.; Ribeiro, I.; Pinazo, M.-J.; Gascon, J.; Muñoz, J. Evaluating Chagas Disease Progression and Cure through Blood-Derived Biomarkers: A Systematic Review. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2013**, *11* (9), 957–976. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.824718>.
- (48) García-Alvarez, A.; Sitges, M.; Pinazo, M. J.; Regueiro-Cueva, A.; Posada, E.; Poyatos, S.; Ortiz-Pérez, J. T.; Heras, M.; Azqueta, M.; Gascon, J.; Sanz, G. Chagas Cardiomyopathy: The Potential of Diastolic Dysfunction and Brain Natriuretic Peptide in the Early Identification of Cardiac Damage. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4* (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000826>.
- (49) Barbosa, M. M.; Nunes, M. o C.; Ribeiro, A. L.; Barral, M. M.; Rocha, M. O. N-Terminal ProBNP Levels in Patients with Chagas Disease: A Marker of Systolic and Diastolic Dysfunction of the Left Ventricle. *Eur J Echocardiogr* **2007**, *8* (3), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.euje.2006.03.011>.
- (50) Moreira, M. a C.; Wang, Y.; Heringer-Walther, S.; Wessel, N.; Walther, T. Prognostic Value of Natriuretic Peptides in Chagas' Disease: A Head-to-Head Comparison of the 3

- Natriuretic Peptides. *Congest Heart Fail* **2009**, *15* (2), 75–81.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7133.2009.00051.x>.
- (51) Filipe, M. D.; Meijers, W. C.; Rogier van der Velde, A.; de Boer, R. A. Galectin-3 and Heart Failure: Prognosis, Prediction & Clinical Utility. *Clin Chim Acta* **2015**, *443*, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.009>.
 - (52) Pineda, M. A.; Cuervo, H.; Fresno, M.; Soto, M.; Bonay, P. Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective Immune Responses in a Murine Model of *Trypanosoma Cruzi* Infection. *J Infect Dis* **2015**, *212* (7), 1160–1171.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiv185>.
 - (53) Hutchinson, K. R.; Stewart, J. A.; Lucchesi, P. A. Extracellular Matrix Remodeling during the Progression of Volume Overload-Induced Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol* **2010**, *48* (3), 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.06.001>.
 - (54) Creemers, E. E.; Pinto, Y. M. Molecular Mechanisms That Control Interstitial Fibrosis in the Pressure-Overloaded Heart. *Cardiovasc Res* **2011**, *89* (2), 265–272.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq308>.
 - (55) Liu, Y. H.; D'Ambrosio, M.; Liao, T. D.; Peng, H.; Rhaleb, N. E.; Sharma, U.; André, S.; Gabius, H. J.; Carretero, O. A. N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Prevents Cardiac Remodeling and Dysfunction Induced by Galectin-3, a Mammalian Adhesion/Growth-Regulatory Lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2009**, *296* (2), H404–12.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00747.2008>.
 - (56) McCullough, P. A. Practical Experience Using Galectin-3 in Heart Failure. *Clin Chem Lab Med* **2014**, *52* (10), 1425–1431. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0278>.
 - (57) Chagas' disease as a foodborne illness - PubMed
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19350996/> (accessed Feb 24, 2021).
 - (58) Rassi Jr, A.; Marin Neto, J. A.; Rassi, A.; Rassi Jr, A.; Marin Neto, J. A.; Rassi, A. Chronic Chagas Cardiomyopathy: A Review of the Main Pathogenic Mechanisms and the Efficacy of Aetiological Treatment Following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) Trial. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2017**, *112* (3), 224–235. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160334>.
 - (59) Old and new challenges in Chagas disease - PubMed
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26231478/> (accessed Feb 24, 2021).
 - (60) Cardoso, C. S.; Sabino, E. C.; Oliveira, C. D. L.; Oliveira, L. C. de; Ferreira, A. M.; Cunha-Neto, E.; Bierrenbach, A. L.; Ferreira, J. E.; Haikal, D. S.; Reingold, A. L.; Ribeiro, A. L. P. Longitudinal Study of Patients with Chronic Chagas Cardiomyopathy in Brazil (SaMi-Trop Project): A Cohort Profile. *BMJ Open* **2016**, *6* (5), e011181.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011181>.
 - (61) Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels (Livro, 1994) [WorldCat.org] <https://www.worldcat.org/title/nomenclature-and-criteria-for-diagnosis-of-diseases-of-the-heart-and-great-vessels/oclc/29430883> (accessed Feb 24, 2021).
 - (62) Ribeiro, A. L.; Marcolino, M. S.; Prineas, R. J.; Lima-Costa, M. F. Electrocardiographic Abnormalities in Elderly Chagas Disease Patients: 10-Year Follow-up of the Bambui Cohort Study of Aging. *J Am Heart Assoc* **2014**, *3* (1), e000632.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000632>.
 - (63) The Minnesota Code Manual of Electrocardiographic Findings | Ronald J. Prineas | Springer <https://www.springer.com/gp/book/9781848827776> (accessed Feb 23, 2021).

- (64) Nagueh, S. F.; Appleton, C. P.; Gillebert, T. C.; Marino, P. N.; Oh, J. K.; Smiseth, O. A.; Waggoner, A. D.; Flachskampf, F. A.; Pellikka, P. A.; Evangelista, A. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* **2009**, 22 (2), 107–133. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2008.11.023>.
- (65) Lang, R. M.; Bierig, M.; Devereux, R. B.; Flachskampf, F. A.; Foster, E.; Pellikka, P. A.; Picard, M. H.; Roman, M. J.; Seward, J.; Shanewise, J. S.; Solomon, S. D.; Spencer, K. T.; Sutton, M. S. J.; Stewart, W. J.; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* **2005**, 18 (12), 1440–1463. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2005.10.005>.
- (66) McCullough, P. A.; Olobatoke, A.; Vanhecke, T. E. Galectin-3: A Novel Blood Test for the Evaluation and Management of Patients with Heart Failure. *Rev Cardiovasc Med* **2011**, 12 (4), 200–210. <https://doi.org/10.3909/ricm0624>.
- (67) Daniels, L. B.; Maisel, A. S. Natriuretic Peptides. *J Am Coll Cardiol* **2007**, 50 (25), 2357–2368. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.09.021>.
- (68) Maisel, A.; Mueller, C.; Adams, K.; Anker, S. D.; Aspromonte, N.; Cleland, J. G. F.; Cohen-Solal, A.; Dahlstrom, U.; DeMaria, A.; Di Somma, S.; Filippatos, G. S.; Fonarow, G. C.; Jourdain, P.; Komajda, M.; Liu, P. P.; McDonagh, T.; McDonald, K.; Mebazaa, A.; Nieminen, M. S.; Peacock, W. F.; Tubaro, M.; Valle, R.; Vanderhyden, M.; Yancy, C. W.; Zannad, F.; Braunwald, E. State of the Art: Using Natriuretic Peptide Levels in Clinical Practice. *Eur J Heart Fail* **2008**, 10 (9), 824–839. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2008.07.014>.
- (69) Cardoso, C. S.; Ribeiro, A. L. P.; Oliveira, C. D. L.; Oliveira, L. C.; Ferreira, A. M.; Bierrenbach, A. L.; Silva, J. L. P.; Colosimo, E. A.; Ferreira, J. E.; Lee, T.-H.; Busch, M. P.; Reingold, A. L.; Sabino, E. C. Beneficial Effects of Benznidazole in Chagas Disease: NIH SaMi-Trop Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* **2018**, 12 (11), e0006814. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006814>.
- (70) GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, Regional, and National Age-Sex Specific Mortality for 264 Causes of Death, 1980-2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **2017**, 390 (10100), 1151–1210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9).
- (71) Victora, C. G.; Huttly, S. R.; Fuchs, S. C.; Olinto, M. T. The Role of Conceptual Frameworks in Epidemiological Analysis: A Hierarchical Approach. *Int J Epidemiol* **1997**, 26 (1), 224–227. <https://doi.org/10.1093/ije/26.1.224>.
- (72) DAGitty v3.0 <http://dagitty.net/dags.html?id=p2uHtg#> (accessed Feb 24, 2021).
- (73) Sguassero, Y.; Roberts, K. N.; Harvey, G. B.; Comandé, D.; Ciapponi, A.; Cuesta, C. B.; Aguiar, C.; Castro, A. M. de; Danesi, E.; de Andrade, A. L.; de Lana, M.; Escribà, J. M.; Fabbro, D. L.; Fernandes, C. D.; Flores-Chávez, M.; Hasslocher-Moreno, A. M.; Jackson, Y.; Lacunza, C. D.; Machado-de-Assis, G. F.; Maldonado, M.; Meira, W. S. F.; Molina, I.; Monje-Rumi, M. M.; Muñoz-San Martín, C.; Murcia, L.; Nery de Castro, C.; Sánchez Negrette, O.; Segovia, M.; Silveira, C. A. N.; Solari, A.; Steindel, M.; Streiger, M. L.; Vera de Bilbao, N.; Zulantay, I.; Sosa-Estani, S. Course of Serological Tests in

- Treated Subjects with Chronic Trypanosoma Cruzi Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Participant Data. *Int J Infect Dis* **2018**, 73, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.05.019>.
- (74) Ruiz-Lancheros, E.; Chatelain, E.; Ndao, M. Chagas Disease Treatment Efficacy Biomarkers: Myths and Realities. In *Chagas Disease: A Clinical Approach*; Altcheh, J. M., Freilij, H., Eds.; Birkhäuser Advances in Infectious Diseases; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 323–349. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7_16.
 - (75) Ho, J. E.; Liu, C.; Lyass, A.; Courchesne, P.; Pencina, M. J.; Vasan, R. S.; Larson, M. G.; Levy, D. Galectin-3, a Marker of Cardiac Fibrosis, Predicts Incident Heart Failure in the Community. *J Am Coll Cardiol* **2012**, 60 (14), 1249–1256. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.04.053>.
 - (76) Okamoto, E. E.; Sherbuk, J. E.; Clark, E. H.; Marks, M. A.; Gandarilla, O.; Galdos-Cardenas, G.; Vasquez-Villar, A.; Choi, J.; Crawford, T. C.; Q., R.; Fernandez, A. B.; Colanzi, R.; Flores-Franco, J. L.; Gilman, R. H.; Bern, C.; for the Chagas Disease Working Group in Bolivia and Peru. Biomarkers in Trypanosoma Cruzi-Infected and Uninfected Individuals with Varying Severity of Cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, 8 (10), e3227. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003227>.
 - (77) Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease | Elsevier Enhanced Reader <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0167527315301595?token=7A712ED039626B81739D99F38AA6EA5019B1F5CEEE1A93A03BEBBA400562D13CA48E0BFE81A4FBEC176DA3B1AD563D0D> (accessed Jan 4, 2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.07.040>.
 - (78) Milting, H.; Ellinghaus, P.; Seewald, M.; Cakar, H.; Bohms, B.; Kassner, A.; Körfer, R.; Klein, M.; Krahn, T.; Kruska, L.; El Banayosy, A.; Kramer, F. Plasma Biomarkers of Myocardial Fibrosis and Remodeling in Terminal Heart Failure Patients Supported by Mechanical Circulatory Support Devices. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **2008**, 27 (6), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2008.02.018>.
 - (79) Oikonomou Evangelos; Siasos Gerasimos; Tousoulis Dimitris. Galectin-3. *Journal of the American College of Cardiology* **2019**, 73 (14), 1875–1875. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.045>.
 - (80) Miller Wayne L.; Hartman Karen A.; Burritt Mary F.; Grill Diane E.; Rodeheffer Richard J.; Burnett John C.; Jaffe Allan S. Serial Biomarker Measurements in Ambulatory Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* **2007**, 116 (3), 249–257. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.694562>.
 - (81) The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population - de Boer - 2012 - Journal of Internal Medicine - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2796.2011.02476.x> (accessed Feb 17, 2021).
 - (82) Lau Emily S.; Liu Elizabeth; Paniagua Samantha M.; Sarma Amy A.; Zampierollo Giovanna; López Begoña; Díez Javier; Wang Thomas J.; Ho Jennifer E. Galectin-3 Inhibition With Modified Citrus Pectin in Hypertension. *JACC: Basic to Translational Science* **2021**, 6 (1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.10.006>.
 - (83) Glinesky, V. V.; Raz, A. Modified Citrus Pectin Anti-Metastatic Properties: One Bullet, Multiple Targets. *Carbohydr Res* **2009**, 344 (14), 1788–1791. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.08.038>.

- (84) Boer, R. A. de; Veldhuisen, D. J. van; Gansevoort, R. T.; Kobold, A. C. M.; Gilst, W. H. van; Hillege, H. L.; Bakker, S. J. L.; Harst, P. van der. The Fibrosis Marker Galectin-3 and Outcome in the General Population. *Journal of Internal Medicine* **2012**, 272 (1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02476.x>.
- (85) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008† - Dickstein - 2008 - European Journal of Heart Failure - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.ejheart.2008.08.005> (accessed Feb 21, 2021).
- (86) Sex-Related Differences in Myocardial Remodeling | Elsevier Enhanced Reader <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0735109710000896?token=81E4B945CC4AFE08D67E9CA2B1DF2C011E113E92B50C471890B443B353BE4D4185C23425BE2C00C2072A6823351D06E7> (accessed Feb 17, 2021). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.065>.
- (87) Barreto, S. M.; Passos, V. M. A.; Firmo, J. O. A.; Guerra, H. L.; Vidigal, P. G.; Lima-Costa, M. F. F. Hypertension and Clustering of Cardiovascular Risk Factors in a Community in Southeast Brazil: The Bambuí Health and Ageing Study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2001**, 77 (6), 576–581. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2001001200008>.
- (88) Passos, V. M. de A.; Barreto, S. M.; Diniz, L. M.; Lima-Costa, M. F. Type 2 Diabetes: Prevalence and Associated Factors in a Brazilian Community - the Bambuí Health and Aging Study. *Sao Paulo Med. J.* **2005**, 123 (2), 66–71. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802005000200007>.
- (89) Ramires, F. J.; Salemi, V. M.; Ianni, B. M.; Fernandes, F.; Martins, D. G.; Billate, A.; Cunha, E.; Mady, C. Aldosterone Antagonism in an Inflammatory State: Evidence for Myocardial Protection. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2006**, 7 (3), 162–167. <https://doi.org/10.3317/jraas.2006.026>.
- (90) Francis, G. S.; Benedict, C.; Johnstone, D. E.; Kirlin, P. C.; Nicklas, J.; Liang, C. S.; Kubo, S. H.; Rudin-Toretsky, E.; Yusuf, S. Comparison of Neuroendocrine Activation in Patients with Left Ventricular Dysfunction with and without Congestive Heart Failure. A Substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* **1990**, 82 (5), 1724–1729. <https://doi.org/10.1161/01.cir.82.5.1724>.
- (91) Fang James C. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or β -Blockers in Heart Failure. *Circulation* **2005**, 112 (16), 2380–2382. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.586545>.
- (92) Stafford, R. S.; Radley, D. C. The Underutilization of Cardiac Medications of Proven Benefit, 1990 to 2002. *J Am Coll Cardiol* **2003**, 41 (1), 56–61. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)02670-0](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)02670-0).
- (93) Bocchi, E. A.; Bestetti, R. B.; Scanavacca, M. I.; Cunha Neto, E.; Issa, V. S. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, 70 (12), 1510–1524. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.08.004>.
- (94) Sosa Estani, S.; Segura, E. L.; Ruiz, A. M.; Velazquez, E.; Porcel, B. M.; Yampotis, C. Efficacy of Chemotherapy with Benznidazole in Children in the Indeterminate Phase of Chagas' Disease. *Am J Trop Med Hyg* **1998**, 59 (4), 526–529. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.526>.
- (95) Morillo, C. A.; Marin-Neto, J. A.; Avezum, A.; Sosa-Estani, S.; Rassi, A.; Rosas, F.; Villena, E.; Quiroz, R.; Bonilla, R.; Britto, C.; Guhl, F.; Velazquez, E.; Bonilla, L.;

- Meeks, B.; Rao-Melacini, P.; Pogue, J.; Mattos, A.; Lazdins, J.; Rassi, A.; Connolly, S. J.; Yusuf, S. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine* **2015**, *373* (14), 1295–1306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>.
- (96) Progression of Baseline Electrocardiogram Abnormalities in Chagas Patients Undergoing Antitrypanosomal Treatment | Open Forum Infectious Diseases | Oxford Academic <https://academic.oup.com/ofid/article/6/2/ofz012/5297078> (accessed Feb 17, 2021).
- (97) Kierszenbaum, F. Where Do We Stand on the Autoimmunity Hypothesis of Chagas Disease? *Trends in Parasitology* **2005**, *21* (11), 513–516. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.013>.
- (98) De Bona, E.; Lidani, K. C. F.; Bavia, L.; Omidian, Z.; Gremski, L. H.; Sandri, T. L.; Messias Reason, I. J. de. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Front. Immunol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>.
- (99) Brito, B. O. F.; Pinto-Filho, M. M.; Cardoso, C. S.; Di Lorenzo Oliveira, C.; Ferreira, A. M.; de Oliveira, L. C.; Gomes, P.; Nunes, M. D. C. P.; Sabino, E. C.; Ribeiro, A. L. P. Association between Typical Electrocardiographic Abnormalities and NT-ProBNP Elevation in a Large Cohort of Patients with Chagas Disease from Endemic Area. *J Electrocardiol* **2018**, *51* (6), 1039–1043. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2018.08.031>.
- (100) Maisel, A.; Mueller, C.; Adams, K.; Anker, S. D.; Aspromonte, N.; Cleland, J. G.; Cohen-Solal, A.; Dahlstrom, U.; DeMaria, A.; Di Somma, S.; Filippatos, G. S.; Fonarow, G. C.; Jourdain, P.; Komajda, M.; Liu, P. P.; McDonagh, T.; McDonald, K.; Mebazaa, A.; Nieminen, M. S.; Peacock, W. F.; Tubaro, M.; Valle, R.; Vanderhyden, M.; Yancy, C. W.; Zannad, F.; Braunwald, E. State of the Art: Using Natriuretic Peptide Levels in Clinical Practice. *Eur J Heart Fail* **2008**, *10* (9), 824–839. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2008.07.014>.
- (101) Ribeiro, A. L. P.; Teixeira, M. M.; Reis, A. M.; Talvani, A.; Perez, A. A.; Barros, M. V. L.; Rocha, M. O. C. Brain Natriuretic Peptide Based Strategy to Detect Left Ventricular Dysfunction in Chagas Disease: A Comparison with the Conventional Approach. *Int J Cardiol* **2006**, *109* (1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.05.048>.
- (102) Buss, L. F.; Silva, L. C. de O.; Moreira, C. H. V.; Manuli, E. R.; Sales, F. C.; Morales, I.; Germanio, C. D.; Almeida-Neto, C. de; Bakkour, S.; Constable, P.; Pinto-Filho, M. M.; Ribeiro, A. L.; Busch, M.; Sabino, E. C. Declining Antibody Levels to Trypanosoma Cruzi Correlate with Polymerase Chain Reaction Positivity and Electrocardiographic Changes in a Retrospective Cohort of Untreated Brazilian Blood Donors. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2020**, *14* (10), e0008787. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008787>.
- (103) Souza, B. S. de F.; Silva, D. N.; Carvalho, R. H.; Sampaio, G. L. de A.; Paredes, B. D.; Aragão França, L.; Azevedo, C. M.; Vasconcelos, J. F.; Meira, C. S.; Neto, P. C.; Macambira, S. G.; da Silva, K. N.; Allahdadi, K. J.; Tavora, F.; de Souza Neto, J. D.; dos Santos, R. R.; Soares, M. B. P. Association of Cardiac Galectin-3 Expression, Myocarditis, and Fibrosis in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology* **2017**, *187* (5), 1134–1146. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.016>.

- (104) de Boer, R. A.; Voors, A. A.; Muntendam, P.; van Gilst, W. H.; van Veldhuisen, D. J. Galectin-3: A Novel Mediator of Heart Failure Development and Progression. *Eur J Heart Fail* **2009**, *11* (9), 811–817. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfp097>.
- (105) van der Velde, A. R.; Gullestad, L.; Ueland, T.; Aukrust, P.; Guo, Y.; Adourian, A.; Muntendam, P.; van Veldhuisen, D. J.; de Boer, R. A. Prognostic Value of Changes in Galectin-3 Levels over Time in Patients with Heart Failure: Data from CORONA and COACH. *Circ Heart Fail* **2013**, *6* (2), 219–226. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000129>.
- (106) Fernandes, F.; Moreira, C. H. V.; Oliveira, L. C.; Souza-Basqueira, M.; Ianni, B. M.; di Lorenzo, C.; Ramires, F. J. A.; Nastari, L.; Cunha-Neto, E.; Ribeiro, A. L.; Lopes, R. D.; Keating, S. M.; Sabino, E. C.; Mady, C. Galectin-3 Associated with Severe Forms and Long-Term Mortality in Patients with Chagas Disease. 9.
- (107) Galectin-3 Levels and Outcomes After Myocardial Infarction: A Population-Based Study | Journal of the American College of Cardiology <https://www.jacc.org/doi/full/10.1016/j.jacc.2019.02.046> (accessed Feb 21, 2021).
- (108) Besler Christian; Lang David; Urban Daniel; Rommel Karl-Philipp; von Roeder Maximilian; Fengler Karl; Blazek Stephan; Kandolf Reinhard; Klingel Karin; Thiele Holger; Linke Axel; Schuler Gerhard; Adams Volker; Lurz Philipp. Plasma and Cardiac Galectin-3 in Patients With Heart Failure Reflects Both Inflammation and Fibrosis. *Circulation: Heart Failure* **2017**, *10* (3), e003804. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003804>.
- (109) Hasslocher-Moreno, A. M.; Saraiva, R. M.; Sangenis, L. H. C.; Xavier, S. S.; de Sousa, A. S.; Costa, A. R.; de Holanda, M. T.; Veloso, H. H.; Mendes, F. S. N. S.; Costa, F. A. C.; Boia, M. N.; Brasil, P. E. A. A.; Carneiro, F. M.; da Silva, G. M. S.; Mediano, M. F. F. Benznidazole Decreases the Risk of Chronic Chagas Disease Progression and Cardiovascular Events: A Long-Term Follow up Study. *EClinicalMedicine* **2021**, *31*, 100694. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100694>.
- (110) Dj, L.; Gm, F.; Pa, M. Comprehensive Cardiac Panel: 2.