



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**FERNANDA GUIMARÃES DE ALENCASTRO**  
**VICTOR COSTA WICHROWSKI**

**BIOMARCADORES DE PERFIL PROTEICO EM PACIENTES PORTADORES DE  
CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA PRÉ-TRANSPLANTE CARDÍACO**

**BRASÍLIA**

**2019**



**FERNANDA GUIMARÃES DE ALENCASTRO**

**VICTOR COSTA WICHROWSKI**

**BIOMARCADORES DE PERFIL PROTEICO EM PACIENTES PORTADORES DE  
CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA PRÉ-TRANSPLANTE CARDÍACO**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e  
Pesquisa.

Orientação: Profa. Dra. Aline Maria Araújo Martins

**BRASÍLIA**

**2019**

**BIOMARCADORES DE PERFIL PROTEICO EM PACIENTES PORTADORES DE CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA PRÉ-TRANSPLANTE CARDÍACO**

**Fernanda Guimarães de Alencastro – UniCEUB, PIC, aluno bolsista**  
*fealencastro@sempreceub.com*

**Victor Costa Wichrowski– UniCEUB, PIC**  
*victor.wichrowski@gmail.com*

**Aline Maria Araújo Martins – UniCEUB, professor orientador**  
*alinemartins@ceub.edu.br*

**Raphaela Menezes de Oliveira – UnB, colaboradora**

**Diego Viana Paiva – UnB, colaborador**

**Mariana Barbosa Ubaldo Paiva – UnB, colaboradora**

**Mickaella Michelson Martins – UnB, colaboradora**

**Fernando Antibas Atik – ICDF, colaborador**

## RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de alta prevalência, com altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo a doença de Chagas (DC) a sua terceira maior causa no Brasil. Para insuficiência cardíaca refratária, o transplante cardíaco é reconhecido como opção curativa, na ausência de contraindicação. O prognóstico pós-transplante de IC pacientes por DC, porém, é pior do que outras causas e ainda não se sabe conhece bem o porquê e sua patogenicidade. O objetivo é identificar marcadores de perfil proteico plasmático e tecidual associados à patogênese da IC, com foco em DC. O método envolve coleta de amostras de plasma e miocárdio de pacientes de cardiomiopatia dilatada por DC (grupo patológico), por causa idiopática e isquêmica (controle positivo) e pacientes não doentes (controle negativo), cujos materiais são analisados por espectrometria de massa, processados em bioinformática (PeaksX) e as informações finais cruzadas com bases de dados universais (UniProt/SWISS-PROT e UniProt/TrEMBL). A amostra contém 15 pacientes cujo perfil clínico-epidemiológico é de 21,4% de chagásicos, com idade média de 62,6 anos, 63,3% masculino, 50% em NYHA III e 85,7% com fração de ejeção de ventrículo esquerdo reduzida abaixo de 40%. Resultados iniciais do piloto indicam a presença de 119 proteínas na amostra de tecido e 47 na de plasma. Destas, 5 foram observadas em ambas: haptoglobina, cadeia beta e alfa de fibrinogênio, proteína ligante secretora de esperma do epidídimo e serotransferrina. A tarefa de identificação de proteínas foi cumprida, devendo ser continuada futuramente e permitindo pesquisas futuras para compreensão da função dessas cadeias na patogênese da IC por DC. Este trabalho é parte de um projeto maior em parceria com a Universidade de Brasília e o Instituto do Coração do Distrito Federal e terá continuidade de coletas e análises para aprofundamento.

**Palavras-Chave: Insuficiência cardíaca. Doença de Chagas. Proteômica.**

## Sumário

INTRODUÇÃO .....	6
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
METODOLOGIA .....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÕES .....	18
REFERÊNCIAS.....	19

## INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de alta prevalência, considerada uma pandemia global, afetando aproximadamente 26 milhões de pessoas no mundo [1]. No Brasil, a doença representa a causa mais frequente de internação por doença cardiovascular e mais de 240 mil novos casos são diagnosticados anualmente [2]. As taxas de mortalidade e morbidade são igualmente altas [3,4]. Apesar dos avanços atuais em técnicas diagnósticas e a instituição de tratamentos mais efetivos que melhoram a evolução, a incidência não diminuiu e o prognóstico permanece reservado, principalmente nas fases avançadas da doença [5], atingindo taxa de mortalidade anual de 30% a 50% para os pacientes mais graves [6]. Para aqueles que evoluem para insuficiência cardíaca refratária, o transplante cardíaco é reconhecido como opção curativa, na ausência de contraindicação.

Dentre as causas de IC, a Doença de Chagas (DC) corresponde à terceira causa no Brasil e a primeira em regiões endêmicas [7,8,9] representando um grande problema de saúde pública na América Latina, onde se estima uma prevalência de oito milhões de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, o protozoário causador da doença [10]. A progressão para a forma cardíaca, denominada cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), ocorre aproximadamente entre 10 a 30 anos após a infecção aguda e compromete cerca de 20 a 40% dos infectados [11,12]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de dois milhões de indivíduos sejam portadores de CCC [13, 14] com mortalidade anual de pacientes ambulatoriais de cerca de 4%.

A morte súbita é um problema de grande magnitude, uma vez que ocorre entre 55% a 65% dos casos, enquanto IC progressiva responde por 25 a 30% e fenômenos tromboembólicos por 10 a 15% [15, 16]. Assim, a natureza essencialmente arritmogênica da cardiopatia chagásica crônica e a evidência de que certos tipos de arritmias, sobretudo as arritmias ventriculares complexas, predispõem à morte súbita, motivam buscas por medidas profiláticas e terapêuticas, medicamentosas ou não, aumentando os custos de saúde pública para esta doença tão prevalente [17]. A relevância da cardiomiopatia chagásica crônica não se restringe apenas às áreas endêmicas, sendo um problema mundial diante das populações migrantes e da globalização [18]. Imigrantes infectados transferem a infecção por meio da transfusão de sangue ou doação de órgãos [19,20], razão pela qual existe em vigor a recomendação da Sociedade Internacional de Transplante Cardiopulmonar (ISHLT) de que protocolos para a detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes candidatos e para a vigilância após o transplante em todos centros de transplante [21].

Por se tratar de uma infecção sistêmica crônica, por muito tempo a CCC foi considerada contraindicação ao transplante cardíaco por causa do risco de recorrência da doença com a

imunossupressão. Com a experiência latino-americana bem-sucedida nos anos de 1980, atualmente a etiologia chagásica já representa a terceira indicação mais comum para transplante [22], respondendo por 18% dos casos de IC refratária no Brasil, país onde foi realizado o primeiro transplante cardíaco ortotópico com CCC e que é referência no transplante cardíaco na Doença de Chagas, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo [23].

Todavia, apesar do avanço da medicina nessa área, o paciente com cardiomiopatia chagásica continua sendo um grande desafio na prática clínica diária, uma vez que esta etiologia de IC prescinde de ensaios clínicos relevantes, diferentemente do que ocorre na cardiomiopatia de etiologia isquêmica (CMI) e dilatada idiopática (CMD), além de se haver uma tendência recente de se analisar mais elementos moleculares proteicos do parasita chagásico do que da clínica médica em si [24,25]. Portanto, este projeto de pesquisa desenvolve-se com a premissa da determinação e quantificação de marcadores de perfil proteico total do processo de remodelamento cardíaco em pacientes chagásicos em comparação com pacientes de cardiomiopatia dilatada idiopática (controle positivo).

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

Na população com IC avançada, aos candidatos a transplante cardíaco são reconhecidos alguns marcadores clínicos e hemodinâmicos considerados de pior prognóstico, a saber: *i)* baixo débito cardíaco, *ii)* congestão refratária, *iii)* insuficiência renal, *iv)* terceira bulha persistente e *v)* hipotensão arterial [24]. Além destes, a etiologia da cardiopatia parece influenciar na evolução dos pacientes na fase avançada de IC [26]. Em comparação às demais cardiopatias em fase final de evolução, a cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a de pior prognóstico [25-30].

Em várias séries observacionais sobre o tema, quando se compara a evolução clínica dos pacientes com cardiomiopatia chagásica com a dos portadores de outras cardiomiopatias (isquêmica, dilatada, hipertensiva, alcoólica), os chagásicos têm pior desfecho [26][27]. Apesar de mais jovens, estes pacientes apresentam menor pressão arterial sistólica e mortalidade maior em 25 meses, o que torna a etiologia chagásica um marcador independente de mau prognóstico com razão de risco de 2,75 [30].

Não obstante, ao se analisar o comportamento clínico dos pacientes submetidos à terapia de ressincronização cardíaca, por exemplo, os pacientes com CCC apresentam taxa significativamente maior de hipocinesia do ventrículo direito, necessidade de estimulação cardíaca artificial e risco de óbito três vezes maior comparados com as outras cardiopatias no mesmo estágio de insuficiência cardíaca [13]. Identifica-se nos chagásicos alta frequência de

processos arrítmicos e estes parecem refletir a patogênese da doença. A presença de focos confluentes de fibrose intermediados por infiltrado mononuclear disseminado pelo miocárdio; isquemia miocárdica secundária às alterações no tônus microvascular de pequenas artérias coronarianas e disfunções autonômicas intracardiácas (levando à hiperatividade simpática) predis põem a múltiplos focos de reentrada, promovendo instabilidade elétrica e o aparecimento de arritmias. De fato, estes pacientes costumam manifestar as primeiras arritmias malignas mais precocemente do que os pacientes não chagásicos e necessitam em maior monta de cardioversão elétrica para encerrarem os processos arrítmicos [27]. Além disso, a sobrevida na CCC comparativamente à cardiomiopatia dilatada se manteve menor, independentemente de outros parâmetros clínicos e ecocardiográficos relacionados a um mau prognóstico na insuficiência cardíaca, como classe funcional da *New York Heart Association* (NYHA); fração de ejeção do ventrículo esquerdo; função ventricular direita e volume atrial esquerdo [30].

Uma visão mais detalhada da insuficiência cardíaca do ponto de vista fisiopatológico e, principalmente molecular, permite a inferência de que a doença não parece ser apenas secundária à lesão miocárdica ou à sobrecarga de volume ou altas pressões intracardiácas, mas, sim, ser o resultado final de uma complexa interação entre genética, ativação neuro-hormonal, inflamatória e bioquímica, cujas alterações atuam sobre o miócito, o interstício cardíaco ou ambos [31]. É sabido que um número crescente de enzimas, hormônios, substâncias biológicas e outros marcadores de estresse cardíaco, coletivamente denominados como biomarcadores, estão presentes em estudos sobre este tema: marcadores *i)* inflamatórios (proteína C reativa, fator de necrose tumoral alfa, Fas (APO-1), interleucina 1, 6 e 18); *ii)* estresse oxidativo (lipoproteínas de baixa densidade, mieloperoxidase); *iii)* remodelamento extracelular (metaloproteinases, pró-colágeno tipo 1), neuro-hormônios (noradrenalina, aldosterona, renina, angiotensina II, vasopressina, endotelina); *iv)* lesão de miócito (troponina I e T, miosina de cadeia pesada, fração MB da proteína creatina quinase); *v)* estresse de miócito (peptídeo natriurético cerebral – BNP e pró-BNP, adrenomedulina, ST2) e *vi)* novos marcadores (adiponectina, galectina).

Apesar deste progresso na imersão da patogênese da IC, o número de terapias cardiovasculares efetivas e as ações terapêuticas viáveis permanecem limitadas. O número de biomarcadores cardiovasculares úteis com aplicabilidade clínica é ainda menor. Neste cenário, o destaque é o BNP, que mostrou se tratar de um acurado preditor de sobrevida em pacientes com insuficiência cardíaca, apresentando correlação linear de seus níveis com o de mortalidade intrahospitalar, sendo útil na estratificação de risco de pacientes com insuficiência cardíaca crônica [31]. Entretanto, estes são resultados de estudos com pacientes com miocardiopatia dilatada e, especificamente na CCC, uma vez mais, os dados literários são



escassos e não há, até o momento, conclusões definitivas referentes a esta afecção especificamente.

Neste cenário, a análise proteômica sérica (plasmática) associada à análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de pacientes em fase avançada da miocardiopatia chagásica crônica pode permitir um melhor entendimento sobre a fisiopatologia e biopatogênese da doença, por um método não invasivo. A composição do cenário molecular não se restringe ao conteúdo plasmático, mas também envolve os componentes de tecido, sendo importante considerar a análise e a relação entre as proteínas de ambos esses sítios [32]. Ao se realizar uma comparação direta entre o perfil de proteínas totais em pacientes chagásicos com o perfil dos portadores de IC de outras etiologias, espera-se gerar entendimento sobre os eventos moleculares que levam ao pior desfecho clínico na cardiopatia chagásica em comparação às demais, ainda que sejam preenchidos os mesmos critérios para insuficiência cardíaca refratária, com indicação de transplante.

## **METODOLOGIA**

### **Pacientes participantes**

Os pacientes participantes da pesquisa são portadores de insuficiência cardíaca (IC) refratária de etiologia chagásica (CCC), dilatada idiopática (CDIC) e isquêmica (CIC) seu controle negativo que são doadores de órgão cardíaco (doadores com morte tronco-cefálica, segundo critérios estabelecidos pelo Decreto nº 9.175, de 18 de outubro de 2017 que Regulamenta a Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997), encaminhados para transplante cardíaco no Serviço de Cirurgia Cardíaca do Instituto de Cardiologia do Distrito Federal (ICDF), localizado em Brasília, Brasil.

Para participarem desta pesquisa, todos os pacientes na fila de transplante que preencheram os critérios da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e podem, a qualquer momento, se desvincular do projeto se assim o desejarem, sem qualquer ônus, com garantia de sigilo das informações e privacidade do sujeito. Todos receberam esclarecimentos quanto aos objetivos e riscos do estudo, cientes da inexistência de custos financeiros adicionais referentes aos procedimentos para os participantes.

A pesquisa está registrada na Plataforma Brasil e com autorização via parecer consubstanciado do CEP segundo o registro CAAE: 13158619.7.0000.0026, vinculado aos conformes do comitê de ética do próprio ICDF.

### **Critérios de inclusão:**

Para inclusão neste estudo, os pacientes devem ser portadores de insuficiência cardíaca (IC) em fase avançada refratária ao tratamento clínico com indicação de transplante cardíaco. Foram formados três grupos para análise: *i*) grupo composto por portadores de cardiomiopatia chagásica crônica (grupo patológico), *ii*) grupo composto por portadores de cardiomiopatia dilatada idiopática e isquêmica (controle positivo) e *iii*) grupo composto por doadores do órgão, não patológicos (controle negativo).

**Crítérios de exclusão:**

Os sujeitos excluídos desta pesquisa são aqueles que apresentam contraindicações ao transplante cardíaco, a saber: *i*) resistência vascular pulmonar fixa > 5 Wood, mesmo após provas farmacológicas; *ii*) doenças cerebrovascular e/ou vascular periférica graves; *iii*) insuficiência hepática irreversível; *iv*) doença pulmonar grave; *v*) incompatibilidade ABO na prova cruzada prospectiva entre receptor e doador; *vi*) doença psiquiátrica grave, dependência química e não aderência às recomendações da equipe.

A Tabela 1 relaciona os pacientes participantes pela etiologia, classe funcional da doença e fração de ejeção no momento da última consulta ambulatorial no Instituto de Cardiologia do Distrito Federal (ICDF) antes do transplante para que possamos compreender o comprometimento que foi alcançado pela insuficiência cardíaca daqueles pacientes.

<b>Tabela 1. Perfil dos pacientes portadores de insuficiência cardíaca participantes do projeto</b>						
<b>Paciente</b>	<b>Transplante</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Etiologia</b>	<b>Classe Funcional</b>	<b>Fração de ejeção</b>
<b>IMS</b>	<b>13/09/2017</b>	<b>62</b>	<b>Masculino</b>	<b>Isquêmica</b>	<b>III</b>	<b>29,26%</b>
<b>FAP</b>	<b>15/10/2017</b>	<b>55</b>	<b>Masculino</b>	<b>Chagásica</b>	<b>IV</b>	<b>15,23%</b>
<b>JN</b>	<b>16/11/2017</b>	<b>20</b>	<b>Feminino</b>	<b>Dilatada idiopática</b>	<b>III</b>	<b>32%</b>
<b>JAS</b>	<b>29/11/2017</b>	<b>66</b>	<b>Masculino</b>	<b>Dilatada idiopática</b>	<b>IV</b>	<b>30,16%</b>
<b>FEN</b>	<b>27/12/2017</b>	<b>15</b>	<b>Masculino</b>	<b>Dilatada idiopática</b>	<b>II</b>	<b>-</b>

DRS	26/01/2018	65	Masculino	Chagásica	III	25%
GSS	14/02/2018	23	Feminino	Dilatada idiopática	I	21,61%
CRG	27/02/2018	57	Masculino	Isquêmica	III	25%
JVS	27/02/2018	63	Masculino	Isquêmica	III	24%
MGB	26/04/2018	51	Feminino	Dilatada idiopática	IV	29%
RSB	07/05/2018	64	Feminino	Idiopática	III	34%
EJR	08/05/2018	38	Feminino	Dilatada idiopática	IV	19%
IJR	02/10/2018	41	Masculino	Dilatada idiopática	-	-
JDR	19/12/2018	68	Masculino	Chagásica	III	32%

### Preparo das amostras e extração

As amostras de biópsia e plasma foram lisadas em 8M ureia contendo coquetel completo de inibidores de proteases (Roche) e de fosfatases (Roche). O extrato proteico foi precipitado com acetona 100% a 4°C, ressuspendido em tampão 100mM bicarbonato de amônio (ABC) em 8M ureia, reduzido com 20mM DTT por uma hora, alquilado com 40mM IAA por no mínimo uma hora no escuro para serem digeridos. No dia seguinte, a solução foi diluída quatro vezes com 100mM ABC e foi adicionado tripsina modificada (Promega) na proporção 1:50 e incubados por mais 3 horas. Em seguida as amostras foram acidificadas com concentração final de TFA igual a 0,1% (v:v) e dessalinizadas em microcolunas *home made* de resina de fase reversa C18.

### Análise por LC-MS/MS e bioinformática

As amostras foram analisadas com um sistema UHPLC-nano (Dionex) acoplado *online* com um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (ThermoScientific). Precisamente 6µg de proteína total extraída a partir do volume inicial de amostra foram carregados em uma coluna PepSwift Monolithic TrapColumn de 5cm (diâmetro interno de 200µm, Dionex-

nanoViper) e separadas em uma coluna analítica de alta resolução PepSwift Monolithic Nano Column de 25cm (diâmetro interno de 100µm, Dionex-nanoViper) e eluídas usando um gradiente de 100% fase A (0.1% ác. fórmico) até 26% fase B (0.1% ác. fórmico, 95% acetonitrila) por 180 min, 26% até 100% fase B por 5 min e 100% fase B por 8 min (um total de 193 min a 200 nL/min). Após a corrida, a coluna lavada com 90% fase B e reequilibrada com fase A.

Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo aplicando-se *data-dependent automatic survey MS scan* e aquisição de espectros de massas em tandem (MS/MS). Cada MS no Orbitrap (amplitude de massa: m/z 350-1800 e resolução: 120000) é seguida por MS/MS dos vinte íons mais intensos no LTQ. A fragmentação no LTQ ocorreu por dissociação de alta energia induzida por colisão (HCD) e as seqüências de íons selecionados serão excluídas dinamicamente por 15 segundos.

O processamento dos dados foi feito com Proteome Discoverer v.1.3 beta (Thermo Scientific). A busca e identificação das proteínas também foi realizada pelo programa Proteome Discoverer e *software* Peaks, com algoritmo Mascot v.2.3 contra um banco de dados de *Homo sapiens* instalado no servidor do laboratório, usando a ferramenta *Database on Demand* (Reisinger & Martens 2009) contendo as proteinases encontradas no UniProt/SWISS-PROT e UniProt/TrEMBL.

As buscas foram feitas com os seguintes parâmetros: precisão no MS de 10ppm, no MS/MS de 0.05Da, até 2 sítios de clivagem perdidos, carbamidometilação de cisteínas como modificação e oxidação da metionina e acetilação N-terminal das proteínas como modificações variáveis. O número de proteínas, grupo de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com uma taxa de detecção de falsos positivos (FDR) menor que 1% e peptídeos com *rank* 1 e mínimo de 2 peptídeos por proteínas serão aceitos para identificação com Proteome Discoverer. O esquema resumido do método está disposto na Figura 1.

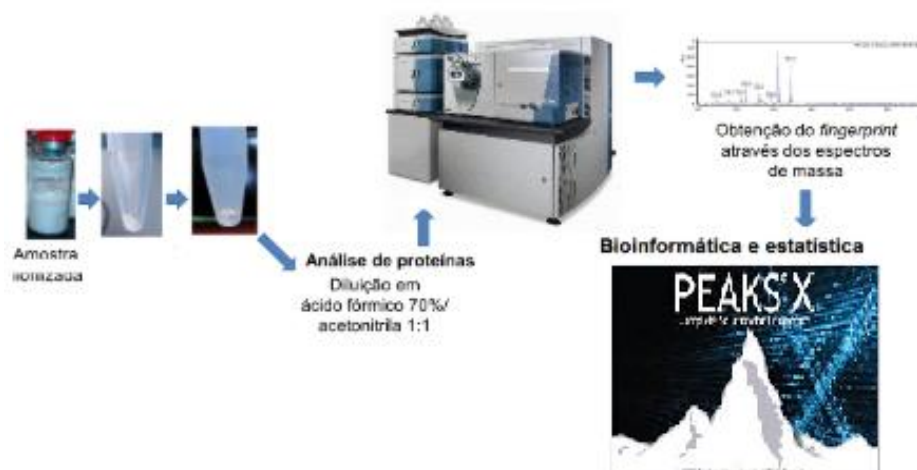


Figure 1. Fluxo de preparo de amostras e análise para o fingerprinting por espectrometria de massas por Orbitrap.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em análise preliminar dos dados obtidos, constata-se que a idade média dos pacientes é de 49,14 anos, sendo a mediana 56 anos e o desvio-padrão de 18,5 anos. Porém, ao se considerar a relação etária com as patologias de base para o transplante cardíaco, tem-se que a média dos pacientes chagásicos é de 62,6 ( $\mp$  6,8) anos de idade, para pacientes de isquemia é 60,6 ( $\mp$  3,2) anos e, em cardiopatia dilatada idiopática, 39,75 ( $\mp$  19,6) anos. Com isso, percebe-se que há maior variedade de idade de pacientes transplantados por etiologia dilatada idiopática, enquanto que a doença de Chagas e a isquemia estão relacionadas a uma população mais próxima de 60 anos, com menor variação.

Quanto à distribuição por sexo, o *Gráfico 1* ilustra tal proporção dos pacientes do estudo. Em contrapartida ao I Registro Brasileiro de Insuficiência Cardíaca (2015) que demonstrou a prevalência maior da doença em mulheres (60%), a amostra do presente estudo tem predomínio de pacientes do sexo masculino (63,3%).

O *Gráfico 2* classifica os pacientes participantes do estudo de acordo com a etiologia da insuficiência cardíaca. Destaca-se o fato de apenas 21,4% expressar fenótipo de doença de Chagas em comparação à grande porcentagem de pacientes cuja etiologia dilatada idiopática. Dessa forma, justifica-se novamente a necessidade da continuidade do trabalho para que se obtenha uma amostra maior de pacientes que se encaixem no padrão chagásico.

**Gráfico 1. Classificação dos pacientes de acordo com o sexo**

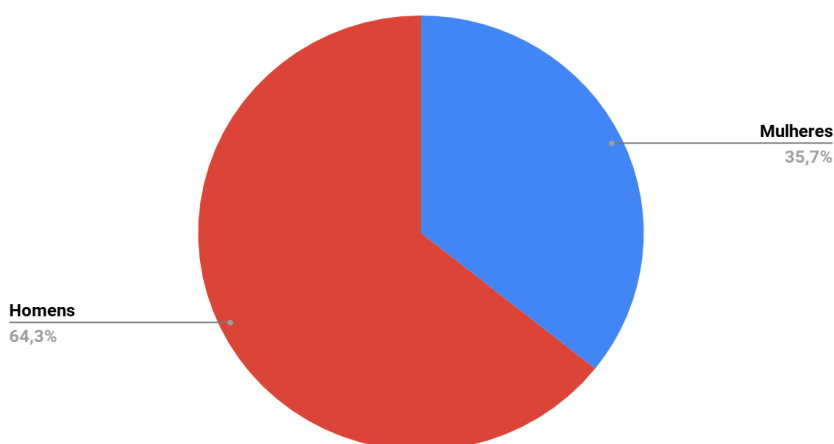
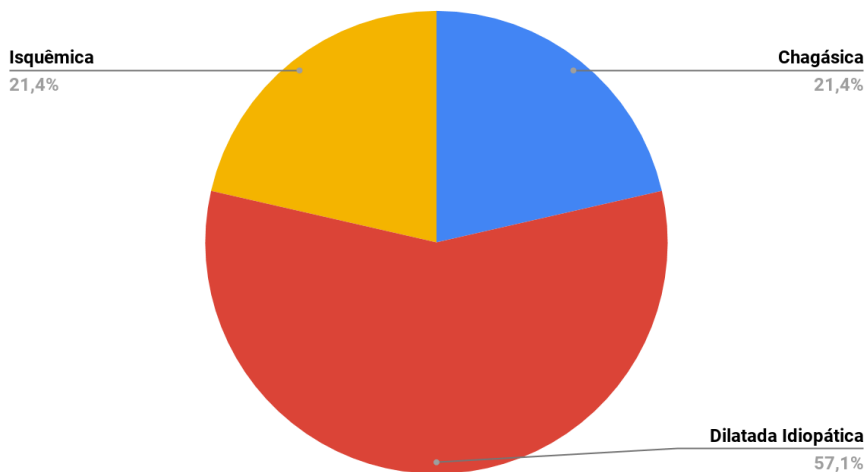
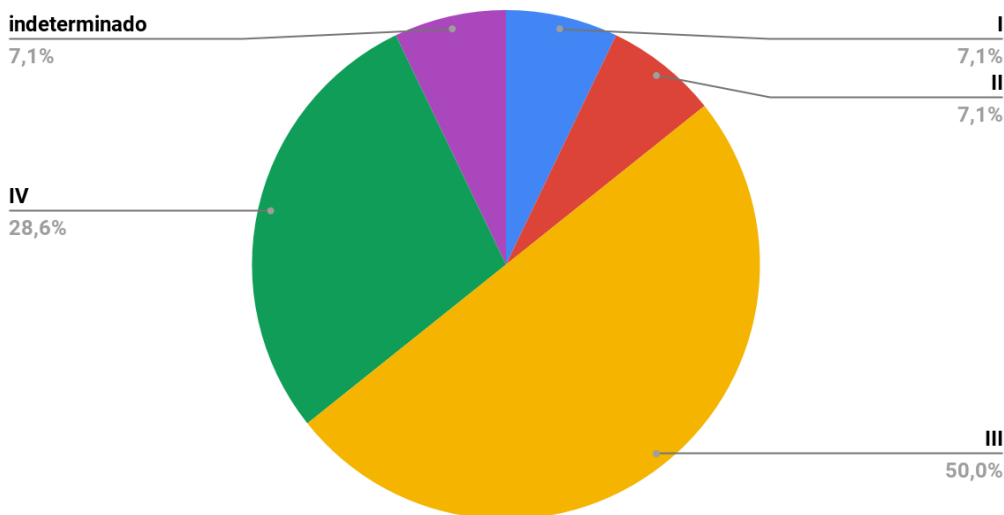


Gráfico 2. Classificação dos pacientes de acordo com a etiologia da Insuficiência cardíaca.



O Gráfico 3 separa os pacientes de acordo com a classe funcional da insuficiência cardíaca de acordo com a *New York Heart Association (NYHA)*. Com predomínio das classes III e IV (representando, juntas 78,6% da amostra), indicando um maior nível de gravidade na doença que levou à necessidade da realização de transplante cardíaco.

Gráfico 3. Classificação dos pacientes de acordo com a classe funcional da insuficiência cardíaca

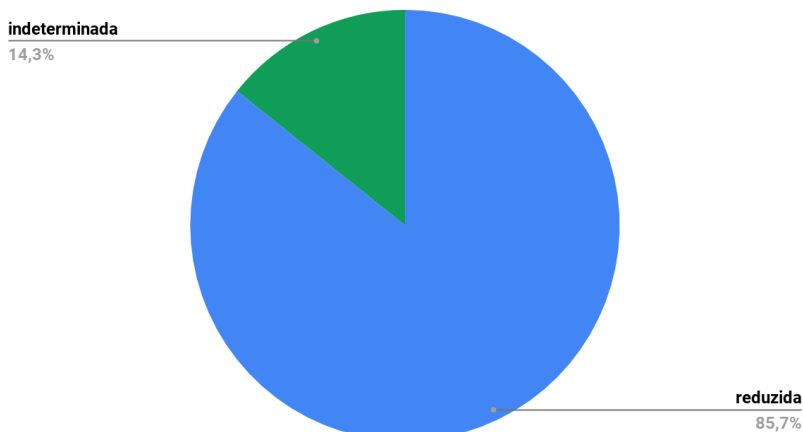


O Gráfico 4 classifica os pacientes de acordo com a intensidade da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). A Sociedade Europeia de Cardiologia (*ESC*) utiliza os seguintes parâmetros para a caracterização da preservação da fração de ejeção na insuficiência cardíaca:

FEVE preservada	FEVE de médio alcance	FEVE reduzida
> 50%	40-49%	< 40%

A partir dessa referência, pode-se notar que a FEVE de todos os pacientes em que foi determinada pela equipe médica do ICDF é reduzida, corroborando para a necessidade do transplante, visto que níveis reduzidos da fração de ejeção levam ao baixo débito cardíaco e menor perfusão tecidual, prejudicial à homeostase do paciente.

Gráfico 4. Classificação dos pacientes de acordo com a FEVE.



Quanto à análise do conteúdo proteômico do material biológico dos participantes, foi realizado, até a elaboração deste relatório, um piloto do perfil proteico plasmático e tecidual do paciente ISM, o qual é um controle positivo (insuficiência cardíaca classe funcional III, fração de ejeção 29,26%). Vale observar que o presente trabalho faz parte de uma pesquisa maior, independente da instituição. Dessa forma, foi planejado para duração de pelo menos dois anos para que o *n* de amostras colhidas seja o maior possível. Sendo assim, ainda está em fase de coleta e análise de mais dados, em relação ao projeto amplo.

A análise das amostras do piloto seguiu o plano metodológico apresentado, tendo sido processadas no espectrômetro e software de bioinformática *Peaks X*. Foram encontradas 119 proteínas na amostra tecidual e 47 na amostra de plasma. Destas, apenas 5 foram observadas em ambas. São elas haptoglobina (HP), cadeia beta e alfa de fibrinogênio (FGB e FGA), proteína ligante secretora de esperma do epidídimo (HEL-S-78p) e serotransferrina (TF).

A haptoglobina captura e combina a hemoglobina que é acumulada no rim, permitindo reciclagem hepática do grupo heme e prevenindo dano renal. Através de mecanismos moleculares como regulação negativa da atividade da oxidoreductase e do processo catabólico de peróxido de hidrogênio além da endocitose receptor-mediada (células de Kupffer), age como antioxidante, tem atividade antibacteriana e desempenha um papel na modulação de respostas inflamatórias de fase aguda.

As cadeias alfa e beta de fibrinogênio são monômeros que foram clivados pela trombina. Juntas, polimerizam para formar uma matriz de fibrina insolúvel, que é um dos principais componentes dos trombos, estabilizando lesões em estágios primários, além de guiar a migração celular durante a reepitelização e induzir agregação e degranulação plaquetária aumentando expressão de SELP em plaquetas ativadas. Além disso, modula resposta inflamatória celular a interleucina 1 e regula negativamente o processo de apoptose celular no endotélio por via extrínseca, protegendo contra a disfunção endotelial.

A proteína ligante secretora de esperma do epidídimo sinaliza ligação de receptores na resposta inflamatória da célula a IL-1, ativação plaquetária e polimerização de proteínas.

A serotransferrina é uma proteína transmembrana transportadora ligante de ferro, através da ligação a dois íons  $Fe^{3+}$  e um ânion (geralmente bicarbonato). Transporta ferro de sítios de absorção e degradação de grupo heme para sítios de armazenamento e utilização. Além de estar envolvida na proliferação celular, organização da membrana celular, regulação positiva de endocitose mediada por receptores, modificação proteica e regulação da sua estabilidade pós-translacional.

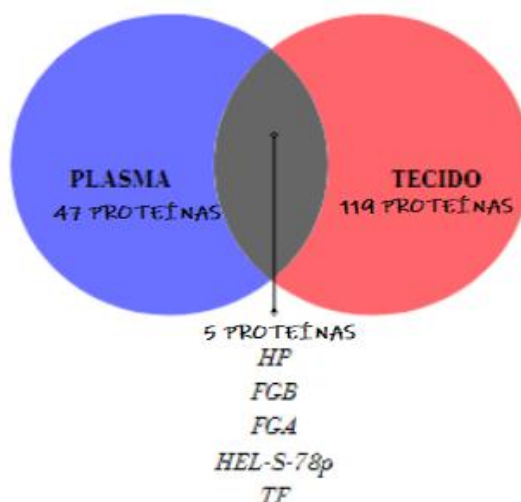


Figure 2 Diagrama de Venn comparando amostras isoladas e suas proteínas com comum.



Chama a atenção o diminuto número de proteínas em comum entre os dois materiais biológicos (figura 2) e para o fato de que não são marcadores específicos para, até onde se sabe até então, a patogênese da insuficiência cardíaca, mais relacionados a inflamação, função plaquetária e endotelial. Todavia, ressalta-se a importância da coleta tanto de plasma quanto de fragmentos de tecido miocárdico para uma análise proteômica mais ampla e completa, que abrange um número maior de possíveis biomarcadores relevantes. Caso fosse optado pela coleta de apenas um tipo de amostra, dezenas de proteínas potencialmente mais específicas e úteis não seriam consideradas.

Observa-se que, dentre as aqui referidas proteínas de intersecção entre os conteúdos plasmático e tecidual, nenhuma foi idêntica às já enumeradas na literatura [25, 31]. Entretanto, observa-se que há proximidade entre alguns elementos gerais de funcionalidade, como o componente de estresse oxidativo (haptoglobina) e de remodelamento extracelular (cadeias alfa e beta de fibrinogênio) [31].

Na realização do STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) demonstrador das interações funcionais entre as proteínas listadas, pode-se perceber o contraste da riqueza analítica especialmente da amostra de tecido (*Figura 3*) em contraste com a análise das proteínas plasmáticas (*Figura 4*) e das comuns (*Figura 5*).

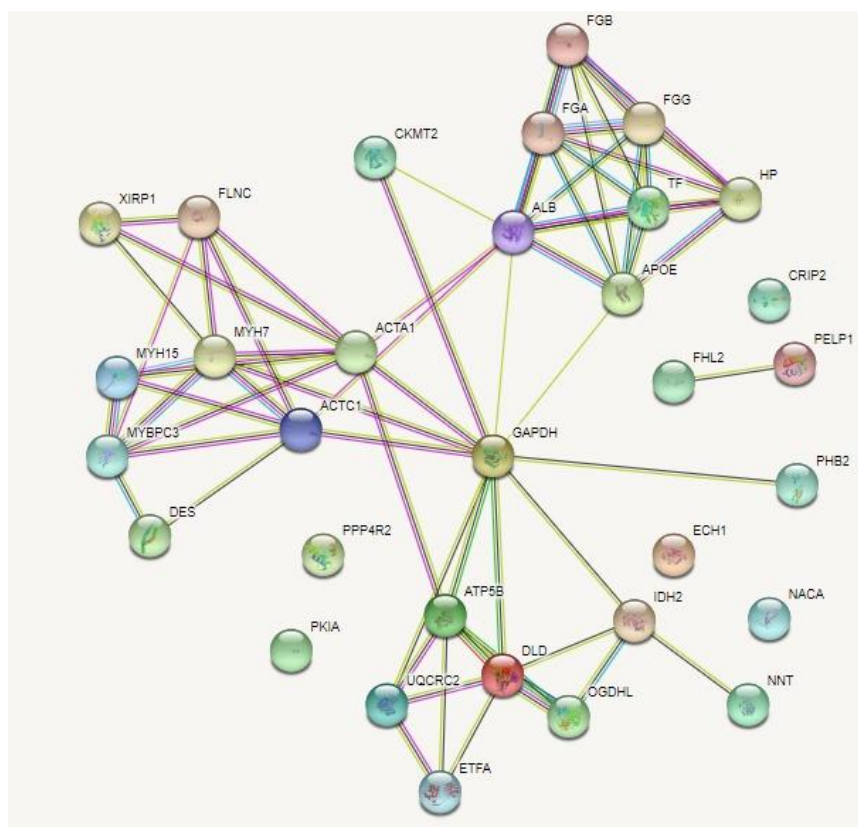


Figure 3. STRING das proteínas encontradas no tecido miocárdico.

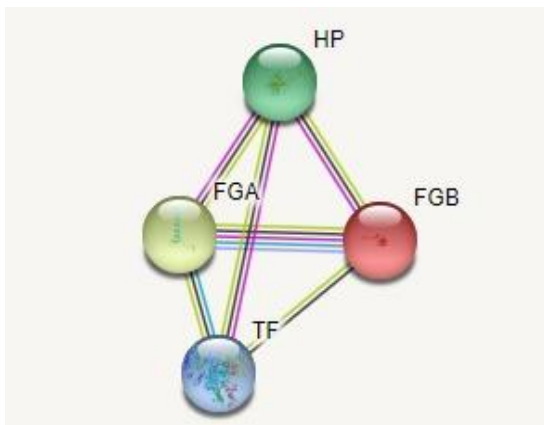


Figure 5. STRING das proteínas encontradas no plasma.

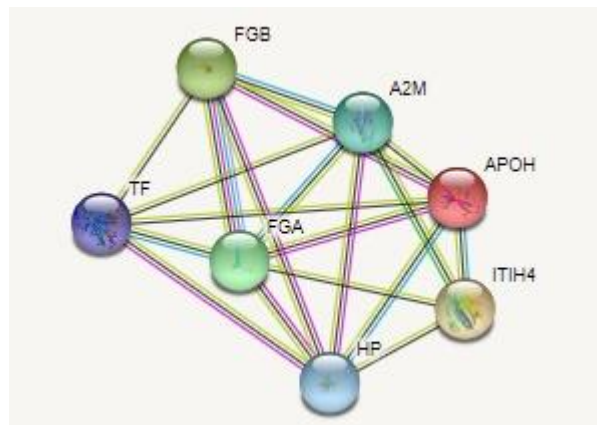


Figure 4. STRING das proteínas em comum entre plasma e tecido.

## CONCLUSÕES

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de alta prevalência, com altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo a doença de Chagas a sua terceira maior causa no Brasil [1-4]. Para insuficiência cardíaca refratária, o transplante cardíaco é reconhecido como opção curativa, na ausência de contraindicação [5, 21-23] e, frente ao total dos transplantes acompanhados neste estudo, de fato representam 21,42% da amostra. Ainda são insipientes pesquisas que corroboram os biomarcadores de cardiopatias de insuficiência [31,32], porém neste estudo também se constata a presença de novas proteínas correlacionadas, indicando seu potencial investigativo.

A partir do modelo de representações de relação STRING, percebe-se que os vínculos entre as proteínas encontradas são íntimos. Com isso se tem a sugestão de que são estruturas relevantes para a composição do tecido miocárdico lesado e as referidas proteínas plasmáticas, o que pode indicar o potencial de se descobrir biomarcadores associados à patogênese da insuficiência cardíaca de cardiomiopatia dilatada. Contudo, apenas amostra de controle foi processada inicialmente, sem se poder dessa forma confirmar o mapeamento completo do desenvolvimento da patologia chagásica.

De toda forma, para fazer uma construção substancial da moléstia já se conseguiu reunir dados e materiais de uma boa amostra de pacientes no Distrito Federal. Em suma, o perfil epidemiológico é predominantemente masculino, com sinais de gravidade de ICC chagásica por volta dos 60 anos (transplantados), sendo o agravamento dos quadros relacionado à diminuição da FEVE (<40%), corroborando a necessidade de transplante.

Este estudo, portanto, mais do que fechar verdades, abre portas para estudos futuros, não só para a continuidade do mesmo projeto com os demais dados a serem analisados em breve, mas permitindo a exploração de novas vertentes a fim de corroborar ou descartar as relações de biomarcadores aqui sugeridas. A conclusão desta pesquisa neste momento é a

evidência de presença de proteínas, a partir de dados iniciais uma população selecionada, que sugestivas de marcadores cuja função na patogênese da insuficiência cardíaca por cardiomiopática dilatada chagásica. Cumpre-se então o objetivo de premissa (determinar e quantificar esses elementos proteicos), ainda com abertura a mais aprofundamentos.

## REFERÊNCIAS

1. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review*. 2017;3(1):7-11.
2. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, e cols. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol* 2009;93(1 supl.1):1-71.
3. Tu JV, Nardi L, Fang J, Liu J, Khalid L, Johansen H. National trends in rates of death and hospital admissions related to acute myocardial infarction, heart failure and stroke, 1994-2004. *CMAJ* . 2009. 180: E118-E125.
4. Areosa et al Evaluation of HF prognostic factors in patients referred for heart transplantation. *Arq. Bras. Cardiol*. 2007; 88(6):590-595.
5. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Joacobsen SJ. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004; 292:344-350.
6. Muntwyler J, Abetel G, Gruner C, Follath F. One-year mortality among unselected outpatients with heart failure. *Eur Heart J*. 2002; 23: 1861-6.
7. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Al- buquerque D, Rodrigues D, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *ArqBrasCardiol*. 2012 ;98(1 supl 1):1-33.
8. Bestetti RB, Theodoropoulos TA, Cardinali-Neto A, Cury PM. Treatment of chronic systolic heart failure secondary to Chagas heart disease in the current era of heart failure therapy. *Am Heart J*. 2008;156(3):422-30.
9. Nogueira PR, Rassi S, Corrêa K de S. Epidemiological, clinical e therapeutic profile of heart failure in a tertiary hospital. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(3):392-8.
10. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375: 1388-402.

11. Garg NJ, Soman KV, Zago MP, Koo S-J, Spratt H, Stafford S, et al. Changes in Proteome Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chronic Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* . 2016. Vol10(2): e0004490.
12. Martinelli Filho M, Peixoto GL, Siqueira SF, Martins SAM, Nishioka SAD, Costa R, Ramires JAF, Kalil Filho R. Cardiac resynchronization therapy in chronic chagasic cardiomyopathy: a good clinical response and the worst prognosis. *Relampa* 2013;26(1):33-8.
13. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Oswaldo Cruz*. 2009; 104(Suppl 1): 152-8.
14. Chagas disease. World Health Organization. (American trypanosomiasis). Jackson, Y., Castillo, S., Hammond, P., Besson, M., Brawand-Bron, A., Urzola, D., Gaspoz, J.-M. and Chappuis, F. (2012), Metabolic, mental health, behavioural and socioeconomic characteristics of migrants with Chagas disease in a non-endemic country. *Tropical Medicine & International Health*, 2010. vol17: 595–603.
15. Pinto Dias JC. Natural history of Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 1995;65:359-66.
16. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007;115:1109-23.
17. Martins-Melo, Francisco Rogerlândio, et al. "Burden of Chagas disease in Brazil, 1990-2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016." *International Journal for Parasitology*. 2019. Vol4(1).
18. Vieira, Jefferson Luis, et al. "Chagas Cardiomyopathy in Latin America Review." *Current cardiology reports* 21.2 (2019): 8.
19. Garraud, O., et al. "Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in non-endemic countries." *Travel medicine and infectious disease*. v.5, n.2 (2007): 110-112.
20. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! Roberto A. Guerri-Guttenberg, Daniel R. Grana, Giuseppe Ambrosio, José Mileil. *European Heart Journal* . 2008. v29, 2587–2591.
21. The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation (ISHLT) listing criteria for heart transplantation: a 10-year update. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Vol 35, No 1, January 2016.

22. Rodolfo D. Benatti, Guilherme H. Oliveira, Fernando Bacal. Heart Transplantation for Chagas Cardiomyopathy. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, June 2017. Vol 36, No 6.
23. Bacal F, Souza-Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes-Braga FG, Mangini S, et al. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *ArqBras Cardiol.* (2009); v.94(1 supl.1).
24. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. *Registro Brasileiro de Transplantes*. Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período de janeiro a setembro de 2018. Ano XXIV Nº 3. 2018. Vol.únic.
25. Acosta, Héctor, et al. "PROTEOMIC ANALYSIS OF GLYCOSOMES FROM *Trypanosoma cruzi* EPIMASTIGOTES." *Molecular and Biochemical Parasitology* . 2019.
26. Mattos, Eliciane C., et al. "Reprogramming of *Trypanosoma cruzi* metabolism triggered by parasite interaction with the host cell extracellular matrix." *PLoS neglected tropical diseases* 2019. V13.2.
27. Silva Christiano Pereira, Del Carlo Carlo Henrique, Oliveira Junior Mucio Tavares de, Scipioni Airton, Strunz-Cassaró Celia, Ramirez José Antonio Franchini et al . Por que os portadores de cardiomiopatia chagásica têm pior evolução que os não-chagásicos?. *Arq. Bras. Cardiol.* 2008; 91( 6 ): 389-394
28. Nunes, Maria Carmo Pereira, et al. "Chagas cardiomyopathy: an update of current clinical knowledge and management: a scientific statement from the American Heart Association." *Circulation*138.12 (2018): e169-e209.
29. Franco, MAM. Uso de CDI em pacientes com cardiomiopatia chagásica: revisão sistemática.Salvador. Tese; UFBA. (2013)
30. da Rocha Araújo, Fátima Derlene, et al. "Prognóstico da Cardiomiopatia Dilatada com Insuficiência Cardíaca Grave de Acordo com Escalas de Classificação Funcional na Infância." *International Journal of Cardiovascular Sciences*31.1 (2018): 12-21.
31. Schirone, Leonardo, et al. "A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling." *Oxidative medicine and cellular longevity* . (2017). Volume 207, Article ID 3920195, 16 p.

32. Loïc. Dayona; Martin, Kussmann. Proteomics of human plasma: A critical comparison of analytical workflows in terms of effort, throughput and outcome. *EuPA Open Proteomics* 2013; 1(8).