



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



Polimorfismo do gene da COX-2 e neuroimagem na doença de Chagas

**Ana Carolina Pereira Ornellas
Prof. Orientador: Jamary Oliveira-Filho**

Tese de Doutorado

Salvador, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Departamento de Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde
Sistema de Bibliotecas da UFBA

O74 Ornellas, Ana Carolina Pereira.
Polimorfismo do gene da COX-2 e neuroimagem na doença de Chagas / Ana Carolina Pereira Ornellas. - Salvador, 2015.
88 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jamary Oliveira Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

1. Insuficiência cardíaca congestiva. 2. Doença de Chagas. 3. Disfunções cerebrais. 4. Polimorfismo genético. 5. Ciclo-Oxigenase 2. I. Oliveira Filho, Jamary. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU: 616.937



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



Polimorfismo do gene da COX-2 e neuroimagem na doença de Chagas

**Ana Carolina Pereira Ornellas
Prof. Orientador: Jamary Oliveira-Filho**

Tese de Doutorado

Salvador, 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

- Argemiro D'Oliveira Junior – UFBA
- Léa Cristina de Carvalho Castelluci – UFBA
- Valeria de Matos Borges – FIOCRUZ
- Walderez Ornelas Dutra – UFMG
- Kenneth Jonh Gollob – Instituto de Ensino e Pesquisa Hospital
Santa Casa-BH

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Ambulatório de Miocardiopatia – AMN
- Instituto de Ciências da Saúde

HOSPITAL ANA NERI

- Ambulatório de ICC

IMAGE MEMORIAL

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Bolsa de Estudo da CAPES

AGRADECIMENTOS

1. Estudantes de Medicina, que fazem parte do grupo de pesquisa, pela colaboração na admissão dos pacientes e realização dos exames cognitivos e revisão de prontuários;
2. Luciana Oliveira, pelo apoio nas atividades realizadas no laboratório;
3. Ao prof. Jmary, pelo apoio e pela confiança depositados em mim;
4. As instituições envolvidas, pela disponibilidade de espaço para admissão dos pacientes;
5. Aos membros da banca examinadora por aceitarem colaborar com nosso estudo;
6. Aos pacientes, que gentilmente colaboraram com esse trabalho;

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------|----|
| Índice de tabelas | 8 |
| Índice de figuras | 9 |
| Lista de abreviaturas | 10 |
| Resumo | 11 |
| I.Introdução | 13 |
| II.Objetivos..... | 15 |
| III.Revisão da Literatura | |
| III.1 Doença de Chagas..... | 16 |
| III.2 Insuficiência Cardíaca..... | 21 |
| III.3 COX-2..... | 23 |
| III.4 Marcadores de Neuroimagem de Disfunção Cerebral..... | 26 |
| IV.Hipótese | 28 |
| V.Material e Métodos | 29 |
| VI.Resultados | 34 |
| VII. Discussão | 42 |
| VII. Conclusão | 47 |
| IX. Summary | 48 |
| X. Referências Bibliográficas | 50 |
| XI. Anexos | 60 |

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características de pacientes com ou sem doença de Chagas 34

Tabela 2: Presença do alelo anormal entre os indivíduos estudados..... 35

Tabela 3: Número de alelos anormais (C) do polimorfismo da COX-2 (rs20417) como preditor para volume cerebral, volume cerebelar e lesão de substância branca 36

Tabela 4: Análise multivariada ajustada para gênero e idade, mostrando o efeito do polimorfismo do gene da COX-2 sobre alterações da ressonância magnética..... 37

Tabela 5: Modelo 2, efeito do gene do polimorfismo do gene da COX-2 (rs20417) e da doença de Chagas sobre o volume cerebral, ajustado para potenciais confundidores..... 38

Índice de figuras

Figura 1: Efeito do polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 sobre o volume cerebral de pacientes chagásicos e não chagásicos 39

Figura 2: Polimorfismo em homozigose (GG e CC) e heterozigose (GC) do gene da COX-2 40

Figura 3: Máscaras do volume intracraniano, cerebelar, cerebral e lesão de substância branca..... 41

Lista de abreviaturas

AVC - acidente vascular cerebral

COX-2 - ciclo-oxigenase 2

IC – insuficiência cardíaca

LSB – lesão de substância branca

PCR – reação em cadeia de polimerase

PGE2 – prostaglandina E2

PTGS2 – prostaglandina endoperoxidase sintase 2

RFLP – polimorfismo de fragment de restrição

RM - ressonância magnética

RESUMO

Introdução: A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública, umas das principais cardiopatias na América do Sul e uma importante causa de acidente vascular cerebral (AVC). A doença de Chagas também é fator de risco para disfunção cognitiva e atrofia cerebral. A enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) é ativada por estímulos inflamatórios como a doença de Chagas e tem papel na aterogênese. A presença do alelo C do polimorfismo do gene da COX-2 tem efeito protetor para doença coronariana e seu papel no AVC ainda é controverso. No presente estudo, o objetivo foi determinar se há associação entre o polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 e doença de Chagas com alterações detectadas na ressonância magnética (RM) cerebral, bem como se a associação do polimorfismo com alterações da RM é modificada pela doença de Chagas.

Métodos: Pacientes de dois ambulatórios de insuficiência cardíaca (IC) sem história clínica de AVC foram recrutados para este estudo. O diagnóstico de IC foi definido pelo médico cardiologista assistente do ambulatório. Amostras de sangue total foram coletadas e o DNA extraído para investigar o polimorfismo rs20417 do gene COX-2. Ressonância magnética foi avaliada de modo cego para dados clínicos quanto ao volume cerebral, volume cerebelar e volume de lesões da substância branca cerebral.

Resultados: 71 pacientes foram estudados, 37 chagásicos e 34 não-chagásicos. A proporção de indivíduos que carregam o alelo C foi de 81% entre os chagásicos e 94% entre os não chagásicos. Ajustado para gênero e idade, o alelo C do polimorfismo apresentou associação significativa com menor volume cerebral ($p=0,039$). Em pacientes chagásicos, o alelo C do polimorfismo

rs20417 esteve associado com maior volume cerebral, enquanto que entre não-chagásicos ele esteve associado com menor volume cerebral ($p=0,028$ para a interação).

Conclusões: O polimorfismo rs20417 da COX-2 não está relacionado com volume cerebelar e lesão de substância branca. O polimorfismo da COX-2 está associado com volume cerebral, estando o alelo C associado com menor grau de atrofia cerebral em chagásicos. Há uma interação significativa entre doença de Chagas e polimorfismo da COX-2 na determinação do volume cerebral.

Palavras chave: 1. Insuficiência cardíaca congestiva; 2. Doença de Chagas; 3. Disfunções cerebrais; 4. Polimorfismo genético 5. COX-2

I. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanossoma cruzi*, um parasito flagelado, adquirido através de um inseto vetor, que provoca sintomas no aparelho vascular e gastrointestinal na sua fase crônica. Esta doença representa uma importante causa de insuficiência cardíaca (IC), acidente vascular cerebral (AVC) e morte nesta região (Aras *et al*,2008).

As doenças cardiovasculares são a maior causa de morbidade e mortalidade mundial. A insuficiência cardíaca (IC) é uma grave complicação de várias dessas doenças, que está aumentando em incidência e prevalência globalmente. A doença cardíaca é considerada o segundo fator de risco mais importante para o AVC, com frequência de 42% para o AVC isquêmico (Azevedo *et al*, 2008).

O polimorfismo -765G>C do gene da cicloxigenase tipo 2 (COX-2), também chamado rs20417, está associado com maior risco de AVC isquêmico em diversas populações (Cipollone *et al*,2004; Lohmussaar *et al*, 2005; Zee *et al*, 2006; Zuniga *et al* 2005). Estudos sobre esse polimorfismo ainda são contraditórios. Enquanto alguns estudos revelam uma associação protetora, mostrando que o alelo C pode ter efeito protetor contra eventos clínicos, outros estudos, como o de Kohsaka *et al*,2008, relatam que o polimorfismo rs20417 da COX-2 é um fator de risco para acidente vascular cerebral em afro-americanos.

Recentemente, diversos grupos tem usado a ressonância magnética (RM) para investigar a ocorrência de lesões subclínicas em populações (Braskie et al, 2014 e Bolandzadeh et al, 2012). Biomarcadores na RM como volumetria cerebral, espessura cortical e volumetria de lesões de substância branca tem sido correlacionadas com maior risco de AVC e disfunção cognitiva. A principal vantagem de usar tais biomarcadores é permitir uma amostra menor para investigar a associação de determinantes de doença com os desfechos de RM, sem a necessidade de um seguimento de longo prazo.

Nesse contexto, usamos os biomarcadores de RM (volumetria cerebral, cerebelar e de lesões de substância branca) como desfechos primários neste estudo, visando investigar dois principais determinantes de doença cerebral: a doença de Chagas e o polimorfismo rs20417 do gene da COX-2.

II. OBJETIVOS

- Determinar se há associação entre polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 e alterações detectadas na ressonância magnética cerebral.
- Determinar se há associação entre a doença de Chagas e alterações detectadas na ressonância magnética cerebral.
- Avaliar se a associação entre o polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 com alterações detectadas na ressonância magnética cerebral é modificada pela doença de Chagas.

III. REVISÃO DA LITERATURA

III.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública e uma das principais cardiopatias na América do Sul e uma importante causa de AVC. É uma infecção aguda que pode evoluir para uma crônica, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitida pelo inseto da família Reduviidae, subfamília *Triatominae* (Kirchoff LV, 1995 ; Del Brutto et al, 2002) e foi descrito pela primeira vez pelo cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas.

A doença de Chagas é endêmica na América Latina, e uma doença emergente na Europa e nos EUA. Aproximadamente 30% dos infectados pelo *T. cruzi* irão desenvolver a fase crônica da doença. Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina e mais de 25 milhões estão em risco de infecção (WHO, 2010). O número anual de mortes é estimado em 10.000 e a taxa de mortalidade de 10 anos podem variar de 9 % a 85 % , dependendo de marcadores clínicos de danos cardíacos (Matta, et al 2012). As formas mais importantes de transmissão da doença de Chagas ainda são as vetoriais (seja via lesão resultante da picada, seja por mucosa ocular ou oral), contudo apresentam também importância epidemiológica a transmissão transfusional, essa sendo o segundo mais importante mecanismo epidemiológico da doença, e congênita (Moncayo, 2003). O curso da evolução da doença pode ser influenciado pela variabilidade biológica e genética, tanto do parasita como do hospedeiro (Maria Ayo, et al 2013).

O diagnóstico da infecção chagásica aguda, crônica ou congênita emprega métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Após a infecção, a maioria dos indivíduos apresenta fase aguda assintomática. Anos, ou mesmo décadas, após a fase aguda da infecção 40% dos pacientes desenvolvem formas sintomáticas da fase crônica da doença (Moncayo,2003). Entre os pacientes chagásicos com forma sintomática, 94,5% dos casos são afetados por problemas cardíacos: 38,5% desses pacientes apresentam morte súbita e 56% morrem por insuficiência cardíaca progressiva.

Os 5,5% restantes desenvolvem síndromes do sistema digestivo, como megaesôfago ou megacólon. (Teixeira, et al, 2011)

A patologia chagásica é principalmente caracterizada pela forma cardíaca, com cardiomiopatia dilatada associada com miocardite, fibrose e disfunção cardíaca. Cerca de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma gastro-intestinal que pode resultar em mega-cólon e/ou mega-esôfago, que são frequentemente associadas à forma cardíaca. A infecção pelo parasita ocorre em qualquer faixa etária, contudo a maioria das infecções em áreas endêmicas ocorre na infância. A doença de Chagas apresenta-se em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda dura de seis a oito semanas e os indivíduos infectados apresentam sinais variáveis, tais como: febre, adenomegalia, hepatomegalia, esplonomegalia, miocardite, encefalite. Durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, há uma fase transitória de imunossupressão humoral associada com ativação policlonal das células B e apoptose (Zuniga et al, 2005). Nessa fase

aguda, a presença do parasita pode ser detectado em hemoculturas, xenodiagnóstico e características moleculares do parasita. (Maria Ayo, et al, 2013).

Os indivíduos que sobrevivem a essa fase podem apresentar evolução da doença para a cura ou uma fase crônica com latências da infecção sem manifestações clínicas. Na fase crônica, os pacientes se tornam assintomáticos, porém com testes sorológicos positivos para a infecção pelo *T.cruzi*. Contudo, após vários anos de iniciar a fase crônica, 20 a 35% dos indivíduos infectados, dependendo da área geográfica, irão desenvolver lesões cardíacas irreversíveis, e também lesões no esôfago, colón e sistema nervoso periférico (Moncayo,2003).

Até 8% da população na América do Sul é soropositiva para doença de Chagas, mas apenas entre 10% e 30% destes terão a doença de forma sintomática (Carot-Artal,2010). A imigração de milhões de pessoas de países endêmicos do *T.cruzi* para os Estados Unidos levantou preocupações quanto a um possível aumento nos casos de cardiopatia chagásica. Danos irreversíveis ao coração podem aparecer de 10 a 20 anos após a infecção chagásica. Manifestações cardíacas da doença de Chagas incluem cardiomegalia, arritmias, insuficiência cardíaca e morte cardíaca súbita. Estudos da patologia do cérebro mostraram infarto cerebral em 9,4% e 26,3% dos pacientes com a forma crônica da doença de Chagas (Carod Artal et al.2005) . Estudos prévios descreveram cardioembolia como causa de AVC isquêmico em pacientes com doença de Chagas.

AVC isquêmico foi recentemente relatado como a primeira manifestação da doença de Chagas, sendo este um fator de risco independente da presença ou grau de cardiopatia (Carod Artal et al.2003, Oliveira-Filho et al.2005, Paixao et al, 2009).

Um estudo mostrou atrofia cerebral independentemente associada com cardiomiopatia chagásica (41 pacientes), quando comparado com outras etiologias de cardiomiopatia (32 pacientes), sem atrofia cerebelar ou alteração no volume ventricular (Oliveira-Filho, 2009). Em estudo retrospectivo de pacientes com Chagas e insuficiência cardíaca crônica, 18-20% tinham infartos cerebrais, com uma associação entre infarto cerebral e morte.(Carod-Artal, 2010) O mecanismo de dano cerebral no indivíduo chagásico independente de cardiopatia é desconhecido.

Em relação à função cognitiva, os pacientes chagásicos apresentaram resultados piores que os controles, pareados por idade, nível educacional e anos que vivem em uma área endêmica. Oliveira Py, 2011, ainda afirma na sua revisão que microembolos cerebrais silenciosos foram mais frequentes em pacientes chagásicos com insuficiência cardíaca do que em pacientes com outras etiologias de insuficiência cardíaca.

Uma potencial justificativa para o envolvimento cerebral na doença de Chagas é o processo inflamatório sistêmico. No entanto, a maioria dos estudos tem se concentrado nas características imunológicas que determinam o

desenvolvimento da forma cardíaca. É conhecido que a neutralização de IFN- γ , TNF- α , e IL-12 agravam a infecção. A infecção por *T.cruzi* é caracterizada por imunossupressão na fase aguda com redução na resposta linfo-proliferativa para antígenos *T.cruzi*. A imunossupressão ocorre devido ao desequilíbrio entre mecanismos responsáveis pela proteção de células receptoras e aquelas envolvidas na supressão da resposta imune (Michelin et al, 2005) .

Mecanismos imunorreguladores estão presentes durante a doença e podem influenciar fortemente a sua evolução clínica. Em um estudo foi demonstrado que os monócitos de pacientes com forma indeterminada da doença de Chagas aumentam a expressão de IL-10 após exposição ao parasita, enquanto que os monócitos de pacientes cardíacos submetidos ao mesmo tratamento preferencialmente expressam TNF- α (Maria Ayo et al,2013). A maior expressão de IL-10 na forma indeterminada da doença, em comparação com pacientes com doença cardíaca foi também observado por outros grupos (Dutra, 2008 , Gomes et al, 2003).

Entre os mecanismos que existem para o comprometimento de uma resposta imunológica em infecções parasitárias estão: diminuição da produção de IL-2 ou de seus receptores, apoptose, aumento do óxido nítrico e produção de prostaglandinas (Michelin et al, 2005).

A doença de Chagas na sua fase aguda também é caracterizada por altos níveis de prostaglandinas (PGE₂), um dos principais produtos da COX-2, e altos níveis deste mediador resultam na inibição da síntese de IL-2 e seus

receptores (Michelin et al, 2005). A prostaglandina também apresenta papel importante na aterosclerose, resposta inflamatória e função plaquetária (Wang et al, 2014). O tratamento com inibidores de COX-2 é capaz de diminuir a síntese de PGE2 nos tecidos do baço e essa redução foi acompanhada pela diminuição de outros fatores, como: infiltrado inflamatório, fibrose cardíaca e níveis reduzidos de COX-2 (Abdalla et al, 2008). O tratamento com inibidores de COX-2 e conseqüente inibição da síntese do PGE2, foi capaz de reduzir os danos cardíacos durante a fase aguda da doença de Chagas (Abdalla et al, 2008).

Estudos experimentais sobre a fase aguda da doença de Chagas consideraram que o *T. cruzi* está associado principalmente à resposta imune através da produção IFN- γ e ativação macrófaga. (Abdalla et al, 2008). No entanto, foi também observado que citocinas Th2 (IL-10 e IL-13) modulam a resposta Th1 foram capazes de diminuir o risco de danos teciduais causados pela infecção pelo *T. cruzi* (Abdalla et al, 2008).

III.2 Insuficiência Cardíaca

As doenças cardiovasculares são a maior causa de morbidade e mortalidade mundial. A insuficiência cardíaca (IC) é uma grave complicação de várias dessas doenças, que está aumentando em incidência e prevalência globalmente. No Brasil, segundo dados do Datasus 2010 , ocorrem 240 000 casos novos por ano, com 293 000 internações e 6,0 % de mortalidade. (Bittencourt, et al, 2014). Afeta cerca de 2% da população adulta; uma

prevalência que aumenta exponencialmente com a idade. A prevalência é menor do que 1% na população com menos de 50 anos, mas dobra a cada década, e excede 8% em pessoas com idade superior a 75 anos. (Sayago-Silva et al, 2013)

A Insuficiência Cardíaca (IC) é a via final de muitas doenças cardíacas, caracterizada por uma série de sinais e sintomas como edema, hepatomegalia, ascite, fadiga e náuseas. A IC apresenta diversas etiologias, podendo ser secundária a doenças cardíacas ou não. Pacientes com fatores de risco para AVC podem apresentar lesões isquêmicas cerebrais sem sintomas clínicos (Barretto, 2001). A doença cardíaca é considerada o segundo fator de risco mais importante para o AVC, com frequência de 41,9% para o AVC isquêmico (Azevedo et al, 2008).

A insuficiência cardíaca é considerada uma doença cada vez mais frequente e uma das principais causas de hospitalizações entre as doenças cardiovasculares. A hipertensão arterial, uma das doenças mais prevalentes na população em geral, encontra-se frequentemente associada à insuficiência cardíaca, quer como causa, quer como fator de agravamento da doença. Além de poder causar insuficiência cardíaca, a hipertensão participa de muitos quadros dessa síndrome, ao contribuir para o desenvolvimento de insuficiência coronária, a principal causa de insuficiência cardíaca do mundo moderno (Barretto,2001).

A forma cardíaca da doença de Chagas crônica também é uma importante causa de IC, sendo considerada uma das principais causas de insuficiência cardíaca na América Latina. (Roman-Campos, et al, 2013).

No presente estudo, a IC foi o principal critério de seleção da amostra. A escolha da amostra foi determinada pelo potencial de selecionar um grupo de pacientes com alto risco para apresentar lesões cerebrais subclínicas (Zuccala et al., 1997; Almeida & Flicker, 2001; Cacciatore et al., 1998).

III.3 COX-2

O gene humano da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), conhecido também como prostaglandina endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), está localizado no cromossomo 1q25.2-q25.3 e contém 10 exons. A COX-2 converte os ácidos graxos em prostaglandinas. A COX catalisa as duas primeiras etapas da produção do ácido araquidônico. A enzima tem três isoformas conhecidas. A COX-1, que é expressa na maioria dos tecidos humanos em condições basais; a COX-2, cuja expressão é induzida principalmente em resposta a estímulos inflamatórios; e a COX-3, que é uma isoenzima derivada da COX-1 (Helgadottir et al, 2004).

A expressão da COX-2 é baixa em muitos tecidos, mas é induzida por uma variedade de mediadores, incluindo citocinas e fator de crescimento. A sua atividade é responsável pela síntese de prostaglandinas (PG) em células do sistema nervoso central e células inflamatórias e também está envolvida em

respostas patofisiológicas, como artrites, inflamação e dor (Helgadottir et al, 2004).

Os níveis da COX-2 são elevados em doenças inflamatórias crônicas, incluindo aterosclerose. Sua expressão tem sido detectada em células endoteliais, células musculares lisas, monócitos e macrófagos em lesões ateroscleróticas. Muitas prostaglandinas produzidas pela via da COX-2 contribuem para a formação de aterosclerose e trombose (Helgadottir et al, 2004).

Um polimorfismo funcional G→ C localizado a 765 pb a partir do sítio de transcrição tem sido identificado no gene humano da COX-2 com o alelo C responsável pela alteração da atividade promotora. (Papafalli,2002), reduzindo a transcrição da COX-2 e os níveis de RNAm, levando a efeitos inflamatórios significativos. Esse polimorfismo também está associado com a redução da produção de PGE2 e baixos níveis de marcadores inflamatórios, tais como proteína C reativa e interleucina-6 (M Li, et al, 2009 e Papafalli,2002).

Estudos sobre os efeitos do polimorfismo da COX-2 em doenças vasculares ainda são contraditórios. Em estudos prévios, mostrou-se que o alelo C pode ter efeito protetor contra eventos clínicos, como por exemplo, AVC e infarto do miocárdio (Cipollone et al, 2004). Em estudos prévios do nosso grupo, o polimorfismo desse gene foi muito comum e apresentamos uma relação do polimorfismo do gene da COX-2 com o AVC ($P < 0,001$) e nenhuma relação do polimorfismo com doenças coronarianas ($P = 0,157$) – dados não-publicados, em anexo (anexo 3). Wang e colaboradores, 2014, concluíram em sua meta

análise que o alelo C tem efeito protetor para doenças cardiovasculares e que o polimorfismo tende a ter efeito protetor para os asiáticos, mas não para os caucasianos.

Em relação ao efeito do polimorfismo sobre o risco de AVC, os resultados são controversos. Kohsaka et al, 2008, relataram que o polimorfismo rs20417 da COX-2 é um fator de risco para acidente vascular cerebral em afro-americanos. Em contraste, em italianos, os heterozigotos aparecem com menor risco de isquemia cerebral, no entanto o número de casos desse estudo foi pequeno (Lemaitre, et al, 2009). Na última meta-análise publicada sobre o tema, o polimorfismo não teve efeito significativo sobre o risco de AVC (Wenlong et al, 2009).

A COX-2 está envolvida também na inflamação que ocorre na fase aguda da doença de Chagas e inibidores de COX-2 reduzem os danos cardíacos (Abdalla et al, 2008). Em um estudo anterior, observamos uma associação do polimorfismo da COX-2 e a doença de Chagas, onde 42,9% apresentaram o polimorfismo em seu estado homozigótico (dados não publicados, em anexo). Indivíduos com a forma crônica cardíaca da doença de Chagas apresentavam um nível menor de PGE2 e um maior risco de AVC ($p=7 \times 10^{-3}$). Da mesma forma, indivíduos com o polimorfismo rs20417 apresentavam um nível menor de PGE2 e maior risco de AVC ($p=4,1 \times 10^{-5}$). No entanto, o efeito do polimorfismo sobre o risco de AVC era o mesmo em chagásicos e não-chagásicos ($p=0,313$) para a interação Chagas/polimorfismo).

III.4 Marcadores de Neuroimagem de Disfunção Cerebral

Diversos marcadores de neuroimagem tem sido estudados na literatura na população idosa normal ou em pacientes com fatores de risco vasculares. Marcadores como volume cerebral e lesões da substância branca se correlacionam com maior risco de AVC, disfunção cognitiva e demência, mesmo entre pacientes sem histórico de AVC (Braskie et al, 2014 e Bolandzadeh et al, 2012). O estudo dessas alterações de imagem nos ajuda a compreender a fisiopatologia da disfunção cerebral em populações específicas. (Breteler, et al, 1994)

Volume cerebral está fortemente associado a desempenho cognitivo em estudos populacionais. (Breteler, et al, 1994) Um estudo mostrou atrofia cerebral independentemente associada com cardiomiopatia chagásica (Oliveira-Filho, 2009). Em chagásicos a despopulação neuronal ocorre predominantemente nas células de Purkinje do cerebelo, mas a influência da doença no volume cerebelar ou sua repercussão cognitiva é desconhecida.(Queiroz et at, 1979)

As lesões de substância branca (LSB) são estudadas como parte do envelhecimento normal e em diversas doenças inflamatórias ou vasculares (Rost, 2010). Há uma forte associação com fatores de risco vasculares e seu acúmulo provavelmente reflete doença de pequenos vasos (Rost et al., 2010 e Erten-Lyons et al., 2013). Lesões de substancia branca estão presentes em 53% de RM em pacientes chagásicos, mesmo na fase inicial da doença, quando comparado a 13% da população em geral. (Py, 2009)

Há evidências que fatores de risco vasculares modificáveis podem influenciar no desenvolvimento desses biomarcadores de lesão cerebral. O controle da hipertensão e o aumento da atividade física podem contribuir para a redução da atrofia cerebral e LSB (Gow et al, 2012).

IV. HIPÓTESES

Primeira hipótese

H0: o polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 não estará associado a alterações de neuroimagem (volume cerebral, volume cerebelar e volume de lesões de substância branca).

H1: o polimorfismo rs20417 do gene da COX2 estará associado a alterações de neuroimagem (volume cerebral, volume cerebelar e volume de lesões de substância branca).

Segunda hipótese

H0: a doença de Chagas não estará associada a alterações de neuroimagem (volume cerebral, volume cerebelar e volume de lesões de substância branca).

H1: a doença de Chagas estará associada a alterações de neuroimagem (volume cerebral, volume cerebelar e volume de lesões de substância branca)

Terceira hipótese

H0: o efeito do polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 sobre as alterações de neuroimagem (volume cerebral, volume cerebelar e volume de lesões de substância branca) será igual entre chagásicos e não-chagásicos.

H1: o efeito do polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 sobre as alterações de neuroimagem (volume cerebral, volume cerebelar e volume de lesões de substância branca) será diferente entre chagásicos e não-chagásicos.

V. MATERIAL E METODOS

V.1. População de estudo

Foi estudada uma série consecutiva de indivíduos acima de 18 anos com diagnóstico clínico de IC. Os pacientes com IC, sem antecedentes de doenças cerebrovasculares, foram recrutados do Ambulatório de Cardiomiopatias do Ambulatório Magalhães Neto (AMNETO) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) e Ambulatório de Insuficiência Cardíaca do Hospital Ana Neri.

O diagnóstico de IC foi definido pelo médico cardiologista assistente do ambulatório pelo conjunto de sintomas (i.e., dispnéia aos esforços, dispnéia paroxística noturna) e sinais (edema de membros inferiores, cardiomegalia, hepatomegalia). Além disso, todos os pacientes apresentavam ecocardiograma transtorácico de no máximo um ano antes do recrutamento no estudo.

Uso de anticoagulantes, uso de prótese metálica, marcapasso ou cardioversor, história de câncer (exceto pele), em diálise ou doença crônica parenquimatosa do fígado, evento trombotico sintomático (IAM, TVP/TEP) nos últimos 6 meses (da data de admissão), AVC alguma vez na vida ou incapaz de obter consentimento informado do paciente ou responsável, foram considerados critérios de exclusão (anexo 1).

Todos os pacientes fizeram ressonância magnética, onde investigadores mascarados quanto a todos os dados clínicos, incluindo sorologia para Chagas, fizeram a análise.

V.2. Avaliação por ressonância magnética

A ressonância magnética (RM) foi realizada em um aparelho GE de 1,5 Tesla. Cortes axiais de 5mm nas sequências T1, T2 e FLAIR foram obtidas em todos os pacientes. O programa MRIcro foi utilizado para análise volumétrica. Os seguintes parâmetros foram obtidos: volume craniano total, volume cerebral total e volume total das LSB. A medida dos volumes foi baseado no uso de filtros de intensidade de sinal seguidos de correção visual das imagens, para evitar a inclusão de artefatos de imagem. As análises volumétricas do cérebro e cerebelo foram realizadas na sequência T1 axial, enquanto que a volumetria das LSB foi realizada na sequência FLAIR. Cada volume mensurado foi expresso como uma fração do volume craniano total, para corrigir para diferenças de gênero e raça.

Cada investigador avaliando as imagens passou por uma fase de treinamento de uma série padronizada de imagens e seu desempenho comparado com um investigador especialista em doenças cerebrovasculares. Para se qualificar como avaliador das imagens, os investigadores deveriam ter um índice de correlação intraclasse acima de 0,9 em todas as volumetrias quando comparado ao investigador especialista.

V.3. Extração de DNA e Genotipagem

Em todos os pacientes foi colhido sangue total e extraído DNA genômico através do kit Qiagen (QIAamp® DNA Mini Kit). Após extração, foi feito PCR (polymerase chain reaction), usando primer's específicos e após amplificação, foi feito RFLP (restriction fragment length polymorphism), com enzima de restrição específica para o polimorfismo estudado.

Para o polimorfismo da COX-2, foram usados os primer's CF8 (5'CCGCTTCCTTTGTCCATCAG3') e CR7 (5'GGCTGTATATCTGCTCTATATGC3'), 0,5 microlitros de 10mM dNTP, 0,75 microlitros de 50mM MgCl₂, 2,5 microlitros de 10x buffer, 0,25 microlitros de cada primer diluído a 100pmol/ microlitros, 0,5 microlitros de Taq polimerase e água adicionada para um volume final de 25 microlitros. Com as seguintes condições da PCR: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, acompanhado de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento por 44 segundos a temperatura de 55°C, 72°C por 30 segundos e a extensão final de 72°C por 10 minutos, mantendo a uma temperatura de 4 °C. O produto da PCR foi submetido ao RFLP, usando a enzima de restrição *Aci I*, ficando a temperatura de 37°C por 1 hora a banho maria. O produto da PCR é constituído por 306 pares de base (pb) e a presença do polimorfismo vai resultar em uma banda de 188pb e outra de 118pb sendo possível ser visualizado em gel de agarose 2% em um transluminador ultravioleta.

Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2).

V.4. Dosagem de prostaglandina E2 (PGE2) sérica

A dosagem de PGE2 no plasma de pacientes e indivíduos saudáveis foi realizada pela técnica de EIA (Enzyme Immuneassay) como indicado pelo fabricante do kit de dosagem (Cayman Chemical)

V.5. Análise Estatística

A amostra foi de conveniência, formada por pacientes consecutivos admitidos em um estudo maior de RM cerebral na doença de Chagas. Não houve cálculo amostral formal devido à ausência de dados prévios na literatura sobre diferenças nos biomarcadores na doença de Chagas.

Modelos de regressão linear foram construídos tendo como variáveis independentes de interesse o polimorfismo do gene da COX-2 (hipótese 1) e a doença de Chagas (hipótese 2); e como variáveis dependentes em 3 modelos distintos o volume de lesão da substância branca cerebral, volume cerebral e volume cerebelar. Todos os volumes foram corrigidos pelo volume intracraniano. A variável de LSB cerebral foi incluída no modelo com transformação logarítmica, pela expectativa conhecida de distribuição não-normal. Todos os modelos foram ajustados para idade e gênero e associações com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Os modelos ajustados para idade e gênero foram denominados “Modelo 1”. Usamos o modelo aditivo para o polimorfismo rs20417 (número de alelos C) em todas as análises.

Na investigação da interação entre a doença de Chagas e o polimorfismo do gene da COX-2 (hipótese 3), o modelo de regressão linear foi construído com as mesmas variáveis do Modelo 1, acrescidos de variáveis com possível relevância para as alterações na ressonância magnética ($p < 0,2$ nas análises univariáveis). Em seguida, retiramos uma variável de cada vez, iniciando pela variável com menor associação (maior p-valor). O Modelo 2 consistiu então de variáveis que mantinham um nível próximo da significância estatística ($p < 0.2$) e aquelas cuja retirada do modelo haviam gerado uma mudança $>10\%$ no efeito (coeficiente beta) do polimorfismo do gene da COX-2 ou $>10\%$ no efeito da doença de Chagas sobre as alterações da ressonância magnética cerebral.

VI. RESULTADOS

Foram estudados 71 indivíduos. A idade média foi 55 anos, sendo 30 indivíduos do gênero masculino. Todos os indivíduos consentiram em participar do estudo e nenhum evento adverso foi notado relacionado com as coletas de amostra sanguínea e durante a ressonância magnética. Foram estudados 34 indivíduos sem a doença de Chagas e 37 pacientes chagásicos. Segue na tabela 1, as características dos pacientes do estudo. De uma forma geral, os indivíduos não-chagásicos apresentavam uma proporção maior de fatores de risco vasculares como hipertensão, doença coronariana e tabagismo. Nas análises univariadas, houve uma proporção maior de indivíduos não-chagásicos com doença coronariana ($p=0,013$), mas não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos demais fatores de risco vasculares, nos biomarcadores de RM ou nos níveis séricos de PGE2.

Tabela 1: Características de pacientes com ou sem doença de Chagas.

| Variável | Chagásico (n=37) | Não chagásico (n=34) |
|-----------------------------|---------------------|-------------------------|
| Idade (anos), média +/- DP | 54 +/- 13 | 56 +/- 6 |
| Gênero masculino, n (%) | 13 (35%) | 17 (50%) |
| Hipertensão arterial, n (%) | 22(59,5%) | 25 (73,5%) |
| Diabetes mellitus, n (%) | 10 (27,0%) | 8 (23,5%) |
| Doença coronariana, n(%) | 4 (11,1%)* | 12 (36,4%)* |
| Uso antiagregante, n (%) | 10(27%) | 14(41,2%) |
| Uso estatina, n (%) | 9 (24,3%) | 11 (32,4%) |
| Tabagista, n (%) | 2 (5,6%) | 5 (14,7%) |

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Volume cerebral (% do volume intracraniano), média +/- DP** | 71,7 +/- 3,1 | 70,6 +/- 3,5 |
| Volume cerebelar (% do volume intracraniano), média +/- DP | 9,6 +/- 1,0 | 9,6 +/- 0,8 |
| Volume de LSB (por 1000ml de volume intracraniano), mediana (valor mínimo e máximo) | 2,8 (0,2 – 18,8) | 3,7 (0,2 – 26,2) |
| Prostaglandina E2 (mg/dl)***, média +/- DP | 514 +/- 358 | 626 +/- 471 |

*p<0,05.

**DP= desvio padrão.

***Para as dosagens de prostaglandina E2 (PGE2), a amostra foi composta de 34 indivíduos (18 chagásicos e 16 não-chagásicos).

Na tabela 2, descreve-se a frequência genotípica do alelo estudado entre os grupos de indivíduos estudados.

Tabela 2: Presença do alelo anormal entre os indivíduos estudados

| Grupo | GG | GC | CC |
|-----------------------|-----------|------------|-----------|
| Chagásicos , n (%) | 7 (18,9%) | 13 (35,1%) | 17 (45,9) |
| Não Chagásicos, n (%) | 2 (5,9%) | 14 (41,2%) | 18 (52,9) |

Investigamos se o polimorfismo do gene da COX-2 estava associado com o volume cerebral, volume cerebelar e lesão da substancia. Na análise não-ajustada, o polimorfismo rs20417 não foi associado com nenhuma alteração nos volumes cerebrais e cerebelares, bem como LSB, como podemos observar na Tabela 3.

Tabela 3: Numero de alelos C do polimorfismo do gene da COX-2 (rs20417) como preditor para volume cerebral, volume cerebelar e lesão de substancia branca

| | Efeito (não ajustado) | Erro Padrão | p |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------|----------|
| Volume Cerebral | - 0,965 | 0,553 | 0,085 |
| Volume Cerebelar | 0,178 | 1,570 | 0,910 |
| Lesão Substancia Branca | 0,294 | 0,178 | 0,103 |

No modelo 1 multivariado, ajustamos para idade e gênero o modelo acima, e após a análise podemos perceber que o polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 apresentou uma associação significativa com volume cerebral. Segue tabela 4 com os resultados da análise:

Tabela 4 : Análise multivariada ajustada para gênero e idade, mostrando o efeito do polimorfismo do gene da COX-2 sobre as alterações da ressonância magnética

| | Efeito (ajustado) | Erro Padrão | p |
|------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------|
| Volume Cerebral | -1,166 | 0,563 | 0,039 |
| Volume Cerebelar | - 0,664 | 1,536 | 0,666 |
| Lesão Subs.Branca | 0,257 | -0,090 | 0,141 |

No modelo 2 multivariado, ajustamos para idade, gênero, doença de Chagas, bem como para variáveis com possível associação entre alteração no volume cerebral e cerebelar e LSB. Entre chagásicos e não chagásicos, não houve associação significativa entre a presença do polimorfismo e LSB ou volume cerebelar ($p=0,18$ e $p=0,28$, respectivamente).

Na análise das variáveis associadas ao volume cerebral, detectamos uma interação significativa entre o gene da COX-2 e a doença de Chagas ($p=0,028$). Entre não chagásicos, o polimorfismo esteve associado a um menor volume cerebral, enquanto em chagásicos ele esteve associado a um maior volume cerebral.

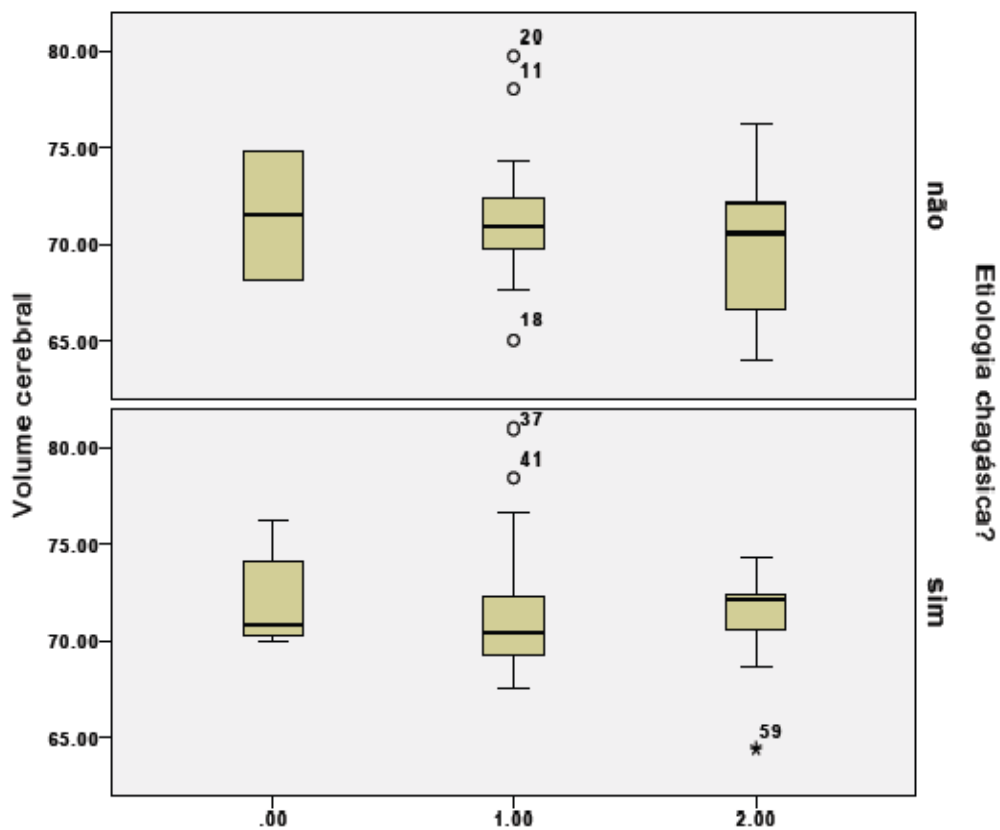
Mesmo ajustada para as outras variáveis, o polimorfismo rs20417 da COX-2 ainda permaneceu associado com alteração no volume cerebral (B= -1,8, e p=0,037). Os resultados completos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Modelo 2, efeito do gene do polimorfismo do gene da COX-2 (rs20417) e da doença de Chagas sobre o volume cerebral, ajustado para potenciais confundidores.

| Variáveis | Efeito | Erro padrão | p |
|-----------------------------|---------------|--------------------|--------------|
| Idade | 0,039 | 0,039 | 0,315 |
| Gênero Masculino | -0,970 | 0,676 | 0,152 |
| rs20417 | -1,863 | 0,895 | 0,037 |
| Doença de Chagas | -3,017 | 1,768 | 0,088 |
| Fração de Ejeção | 0,067 | 0,028 | 0,020 |
| Uso Estatina | 1,100 | 1,015 | 0,279 |
| Doença arterial coronariana | -2,816 | 1,052 | 0,007 |
| rs20417 x Chagas | 2,548 | 1,161 | 0,028 |

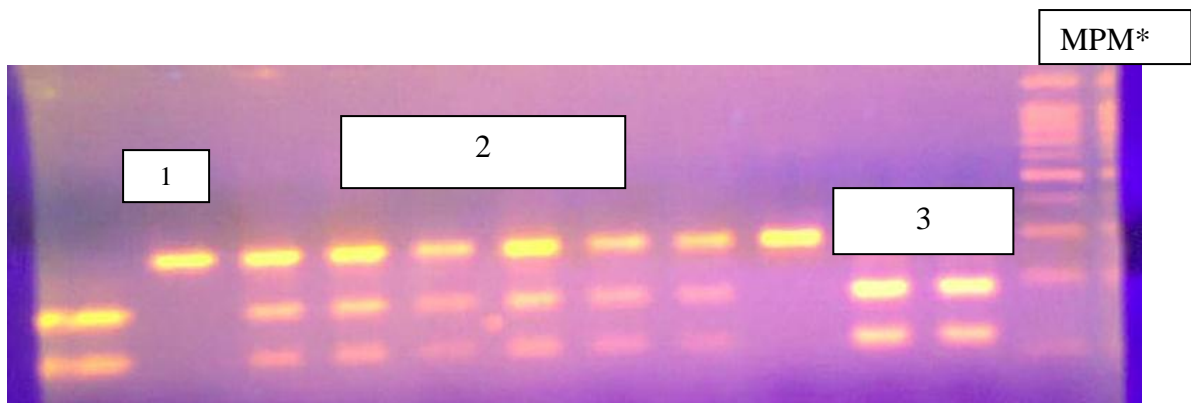
Na Figura 1, observa-se o efeito do polimorfismo do gene da COX-2 sobre o volume cerebral nos pacientes chagásicos e não chagásicos. Onde podemos observar que quanto mais o numero de alelo C menor o volume cerebral entre o não chagásico. Da mesma forma observamos que quanto maior o numero de alelo C maior o volume cerebral entre os chagásicos.

Figura 1: Efeito do polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 sobre o volume cerebral de pacientes chagásicos e não chagásicos.



Na Figura 2 pode-se observar um gel após o RFLP da COX-2 quando estes se apresentam sem polimorfismo (homozigoto normal), heterozigoto e homozigoto polimórfico

Figura 2: Polimorfismos em homozigose_(GG e CC) e heterozigose_(GC) do gene da COX-2.

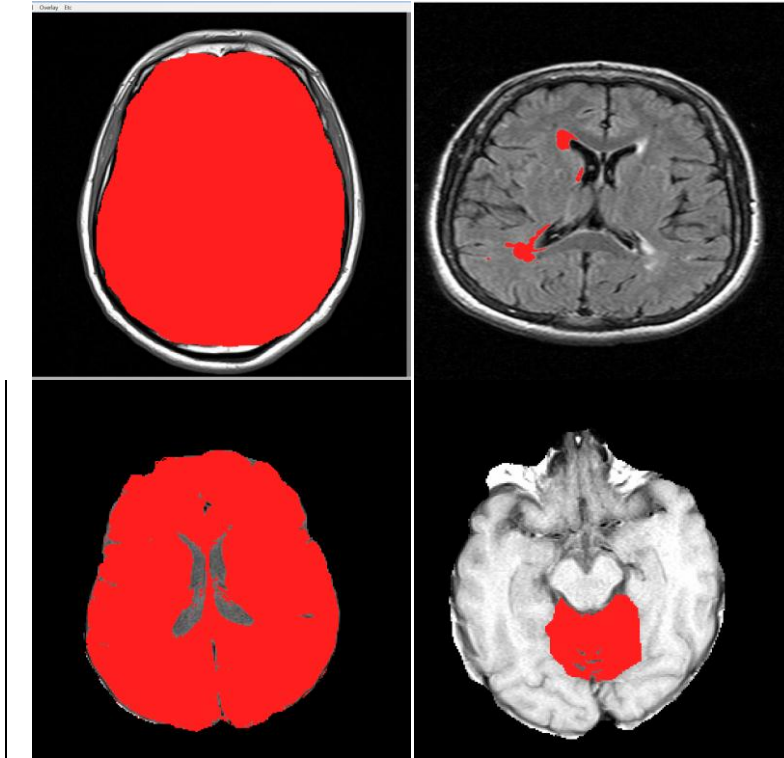


*Marcador de Peso Molecular

1. Homozigoto GG
2. Heterozigoto GC
3. Homozigoto CC

Na Figura 3 pode-se observar volumetria encefálica de um paciente do estudo, feito a partir de uma imagem de ressonância magnética

Figura 3: Máscaras de volume intracraniano, cerebral, cerebelar e de lesão de substância branca, a partir de uma imagem de Ressonância Magnética de um paciente do estudo.



Legenda (em sentido horário a partir da imagem superior esquerda): 1. Volume intracraniano, 2. Lesão de substancia branca, 3. Volume cerebelar 4.volume cerebral

VII. DISCUSSÃO

No presente estudo, o principal achado foi à associação significativa entre a presença do polimorfismo do gene da COX-2 e a doença de Chagas para o volume cerebral dos pacientes estudados. A seguir, discutiremos sobre o tema e suas implicações.

VII.1 Características Clínicas de chagásicos e não chagásicos

Em relação à raça, é uma população miscigenada, característica própria do local do estudo. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à raça, sendo a cor negra maior em chagásicos e mulatos em não chagásicos. Quanto ao gênero não houve diferença significativa entre gênero masculino e feminino dentro do grupo estudado, mesmo sendo o gênero feminino em maior número (n=44). Em relação aos fatores de risco vasculares, de uma forma geral os indivíduos não-chagásicos apresentavam uma proporção maior desses fatores como hipertensão arterial, doença coronariana e tabagismo. De forma semelhante, indivíduos não-chagásicos também usavam mais medicações para tratar esse fatores de risco, como antiagregantes e estatinas. Os resultados descritos são semelhantes a outras séries de pacientes com IC, onde o grupo controle formado de não-chagásicos é formado por pacientes com cardiopatias de diversas etiologias, incluindo etiologia hipertensiva e isquêmica, justificando essas diferenças entre os grupos (Oliveira-Filho et al., 2005 e Braga et al., 2008).

VII.2. Associação entre o polimorfismo do gene da COX-2 e biomarcadores de ressonância magnética cerebral

Na investigação da associação entre o polimorfismo do gene da COX-2 e os três biomarcadores de RM, apenas o volume cerebral mostrou uma associação em ambos os modelos de análise multivariada ($p=0,037$ no modelo ajustado para idade e gênero; $p=0,039$ no modelo ajustado para todos os confundidores).

Não há estudos similares na literatura de volumetria cerebral e sua associação com o gene da COX-2. No entanto, biomarcadores séricos inflamatórios como interleucina-6 (IL-6) e interferon-gama estiveram associados a atrofia cerebral em um estudo populacional (Jefferson AL et al, 2007) e o polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 esteve associado ao nível sérico de IL-6 (Papafalli,2002). Portanto, uma possível explicação para nosso achado é que o gene da COX-2 possa estar envolvido direta ou indiretamente na determinação de marcadores inflamatórios que influenciam o volume cerebral.

VII.3. Associação entre a doença de Chagas e biomarcadores de RM cerebral

No presente estudo, não confirmamos associações prévias entre a doença de Chagas e os biomarcadores de RM cerebral. Em um estudo similar do nosso grupo com uma amostra independente de 73 pacientes com IC submetidos a tomografia computadorizada do crânio, a doença de Chagas foi associada com

menor volume cerebral (Oliveira-Filho et al., 2009), confirmando uma observação prévia de estudos anátomo-patológicos (Queiroz et al., 1979). Nesse estudo (Oliveira-Filho et al., 2009) não foi mensurado o volume cerebelar ou de LSB para comparar com o nosso. O motivo da discordância entre os dois estudos na associação com volumetria cerebral pode ser justificado pelo maior poder estatístico do primeiro estudo, onde houve pareamento da amostra por idade e gênero. No entanto, não podemos afastar que o achado no primeiro estudo tenha sido um falso-positivo.

O volume cerebelar nunca foi mensurado em estudos prévios de indivíduos chagásicos. A justificativa para estudá-lo nesse contexto foi a observação anátomo-patológica de uma maior despopulação neuronal de células de Purkinje cerebelares (Queiroz et al., 1979). No entanto, não foi comparado o volume ou peso cerebelar separadamente. Uma possível explicação é que a despopulação neuronal encontrada em uma camada do córtex cerebelar não seja suficiente para provocar uma redução do volume cerebelar global.

VII.4. Efeito do polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 sobre o volume cerebral em indivíduos chagásicos e não chagásicos

Em nosso estudo, encontramos uma interação significativa ($p=0,028$) entre a presença do alelo C em homozigose e doença de Chagas, quanto ao volume cerebral. A interação determina que em indivíduos chagásicos o polimorfismo esteja associado a um maior volume cerebral, enquanto que em não-chagásicos o polimorfismo esteja associado a um menor volume cerebral.

Esta interação entre predisposição genética e um estímulo ambiental pode justificar um efeito diferente de um determinado gene sobre um desfecho clínico ou de neuroimagem. O motivo do efeito atenuador da doença de Chagas sobre a atrofia cerebral relacionada ao gene da COX-2 é desconhecido. Estudos funcionais do gene em indivíduos chagásicos e não chagásicos são necessários para determinar a relevância biológica desta interação.

VII.5. Limitações

Nossa amostra não passou por um cálculo formal estatístico devido à ausência de dados na literatura sobre volumetria cerebral na doença de Chagas usando RM cerebral. Baseado apenas na diferença de 15% de volumetria cerebral encontrada no método de tomografia computadorizada do crânio em um estudo prévio do grupo (Oliveira-Filho et al., 2009), precisaríamos de uma amostra de 426 pacientes para confirmar essa associação. Um estudo com esse objetivo encontra-se em andamento com uma amostra estimada final de 500 pacientes (CLINICS, registrado no ClinicalTrials.gov sob o número NCT01650792). Com a atual amostra de 71 pacientes, tivemos um poder de 86% para detectar uma diferença de volumetria na ordem de 40% entre os grupos chagásico e não-chagásico. Como a diferença detectada entre os grupos foi inferior a 5%, devemos avaliar os resultados neutros das volumetrias com cautela e sujeitos a erros do tipo II.

Em relação aos resultados positivos de volumetria cerebral, devemos interpretar os resultados como exploratórios, já que não realizamos uma correção formal para os múltiplos testes realizados. O resultado exploratório significa que será necessária uma amostra independente avaliando o polimorfismo da COX-2 em uma área endêmica para doença de Chagas para confirmar nossos achados.

Finalmente, os resultados de PGE2 só puderam ser realizados em uma subpopulação da nossa amostra, o que reduz o poder e validade das inferências sobre esse biomarcador específico. Por esse motivo, somente resultados descritivos foram apresentados.

VIII. CONCLUSÕES

1. O polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 foi associado com um menor volume cerebral, mas não foi associado com o volume cerebelar nem com lesão de substancia branca cerebral.
2. A doença de Chagas não foi associada com lesão de substancia branca, nem com volumes cerebral ou cerebelar.
3. O efeito do polimorfismo rs20417 do gene da COX-2 sobre o volume cerebral diferiu entre chagásicos e não-chagásicos: nos pacientes chagásicos, o polimorfismo esteve associado com maior volume cerebral, enquanto que em não-chagásicos o polimorfismo esteve associado com menor volume cerebral.

IX. SUMMARY

Introduction: Chagas disease (CD) is a major public health problem in South America, as well as an important cause of stroke. It is also a risk factor for cognitive impairment and brain atrophy. The cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme is activated by inflammatory stimuli including CD itself and plays a role in atherogenesis. The presence of the C allele polymorphism of the COX-2 gene has a protective effect against coronary heart disease and its role in stroke remains controversial. The present study aims to determine whether there is an association between rs20417 polymorphism of the COX-2 gene and CD with changes detected on brain magnetic resonance imaging (MRI) as well as if the association of the polymorphism with changes of MRI is modified by CD.

Methods: Patients of two outpatient heart failure (HF) clinics without a history of stroke were recruited for this study. The diagnosis of HF was defined by the clinics' assistant cardiologists. Whole blood samples were collected and DNA extracted to investigate the rs20417 polymorphism of the COX-2 gene. MRI were evaluated by a masked investigator for clinical data on brain, cerebellar, white matter lesion volumes.

Results: 71 patients were analyzed, 37 chagasic and 34 nonchagasic. The proportion of individuals carrying the C allele was 81% among the Chagas patients and 94% among non-Chagas. Adjusted for gender and age, the C allele polymorphism was significantly associated with smaller brain volume ($p = 0.039$). In patients with Chagas disease, the C allele rs20417 polymorphism was associated with increased brain volume, while among non-chagasic it was associated with smaller brain volume ($p = 0.028$ for interaction).

Conclusions: rs20417 polymorphism of COX-2 is not related to volume and cerebellar white matter lesion. However, polymorphism of the COX-2 is associated with brain volume, while C allele is associated with lower brain atrophy in Chagas disease. There is a significant interaction between Chagas disease and polymorphism of the COX-2 in the determination of brain volume.

Keywords: 1. Congestive heart failure; 2. Chagas disease; 3. brain disorders; 4: Genetic polymorphism 5. COX-2

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Abdalla G.K., Faria G.E.L.,Silva K.T, et al. Trypanosoma cruzi: The role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection Experimental Parasitology 2008;118 :514–521

2- Almeida OP, Flicker L The mind of a failing heart: a systematic review of the association between congestive heart failure and cognitive functioning Intern Med J. 2001 Jul;31(5):290-5.

3-Aras R, Veiga M, Gomes I, et al Prevalence of Chagas' disease in Mulungu do Morro northeastern Brazil. Arq Bras Cardiol 2002;78:441-443.

4- Arteaga-Fernandez E, Barretto AC, Ianni BM, et al. Trombose cardíaca e embolia em pacientes falecidos de cardiopatia chagásica crônica. Arq Bras Cardiol 1989;52:189-192

5- Azevedo R V M, Moretão D I C, Moretão V J Prevenção De Acidente Vascular Cerebral Em Pacientes Portadores De Cardiopatia. Interseção, Belo Horizonte, 20081, 2, p. 82-90

6- Barretto A C P. Hipertensão Arterial e Insuficiência Cardíaca Revista Brasileira Hipertensão 20018: 339-43

7-Bittencourt M, Ribeiro F V, Rocha R M, Albuquerque D C, Importance of Etiological Diagnosis in Idiopathic Heart Failure Rev Bras Cardiol. 2014;27(2):624-26 março/abril

8- Braga JC, Reis F, Aras R Jr, Dantas N, Bitencourt A, Neves FS, Latado AL. Is Chagas cardiomyopathy an independent risk factor patients with heart failure? Int J Cardiol. 2008. May 23;126(2): 276-8 Epub 2007 Abr 27

9- Braskie MN, Thompson PM. A focus on structural brain imaging in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. Biol Psychiatry. 2014;75(7):527-33.

10- Breteler MM, van Swieten JC, Bots ML, et al. Cerebral white matter lesions, vascular risk factors, and cognitive function in a population-based study: the Rotterdam Study. Neurology. 1994 Jul;44(7): 1246-52

11- Bolandzadeh N, Davis JC, Tam R, Handy TC, Liu-Ambrose T. The association between cognitive function and white matter lesion location in older adults: a systematic review. BMC Neurol 2012;12:126.

12- Cacciatore G, Menichelli M, Albi F, De Lio L, Boccanelli A [Outpatient management program of patients with chronic heart failure]. G Ital Cardiol. 1998 Oct;28(10):1106-12.

13- Carod-Artal F J, Vargas A P, Horan T A and Nunes L G N. Chagasic Cardiomyopathy Is Independently Associated With Ischemic Stroke in Chagas Disease Stroke 2005;36(5):965-970

14- Carod-Artal F J, Gascon J. Chagas disease and stroke, Lancet Neurol 2010; 9: 533–42

15- Castro SC, Marcelino PC, Santos MB, et al. Doença cerebrovascular na Uberlândia: II. Epidemiologia e Clínica. Arq Neuropsiquiatr 1986;44:139-146.

16- Cipollone F., Toniato E., Martinotti S et al. A Polymorphism in the Cyclooxygenase 2 Gene as an Inherited Protective Factor Against Myocardial Infarction and Stroke. JAMA 2004;291:2221-2228

17- Del Brutto OH, Carod-Artal FJ, Romaín GC, Sennanayake N. Tropical neurology. In: American Academy of Neurology, ed. *Continuum*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

18- DICHAGANS M. Genetic Of Ischaemic Stroke – Lancet Neurol. 2007 6:149-161

19-Di Napoli M, Papa F. Inflammation, hemostatic markers, and antithrombotic agents in relation to long-term risk of new cardiovascular events in first-ever ischemic stroke patients. Stroke. 2002; 33:1763-1771.

20- Dixon WT, Demetrick DJ, Ohyama K, et al. Biosynthesis, glycosylation and intracellular processing of the neuroglandular antigen, a human melanoma-associated antigen. *Cancer Res.* 1990; 50: 4557–4565

21- Dutra Walderez O. and Gollob Kenneth J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease ,*Curr Opin Infect Dis.* 2008 June ; 21(3): 287–292

22- European Stroke Initiative AVC Isquêmico Profilaxia e Tratamento Informação para médicos hospitalares e medicina ambulatoria *Recomendações 2003.*

23- Erten-Lyons D, Woltjer R, Kaye J, et al. *Neurology* 2013;81;977-983

24- Fritsche E, Baek S J, King L M., et al Functional Characterization of Cyclooxygenase-2 Polymorphisms *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2001 ;299(2):468-476

25- Gomes J A, Bahia-Oliveira L M, Rocha M O et al Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a TH1-specific immune response. *Infect Human* 2003;71: 1185-1193

26- Gow AJ, Bastin ME, Maniega SM, et al. Neuroprotective lifestyles and the aging brain. *Neurology* 2012

27- Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nature Genetics* 2004; 36: 233-239

28- Huuskonen K H, Kunnas T A, Tanner M M, et al. COX-2 Gene Promoter Polymorphism and Coronary Artery Disease in Middle-Aged Men: The Helsinki Sudden Death Study Mediators of Inflammation v. 2008, 1-5

29- Jefferson A. L. , PhD, Massaro J. M. , PhD, Wolf P. A. et al. Inflammatory biomarkers are associated with total brain volume: The Framingham Heart Study , *Neurology*. 2007 March 27; 68(13): 1032–1038

30- Jones WJ, Williams LS, Meschia JF Validating the Questionnaire for Verifying Stroke-Free Status (QVSFS) by neurological history and examination *Stroke*. 2001 Oct;32(10):2232-2236.

31- Kirchoff LV. *Trypanosoma* species (American Trypanosomiasis, Chagas' disease): biology of trypanosomes. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Disease*, 4th edition. New York:Churchill Livingstone; 1995:2442–2450.

32- Kohsaka S, Volcik KA, Folsom AR, et al. Increased risk of incident stroke associated with the cyclooxygenase 2 (COX-2) G-765C polymorphism in African-Americans: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis* 2008; 196(2):926-930.

33- Li M, Gao Y, Li C , et al . Association of COX2 functional polymorphisms and the risk of vitiligo in Chinese populations, *Journal of Dermatological Science* 53 (2009) 176–181

34- Lemaitre RN, Rice K, Marcianti K, et al. Variation in eicosanoid genes, non-fatal myocardial infarction and ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):e58-63.

35- Lohmussaar E, Gschwendtner A, Mueller JC, et al. ALOX5AP gene and the PDE4D gene in a Central European population of stroke patients. *Stroke* 2005; 36: 731-736

36- Maria Ayo C, Dalalio M M O, Visentainer J E L, et al. *Review Article Genetic Susceptibility to Chagas Disease:An Overview about the Infection and about the Association between Disease and the Immune Response Genes*, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 284729, 13 pages

37- Matta J A M, Aras R, Jr, [...], and Netto E M, Stroke Correlates in Chagasic and Non-Chagasic Cardiomyopathies, *Plos One*: 2012; 7(4):e35115

38- Meschia JF, Brott TG, Brown Jr, RD, Crook R et al. Phosphodiesterase 4D and 5-lipoxygenase activating protein in ischemic stroke. *Annals Neurology* 2005; 58(3): 351-361

39-Michailovsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Viera J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2001; 159: 1723-1733.

40- Michelin M.A, Silva J.S, Cunha F.Q.C. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection *Experimental Parasitology* 2005;111: 71–79

41- Moncayo.A Mem Inst Oswaldo Cruz. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *2003 ;98(5):577-591.*

42- Oliveira-Filho J, Vieira-de-Melo RM, Reis PSO, et al. Chagas disease is independently associated with brain atrophy *J Neuro*, 2009. 256: 1363-1365

43- Oliveira-Filho J, Vianna LC, Vieira-de-Melo RM, et al,. Chagas disease is an independent risk factor for stroke: baseline characteristics of a Chagas Disease cohort.. *Stroke*, 2005;36:2015-2017

44- Organização Mundial da Saúde. Control de la Enfermidad de Chagas: série de informes técnicos-811, 1991.

45- Papafili A., Hill M.R, Brull D.J, et al. Common Promoter Variant in Cyclooxygenase-2 Represses Gene Expression: Evidence of Role in Acute-

Phase Inflammatory Response. *Arterioscler, Thomb Vasc Bio*, 2002;22:1631-1636

46- Pires S L, Gagliardi R J, Gorzoni M L Estudo Das Freqüências Dos principais Fatores De Risco Para Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Em Idosos *Arq Neuropsiquiatr* 2004;62(3-B):844-851

47- Pontes-Neto O M; Silva G S; Feitosa M R; et al. Stroke Awareness in Brazil Alarming Results in a Community-Based Study *Stroke*. 2008;39:292-296

48- PY, M. O. ; Pedrosa, R. C. ; Silveira, J. S. ; Medeiros, A. S. ; Andre, C. . Neurological manifestations in Chagas disease without cardiac dysfunction: correlation between the parasympathetic nervous system and white matter lesions in the brain.. *Journal of Neuroimaging*, v. 19, p. 332-336, 2009

49- Queiroz AC, Ramos EA. Estudo anátomo-patológico do cérebro na cardiomegalia idiopática. *Arq Neuropsiquiatr* 1979;37:405-411.

50- Roman-Campos D, Sales-Júnior P, Duarte H L, et al. Cardiomyocyte dysfunction during the chronic phase of Chagas disease, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 108(2): 243-245, April 2013

51- Rost NS, Rahman R, Sonni S, et al. Determinants os White Matter Hyperintensity Volume in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Journal os Stroke and Cerebrovascular Disease*, Vol 19, N°3, 230-235, 2010

52- Sayago-Silva I, Pez F G, and Segovia-Cubero J, Epidemiology of Heart Failure in Spain Over the Last 20 Years, *Rev Esp Cardiol.* 2013;66(8):649–656

53- Teixeira, A. R. L., Hecht M.M., Guimaro Maria C., Sousa Alessandro O., and Nitz Nadjar, Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity, *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, July 2011, p. 592–630

54-Viana LC, Reis FJFB, Lacerda A, et al. Chagas disease cohort study: Long-term predictors of stroke and death. *Stroke* 2006;37:672

55- Wang H, et al. The COX-2 rs20417 polymorphism and risk of coronary artery disease: evidence from 17,621 subjects. *Heart, Lung and Circulation* (2014)

56- Wei-Li Z, Xiao-Min Y, Jia S, et al. Polymorphism of SG13S114T/A in the *ALOX5AP* Gene and the Risk for Stroke in a Large Chinese Cohort. *Acta Genetica Sinica* 2006; 33 (8):678–684

57- WHO, Chagas Disease (American Trypanosomiases), 2010

58- Wenlong L, Xu J, Chen J et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) G-765C is a protective factor for coronary artery disease but not for ischemic stroke: A meta-analysis. *Atherosclerosis*, 2009 Dec, Volume 207, Issue 2, Pages 492–495

59- Zee RYL, Cheng S, Hegener HH, et al. Genetic Variants of Arachidonate 5-Lipoxygenase-Activating Protein, and Risk of Incident Myocardial Infarction and Ischemic Stroke: A Nested Case-Control Approach. *Stroke* 2006;37;2007-2011

60- Zuccalà G, Cattel C, Manes-Gravina E, et al. Left ventricular dysfunction: a clue to cognitive impairment in older patients with heart failure *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1997;63:509–512

61- Zuniga E, Acosta-Rodriguez E, Merino M C et al. Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway *Eur. J. Immunol.* 2005. 35: 1849–1858

ANEXOS

ANEXO 1

Iniciais do investigador: _____ No. Prontuário HUPES: _____

VISITA BASAL

DATA: ____/____/____
D D M M A A A A

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO - Todas as respostas devem ser NÃO para incluir o paciente.

| | SIM | NÃO |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Está em uso de anticoagulantes | | |
| Usa prótese metálica, marcapasso ou cardioversor | | |
| Apresenta história de câncer (exceto pele) | | |
| Realiza diálise ou apresenta doença crônica parenquimatosa do fígado | | |
| Teve evento trombótico sintomático (IAM, TVP/TEP) nos últimos 6 meses | | |
| Já teve AVC alguma vez na vida | | |
| Incapaz de obter consentimento informado do paciente ou responsável | | |

Questionário para verificar ausência de acidente vascular cerebral (QVSFS)

História da moléstia atual (Todas as respostas devem ser NÃO para incluir o paciente, com exceção da Q.2)

1. Seu médico informou que você teve um derrame ou AVC? SIM NÃO
2. Seu médico informou que você teve um AIT ou "princípio de derrame"? SIM NÃO

Revisão dos sintomas (Desde que tenham permanecido por tempo ≥ 24 horas)

3. Você já apresentou subitamente fraqueza indolor em um lado do corpo? SIM NÃO
4. Você já apresentou subitamente dormência ou formigamento em um lado do corpo? SIM NÃO
5. Você já apresentou início súbito e indolor de perda de visão em um ou ambos os olhos? SIM NÃO
6. Você já perdeu subitamente metade de sua visão? SIM NÃO
7. Você já perdeu subitamente a capacidade para entender o que outras pessoas falavam? SIM NÃO
8. Você já perdeu subitamente a capacidade para falar ou escrever? SIM NÃO

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO (Critérios de FRAMINGHAM para diagnóstico de ICC)
2 critérios maiores ou 2 menores e 1 maior para incluir o paciente

| MAIORES | SIM | NÃO |
|------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| Dispneia paroxística noturna | | |
| Ortopneia | | |
| Turgência jugular | | |
| Estertores à ausculta pulmonar | | |
| B3 à ausculta cardíaca | | |
| Cardiomegalia ao Rx de Tórax | | |
| Edema pulmonar ao Rx de tórax | | |
| Pressão venosa central > 16 cm H2O | | |
| Perda de peso ≥4,5Kg em 5 dias em resposta ao tratamento da ICC | | |
| MENORES | SIM | NÃO |
| Edema periférico | | |
| Tosse noturna | | |
| Dispneia aos esforços | | |
| Hepatomegalia | | |
| Derrame pleural | | |
| Taquicardia (FC maior que 120 bpm) | | |
| Perda de peso ≥4,5Kg em 5 dias | | |
| TEM DIAGNÓSTICO DE ICC DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE FRAMINGHAM | SIM | NÃO |

Lembrar de questionar o paciente sobre:

- Disponibilidade para realizar os exames de imagem
- Claustrofobia

IDENTIFICAÇÃO:

Paciente:

Sexo: M (1) F (2) DN: ____/____/19____ Idade:____ Raça: Branco(1) Negro(2)
Mulato(3) Amarelo(4)

Naturalidade: _____ Procedência _____

Profissão: _____

Endereço Residencial Completo:

Cidade: _____ CEP _____ - Estado _____

Telefone: (_____) _____ Tel 02:

(_____) _____

DIAGNÓSTICO DA MIOCARDIOPATIA:

MCC (1) Isquêmica (2) Hipertensiva (3) Álcool (4) Idiopático (5) Valvulopatia Reumática (6)

Periparto (7) Miocardite Viral (8) Outras (9) Miocardite Hipertrofica (10)

Tem Chagas? S (1) N (2)

Classe Funcional: I II III IV Ano do

Diagnóstico: _____

IAM PRÉVIO: S (1) N (2) Data: ____/____/_____

Usa Antiagregante S (1) N (2) **Usa Estatina** S (1) N (2) **Tabagismo atual** S (1) N (2)

DM S (1) N (2) **DAC** S (1) N (2) **HAS** S (1) N (2)

| | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| ESCOLARIDADE: Analfabeto (1) | Fundamental Incompleto (2) | Fundamental Completo (3) |
| Ensino Médio incompleto (4) | Ensino Médio Completo (5) | Superior Incompleto (6) |
| Superior Completo (7) | Pós-graduação/mestrado/doutorado (8) | |

| PARÂMETRO | PONTUAÇÃO |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1a. Nível de consciência | 0=alerta; 1=desperta com estímulo verbal; 2=desperta somente com estímulo doloroso; 3=resposta reflexa a estímulo algico. |
| 1b. Orientação: idade e mês | 0=ambos corretos; 1=um correto; 2=ambos incorretos. |
| 1c. Comandos: abrir/fechar olhos, apertar e soltar mão | 0=ambos corretos; 1=um correto; 2=ambos incorretos. |
| 2. Motricidade ocular (voluntária ou olhos de boneca) | 0=normal; 1=paresia do olhar conjugado; 2=desvio conjugado do olhar. |
| 3. Campos visuais | 0=normal; 1=hemianopsia parcial, quadrantanopsia, extinção; 2=hemianopsia completa; 3=cegueira cortical. |
| 4. Paresia facial | 0=normal; 1=paresia mínima (aspecto normal em repouso, sorriso assimétrico); 2=paresia/segmento inferior da face; 3=paresia/segmentos superior e inferior da face. |
| 5. Motor membro superior: braços entendidos 90° (sentado) ou 45° (deitado) por 10 s. 6. Motor membro inferior: elevar perna a 30° deitado por 5 s. | 0=sem queda; 1=queda, mas não atinge o leito; 2=força contra gravidade mas não sustenta; 3=sem força contra gravidade, mas qualquer movimento mínimo conta; 4=sem movimento. MSD _____ MSE _____ MID _____ MIE _____ |
| 7. Ataxia apendicular | 0=sem ataxia (ou afásico, hemiplégico); 1=ataxia em membro superior ou inferior; 2=ataxia em membro superior e inferior. |
| 8. Sensibilidade dolorosa | 0=normal; 1=déficit unilateral mas reconhece o estímulo (ou afásico, confuso); 2=paciente não reconhece o estímulo ou coma ou déficit bilateral. |
| 9. Linguagem | 0=normal; 1=afasia leve-moderada (compreensível); 2=afasia severa (quase sem troca de informações); 3=mudo, afasia global, coma. |
| 10. Disartria | 0=normal; 1=leve a moderada; 2=severa, ininteligível ou mudo; X=intubado. |
| 11. Extinção/negligência | 0=normal; 1=negligência ou extinção em uma modalidade sensorial; 2=negligência em mais de uma modalidade sensorial. |

TOTAL NIHSS: _____

EXAME FÍSICO: Peso _____ Alt.: _____ PA: _____ / _____ mmHg FC _____ bpm FR _____ irpm

Estase jugulares a 45°: Não (1) Sim (2)

Estertores Não (1) Sim, em bases (2) Sim, em terço médio (3) Sim, EAP (4)

Sopro sistólico: Não (1) Sim (Ao ____/VI; mitral ____/IV; tricúspide ____/VI; pulmonar ____/VI)

Sopro diastólico: Não (1) (Ao ____/VI; mitral ____/IV; tricúspide ____/VI; pulmonar ____/VI)

Frêmito Não (1) Sim (2) **Atrito pericárdico** Não (1) Sim (2) **Ictus:** Não (1) Sim: ____ EIC

Ascite Não (1) Sim (2) **Hepatomegalia** Não (1) Sim (2) **Edema em extremidades:** Não (1) Sim (/4+)

Hb: _____ **Ht:** _____

ELETROCARDIOGRAMA em ____/____/_____:

Ritmo: Sinusal (1) Juncional (2) FA (3) Flutter (4) Marcapasso (5) Idioventricular (6)

BloqueioAV: N(0) BAV 1º grau (1) BAV 2º grau tipo I □ (2) BAV 2º grau tipo II (3) BAV total (4)

BRE Sim (1) Não (2) **BRD** Sim (1) Não (2) **BDAS** Sim (1) Não (2)

BDPI Sim (1) Não (2) **BDAM** Sim (1) Não (2) **Bloq. Sinusal** Sim (1) Não (2)

Arritmias Supraventriculares:

Extrassístoles supraventriculares (1) Salvas de ESSV (2) Ausência de arritmia SV (3)

Arritmias Ventriculares:

Extrassístoles ventriculares (1) Salvas de ESV (2) Ausência de arritmia Ventricular (3)

Sobrecarga: **AE** Sim (1) Não (2) **VE** Sim (1) Não (2) **AD** Sim (1) Não (2) **VD** Sim (1) Não (2)

Zona eletricamente inativa Sim (1) Não (2)

ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCICO em ____/____/_____

AE: _____

Dados do VE:

DD _____ DS _____ FE _____ Delta _____ Par.Post. _____ Septo _____

Alteração Segmentar:

Septal Sim (1) Não (2) **Lateral** Sim (1) Não (2) **Posterior** Sim (1) Não (2)

Inferior Sim (1) Não (2) **Anterior** Sim (1) Não (2) **Apical** Sim (1) Não (2)

Comprometimento do VE: Sim (1) Não (2)

Comprometimento de VD: Sim (1) Não (2)

| | |
|-----------------------------|---------------------|
| Prolapso Mitral | Não (1) Sim (2) |
| Estenose mitral | Não (1) Sim (2) |
| Calcificação mitral | Não (1) Sim (2) |
| Válvula metálica | Não (1) Sim (2) |
| Bioprótese valvar | Não (1) Sim (2) |
| Aneurisma em ápice de VE | Não (1) Sim (2) |
| Aneurisma atrial septal | Não (1) Sim (2) |
| Forame oval patente | Não (1) Sim (2) |
| Turbulência atrial("smoke") | Não (1) Sim (2) |
| Mixoma atrial | Não (1) Sim (2) |
| Endocardite bacteriana | Não (1) Sim (2) |
| Endocardite não-bacteriana | Não (1) Sim (2) |

Trombo

Trombo em VE (1) Trombo em AE (2) Trombo em AD (3) Trombo em VD (4) AUSÊNCIA (9)

Função diastólica

Normal (1) Alt. Relaxamento (2) Pseudonormal (3) Restritivo (4)

Observações _____

| | | | |
|-------------------------------|--------------------|----------------|----------------|
| SOROLOGIA PARA CHAGAS: | Dado perdido (0) | POSITIVA (1) | NEGATIVA (2) |
|-------------------------------|--------------------|----------------|----------------|

QUALIDADE DE VIDA:**Mobilidade**

(1) Não tem problemas para andar (2) Tem alguma dificuldade para andar (3) Está confinado à cama

Dor/desconforto

(1) Não tem dor ou desconforto extremos (2) Tem dor ou desconforto moderados (3) Tem dor ou desconforto

Auto-ajuda

(1) Não tem dificuldades para se cuidar ou tomar banho sozinho (2) Tem algumas dificuldades para se cuidar (3) É incapaz de se vestir

Ansiedade/Depressão

(1) Não está ansioso ou deprimido ansioso ou deprimido (2) Está moderadamente ansioso ou deprimido (3) Está extremamente

Atividades habituais

(1) Não tem dificuldades para realizar atividades habituais (2) Tem alguma dificuldade p/ realizar atividades habituais

(3) É incapaz de realizar atividades habituais

Moradia

No. de pessoas que moram em sua casa (contando com o paciente): _____

Tipo de casa : (1) Taipa (2) Tijolo

Tipo de telhado: (1) Telha/laje (2) Palha (3) PVC/fibra de vidro

No. de quartos na casa: _____

FATORES DE RISCO:

Tabagismo: (1) Nunca fumou (2) Fumou no Passado (3) Fuma atualmente

Nº. Cigarros/dia _____ Nº. anos fumando _____ tem quantos anos que parou: _____

Etilismo: (1) Nunca (2) Bebeu muito no passado mas parou (3) Ocasional no passado (4) Ocasional no presente

(5) 1-2vezes/dia no presente (6) 3 ou mais vezes /dia no presente

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: Neuroimagem na Doença de Chagas (CHADSS - Chagas disease scan study)

Pesquisadores Responsáveis: Jamary Oliveira Filho, Pedro Antonio Pereira de Jesus, Luciana Pimentel, Francisco Reis e Karen Furie

Justificativa e Objetivo

Estamos solicitando sua participação em um projeto de pesquisa sobre doença de Chagas. A doença de Chagas é uma doença freqüente em nossa região, causada por um agente transmitido pela picada do barbeiro. A maioria das pessoas manifesta a doença com problemas no coração, como arritmias, falta de ar, e inchaço nas pernas. Algumas pessoas, entretanto, podem desenvolver coágulos no coração que podem se desprender e causar entupimento de artérias no cérebro, o chamado “derrame cerebral”. Esta pesquisa visa descobrir quais são essas pessoas em risco para desenvolver esses derrames cerebrais.

Procedimentos

O estudo será desenvolvido no Ambulatório de Cardiomiopatias do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES) com cerca de 500 pacientes. Como parte do estudo, todos os participantes serão avaliados por um dos pesquisadores responsáveis e responderão a um questionário estruturado e terão sangue colhido para exame. Uma parte desse material será analisada imediatamente para pesquisa de fatores no sangue que aumentem o risco de derrame cerebral. Outra parte do material será guardada para estudar características do seu código genético (material presente em todas as células do seu corpo e que diferenciam você de outras pessoas). Este material guardado só será utilizado em outras pesquisas com a sua autorização mediante assinatura de um novo termo de consentimento. Não serão realizadas intervenções cirúrgicas como parte desse estudo.

Como parte do estudo será realizado um exame de ultrassonografia cerebral (Doppler transcraniano) para avaliar a circulação do sangue no cérebro, que permitirá avaliar a presença de coágulos nos vasos do cérebro e desta maneira determinar o risco do desenvolvimento de derrame. A realização deste exame não provoca dor ou exposição a raio X ou qualquer complicação. Será colocado um pequeno transdutor (pequeno objeto semelhante a um microfone) em contacto com a sua pele na região temporal (têmporas) sem provocar dor com leve pressão, sendo necessário que permaneça deitado e sem mexer muito a cabeça durante aproximadamente 1 hora, podendo interromper o exame por alguns minutos para descanso ou mesmo parar o exame se desejar.

Não sabemos o real significado desses pequenos coágulos localizados nos vasos do cérebro. Por esse motivo, metade dos pacientes receberá uma medicação anticoagulante, para “afinar” o sangue e evitar a formação de novos coágulos, chamada ácido acetil-salicílico (AAS), durante 1 (uma) semana. Ao final desta semana será repetido o estudo de Doppler transcraniano. Os dois grupos de pacientes (usando ou não AAS) serão aconselhados quanto à prevenção primária habitual de derrame cerebral.

Por fim, será realizado um exame de ressonância magnética cerebral que irá determinar se já houve algum derrame cerebral, mesmo que não tenha gerado sintomas. Para realizar esse exame, os participantes irão comparecer a uma clínica de radiologia (Image Memorial) em dia previamente agendado, deitarão em uma mesa de exame, e aguardarão cerca de 20 minutos enquanto o aparelho tira várias fotos do cérebro. Os pacientes que apresentarem sinais de derrame cerebral na ressonância magnética ou coágulos no

Doppler transcraniano serão aconselhados quanto à prevenção habitual de derrame cerebral.

Esclarecimentos sobre a pesquisa

Sua assistência médica continuará sendo realizada no HUPES. Qualquer dúvida sobre a pesquisa poderá ser esclarecida por um dos pesquisadores (Dr. Jamarly Oliveira Filho – tel. 3353-5156 ou 9162-0954, e Francisco Reis – tel. 9982-2808). Ambos os pesquisadores e o Comitê de Ética em Pesquisa estão localizados no HUPES, Rua Augusto Viana, sem número: Bairro Canela, CEP 40110-060, tel. 3283-8000.

Riscos e Benefícios

Risco mínimo (<1%) é associado com a retirada de sangue para o estudo, como inflamação, infecção e formação de hematoma no local da retirada do sangue. Esses efeitos podem ser revertidos com uso de medicação local ou mesmo espontaneamente. Não há efeitos adversos conhecidos do Doppler transcraniano ou da ressonância magnética. O som do aparelho de ressonância magnética pode incomodar, mas protetores de ouvido serão fornecidos para minimizar esse incômodo. O medicamento AAS raramente (<1%) pode estar associado a reação alérgica, sangramento nas fezes, vômitos, náuseas, zumbido, broncoespasmo e síndrome de Reye (este último somente em crianças). No caso de apresentar qualquer uma destas reações você deverá fazer contato imediato com um dos pesquisadores do estudo, o qual garantirá o tratamento desses sintomas.

Não há benefício direto na participação desse estudo. Você estará ajudando a médicos e outros pacientes a compreenderem melhor essa doença e como potencialmente evitá-la e tratá-la melhor.

Liberdade de Recusa ou Desistência

A participação nesse estudo é voluntária. Caso não queira participar nesse estudo, seu cuidado médico continuará a ser o mesmo de qualquer outro paciente. Em qualquer momento poderá desistir do estudo sem que isto afete os cuidados médicos a que tem direito.

Sigilo e Privacidade

Seu nome e registro médico serão mantidos em total sigilo pelos pesquisadores. As fichas serão guardadas em local lacrado inacessível a outros médicos ou curiosos.

Custos

Não haverão gastos por parte dos pacientes. Haverá ressarcimento do valor do transporte quando o motivo do transporte tiver sido exclusivamente para a pesquisa. Não haverá ressarcimento de transporte para as consultas médicas de rotina no ambulatório.

É garantido ao paciente uma indenização em casos de danos diretos decorrentes da participação deste estudo.

Tendo lido o conteúdo acima, concordo e subscrevo-me abaixo,

Paciente

Data

| | |
|-------------|------|
| Pesquisador | Data |
|-------------|------|

| | |
|-------------|------|
| Testemunha1 | Data |
|-------------|------|

| | |
|-------------|------|
| Testemunha2 | Data |
|-------------|------|

ANEXO 3

COX-2 rs20417 polymorphism is associated with stroke and white matter disease

Jamary Oliveira-Filho^{1,2}, Ana C.P. Ornellas^{1,2}, Cathy R. Zhang³, Luciana M.B. Oliveira^{1,2}, Théo Araújo-Santos⁴, Valeria M. Borges⁵, Laís M.G.B. Ventura^{1,2}, Francisco J. F. B. Reis¹, Roque Aras¹, André M. Fernandes¹, Jonathan Rosand³, Steven M. Greenberg³, Karen L. Furie⁶, Natalia S. Rost³.

From the (1) Stroke and Cardiomyopathy Clinics, Federal University of Bahia; (2) Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia em Doencas Tropicais (INCT-DT), Brazilian National Research Committee (CNPq); (3) Stroke Division, Massachusetts General Hospital; (4) Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB); (5) Centro de Pesquisas Goncalo Moniz, Oswaldo Cruz Foundation – Bahia (CPqGM, FIOCRUZ-BA); and (6) Department of Neurology, Brown University.

Cover title: COX-2 gene polymorphism and stroke

Number of tables: 3

Key words: [44] Acute Cerebral Infarction, [55] Genetics of Stroke, [58] Magnetic Resonance Imaging, Chagas disease

Total word count: 4063.

Corresponding author:

Jamary Oliveira-Filho, MD, MS, PhD

Rua Reitor Miguel Calmon, sem número, Instituto de Ciencias da Saude, sala 415

Salvador, Bahia 40110-100, Brazil

Telefax: +55-71-33348603 Email: jamary@mail.harvard.edu

Abstract

Background and Purpose: The rs20417 cyclooxygenase-2 (COX-2) polymorphism is associated with risk of coronary heart disease. We aimed to investigate the effect of COX-2 polymorphism and its product, prostaglandin-E2 (PGE2), on stroke risk in an endemic area for Chagas disease (Brazil). In a separate cohort (Boston), we investigated the effect of COX-2 polymorphisms on a total burden of cerebral white matter disease.

Methods: Cases were outpatients with ischemic stroke; controls were stroke-free subjects from two outpatient clinics (heart failure and caregivers of a movement disorders clinic). We extracted DNA from total blood to investigate the rs20417 COX-2 polymorphism. Serologic tests (ELISA) were performed to confirm *T. cruzi* infection and to quantify PGE2 levels. In the Boston cohort, white matter hyperintensity volume (WMHv) was quantified on the admission brain MRIs of subjects with ischemic stroke, who also donated DNA for the COX-2 gene region analysis.

Results: We studied 44 patients with stroke and 96 controls (46 with heart failure and 50 caregivers) in the Brazilian cohort; and 788 stroke patients (302 cardioembolic, 486 non-cardioembolic) in the Boston cohort. In the Brazilian cohort, rs20417 polymorphism was associated with both stroke ($p=5 \times 10^{-6}$) and decreased PGE2 levels ($p=4 \times 10^{-5}$); similarly, Chagas was associated with stroke ($p=4 \times 10^{-3}$) and decreased PGE2 levels ($p=7 \times 10^{-3}$). In the Boston cohort, rs20417 polymorphism was associated with increased WMHv among non-cardioembolic ($p=0.037$), but not among cardioembolic stroke patients.

Conclusions: Variation in COX-2 gene is associated with both symptomatic and silent brain cerebrovascular disease. This candidate gene region should be tested in population-based samples.

Key Words: Chagas disease, COX-2 polymorphism, prostaglandin E2, stroke.

INTRODUCTION

The human gene for cyclooxygenase-2 (COX-2) is located on chromosome 1q25.2-q25.3 and converts fatty acids into prostaglandins. The enzyme has three known isoforms: COX-1, which is expressed in most human tissues under basal conditions; COX-2, whose expression is induced primarily in response to inflammatory stimuli; and COX-3, which is an isoenzyme derived from COX-1¹. The expression of COX-2 is enhanced in chronic inflammatory diseases, including atherosclerosis and chronic infections. The rs20417 G>C COX-2 polymorphism has been associated with decreased gene expression and protection against coronary heart disease^{2,3}. However, no consistent association has been found with stroke, although a COX-2 inhibitor drug was withdrawn from the market because of an increased stroke risk⁴.

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, a flagellate parasite acquired through contact with an insect vector, and it is a major cause of cardiac disease and stroke in South America⁵. Up to 8% of the South American population is seropositive for Chagas, but only 10% to 30% of the infected individuals will present the symptomatic form of the disease⁶. Over 300,000 individuals with the infection are estimated to live in the United States⁷. Stroke is associated with Chagas independently of cardiomyopathy⁸, and since Chagas serologic tests are not a routine part of stroke investigation, its prevalence is likely underestimated. The main product of the COX pathway, prostaglandin-E2 (PGE2), is found in high levels in acute Chagas⁹, and treatment with COX-2 inhibitors and subsequent inhibition of PGE2 synthesis can reduce cardiac damage during the acute phase of experimental Chagas disease¹⁰. However, the exact role of COX-2 in chronic Chagas is unknown.

A total burden of white matter disease is detected on T2 MRI as white matter hyperintensity (WMH), which is considered a marker of chronic small vessel cerebrovascular disease¹¹. Although grouped under the term of “silent” brain pathology, WMH has been associated with cognitive decline and increased stroke risk¹². Several polymorphisms have been associated with the phenotype of WMH, which may identify important pathways in the pathophysiology of cerebrovascular diseases¹³. In this study, we sought to determine the effect of the rs20417 COX-2 gene polymorphism on cerebrovascular disease in two separate cohorts. In a Brazilian cohort where Chagas is endemic, we investigated the effect of rs20417 polymorphism on stroke risk; in a Boston cohort, we investigated the effect of rs20417 and other COX-2 polymorphisms on WMH severity. Secondary aims in the Brazilian cohort were to determine whether there is a significant interaction between Chagas and the rs20417 polymorphism; and whether the rs20417 polymorphism and Chagas affect PGE2 serum levels.

METHODS

Brazilian cohort

Patient ascertainment. The present study involved two cohorts (Brazil and Boston). In the Brazilian cohort, patients were recruited consecutively at a university-based outpatient clinic. Cases were patients with neuroimaging-confirmed ischemic stroke (IS) recruited from a reference stroke clinic at Hospital Universitario Professor Edgard Santos. Controls were stroke-free subjects from a heart failure (HF) clinic and caregivers from a movement disorders clinic. HF patients were part of a larger cohort study studying biomarkers and neuroimaging in Chagas, registered under Clinicaltrials.gov (identifier NCT01650792). We applied the Questionnaire for Verifying Stroke-Free Status¹⁴ to exclude stroke from the

heart failure and caregiver groups. IS was defined as an acute onset of a focal neurological deficit lasting over 24 hours and confirmed by imaging (CT or MRI). The present study was approved by the local ethics committee and all patients signed informed consent.

Clinical characteristics. A standardized questionnaire was used to collect data on patient admission: demographic information such as age and sex, cerebrovascular risk factors such as systemic hypertension (defined as two outpatient blood pressure measurements above 140/90 mmHg or by previous antihypertensive medication use for this indication), dyslipidemia (defined as total serum cholesterol > 200mg/dl or LDL > 100mg/dl or HDL < 50mg/dl or triglycerides > 150mg/dl or by current statin or lipid-lowering medication use), diabetes mellitus (defined by a previous diagnosis or current medication use), atrial fibrillation detected on any previous EKG or Holter monitorization and current smoking.

Laboratory analysis. Genomic DNA was extracted from patients' blood using a Qiagen kit (QIAamp ® DNA Mini Kit). After extraction, a polymerase chain reaction (PCR) was performed using specific primers and after amplification, restriction fragment length polymorphism (RFLP) was conducted, with restriction enzymes specific for each polymorphism. To investigate the presence of the rs20417 polymorphism, primers CF8 (5' CCGCTTCCTTTGTCCATCAG 3') and CR7 (5' GGCTGTATATCTGCTCTATATGC 3') with standard PCR conditions were used. The PCR product was subjected to RFLP using the restriction enzyme AclI. The PCR product consists of 306 base pairs and the presence of the polymorphism will result in one band of 188 base pairs and another one of 118 base pairs, and can be visualized on 2% agarose gel on a UV transilluminator.

PGE2 levels were estimated in plasma samples by enzyme-linked immunoassay, according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, USA).

Boston cohort

Patient ascertainment. Study subjects were recruited as part of an ongoing hospital-based study of patients with IS. Consecutive patients aged ≥ 18 years admitted to the Massachusetts General Hospital (MGH) Stroke Unit, including those admitted directly to the emergency department (ED) or transferred to the ED from a referring hospital, between July 2000 and December 2013 were considered for enrollment. Patients were evaluated by a neurologist and imaged prior to diagnosis IS defined as either (1) clinical stroke syndrome associated with radiographically proven infarct or (2) a fixed neurological deficit persisting for >24 hours that was consistent with a vascular event but without evidence of demyelination or nonvascular disease. Only patients with axial T2-FLAIR sequences of quality suitable for quantification on cranial MRIs obtained <72 hours after admission for stroke were included in the analysis. Patients with symptoms of ischemic stroke related to specific vascular disorders (such as vasculitis, subacute bacterial endocarditis, fibromuscular dysplasia, vasospasm due to subarachnoid hemorrhage or cocaine abuse) or other known causes of WMH/stroke (such as CADASIL, MELAS, cranial radiotherapy, leukodystrophies, or mitochondrial disorders) were excluded. The institutional review board approved all aspects of this study, and informed consent was provided by all subjects or their medical proxy. Phenotyping of ischemic etiology was performed according to the Causative Classification of Stroke or TOAST Classification, as previously described^{15,16}. Patients with large vessel atherosclerosis, small vessel atherosclerosis and other or undetermined

causes of IS were grouped into a “non-cardioembolic stroke” category and analyzed separately from patients with cardioembolic ischemic stroke.

Neuroimaging Analysis. MRI scans were acquired on 1.5 T Signa scanners (GE Medical Systems, Milwaukee, WI) and converted from Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM) format to Analyze format, using MRIcro software (www.mricro.com). Using a previously published semi-automated method with high inter-rater reliability, axial T2-FLAIR sequences aligned with corresponding diffusion weighted imaging (DWI) sequences were used to create WMH volume (WMHv) maps, excluding acute ischemia, edema, and chronic territorial infarcts¹⁷. The WMHv in the hemisphere unaffected by the acute stroke was doubled to calculate total WMHv, which was then normalized for head size.

Genotyping. Genotyping was performed on the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix), Illumina Human610-Quad v1.0 (Illumina), or HumanOmniExpress-12 v1.0 (Illumina) platforms. Standard quality control measures excluded improperly genotyped or rare single nucleotide polymorphisms (SNPs) and subjects that were (1) improperly genotyped, (2) related to another subject with higher genotyping rate, or (3) were demonstrated to have non-European ancestry by principal component analysis with reference populations from the HapMap Project. Unobserved SNPs were imputed using Segmented HAPlotype Estimation and Imputation Tool (SHAPEIT) v2.5, IMPUTE2 v2.2.2 and phase 1 version 3 reference panels from the 1000 Genomes Project. All genetic analyses were performed using PLINK v1.07, including age, sex, and principal components 1 and 2 as covariates in association analysis of log-transformed WMHv.

Statistical analysis

Descriptive statistics and regression models for the Brazilian cohort were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0. Normally distributed continuous variables were summarized as means and standard deviations, while categorical variables were expressed as proportions. All regression models were adjusted for age and sex. Multinomial regression was used to investigate the association between the rs20417 polymorphism (number of C alleles), Chagas (binary independent variable) and stroke (dependent variable). An interaction term between the rs20417 polymorphism and Chagas was used to test for multiplicative effect measure modification. We used log-transformed PGE2 levels due to the skewed distribution of PGE2 and applied linear regression to investigate the association between the rs20417 polymorphism (number of C alleles) and log-transformed PGE2 levels, also adjusted for age and sex. We reported crude p-values and considered values less than 0.05 after Bonferroni correction as statistically significant.

RESULTS

Clinical characteristics of the Brazilian and Boston cohorts are shown in Table 1. In the Brazilian cohort, we studied 140 individuals, including 44 ischemic stroke cases and 96 controls (50 caregivers and 46 stroke-free subjects with HF). Mean age was 64 ± 11 years, 84 (60%) female. Among stroke cases, 18 (40%) were cardioembolic and 26 (60%) non-cardioembolic. The Boston cohort had 788 ischemic stroke patients, mean age 66 ± 14 years, 298 (38%) female; 302 (38%) were cardioembolic and 486 (62%) non-cardioembolic. Most etiologic phenotypic classification was performed using CCS, but in 264 (34%) subjects the TOAST classification was used, with similar age distribution for subjects categorized according to each classification ($p=0.094$). When both classifications were available ($n=447$), agreement between CCS and TOAST in

cardioembolic category determination was 81%. Distribution of rs20417 genotypes showed a predominance of the C allele in the stroke groups (61% in the Brazilian stroke group and 83% in the Boston cohort) and a predominance of the G allele in the control group (66%).

Table 2 shows the effect of the rs20417 COX-2 gene polymorphism and Chagas on the risk of stroke in the Brazilian cohort. We found a significant association between the rs20417 polymorphism and stroke (odds ratio 6.97; 95% confidence interval 3.02 to 16.07, $p = 5.28 \times 10^{-6}$); and between Chagas and stroke (odds ratio 6.71; 95% confidence interval (CI) 1.85-24.37, $p = 3.80 \times 10^{-3}$). No significant multiplicative interaction between Chagas and the polymorphism was found ($p=0.313$). The association between the rs20417 polymorphism and stroke remained significant when comparing the stroke group to both control groups (HF and caregivers) categorized as a single group – odds ratio 3.51, 95% CI 1.86-6.63, $p = 1.02 \times 10^{-4}$). Hardy-Weinberg equilibrium was met in all groups ($p=0.319$ for the Brazilian stroke group, $p=0.649$ for the Brazilian control group and $p=0.562$ for the Boston stroke cohort).

In Table 3, we show the effect of both the rs20417 polymorphism and Chagas on the main COX-2 gene product, PGE2. Increasing C allele count was associated with a significant decrease in PGE2 level (beta coefficient = -0.77, standard error=0.19, $p=4.1 \times 10^{-5}$); similarly, Chagas was also associated with decreased PGE2 level (beta coefficient = -0.76, standard error = 0.28, $p=7.0 \times 10^{-3}$). However, no significant interaction was found between Chagas and the rs20417 polymorphism ($p=0.431$).

In the Boston cohort, three polymorphisms within the COX-2 gene region were significantly associated with WMHv: rs19545927, rs20417 and rs201231411 (Table 4). The only polymorphism associated with both cardioembolic and non-cardioembolic stroke was rs199545927, while rs20417 and rs201231411 had significant association only with non-cardioembolic stroke. The direction of the association of the rs20417 polymorphism was similar to the Brazilian cohort, with increasing C allele count associated with increasing WMHv (p=0.037).

DISCUSSION

The association between the COX-2 gene rs20417 polymorphism and stroke is controversial. While adequately powered cohorts have suggested an association¹⁸⁻²⁰, the most recent meta-analysis did not confirm prior findings². One potential explanation is that the association is highly dependent on the interaction with environmental factors affecting expression of the gene. Experimental studies suggest that both acutely enhanced expression and chronic inhibition of the COX-2 pathway promotes neuronal damage^{4, 21, 22}. The major strengths of the present study are the investigation of the COX-2 gene pathway in a disease model (Chagas disease) where chronic inhibition of the pathway occurs; and the validation of the COX-2 gene pathway in acute and chronic vascular outcomes in two independent cohorts.

The major finding of the study is the evidence of association between the rs20417 polymorphism and stroke in the Brazilian cohort. The association was confirmed in both a case-control logistic regression model and a multinomial regression model. We also confirmed a previously demonstrated association between Chagas disease and stroke^{5, 8}, which seems to be independent of cardiac disease and may be mediated by

inflammatory mechanisms. While it is known that triggers of inflammation, such as Chagas disease, influence COX-2 gene expression, we hypothesized that the interaction between these two factors would further increase stroke risk. However, we could not confirm this hypothesis, possibly due to insufficient statistical power.

We further investigated the COX-2 gene pathway by measuring PGE2 serum levels in the Brazilian cohort and confirmed that both the rs20417 polymorphism and chronic Chagas disease were associated with lower PGE2 levels. Experimentally, both acutely elevated and chronically low PGE2 levels are associated with adverse outcomes in stroke^{4, 22}. In a knock-out mouse model with acute Chagas disease infection, cardiac myocytes with low PGE2 levels had decreased survival when compared to wild-type mice with normal PGE2 levels²³. In human chronic cardiac Chagas disease, one study found that anti-muscarinic acetylcholine receptor antibodies activate COX-2 gene expression and PGE2 production²⁴. Jointly, these data support the role of the COX-2 gene pathway in stroke and Chagas disease.

We further explored the relevance of the COX-2 gene pathway in silent brain cerebrovascular disease and found new associations between three polymorphisms (rs19545927, rs20417 and rs201231411) within the locus of interest and WMHv. White matter disease is a marker of small vessel disease and increases with aging and cumulative burden of cerebrovascular risk factors^{11, 17}. Additionally, chronic inflammatory diseases such as lupus erythematosus may trigger white matter disease without these cerebrovascular risk factors^{25, 26}.

There are limitations to our study. The wide confidence intervals and large effect size for stroke risk reflect the small sample size from the Brazilian cohort and increase the probability of a false-positive finding, highlighting the need for replication in a larger population-based sample in order to ensure generalizability of our findings. However, the results were robust in two separate statistical models, and the relevance of the COX-2 gene pathway in silent brain ischemia was confirmed in an independent, larger cohort. In the Brazilian cohort, controls were sampled from two separate groups that differed considerably in cerebrovascular risk factor burden, where patients with HF would be more similar to stroke patients than the caregiver group. If this were true (i.e., controls are more similar to cases), then one would expect a decreased chance of finding significant association in this analysis, which is not the case. Finally, the Boston cohort lacked a control group or information about Chagas status. However, we studied WMH, a validated surrogate for chronic brain small vessel disease, and the proportion of Chagas in the Boston sample is expected to be low.

SUMMARY/CONCLUSIONS

In a case-control design, we demonstrated that both Chagas disease and a COX-2 gene polymorphism, rs20417, are associated with increased stroke risk and decreased serum PGE2 levels. In a separate cohort, three separate COX-2 gene polymorphisms were associated with chronic silent brain cerebrovascular disease detected on brain MRI as WMH. Together, these findings suggest that the COX-2 gene pathway should be investigated in population-based samples as a potential target for ischemic stroke therapies.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported, in part, by NIH grant R01NS063925 and a Brazilian National Committee in Research (CNPq) Productivity Grant (J.O.-F.).

REFERENCES

1. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nature genetics* 2004;36:233-239.
2. Li W, Xu J, Wang X, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) G-765C is a protective factor for coronary artery disease but not for ischemic stroke: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2009;207:492-495.
3. Wang H, Fu Y, Liu D, et al. The COX-2 rs20417 polymorphism and risk of coronary artery disease: evidence from 17,621 subjects. *Heart, lung & circulation* 2014;23:572-577.
4. Funk CD, FitzGerald GA. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2007;50:470-479.
5. Carod-Artal FJ. Stroke: a neglected complication of American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007;101:1075-1080.
6. Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas disease and stroke. *The Lancet Neurology* 2010;9:533-542.
7. Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009;49:e52-54.

8. Oliveira-Filho J, Viana LC, Vieira-de-Melo RM, et al. Chagas disease is an independent risk factor for stroke: baseline characteristics of a Chagas Disease cohort. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2005;36:2015-2017.
9. Corral RS, Guerrero NA, Cuervo H, Girones N, Fresno M. Trypanosoma cruzi infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. *PLoS neglected tropical diseases* 2013;7:e2034.
10. Abdalla GK, Faria GE, Silva KT, Castro EC, Reis MA, Michelin MA. Trypanosoma cruzi: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Experimental parasitology* 2008;118:514-521.
11. Rost NS, Rahman RM, Biffi A, et al. White matter hyperintensity volume is increased in small vessel stroke subtypes. *Neurology* 2010;75:1670-1677.
12. Chutinet A, Rost NS. White matter disease as a biomarker for long-term cerebrovascular disease and dementia. *Current treatment options in cardiovascular medicine* 2014;16:292.
13. Adib-Samii P, Rost N, Traylor M, et al. 17q25 Locus is associated with white matter hyperintensity volume in ischemic stroke, but not with lacunar stroke status. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2013;44:1609-1615.
14. Jones WJ, Williams LS, Meschia JF. Validating the Questionnaire for Verifying Stroke-Free Status (QVSFS) by neurological history and examination. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2001;32:2232-2236.
15. Ay H, Benner T, Arsava EM, et al. A computerized algorithm for etiologic classification of ischemic stroke: the Causative Classification of Stroke System. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2007;38:2979-2984.
16. Gordon DL, Bendixen BH, Adams HP, Jr., Clarke W, Kappelle LJ, Woolson RF. Interphysician agreement in the diagnosis of subtypes of acute ischemic stroke:

implications for clinical trials. The TOAST Investigators. *Neurology* 1993;43:1021-1027.

17. Rost NS, Rahman R, Sonni S, et al. Determinants of white matter hyperintensity volume in patients with acute ischemic stroke. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 2010;19:230-235.

18. Kohsaka S, Volcik KA, Folsom AR, et al. Increased risk of incident stroke associated with the cyclooxygenase 2 (COX-2) G-765C polymorphism in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis* 2008;196:926-930.

19. Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC. Cyclooxygenase polymorphisms and risk of cardiovascular events: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2008;83:52-60.

20. Yi XY, Zhou Q, Lin J, Chi LF, Chi WZ. Interaction between ALOX5AP-SG13S114A/T and COX-2-765G/C increases susceptibility to cerebral infarction in a Chinese population. *Genetics and molecular research : GMR* 2013;12:1660-1669.

21. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 2002;296:539-541.

22. Liang X, Lin L, Woodling NS, et al. Signaling via the prostaglandin E₂ receptor EP₄ exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia. *The Journal of clinical investigation* 2011;121:4362-4371.

23. Sharma J, Eickhoff CS, Hoft DF, Ford DA, Gross RW, McHowat J. The absence of myocardial calcium-independent phospholipase A₂γ results in impaired prostaglandin E₂ production and decreased survival in mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity* 2013;81:2278-2287.

24. Ganzinelli S, Borda E, Joensen L, Sterin-Borda L. Chagasic antibodies induce cardiac COX-2/iNOS mRNA expression with PGE2/NO production. *International journal of cardiology* 2009;134:212-223.
25. Kozora E, Filley CM. Cognitive dysfunction and white matter abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* 2011;17:385-392.
26. Tektonidou MG, Varsou N, Kotoulas G, Antoniou A, Moutsopoulos HM. Cognitive deficits in patients with antiphospholipid syndrome: association with clinical, laboratory, and brain magnetic resonance imaging findings. *Archives of internal medicine* 2006;166:2278-2284.

TABLES

Table 1: Clinical characteristics of the Brazilian and Boston cohorts.

| Variable | Brazilian cohort | | | Boston cohort (stroke) n=788 |
|----------------------------|------------------|-------------------------|---------------------|------------------------------------|
| | Stroke (n=44) | Heart failure (n=46) | Controls (n=50) | |
| Age (years), mean +/- SD | 65+/- 13 | 63+/- 11 | 65 +/- 9 | 66 +/- 14 |
| Female sex, n (%) | 21 (48) | 26 (57) | 35 (70) | 298 (38) |
| Chagas Disease, n (%) | 19 (43) | 22 (48) | 5 (10) | - |
| rs20417 genotype | | | | |
| GG, n (%) | 5 (11) | 9 (20) | 34 (68) | 20 (3) |
| GC, n (%) | 24 (55) | 31 (67) | 10 (20) | 225 (29) |
| CC, n (%) | 15 (34) | 6 (13) | 6 (12) | 543 (69) |
| Minor (C) allele frequency | 0.61 | 0.47 | 0.22 | 0.83 |

Table 2: Multinomial regression predictors of stroke and heart failure in 140 patients from the Brazilian cohort, adjusted for age and sex.

| Group | Variable | Odds ratio | 95% CI | P-value |
|------------------------------|------------------------|----------------------------------|---------------|----------------------|
| Stroke vs. caregivers | rs20417 C allele count | 6.97 for every additional allele | 3.02 to 16.07 | 5.3×10^{-6} |
| | Chagas disease | 6.71 | 1.85 to 24.37 | 3.8×10^{-3} |
| Heart failure vs. caregivers | rs20417 C allele count | 3.25 for every additional allele | 1.55 to 6.79 | 2.0×10^{-3} |
| | Chagas disease | 8.00 | 2.46 to 26.03 | 1.0×10^{-3} |

*p=0.313 for COX-2/Chagas interaction.

Table 3: Effects of COX-2 rs20417 polymorphism and Chagas disease on serum PGE2 level in 115 subjects from the Brazilian cohort, adjusted for age and sex.

| Variable | Effect estimate | Standard error | P-value |
|----------------------------------------|------------------------------------|----------------|----------------------|
| rs20417 minor allele count (0, 1 or 2) | -0.766 for every additional allele | 0.187 | 4.1×10^{-5} |
| Chagas disease | -0.755 | 0.282 | 7.0×10^{-3} |

*p=0.431 for COX-2/Chagas interaction.

Table 4: Effect of COX-2 gene polymorphisms on log-transformed white matter hyperintensity volume in 788 stroke patients from the Boston cohort (adjusted for age, sex, and principal components 1 and 2). The non-cardioembolic (non-CE) cohort had 486 patients.

| SNP | Cohort | Risk Allele | Effect estimate | Standard error | P-value |
|-------------|--------|-------------|-----------------|----------------|---------|
| rs199545927 | All | A | 0.247 | 0.124 | 0.047 |
| rs199545927 | Non-CE | A | 0.383 | 0.160 | 0.016 |
| rs20417 | All | C | 0.092 | 0.061 | 0.131 |
| rs20417 | Non-CE | C | 0.164 | 0.079 | 0.037 |
| rs201231411 | Non-CE | A | 0.339 | 0.149 | 0.023 |