UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Luciano Fonseca Lemos de Oliveira

Emprego de métodos de imagem de alta-resolução in vivo para estudo das alterações perfusionais e inflamatórias miocárdicas em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster

> Ribeirão Preto 2018

Luciano Fonseca Lemos de Oliveira

Emprego de métodos de imagem de alta-resolução in vivo para estudo das alterações perfusionais e inflamatórias miocárdicas em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster

Versão Corrigida

(A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD))

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

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Oliveira, Luciano Fonseca Lemos de

Emprego de métodos de imagem de alta-resolução in vivo para estudo das alterações perfusionais e inflamatórias miocárdicas em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster. Ribeirão Preto, 2018.

146 f.: 33 il.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões

1. Miocardiopatia chagásica 2. Perfusão miocárdica 3. Inflamação miocárdica

Nome: OLIVEIRA, Luciano Fonseca Lemos de

Título: Emprego de métodos de imagem de alta-resolução in vivo para estudo das alterações perfusionais e inflamatórias miocárdicas em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Investigação Biomédica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr:	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
	T~
Prof. Dr:	
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr:	Instituição:
Julgementer	A aginatura:
	Assiliatura:
Prof. Dr:	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Dedicatória

Aos meus pais, Rosângela e Luiz, que sempre me deram os meios para conquistar meus sonhos e seguir em frente e em especial à minha irmã Aline que sempre me deu exemplos de superação independente do problema a ser enfrentado.

Agradecimentos

Agradeço,

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades que me foram concedidas.

Agradeço à minha família, minha principal fonte de energia e de luz, em especial aos meus pais Rosângela e Luiz e aos meus irmãos Aline e Márcio que tiveram a máxima paciência para suportar principalmente a minha ausência e meus momentos de angústia.

À minha noiva Camila por todo companheirismo, paciência, carinho e estímulo para que eu pudesse superar a cada dia todos os momentos de provação que enfrentei durante o período de execução dessa tese.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinícius, por todo o ensinamento, paciência, exemplo e principalmente confiança durante essa longa jornada até este momento.

Aos meus colaboradores de pesquisa, Prof^a. Dr^a. Minna Moreira Dias Romano, Dr. Jorge Mejia, Prof^a. Dr^a Maria de Lourdes Higuchi, Prf. Dr. João Santana da Silva, Prof. Dr. Edécio Cunha Neto, Prof. Dr. Carlos Malamut, Prof. Frank M. Bengel, Prof. Dr. José Antônio Marin Neto, Dr. Henrique Turin e Dr^a. Carla Duque que contribuíram de forma essencial para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório Eduardo Elias, Denise Tanaka, Jaqueline Gentil, Luciana Seabra, Camila Fabricio e Mariane Delarisse que enfrentaram semelhantes desafios e que sempre estiveram do meu lado me apoiando e me auxiliando na execução do projeto.

Aos amigos de trabalho Prof. Dr. Lourenço Gallo Júnior, Júlio César Crescêncio, Camila Bertini e Eduardo Rubio Azevedo pelos ensinamentos e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos do Departamento de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina de Hanôver Dr. James Thackeray, Dr. Pablo Bascuñana, Tobias Borchert, Annika Hess, Martin Mamach, Bettina Wolf, Mariella Kessler, Aylina Glasenappp, Silvia Eilert, Alexander Kanwischer e Petra Felsch pelos ensinamentos e paciência celestial durante minha estadia na instituição mesmo frente as dificuldades do idioma. Aos funcionários do biotério do departamento de Clínica Médica,

Ao meu professor de inglês Rodrigo e a minha professora de alemão Ieda os quais facilitaram imensamente a minha jornada durante o período sanduíche na Alemanha.

Aos funcionários da Divisão de Cardiologia e da Medicina Nuclear em especial à Joseane Souza e a Lucimara Parise.

Aos funcionários do laboratório de Epilepsia em especial a Renata Scandiuzzi, Raquel e Daniela.

Aos funcionários da oficina de precisão da USP em especial ao Amaury e Otavio.

Aos amigos que moraram comigo durante essa trajetória Olavo, Eduardo, Fernando, Rodrigo, Maurício, José Paulo e Thiago.

Aos meus colegas e amigos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do trabalho aqui desenvolvido com os processos nº 2015/25209-5 e nº 2016/16746-0.

À Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas (FAEPA).

"Nós que rogamos tantos favores a Deus, não nos esqueçamos de pedir-lhe a força mental indispensável para que nos desliguemos da agitação e do barulho, ao redor de nós, a fim de continuarmos a trabalhar."

Emmanuel

Resumo

RESUMO

OLIVEIRA, L. F. L. Emprego de métodos de imagem de alta-resolução in vivo para estudo das alterações perfusionais e inflamatórias miocárdicas em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster. 2018. 146f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Fundamento: Distúrbios da perfusão miocárdica (DPM) são achados comuns na cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), mas não é claro se essas alterações podem preceder a progressão da disfunção sistólica e da lesão tecidual fibrosante do ventrículo esquerdo (VE). Nós investigamos a evolução temporal das alterações da perfusão miocárdica e suas correlações com a disfunção sistólica e alterações histopatológicas do VE em um modelo experimental de CCC, utilizando métodos de imagem in vivo.

Métodos: Foram estudados hamsters sírios fêmeas (n=40) infectados com $3,5x10^4$ formas tripomastigotas sanguíneas de T. cruzi (cepa Y) e seus respectivos controles (n=12). Os animais sobreviventes (controles, n=10; infectados, n=22) foram submetidos aos exames de imagem *in vivo* 2, 4, 6, 8 e 10 meses após a infecção. SPECT de alta resolução com ^{99m}Tc-sestamibi foi utilizada para avaliar o tamanho do DPM pela construção de mapas polares considerando como limiar de captação as contagens abaixo de 50% em relação ao pixel de máxima contagem. A função e morfologia do VE foram avaliadas pelo ecocardiograma-2D, em que as medidas obtidas foram a fração de ejeção (FEVE) e os diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo (DSVE e DDVE). Os animais foram submetidos a imagens de PET para avaliação de viabilidade e inflamação miocárdica com ¹⁸F-FDG 10 meses após infecção. As imagens de PET foram co-registradas com as imagens de SPECT. A análise histopatológica incluiu a quantificação da intensidade de inflamação e da extensão de fibrose.

Resultados: Dos animais infectados sobreviventes até o final do estudo, 8 de 22 (36%) apresentaram queda significativa da FEVE após 8 (%; 60 ± 11 vs 70 ± 3 vs 70 ± 5 , p=0,007) e 10 (%; 54 ± 9 vs 70 ± 3 vs 70 ± 3 , p<0,0001) meses de infecção quando comparados aos animais controles e animais infectados sem disfunção sistólica do VE, respectivamente. Entretanto, nesse subgrupo de animais, a deterioração da perfusão foi significativa já a partir de 6 meses de infecção. Os DPM em fases mais precoces se correlacionaram com a FEVE, com os diâmetros do VE tardios e com a fibrose miocárdica. Além disso, o DPM no 6° mês se correlacionou com queda da FEVE do 6° para o 10° mês após infecção (r= 0,56, p=0,0008). DPM ocorreram em frequência e topografia comparável a doença humana, em regiões de miocárdio viável e topograficamente correlacionados com maior captação regional de ¹⁸F-FDG sugerindo correlação entre a inflamação e a deterioração da perfusão miocárdica, confirmada pelo estudo histológico.

Conclusão: Defeitos de perfusão miocárdica em repouso precedem o desenvolvimento e se correlacionam com a deterioração ulterior da disfunção sistólica e da lesão tecidual do VE na CCC experimental. DPM foi topograficamente associado a captação elevada de ¹⁸F-FDG indicando correlação entre a inflamação e a deterioração da perfusão miocárdica. Nossos resultados sugerem que DPM pode ser um marcador substituto de inflamação miocárdica na CCC levantando a possibilidade da utilização de imagens de perfusão na estratificação de risco e monitorização da evolução dessa doença miocárdica.

Palavras-chave: Miocardiopatia chagásica. Perfusão miocárdica. Inflamação miocárdica

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. F. L. Use of high-resolution imaging methods for in vivo study of perfusion and myocardial inflammatory changes in an experimental model of chronic Chagas cardiomyopathy in hamster. 2018. 146f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Background: Myocardial perfusion defects (MPD) is a common finding in Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), but it is unclear if the perfusion derangement can precede and correlate with the development of left ventricular (LV) systolic dysfunction and myocardial fibrosis. We investigated the time-course of myocardial perfusion changes and the correlation with the histopathological changes and the progression of LV systolic dysfunction in an experimental model of CCC.

Methods: The study included 40 female Syrian hamsters infected with 3.5×10^4 trypomastigotes forms of *T. cruzi* Y-strain and their respective controls (n=10). Surviving animals (22 infected and 10 controls) were submitted to *in vivo* imaging 2, 4, 6, 8 and 10-months afterwards. Rest high-resolution SPECT imaging using ^{99m}Tc-sestamibi was used to assess MPD extension that was analyzed by using polar maps considering the uptake threshold of 50% compared to the maximum pixel uptake value. The left ventricular ejection fraction (LVEF) and the systolic and diastolic diameter (LVSD and LVDD) were assessed by using 2D-echocardiogram. The animals underwent PET imaging using ¹⁸F-FDG for assessment of myocardial viability and inflammation. Histological analysis included quantification of myocardial inflammation intensity and fibrosis extension.

Results: Eight out of 22 (36%) surviving infected animals showed significant LV ejection fraction (LVEF) deterioration after 8-months (%; 60 ± 11 vs 70 ± 3 vs 70 ± 5 , p=0.007) and 10-months (%; 54 ± 9 vs 70 ± 3 vs 70 ± 3 , p<0.0001) compared to control and infected animals without systolic disfunction, respectively. However, MPD in infected animals showing LV systolic disfunction displayed significant progressive deterioration first detected at 6 months after infection. Early stages MPD correlated with the late values of LVEF, LVSD, LVDD and extent of myocardial fibrosis. Moreover, MPD at 6-months correlated with the LVEF decrease from 6 to 10 months after infection (r= 0,56, p=0,0008). MPD in the present experimental model exhibited frequency and topographic similarities with MPD seen in human CCC. Also, MPD correspond to areas with metabolically viable myocardium and correlates topographically with higher ¹⁸F-FDG uptake indicating that MPD were associated to myocardial inflammation, which was confirmed by histological assessment.

Conclusions: Rest MPD precedes the development and correlates with the ulterior fibrosis and deterioration of LV systolic dysfunction in experimental CCC. The MPD was topographically associated with increased ¹⁸F-FDG uptake, suggesting a correlation between inflammation and the myocardial perfusion derangement. Our findings indicate that MPD may be a surrogated marker for myocardial inflammation in CCC and raise the possibility of using perfusion imaging for risk stratification and monitoring the course of this myocardial disease.

Keywords: Chagas cardiomyopathy. myocardial perfusion. Myocardial inflammation

Listas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho experimental com infecção dos animais no mês 0, seguida por ecocardiograma-2D e SPECT aos 2, 4, 6, 8 e 10 meses após a infecção. Os animais controles e infectados foram estudados longitudinalmente como indicado. As imagens positrônicas foram realizadas no décimo mês após a infecção. Eco-2D= ecocardiograma 2D; 99mTc-MIBI= sestamibi marcado com tecnécio 99m; 18F-FDG= Fluorodesoxiglicose marcado com Flúor-18; SPECT= tomografia computadorizada por emissão de fótons singulares; PET= Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons.

Figura 2 – A - Animal anestesiado, submetido à tricotomia do tórax e posicionado em decúbito lateral esquerdo para aquisição das imagens ecocardiográficas; B - Avaliação da FE do VE pelo método Teichholz; C – Imagens bidimensionais obtidas do eixo curto em níveis basal e medioventricular, e paraesternal para visualização do eixo longo do coração.

Figura 3 - Sistema "mini-Spect" posicionado em uma das duas cabeças da gamma câmara clínica BrightView XCT. (1) – Detector da gama-câmara, (2) – Carro suporte do colimador pinhole, (3) – Suporte rotacional para conter o pequeno animal durante a aquisição acoplado a motor de passo.

Figura 4 - Protocolo de aquisição de imagem de SPECT de perfusão miocárdica com 99mTc-Sestamibi. Iso = Isoflurano; MIBI= sestamibi.

Figura 5 – Sistema de MicroPET dedicado (General Electric Healthcare modelo LabPET 4 solo) da Unidade de Pesquisa de Radiofármacos do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear em Belo Horizonte, Brasil.

Figura 6 - Mapa polar dos 17 segmentos do ventrículo esquerdo criados pelo software Munich Heart

Figura 7 – Avaliação sequencial da FEVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Figura 8 – Avaliação sequencial do DSVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DDVE= diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

Figura 9 – Avaliação sequencial do DDVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DDVE= diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Figura 10 – Avaliação sequencial da FEVE ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

Figura 11 – Avaliação sequencial do DSVE ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. DSVE= diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

Figura 12 – Avaliação sequencial do DDVE ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. DDVE= diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle; # = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

Figura 13 – Avaliação sequencial do DPM dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DPM= defeito de perfusão miocárdica.

Figura 14 – Avaliação sequencial do DPM ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. DPM= defeito de perfusão miocárdica; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle; # = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

Figura 15 – Evolução da incidência relativa dos defeitos de perfusão miocárdica de acordo com a distribuição topográfica nos 17 segmentos do ventrículo esquerdo.

Figura 16 – Mapa polar de perfusão miocárdica de um animal infectado demonstrando DPM progressivo. Respectivos mapas polares demonstrando área de DPM (%, 2m= 12, 4m= 8, 6m= 13, 8m= 18, 10m= 24) marcadas em azul (pixels com contagem menor do que 50% do pixel de maior acúmulo) envolvendo os segmentos apicais nas janelas temporais iniciais e com posterior progressão dos defeitos para as paredes anterior e anterolateral média.

Figura 17 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre valores individuais da área de defeito de perfusão miocárdica e a FEVE na mesma janela temporal. FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DPM: defeito de perfusão miocárdica.

Figura 18 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação dos valores individuais da área de defeito de perfusão miocárdica com o DSVE e o DDVE na mesma janela temporal. DPM: defeito de perfusão miocárdica; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

Figura 19 - Mapas polares de perfusão miocárdica de animais infectados e os respectivos valores da área de defeito de perfusão miocárdica e fração de ejeção; A- animal apresentando DPM aos 2m, progressiva deterioração da perfusão após 6m e queda da FEVE somente a partir do oitavo mês pós-infecção; B- animal apresentando DPM aos 2m, parcial melhora aos 4m e progressiva deterioração da perfusão a partir do 6m. A FEVE apresentou queda consistente a partir do oitavo mês pós-infecção; DPM= defeito de perfusão miocárdica; FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Figura 20 - SPECT de perfusão miocárdica de um animal infectado revelando um defeito de perfusão grave (captação <50% do máximo) envolvendo 28% da área de superfície do VE acometendo os seguimentos anterior e anterolateral médios, e apicais (painel inferior). Imagens correspondentes de PET com 18F-FDG com captação preservada demonstrando miocárdio viável em regiões de defeitos de perfusão (mismatch).

Figura 21 - Corregistro de imagens de PET e SPECT em um animal controle evidenciando supressão da captação miocárdica de 18F-FDG (painel superior) e perfusão miocárdica

normal com 99mTc-sestamibi (painel central). O painel inferior evidencia a fusão das duas imagens.

Figura 22 - Comparação da captação de 18F-FDG no ventrículo esquerdo entre os animais controles e animais infectados. %DI/g = porcentagem da dose injetada por grama de tecido; SUV= standardized uptake value; TBR= relação órgão alvo/fundo; * = p <0,05.

Figura 23 - Corregistro de imagens de PET e SPECT em um animal infectado evidenciando captação miocárdica regional de 18F-FDG sob efeito de Ketamina e xilazina (painel superior) topograficamente correlacionada com defeito de perfusão miocárdica 99mTc-sestamibi (painel central). O painel inferior evidencia a fusão das duas imagens.

Figura 24 - Comparação da captação de 18F-FDG entre segmentos com perfusão normal e segmentos hiporperfundidos. DPM= defeito de perfusão miocárdica; PN= Perfusão normal. %DI/g = porcentagem da dose injetada por grama de tecido; SUV= standardized uptake value; TBR= relação órgão alvo/fundo; * = p <0,0001.

Figura 25 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre a captações regionais de 18F-FDG e 99mTc-Sestamibi.

Figura 26 - Análise histopatológica dos animais controles e infectados. A- Corte histológico de um animal controle marcado com picrosírus vermelho (PV) demonstrando morfologia preservada do VE e baixa intensidade de fibrose, B- Corte histológico de um animal infectado marcado com PV demonstrando dilatação importante e afilamento das paredes do VE e alta intensidade de fibrose. C- Cortes microscópicos marcados com PV e HE de um animal controle evidenciando baixa intensidade de fibrose, fibras preservadas e poucas células inflamatórias mononucleadas. D - Cortes microscópicos marcados com PV e HE de um animal infectado evidenciando alta intensidade de fibrose, fibras lesionadas, congestão intersticial e difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleadas. E – Comparação da extensão de fibrose entre os animais controles e infectados, F - Comparação da intensidade de inflamação entre os animais controles e infectados. * = p <0,05.

Figura 27 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre valores individuais da área de defeito de perfusão miocárdica em cada janela temporal e a extensão de fibrose miocárdica. DPM: defeito de perfusão miocárdica.

Figura 28 - Gráficos de dispersão ilustrando: A - correlação dos valores individuais entre a captação miocárdica de 18F-FDG e a intensidade de inflamação; B – correlação entre a captação regional miocárdica de 18F-FDG e a intensidade de inflamação em cada segmento do VE dos animais estudados.

Figura 29 - Imagem de Gated-SPECT de perfusão miocárdica demonstrando encurtamento do eixo longo do coração. Uma marca fiducial foi colocada no ápice do VE na diástole final (gate 7). Pode-se observar que a marca sai do VE durante a sístole final (gate 2). Isso levaria a artefatos de movimentação nas imagens.

Figura 30 - Esquema dos principais mecanismos patogênicos na cardiomiopatia chagásica crônica utilizado por Marin-Neto et al. (2007).

Figura Suplementar 1 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva da FEVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. FEVE= fração de ejeção ventrículo esquerdo.

Figura Suplementar 2 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva do DSVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DSVE= diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

Figura Suplementar 3 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva do DDVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DDVE= diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Figura Suplementar 4 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva do DPM dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante

o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DPM= defeito de perfusão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário dos resultados da avaliação da função sistólica e morfologia ventricular esquerda dos animais controles e infectados.

Tabela 2 - Sumário dos resultados da avaliação da perfusão miocárdica ventricular esquerda dos animais controles e infectados.

Tabela 3 - Análise de correlação entre a função sistólica e morfologia do VE aos 10 meses e o acometimento precoce dos defeitos de perfusão miocárdica.

Tabela 4 - Análise de correlação entre a função sistólica e morfologia do VE aos 10 meses e os achados histopatológicos.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1.	Doença de Chagas	25
1.2.	Mecanismos fisiopatogênicos	
1.3.	A lesão miocárdica relacionada ao parasita	27
1.4.	As lesões inflamatórias na CCC	
1.5.	Distúrbios da microcirculação	
1.6.	Imagens de perfusão miocárdica em modelo experimental de CCC	
1.7.	Imagens de viabilidade e inflamação miocárdica com 18F-FDG	41
1.8.	Resumo da justificativa	43
2.	OBJETIVOS	45
2.1.	Objetivos gerais	45
2.2.	Objetivos específicos	45
3.	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.	Animais experimentais	
3.2.	Delineamento geral do estudo	
3.3.	Confirmação da infecção	49
3.4.	Métodos de imagem	49
3.4.1	. Ecocardiograma bidimensional	49
3.4.2	2. Cintilografia de perfusão miocárdica com Mini-SPECT	51
3.4.3	. Imagens de tomografia positrônica com 18F-FDG	54
3.4.4	Processamento e análise das imagens	56
3.5.	Histopatologia	57
3.5.1	. Digitalização e análise histológica quantitativa	58
3.6.	Aspectos éticos de investigação animal	
3.7.	Análise estatística	59
4.	RESULTADOS	62
4.1.	Mortalidade	62
4.2.	Função sistólica e remodelamento ventricular esquerdo	62
4.3.	Avaliação da perfusão miocárdica	68
4.3.1	. Correlação entre defeitos de perfusão e função sistólica e morfologia	do VE 72
4.3.2 e mo	2. Correlação entre defeitos de perfusão em fases mais precoces e funçã orfologia do VE tardias	io sistólica 73
4.4.	Imagens de PET in vivo	
4.4.1	. Avaliação da viabilidade miocárdica in vivo	
4.4.2	2. Avaliação da atividade inflamatória miocárdica in vivo	77

4.5.	Análise histopatológica8	0
4.5.1	l. Avaliação qualitativa e quantitativa8	0
4.5.2	2. Correlação dos achados histopatológicos com as imagens in vivo8	2
5.	DISCUSSÃO	5
5.1.	Principais achados	5
5.2.	O modelo experimental de CCC no hamster8	6
5.3.	Disfunção ventricular esquerda8	8
5.4.	Perfusão miocárdica9	0
5.5.	Artefatos de atenuação e/ou captação9	1
5.6.	Defeitos perfusionais se correlacionam com disfunção sistólica9	2
5.7.	Defeitos de perfusão precedem a disfunção sistólica e a lesão tecidual do VE9	4
5.8.	Alterações histopatológicas subjacentes9	6
5.9.	Hipoperfusão e inflamação9	8
5.10.	Limitações do estudo)4
5.11.	. Implicações dos resultados do presente estudo)5
6.	CONCLUSÕES)7
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
8.	Anexo A	-2
9.	Figuras Suplementares	.3

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita pela primeira vez em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, é causada por um parasita protozoário, o *Trypanosoma cruzi*. A principal forma de transmissão ao homem é através de um vetor triatomíneo. O *Trypanosoma cruzi* é um parasito eucariota unicelular que possui um ciclo de vida complexo envolvendo múltiplos estágios tanto no hospedeiro (mamífero) como no inseto transmissor. A infecção natural do hospedeiro definitivo se dá quando as formas infectantes, encontradas nas dejeções dos triatomíneos (vetores), penetram nas células da derme e mucosas, replicando-se em células nucleadas causando a doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

Embora se tenha estabelecido o controle da transmissão natural usando estratégias para eliminar os vetores do ambiente peridomiciliar (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006), a doença de Chagas constitui ainda uma importante preocupação para as autoridades sanitárias nas Américas, principalmente em países pobres, onde as condições socioeconômicas mantém a interação entre o homem e o inseto transmissor. A doença também pode ser transmitida através de doação de órgãos, transfusões sanguíneas, verticalmente de mãe para filho (BERN; MONTGOMERY, 2009; JACKSON *et al.*, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010), em acidentes laboratoriais (HERWALDT, 2001), assim como através da ingestão de comidas ou bebidas contaminadas (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A doença de Chagas é um sério problema de saúde pública em países endêmicos e não endêmicos, com 6 a 7 milhões de casos ao redor do mundo levando a alta morbidade e mortalidade (CUCUNUBA *et al.*, 2016), e devido às correntes migratórias e a globalização, tem tornado-se mais comum ao redor do mundo (NUNES *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, estima-se que existam mais de 300 mil pessoas cronicamente infectadas (BERN; MONTGOMERY, 2009) e foram reportados recentemente transmissão vetorial e casos autóctones da doença de Chagas em estados sulistas (GARCIA *et al.*, 2015).

A doença apresenta duas fases bem distintas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda de duração curta, 1 a 3 meses, destaca-se por uma reação inflamatória localizada no ponto da inoculação, assim como manifestações cardiovasculares derivadas de uma intensa reação

INTRODUÇÃO 26

inflamatória no coração secundária ao parasitismo das fibras cardíacas por ninhos da forma amastigota do T. cruzi. Na fase crônica, de longa duração, a doença pode ser assintomática (forma indeterminada da doença) ou apresentar o desenvolvimento de complicações digestivas e/ou cardíacas (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). A forma indeterminada é caracterizada por infecção sorológica pelo T. cruzi e ausência de manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas de acometimento cardíaco ou digestivo (VALIDADE DO CONCEITO DE FORMA INDETERMINADA DE DOENÇA DE CHAGAS, 1985) onde os pacientes têm excelente prognóstico e sobrevida semelhante à população em geral (RIBEIRO; ROCHA, 1998). Enquanto a forma digestiva acomete cerca de 10% dos pacientes, as complicações cardíacas são as mais graves e atingem cerca de 30 % dos casos de indivíduos chagásicos (MARIN-NETO et al., 2007). A característica patológica essencial da cardiopatia chagásica é a miocardite focal, clinicamente silenciosa, mas incessante nas formas indeterminada e crônica da doença, como foi demonstrado em estudos experimentais (ANDRADE et al., 1997) e em estudos necroscópicos e de biópsia endomiocárdica em humanos (LOPES et al., 1975; PEREIRA BARRETTO et al., 1986; CARRASCO GUERRA et al., 1987).

Em estágios mais avançados da doença ocorrem importantes alterações da função cardíaca global com importante dilatação das câmaras do coração assumindo o fenótipo clínico de uma miocardiopatia dilatada (KOBERLE, 1968; ROSSI, 1990). Essa disfunção sistólica ventricular global é com frequência precedida por alterações segmentares da mobilidade parietal segmentar do ventrículo esquerdo. Esse acometimento apresenta-se predominantemente nos segmentos inferiores (MATSUMOTO *et al.*, 1979) e póstero-laterais em níveis médio e apical e estão correlacionados com pior prognóstico da doença (ALMEIDA-FILHO *et al.*, 2002; PAZIN-FILHO *et al.*, 2006). Outra característica predominante da CCC é o aneurisma apical que está fortemente relacionado com a gravidade da doença (ACQUATELLA, 2007).

1.2. Mecanismos fisiopatogênicos

Apesar da sua importância clínica e epidemiológica, a fisiopatogenia da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) ainda não é completamente compreendida (PRATA,

2001). O aspecto mais intrigante da história natural desta forma de cardiomiopatia dilatada é o longo tempo, cerca de 2-3 décadas, de aparente quiescência clínica que se interpõe entre a infecção inicial (fase aguda) e sua fase crônica, caracterizada por uma miocardiopatia dilatada com manifestação de insuficiência cardíaca (IC), arritmias cardíacas, eventos tromboembólicos e morte súbita (NUNES *et al.*, 2013). As lesões histopatológicas nesta fase compreendem uma miocardite focal difusa, com infiltrado predominante de células mononucleares, destruição de miofibras e fibrose intersticial, com parasitismo de fibras cardíacas de muito baixa intensidade ou indetectável (HIGUCHI *et al.*, 1987).

Particularmente desafiadora é a caracterização dos mecanismos lesivos envolvidos nesta lenta progressão da disfunção miocárdica, ou a rápida eclosão da agressão miocárdica, na fase crônica da doença.

Dois mecanismos fisiopatogênicos centrais têm sido aventados para explicar o desenvolvimento da miocardite crônica da CCC: agressão miocárdica dependente do parasitismo persistente e de baixa intensidade no tecido cardíaco (BENVENUTI *et al.*, 2008) e lesão miocárdica por resposta inflamatória exacerbada, mediada por mecanismos de autoimunidade, alimentada pelo parasitismo persistente (BORGES *et al.*, 2013).

Além desses mecanismos principais, vários estudos clínicos, necroscópicos e experimentais têm sugerido que fenômenos de isquemia miocárdica microvascular sejam comuns na CCC e que possam estar envolvidos nos processos fisiopatogênicos que levam à lesão miocárdica e à disfunção sistólica ventricular esquerda, por mecanismos semelhantes à hibernação miocárdica, com consequente desenvolvimento tardio de fibrose miocárdica regional (MARIN-NETO *et al.*, 2013).

1.3. A lesão miocárdica relacionada ao parasita

A fase aguda da cardiopatia chagásica é claramente relacionada à intensa parasitemia e parasitismo das fibras cardíacas por ninhos de formas amastigotas do *T. cruzi*. Contudo, na fase crônica da doença, ninhos de parasitas são muito raros ou completamente não detectáveis, quando se utiliza métodos de microscopia convencional (TARLETON, 2001). Desde 1909, nos estudos primordiais de Carlos Chagas, foi observado que na fase crônica da

moléstia a inflamação que se observava não era acompanhada de proporcional presença de parasitas (CHAGAS, 1909; 1916).

Por outro lado, estudos mais atuais mostraram, primeiramente em modelos animais de miocardite chagásica (BEN YOUNES-CHENNOUFI *et al.*, 1988; FRANCO, 1990) e mais tarde em humanos, utilizando imunohistoquímica e técnicas de biologia molecular, que antígenos e material genômico do *T. cruzi* estavam presentes e claramente associados topograficamente aos focos de inflamação e dano tissular (HIGUCHI *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1993; BELLOTTI *et al.*, 1996; ANEZ *et al.*, 1999). Trabalhos recentes utilizando técnicas elegantes de imagem molecular com bioluminescência demonstraram que foi possível detectar a presença de parasitas clonados emitindo luciferase em diversos órgãos durante a infecção crônica, mesmo não sendo possível a detecção de parasitas no sangue por microscopia na maioria dos animais (LEWIS *et al.*, 2014; SILBERSTEIN *et al.*, 2018). Foi observada a presença de parasitas no músculo esquelético, intestino, gordura mesentérica, pulmão, fígado e coração 126 dias após a infecção (SILBERSTEIN *et al.*, 2018).

Além disso, a transmissão da doença através de doação de órgãos (GOMEZ *et al.*, 2014; COREY *et al.*, 2017; PIERROTTI *et al.*, 2018), transfusões sanguíneas (ANGHEBEN *et al.*, 2015; RIES *et al.*, 2016), verticalmente de mãe para filho (JACKSON *et al.*, 2009; MUNOZ *et al.*, 2009; FEARON *et al.*, 2013) assim como a reagudização da doença em indivíduos imunossuprimidos (SIMOES, *et al.*, 1995; SALVADOR *et al.*, 2015) são evidências clínicas que suportam a hipótese da persistência do parasita durante a fase crônica da infecção. Vários mecanismos são aventados para que o *T. cruzi* engane o sistema imune e permanece em diferentes células do hospedeiro.

Após a infecção, macrófagos ativados exercem efeito citotóxico contra micróbios ativando NADPH oxidase (NOX2) e iNOS para a produção de superóxido (O_2^{\bullet}) e óxido nítrico (NO), respectivamente. Trabalhos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a ativação de NOX2 com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) controlam o parasita diretamente em macrófagos e esplenócitos (DHIMAN; GARG, 2011; SANTIAGO *et al.*, 2012). Além disso, NOX2/EROs sinalizam o desenvolvimento de linfócito T CD8+ específicos para antígenos para o controle parasitário em camundongos infectados (DHIMAN; GARG, 2014).

Trabalhos anteriores demonstraram ação tripanomicida dependente de NO em macrófagos de camundongos (GAZZINELLI *et al.*, 1992; MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992b) e de humanos (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992a), que podem ser bloqueados por L-MNNA, um inibidor de óxido nítrico sintase. Foi demonstrado também que cardiomiócitos

infectados com *T. cruzi* induzem ação tripanomicidade mediada por NO (MACHADO *et al.*, 2000). Não obstante, a reação de NO com O_2^{\bullet} produz peroxinitrito (ONOO⁻), que é um potente oxidante citotóxico com ação tripanomicida em macrófagos (PIACENZA *et al.*, 2008; ALVAREZ *et al.*, 2011).

Entretanto, o parasita parece ter desenvolvido um elaborado sistema antioxidante para prevenir o controle parasitário mediado por EROs e NO. Uma cascata enzimática para detoxificação de hidroperóxidos tem sido descrita na infecção pelo *T. cruzi*. Essa defesa antioxidante utiliza a tripanotiona (exclusivamente produzido pelo parasita) que transporta os equivalentes redutores para as peroxidases através de triparedoxinas (PIACENZA *et al.*, 2009). De fato, supraexpressão de triparedoxina peroxidases (TXNPxs) mitocondrial e citosólica foram observadas in cepas virulentas isoladas quando comparadas a cepas atenuadas (ZAGO *et al.*, 2016). A supraexpressão de TXNPxs em parasitas isolados favoreceu a multiplicação de parasitas em macrófagos sugerindo um mecanismo de sobrevivência do *T. cruzi* em macrófagos e outras células (PIACENZA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2018).

Além de causar a morte do parasita diretamente (DHIMAN; GARG, 2011), altas doses de EROs promovem a liberação de EROs mitocondrial e estimulam apoptose celular para eliminação de células danificadas (VAN EMPEL *et al.*, 2005). Dessa forma, postula-se que *T. cruzi* expressando altos níveis de antioxidantes conseguiriam limpar as EROs mitocondriais evitando assim a morte celular programada de células invadidas, garantindo assim um fornecimento de nutrientes para a sua sobrevivência a longo prazo no hospedeiro (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

Outro mecanismo de sobrevivência do parasita seria através de mediadores lipídicos. O *T. cruzi* utiliza prostaglandina H2 (PGH2) do hospedeiro para produzir tromboxano A2 (TXA2). Foi demonstrado que, durante a infecção aguda de camundongos, altos níveis de TXA2 são detectados e que mais de 90% dessa produção tem como fonte o parasita (ASHTON *et al.*, 2007). Além de induzir vasoespasmo, trombose, aumentar a permeabilidade vascular e gerar disfunção celular endotelial, TXA2 modula negativamente a imunidade adquirida prevenindo a adesão de células apresentadora de antígenos e por inibir a proliferação de linfócitos T. Por outro lado, TXA2 serviria como um mecanismo indicativo da carga parasitária intracelular para regular a proliferação intracelular de amastigotas de *T. cruzi* (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). No conjunto, esses mecanismos permitiriam a transição para um estado infeccioso persistente crônico. Estudos têm demonstrado ainda alta quantidade de parasitas em adipócitos durante a infecção aguda e com progressiva redução ao longo tempo, entretanto, o tecido adiposo pode ter um papel importante durante a infecção e pode ser um reservatório para o parasita durante a fase crônica da qual pode ocorrer recrudescimento da infecção durante os períodos de imunossupressão (COMBS *et al.*, 2005; NAGAJYOTHI *et al.*, 2009).

A contribuição da presença do parasita em causar lesão miocárdica na fase crônica da cardiopatia chagásica é também sugerida por estudos em modelos experimentais mostrando que o tratamento etiológico leva a uma diminuição da carga parasitária e à atenuação do processo inflamatório e da gravidade da cardiopatia (ANDRADE *et al.*, 1991; GARCIA *et al.*, 2005). Pequenos estudos observacionais demonstraram, após tratamento com tripanomicida, redução da carga parasitária e aumento da soroconversão que poderiam impedir a progressão da doença (VILLAR *et al.*, 2002; VIOTTI *et al.*, 2006; VILLAR *et al.*, 2014).

Entretanto, um estudo com duração de 8 anos envolvendo 279 pacientes não foi evidenciada relação entre a parasitemia e a evolução da doença. Independente da parasitemia, houve progressão da cardiopatia (PEREIRA *et al.*, 1992).

Além disso, o estudo *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis* (BENEFIT) (MARIN-NETO *et al.*, 2008), desenhado para avaliar a segurança e eficácia do tratamento com benzonidazol na progressão de pacientes com CCC, não resultou em melhora significativa dos desfechos cardíacos nos pacientes tratados com a droga (MORILLO *et al.*, 2015).

O mecanismo exato pelo qual o parasitismo de muito baixa intensidade na fase crônica pode causar dano miocárdico ainda não está definido. Ainda que a agressão direta da fibra miocárdica seja uma possibilidade, é muito mais provável que o papel do parasitismo de tão baixa intensidade resida na estimulação das respostas imunes que perpetuem a inflamação e a agressão de fibras cardíacas não parasitadas.

1.4. As lesões inflamatórias na CCC

A cardiopatia chagásica, nas suas diferentes fases evolutivas, tem na miocardite a sua característica patológica essencial. Ainda que mais evidente na fase aguda, é clinicamente silenciosa, mas incessante nas formas indeterminada e crônica da doença, como demonstrado em estudos experimentais (ANDRADE *et al.*, 1997) e em estudos necroscópicos e de biópsia

INTRODUÇÃO 31

endomiocárdica em humanos (LOPES *et al.*, 1975; PEREIRA BARRETTO *et al.*, 1986; CARRASCO GUERRA *et al.*, 1987).

A prevalência da miocardite se correlaciona com a gravidade da insuficiência cardíaca (HIGUCHI *et al.*, 1987) e correlação significativa foi descrita entre o grau de dilatação e disfunção sistólica ventricular esquerda e as alterações inflamatórias e fibróticas em modelo experimental de CCC em hamster sírios (BILATE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Vários estudos independentes apontam para que a miocardite difusa com miocitólise e fibrose reparativa, que são as características marcantes da CCC, exiba características de uma reação de hipersensibilidade tardia, com infiltrados inflamatórios focais compostos por células mononucleares (TORRES, 1941; MUNIZ; AZEVEDO, 1947; ANDRADE, 1983; HIGUCHI *et al.*, 1993). Adicionalmente, demonstra-se a deposição de imunoglobulinas e complemento no tecido miocárdico de pacientes com CCC, constituindo o conjunto de evidências de primeira linha indicando o envolvimento de fatores immunológicos na patogênese da miocardite na CCC (CUNHA-NETO *et al.*, 2006).

Citocinas e quimiocinas

Após a infecção incial do *T. cruzi* nas células epiteliais (primeira barreira de defesa), há um aumento da expressão dos genes pró-inflamatórios via receptores do tipo *toll* (especialmente TLR2 e TLR9) (BAFICA *et al.*, 2006) e via sinalização de citocinas (MACHADO *et al.*, 2000). Pode-se observar também uma suprarregulação de quimiocinas nessas células epiteliais para atrair células fagocíticas profissionais para o sítio de infecção inicial (CHIRIBAO *et al.*, 2014).

Os receptores do tipo *toll*, presentes nas células fagocíticas do sistema imune inato (macrófagos e células dendríticas), reconhecem moléculas com padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) e sinalizam o recrutamento de moléculas adaptadoras como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) que subsequentemente induz a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB). A ativação de NF-κB leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e está relacionada à transição da resposta imune inata à reposta imune adaptativa (SANTOS *et al.*, 2016; LOPEZ *et al.*, 2018).

Macrófagos infectados com *T. cuzi* produzem interleucina 12 (IL-12), que é um importante mediador para a indução do desenvolvimento de células Th1 e para a produção de interferon-gamma (IFN- γ) por células *natural killer* (NK) (ANTUNEZ; CARDONI, 2000). A produção de IFN- γ , em conjunto com a produção de TNF- α (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*,

1992a), levam à ativação de macrófagos e aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e NADPH oxidase (NOX2) para consequente produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs). Além de agir diretamente sobre o parasita exercendo efeito tripnomicida como descrito no tópico anterior, EROs e NO são sinalizadores intermediários envolvidos na ativação de fatores transcricionais (NF- κ B e AP-1) com consequente expressão de citocinas pró-inflamatórias em diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* (HALL *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2008; DHIMAN; GARG, 2011; PINTO *et al.*, 2011; WAN *et al.*, 2016). O tratamento com antioxidantes e com antagonista químico de NOX2 demonstraram que o bloqueio de EROs/NOX2 evita a ativação e a proliferação de esplenócitos e produção de citocinas próinflamatórias (e.x. IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α) em camundongos infectados (DHIMAN; GARG, 2011).

Essas citocinas produzidas durante a infecção inicial por T. cruzi também induzem a produção de quimiocinas pelos macrófagos e miócitos cardíacos que resultará no recrutamento e ativação de outras células inflamatórias (MACHADO et al., 2000; ROFFE et al., 2010). De fato, camundongos deficitários da expressão de CCR5, marcador de resposta imune Th1, são susceptíveis à infecção por T. cruzi. Entretanto, o tratamento de camundongos com antagonista de CCR5 (met-RANTES) na fase crônica da infecção ameniza a miocardite com menor infiltrado de células T CD4+ e CD8+ (MEDEIROS et al., 2009). Foi observado também que pacientes com CCC, quando comparados a pacientes na forma indeterminada da doença e a indivíduos não infectados, apresentavam uma maior expressão de CCR5 em células mononucleares do sangue periférico (GOMES et al., 2005). No mesmo sentido, foi observado ainda uma maior expressão de CCR5 em células mononucleadas no miocárdio assim como maior expressão do RNAm de CCR5 no miocárdio de pacientes com CCC quando comparados a pacientes com cardiomiopatia não inflamatória e a doadores normais (NOGUEIRA et al., 2012). No conjunto, esses dados indicam que quimiocinas, que são importantes para a proliferação de células T e para diferenciação inicial Th1/Th2, são essenciais no controle da infecção aguda, entretanto, a elevada expressão de citocinas de perfil Th1, especialmente CCR5, pode contribuir para a manutenção da inflamação levando a um dano tecidual cardíaco (DE OLIVEIRA et al., 2016).

INTRODUÇÃO 33

Resposta celular

A CCC tem como característica histopatológica essencial o infiltrado de células mononucleares compostas por macrófagos (50%), linfócitos T (40%) e B (10%) que são ativadas na fase da aguda da infecção, mas que perpetuam sua atividade na fase crônica resultando na manutenção da produção local de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (REIS *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 1997; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014).

Macrófagos

Apesar de estarem envolvidos na disseminação da infecção por mecanismos de sobrevivência do parasita (PIACENZA *et al.*, 2008; CALDERON *et al.*, 2012), macrófagos diferenciados e ativados por citocinas de perfil Th1 (macrófagos M1, pró-inflamatório) aumentam a expressão de iNOS, o qual metaboliza a L-arginina e produz NO com consequente controle da replicação parasitária durante a infecção aguda (BERGERON; OLIVIER, 2006; PONCE *et al.*, 2016). Por outro lado, macrófagos M2 (induzidos por citocinas regulatórias e Th2, caracteristicamente anti-inflamatórios) têm sido implicados no crescimento de parasitas (VINCENDEAU *et al.*, 2003). Macrófagos M2, expressam Arginase 1 que metaboliza L-arginina para a produção de ornitina e consequentemente poliaminas necessárias para o crescimento celular. Trabalhos anteriores documentaram uma elevada expressão de Arginase 1 (marcador de macrófagos M2) associada a sobrevivência do parasita e suscetibilidade à infecção aguda (STEMPIN *et al.*, 2004; BOHME *et al.*, 2016).

Sugere-se que uma inicial infiltração de macrófagos M1 no coração para controle parasitário, deva ser seguida de proliferação de macrófagos M2 para controlar a inflamação e cicatrizar o coração (SANMARCO *et al.*, 2017; FRESNO; GIRONES, 2018). Entretanto, pacientes chagásicos com formas mais avançadas de cardiopatia apresentam níveis circulantes aumentados de monócitos TNF- α + e reduzidos de monócitos IL10+ quando comparados a pacientes com formas mais brandas da cardiopatia ou na forma indeterminada da doença (SOUZA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2012). Dessa forma, esse fino balanço entre macrófagos M1 e M2 pode ter um papel importante na fisiopatogenia da CCC.

Linfócitos

Linfócitos T se originam dos linfoblastos na medula óssea que entram na circulação e são diferenciados no timo em diferentes tipos de linfócitos como auxiliares CD4+ (Th), reguladores (Treg), citotóxicos CD8+ (CTLs), e *natural killer* (NKT) que colonizam os órgãos linfóides secundários e tecidos (CARDILLO *et al.*, 2015). Sabe-se que após a infecção pelo *T. cruzi*, linfócitos Th1 respondem rapidamente mediados por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e essa resposta é protetora contra a infecção (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992a; ALIBERTI *et al.*, 2001). Citocinas expressas por células Th2 como IL-10, IL-4 e IL-13 associadas a TFG- β previnem uma resposta pró-inflamatória exacerbada, principalmente regulando a liberação de IFN- γ (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 1992; ABRAHAMSOHN *et al.*, 2000; ANTUNEZ; CARDONI, 2001; SCHINDLER *et al.*, 2001). Embora essa maior resposta Th1 sobre Th2 exerça um papel protetor contribuindo para a resistência à infecção durante a fase aguda (CUERVO *et al.*, 2008; SANOJA *et al.*, 2013), ela tem sido associada ao desenvolvimento da CCC em humanos (GOMES *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2014). Portanto, alguma regulação parece ser necessária para evitar a progressão da doença.

Células reguladoras (Treg), caracterizadas pelos fatores de transcrição *forkhead Box P3* (FOXP3) e expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TFG- β , podem controlar a resposta imune durante a infecção reduzindo a lesão cardíaca e impedindo a progressão da doença (ARAUJO *et al.*, 2012). Trabalhos recentes demonstraram que IL27 (formada por duas subunidades Ebi3 e IL-27p28), produzida por células mieloides, é capaz de induzir a produção de IL-10 por um diferente tipo de células reguladoras chamadas de células Tr1 (LIU *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2011). Trabalhos demonstraram que IL-27, diretamente ou sinergicamente com IL-12, é capaz de suprimir linfócitos Th2 e Th17 (LUCAS *et al.*, 2003; DIVEU *et al.*, 2009; HEINEMANN *et al.*, 2014). Foi demonstrado ainda que IL27 antagoniza a produção de IL-12 com consequente supressão de Th1 e sua produção de IFN- γ (BOHME *et al.*, 2016). Essa supressão mediada por IL-10 foi efetiva em melhorar a miocardite em camundongos deficientes de Ebi3 e, polimorfismos desses genes se associaram com a gravidade da doença em humanos (MEDINA *et al.*, 2017).

Esse conjunto de dados sugere que células Treg podem ter papel importante na regulação da resposta imune contra o *T. cruzi*. Foi demonstrado que pacientes na fase indeterminada da doença possuem maior frequência de células reguladoras, sugerindo melhor controle do efeito citotóxico e da lesão tecidual (ARAUJO *et al.*, 2011). Além disso, pacientes

INTRODUÇÃO 35

com CCC submetidos a transplante cardíaco apresentavam um perfil celular citotóxico Th1 com escassez de células Treg, somente observadas em regiões de miocardite grave (ARGUELLO *et al.*, 2014).

Dessa forma, a resposta Th1 parece ser necessária para o controle da infecção no coração, mas se essa resposta não for controlada por células reguladoras, pode levar a uma inflamação excessiva e progressão para CCC (SANOJA *et al.*, 2013; FRESNO; GIRONES, 2018).

Autoimunidade

Vários mecanismos tem sido indicados como exercendo um papel em desencadear a agressão auto-imune após a infeção do *T. cruzi*, resumidamente: a exposição de antígenos secundária à lesão tissular, seguida pela sensibilização em um ambiente inflamatório apropriado, mimetismo molecular onde células B e T que reconhecem antígenos parasitários que compartilham epítopos estruturalmente semelhantes nos antígenos do hospedeiro, gera uma resposta imune com reatividade cruzada e ativação policional levando a produção de auto-anticorpos e agressão celular (CUNHA-NETO *et al.*, 2006).

Após a infecção aguda pelo *T. cruzi*, uma resposta intensa pelas células B é iniciada para auxílio do controle parasitário através de lise direta do parasita por anticorpos (GAZZINELLI *et al.*, 1991). Cordeiro et.al. (2001) demonstraram também um possível papel protetor da presença de anticorpos líticos na fase crônica da doença. Os autores observaram autos níveis de anticorpos líticos em indivíduos na fase indeterminada da doença quando comparados a indivíduos com CCC sugerindo uma resposta protetora desses anticorpos (CORDEIRO *et al.*, 2001). Entretanto, em adição ao possível papel no controle de parasitas e na manutenção de respostas protetoras em pacientes chagásicos, anticorpos também podem contribuir para alterações patológicas observadas na fase crônica da doença.

Estudos antigos já haviam demonstrado níveis circulantes elevados de autoanticorpos produzidos por células B autorreativos a antígenos do endocárdio, dos vasos e do interstício em pacientes com miocardiopatia chagásica (COSSIO *et al.*, 1974). Adicionalmente, em torno de 80% dos pacientes com CCC apresentaram autoanticorpos contra neurônios (RIBEIRO dos SANTOS *et al.*, 1979). Vários trabalhos documentaram também a produção de anticorpos em pacientes com CCC capazes de reconhecer várias proteínas do hospedeiro que poderiam levar a lesão tecidual como autoanticorpos contra miosina cardíaca (CUNHA-NETO *et al.*, 1995), galectina-1 (GIORDANENGO *et al.*, 2001) e receptores adrenérgicos e colinérgicos (GOIN *et al.*, 2001)

al., 1993; GOIN *et al.*, 1994; BORDA; STERIN-BORDA, 1996). Além disso, trabalho mais recente propôs ainda que antígenos cardíacos expostos ao estresse oxidativo induzido pelo *T. cruzi* produzem neoantígenos desencadeando resposta auto-dirigida de anticorpos (DHIMAN *et al.*, 2012).

Além dessa resposta autoimune humoral, foi demonstrado que a transferência de linfócitos T CD4+ de camundongos infectados causam lesões cardíacas passivamente em camundongos sadios (SANTOS *et al.*, 1992). Essa lesões podem ser causadas por células T CD4+, que após a infecção pelo *T. cruzi*, reconhecem cruzadamente a miosina cardíaca (RIZZO *et al.*, 1989; CUNHA-NETO *et al.*, 1996) que compartilha epítopos semelhantes à proteína B13 do *T. cruzi* (ABEL *et al.*, 1997; IWAI *et al.*, 2005).

Portanto, esses achados sugerem que anticorpos antiparasita ou contra neoantígenos do hospedeiro poderiam servir como fonte constante de estímulo, promovendo um mecanismo que perpetuaria a ativação celular durante a fase crônica da doença (MACHADO *et al.*, 2012).

1.5. Distúrbios da microcirculação

As evidências iniciais da participação de distúrbios da microcirculação nos mecanismos de lesão miocárdica na cardiopatia chagásica crônica foram levantadas nos primeiros estudos necroscópicos caracterizando séries de casos de pacientes falecidos pela doença (TORRES, 1958; 1960). Nestes estudos, Carlos Margarino Torres descreveu de forma original a presença de intensas lesões vasculares com hiperproliferação intimal, espessamento da parede e obstrução de finos ramos arteriolares coronários intramurais em corações chagásicos. Adicionalmente, observou-se que as fibras miocárdicas topograficamente associadas a essas lesões vasculares exibiam necrose miocitolítica, lesão miocelular caracteristicamente associada à isquemia microvascular na gênese dos focos inflamatórios, de miocitólise e posterior fibrose reparativa na fase crônica da cardiopatia chagásica. Esses achados foram reforçados e ampliados por mais estudos recentes com técnicas mais avançadas de microscopia (ROSSI, 1990; HIGUCHI *et al.*, 1998).

Além dessas evidências iniciais derivadas de estudos anátomo-patológicos, a cardiomiopatia chagásica tem sido objeto de vários estudos experimentais e clínicos
demonstrando que a isquemia microvascular, possivelmente dependente de alterações estruturais/funcionais da regulação do fluxo coronariano, esteja envolvida no processo fisiopatogênico e na gênese das manifestações clínicas (ROSSI, 1990; MENGEL; ROSSI, 1992; SIMOES *et al.*, 2000; HISS *et al.*, 2009).

Estudos histopatológicos em modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica demonstraram intensas anormalidades estruturais da microcirculação (FACTOR *et al.*, 1985) e alterações morfológicas vinculadas à isquemia em células miocárdicas (ROSSI, 1990). Adicionalmente, o tratamento com droga bloqueadora de canais de cálcio produziu evidente efeito favorável na mortalidade neste modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica, resultado provavelmente da redução de lesão tissular isquêmica pela prevenção de espasmo microarteriolar (TANOWITZ *et al.*, 1989).

No cenário dos estudos clínicos, investigações empregando cintilografia de perfusão miocárdica evidenciaram elevada frequência de defeitos perfusionais isquêmicos em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica com coronárias subepicárdicas normais, sugerindo fortemente que distúrbios funcionais da regulação do fluxo sanguíneo miocárdico seja o mecanismo responsável pelos fenômenos isquêmicos nessa cardiopatia (MARIN-NETO *et al.*, 1992; MARIN-NETO *et al.*, 1995; HISS *et al.*, 2009).

Marin-Neto et al. (1992) estudando pacientes com CCC encontraram defeito de perfusão em pelo menos um dos 7 segmentos estudados em cada paciente. Os segmentos com defeitos fixos estavam associados a alterações de mobilidade parietal severa enquanto que defeitos reversíveis estavam associados a alterações de mobilidade mais brandas. Os autores do estudo concluíram que defeitos fixos poderiam corresponder a extensas lesões fibróticas ou necróticas e que os defeitos reversíveis poderiam ocorrer em consequência de transtornos regionais do fluxo sanguíneo ou metabólicos. Sugeriram também que os defeitos paradoxais poderiam refletir às áreas de necrose não transmural entremeada com miocárdio viável (MARIN-NETO *et al.*, 1992).

Corroborando esses achados, estudos em cardiopatas chagásicos documentaram controle anormal da regulação do tônus arterial coronário à hiperventilação (SIMOES *et al*, 1998) e respostas paradoxais do fluxo sanguíneo arterial coronário ao estímulo de acetilcolina (TORRES *et al.*, 1995).

Além desses aspectos, evidenciou-se correlação topográfica entre distúrbios regionais da mobilidade segmentar parietal ventricular esquerda e defeitos perfusionais isquêmicos em pacientes em diferentes estágios evolutivos da cardiomiopatia chagásica crônica (SIMOES *et al.*, 2000; HISS *et al.*, 2009).

Simões et al. (2000), estudando pacientes chagásicos com diferentes níveis de disfunção miocárdica, identificaram defeitos de perfusão regional cardíaco em uma frequência razoavelmente alta mesmo em pacientes sem nenhum grau de disfunção miocárdica. Os autores demonstraram ainda correlação entre os defeitos de perfusão e o grau do dano miocárdico refletido pela redução da fração de ejeção. Eles interpretaram esses achados como consequência da extensão da fibrose miocárdica regional em estágios mais avançados da doença. A alteração da mobilidade associada a defeitos fixos ou paradoxais também se comportaria da mesma forma, tendo em vista que esses tipos de defeitos geralmente implicam na presença de cicatrizes na parede do ventrículo esquerdo.

Hiss et al. (2009), demonstraram por meio de estudo longitudinal retrospectivo utilizando cintilografia de perfusão miocárdica, que a isquemia microvascular correlaciona-se topograficamente com aparecimento de fibrose regional miocárdica durante a evolução da cardiopatia chagásica. Dos 54 segmentos apresentando defeitos isquêmicos no estudo inicial, 36 (68%) evoluíram para defeitos perfusionais em repouso, ou seja, provavelmente fibrose. Dos 487 segmentos não apresentando isquemia no estudo inicial somente 49 tiveram a mesma evolução (10%). Esses resultados reforçam a hipótese de que a disfunção miocárdica microvascular esteja diretamente envolvida no mecanismo de declínio progressivo da função sistólica do ventrículo esquerdo e de formação da fibrose regional observados na cardiomiopatia chagásica crônica.

Pelo exposto nos parágrafos acima, pode-se concluir que a determinação da relevância desse processo (distúrbios da perfusão miocárdica) na história natural da cardiomiopatia chagásica crônica demanda um estudo prospectivo longitudinal, utilizando as ferramentas de imagem adequadas para investigação *in vivo*. Contudo, a execução desse estudo em humanos apresenta um elevado grau de dificuldade, ou virtual impedimento, considerando o longo tempo necessário para observar-se o desenvolvimento do dano miocárdico crônico, cerca de 3 décadas.

1.6. Imagens de perfusão miocárdica em modelo experimental de CCC

O uso de modelos experimentais de cardiopatia chagásica crônica em pequenos animais, lançando-se mão de recentes métodos de aquisição de imagens ecocardiográficas e

INTRODUÇÃO 39

cintilográficas de alta resolução para obtenção de estudos *in vivo* poderia constituir estratégia de investigação útil capaz de gerar resultados originais que lancem luz sobre a participação dos distúrbios de perfusão e da inflamação no mecanismo fisiopatogênico da CCC.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa recentemente desenvolveu um sistema de aquisição e processamento de imagens cintilográficas tomográficas de alta resolução em pequenos roedores (mini-SPECT) a partir da adaptação de uma gama-câmara convencional de uso clínico (MEJIA *et al.*, 2009; MEJIA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2018a). Esse sistema pode ser empregado para obtenção de imagens funcionais da função sistólica ventricular esquerda, da perfusão miocárdica e da inervação simpática regional do coração de pequenos roedores, *in vivo* e de forma sequencial ao longo da "história natural" da progressão da doença miocárdica em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica.

A fim de se estudar os mecanismos envolvidos na fisiopatogênese da CCC, vários modelos animais têm sido pospostos: macacos (CARVALHO *et al.*, 2003), coelhos (FIGUEIREDO *et al.*, 1985) cães (DE LANA *et al.*, 1992), ratos (GUARITA-SOUZA *et al.*, 2006) e camundongos (CHANDRA *et al.*, 2002; JELICKS *et al.*, 2002). Os modelos em pequenos roedores têm sido preferidos levando-se em conta as necessidades de espaço para alojamento e custos mais reduzidos em comparação aos modelos com animais maiores. Entretanto, alguns estudos mostraram que o camundongo pode não reproduzir de forma fidedigna as fases evolutivas da CCC, pois exibe alterações inflamatórias muito intensas na fase aguda evoluindo indistintamente para fases sub-aguda e crônica sem exibir uma fase de latência entre elas (MELLO *et al.*, 1979). Por sua vez, o rato exibe intensas alterações miocárdicas na fase aguda, mas, frequentemente, falha em desenvolver a fase crônica da cardiopatia (ZELEDON *et al.*, 1988).

Mais recentemente, o modelo do hamster sírio tem mostrado bons resultados, com características semelhantes à doença humana (RAMIREZ *et al.*, 1994). Colmanetti et al. (2005), em um estudo ultraestrutural e morfométrico de cardiomiócitos de hamsters infectados com *T. cruzi*, demonstraram alterações morfológicas encontradas nas junções dos cardiomiócitos assim como dos sarcômeros. Foi encontrada ainda diferença significativa tanto no comprimento quanto na espessura de miofibrilas de animais infectados quando comparados a animais não infectados. Estes dados demonstram a ocorrência de uma cardiomiopatia dilatada semelhante ao descrito em pacientes chagásicos e em modelos experimentais.

No estudo de Bilate et al. (2003), a infecção de hamsters sírios fêmeas com 3,5 x 10^4 ou 10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* produziu graus variáveis de disfunção sistólica ventricular esquerda e miocardite difusa ou multifocal na quase totalidade dos animais investigados 12 meses após a infecção inicial. Na fase crônica, uma parcela dos animais desenvolveu importante dilatação cavitária ventricular esquerda com grave disfunção sistólica ao longo do estudo sequencial da função ventricular mediante emprego de imagens *in vivo* com ecocardiograma. O mesmo modelo foi também objeto de outros estudos, demonstrando que o curso do desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica neste modelo em hamster se assemelha nas alterações estruturais e funcionais cardíacas de forma muito próxima àquela encontrada em humanos (BILATE *et al.*, 2007).

Uma particularidade deste modelo, que o torna especialmente útil para um estudo de correlação de achados morfológicos e funcionais, é o fato de existir na fase crônica uma variedade considerável de comprometimento da função cardíaca e de dano histológico, encontrando-se desde animais com função sistólica normal ou com mínimo comprometimento, até animais com grave disfunção sistólica e importante dilatação ventricular esquerda. Recentemente, nosso grupo observou neste modelo que, além de alterações da função sistólica global do VE, com incidência semelhante à observada em humanos (29%), foram observadas alterações da função sistólica segmentar do VE em animais com fração de ejeção ainda preservada. Ainda mais importante, essas áreas de alterações da mobilidade parietal regional estavam correlacionadas mais intensamente com alterações histológicas inflamatórias do que com a extensão de fibrose. Não obstante, as anormalidade segmentares funcionais demonstravam topografia de acometimento semelhante à observada em humanos (OLIVEIRA et al., 2016).

Subsequentemente, demonstramos no mesmo modelo a presença frequente de defeitos de perfusão miocárdica (DPM) envolvendo uma extensão significativa do ventrículo esquerdo em animais infectados com *T. cruzi*. Estes DPM se correlacionaram com a disfunção sistólica global do VE e exibiram correlação topográfica com alterações da mobilidade segmentar parietal do VE. Adicionalmente, apesar de serem observados em repouso, esses defeitos perfusionais não correspondiam a regiões de fibrose transmural ou alterações estruturais da microcirculação. Os DPM se correlacionaram com extensa inflamação sugerindo a presença de miocárdio viável hipoperfundido e metabolicamente alterado (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Esses resultados foram corroborados por outro estudo do nosso grupo onde animais cronicamente infectados e tratados com dipiridamol, agente antiagregante plaquetário e vasodilatador da microcirculação coronariana, melhoraram as alterações perfusionais, suportando a ideia de miocárdio viável e hipoperfundido. Interessantemente, resultados deste estudo sugerem, de forma semelhante ao proposto em humanos, que DPM antecedem o declínio da função sistólica do ventrículo esquerdo nesses animais (TANAKA *et al.*, 2018).

Até o momento, no melhor do nosso conhecimento, não há relatos da aplicação de imagens cintilográficas *in vivo* para a avaliação do curso temporal das alterações da perfusão miocárdica e da participação desse processo lesivo sobre a progressão da disfunção ventricular e a sobrevida neste modelo.

1.7. Imagens de viabilidade e inflamação miocárdica com 18F-FDG

Desde a introdução do primeiro equipamento de tomografia por emissão de pósitrons (PET) em 1975 (TER-POGOSSIAN *et al.*, 1975), o PET tem sido utilizado para obtenção de imagens não invasivas da quantificação do fluxo sanguíneo miocárdico (SCHELBERT *et al.*, 1981; UREN *et al.*, 1994), da inervação autonômica cardíaca (SCHWAIGER *et al.*, 1990) e do consumo de substrato energético miocárdico (TILLISCH *et al.*, 1986; KNUUTI *et al.*, 2002).

Devido à sua capacidade de fornecer avaliação quantitativa, sua superior sensibilidade de detecção e sua melhor resolução espacial e temporal sobre outras técnicas de medicina nuclear, o PET já tem sido há longo tempo considerado o padrão ouro para avaliação da perfusão e viabilidade miocárdicas (SCHINKEL *et al.*, 2007; BENGEL *et al.*, 2009). O fluorodesoxiglicose-¹⁸F (¹⁸F-FDG) é um análogo da glicose que é captado ativamente pelo cardiomiócito por mecanismo de transporte facilitado de glicose. Dessa forma, seu acúmulo na célula miocárdica é um marcador muito acurado da atividade metabólica energética e, portanto, da viabilidade da fibra miocárdica (KNUUTI *et al.*, 2002; MACHAC *et al.*, 2006). Na fase subaguda pós-infarto agudo do miocárdio, imagens positrônicas utilizando ¹⁸F-FDG distinguem pacientes com disfunção miocárdica reversível dos pacientes com disfunção irreversível, com importante valor prognóstico pós-revascularização (DI CARLI *et al.*, 1994). O princípio subjacente é que o miocárdio isquemicamente lesado demonstra uma mudança no metabolismo miocárdico da oxidação de ácidos graxos livres para a utilização de glicose. Hipoperfusão crônica ou períodos repetitivos de atordoamento miocárdio levam a esse metabolismo preferencial de glicose chamado de hibernação miocárdica (CAMICI *et al.*, 2007).

INTRODUÇÃO 42

2008). Interessantemente, miocárdio hipoperfundido, porém com captação de ¹⁸F-FDG preservada ou aumentada tem potencial para recuperação após restauração do fluxo sanguíneo no miocárdico (HEYNDRICKX *et al.*, 1975).

Na CCC, umas das características anatomopatológicas principais é a necrose miocitolítica associada a regiões de lesões vasculares, infiltrado inflamatório de células mononucleares e fibrose reparativa (TORRES, 1958; 1960; ROSSI, 1990). A necrose miocitolítica classicamente é interpretada como lesão celular por fenômenos hipóxicos e isquêmicos repetitivos e de baixa intensidade (ROSSI; RAMOS, 1996). Em trabalho recente do nosso grupo em modelo de CCC em hamsters, demonstramos regiões de defeito perfusional grave em repouso topograficamente associadas a alterações da mobilidade parietal que corresponderam histologicamente a áreas de miocárdio estruturalmente preservado, porém inflamado (OLIVEIRA *et al.*, 2018). No conjunto esses resultados reforçam nitidamente a noção de que os distúrbios de perfusão miocárdica na CCC possam associar-se a fenômenos semelhantes à hibernação miocárdica vista na doença arterial coronária obstrutiva crônica e poderia ter implicações clínicas relevantes para o diagnóstico, prognóstico e manejo dos pacientes com CCC.

Mais recentemente, imagens positrônicas utilizando ¹⁸F-FDG têm se demonstrado úteis na detecção de processos inflamatórios patológicos no coração em diferentes condições, como endocardite (SABY *et al.*, 2013), doença aterosclerótica coronariana (DEMEURE *et al.*, 2014), pós-infarto agudo do miocárdio (NAHRENDORF *et al.*, 2015), sarcoidose (SCHATKA; BENGEL, 2014), pericardite (SALOMAKI *et al.*, 2014) e miocardite (NENSA *et al.*, 2018).

O miocárdio possui avidez variada para a utilização de glicose. Em condições normais, dietas a base de carboidratos estimulam a liberação de insulina que consequentemente ativa a expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4), permitindo assim a entrada de glicose no miócito. Na ausência de carboidratos e insulina, o miocárdio utiliza ácidos graxos livres para produzir energia. Entretanto, a glicose entra em células inflamatórias por transporte facilitado pela ação da GLUT1 e da GLUT3, que são constitutivas e estão superexpressas em células inflamatórias (MOCHIZUKI *et al.*, 2001). Portanto, estratégia de preparo para aquisição de imagens baseadas em supressão de captação de glicose pelo miócito cardíaco pode permitir a detecção de processo inflamatório ativo no coração (MIYAGAWA *et al.*, 2014).

No cenário clínico são descritos diversos protocolos para preparação da condição metabólica do miocárdio para suprimir a captação do ¹⁸F-FDG pelo cardiomiócito e

recomendações atuais pautam-se na utilização de pelo menos duas refeições ricas em gorduras com ausência de carboidratos no dia anterior ao exame, além de jejum de pelo menos 4 horas antes da administração do ¹⁸F-FDG (JAMAR *et al.*, 2013; OSBORNE *et al.*, 2017). Embora protocolos de jejum semelhantes aos adotados no cenário clínico possam ser adotados nos estudos experimentais (WERNER *et al.*, 2018), uma outra estratégia, mais efetiva e que promove menor sofrimento ao animal tem sido utilizada. Esta estratégia baseia-se no emprego de agentes anestésicos específicos, capazes de agir sobre o metabolismo miocárdico e suprimir a captação de ¹⁸F-FDG pelo cardiomiócito. Dessa forma, o acúmulo do radiotraçador no coração pode evidenciar regiões de inflamação, como bem documentado em modelos de infarto agudo do miocárdio em camundongos (THACKERAY *et al.*, 2015; THACKERAY *et al.*, 2015).

Dessa forma, para aprofundamento no entendimento da contribuição de cada mecanismo fisiopatológico para o desenvolvimento da disfunção miocárdica e também determinar a correlação entre eles, nominalmente a isquemia microvascular (levando à hibernação miocárdica) e a inflamação, propomos usar correspondentes métodos de imagem capaz de detectar e quantificar os distúrbios de perfusão (SPECT de perfusão miocárdica) e a inflamação (FDG-PET) miocárdica *in vivo*.

1.8. Resumo da justificativa

Dada o atual desconhecimento do papel dos vários mecanismos envolvidos na lesão miocárdica crônica induzida pelo *T. cruzi*, assim como a atual falta de alvos para intervenções terapêuticas, a descoberta de marcadores precoces que se correlacionem com a progressão da doença, constitui um objetivo relevante para o futuro planejamento de novos tratamentos e mais acurada avaliação prognóstica da CCC. Portanto, o presente estudo espera contribuir para o entendimento dos processos fisiopatogênicos da CCC, particularmente endereçando a participação dos distúrbios de perfusão miocárdica microvasculares e a inflamação miocárdica para o desenvolvimento da disfunção miocárdica e investigando a correlação entre esses distúrbios. Para tanto, utilizamos métodos de imagens cintilográficas de alta-resolução, baseados na tecnologia de SPECT e PET, representando abordagens originais em estudos experimentais na CCC.

INTRODUÇÃO | 44

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo tem por objetivos, em modelo experimental de CCC no hamster sírio:

1. Investigar, mediante emprego de métodos de imagem *in vivo* e de forma longitudinal, a associação dos distúrbios de perfusão miocárdica com a progressão da disfunção sistólica ventricular esquerda em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters sírios.

2. Investigar a correlação entre e a atividade inflamatória miocárdica detectada *in vivo*, com a presença e o grau da disfunção contrátil global do ventrículo esquerdo, distúrbios de perfusão miocárdica e com o grau de lesão tecidual miocárdica.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar a progressão da disfunção sistólica ventricular esquerda neste modelo experimental;

- Investigar a presença e extensão de distúrbios da perfusão miocárdica;

- Analisar a correlação do acometimento precoce da perfusão miocárdica com a posterior progressão para formas mais graves de disfunção miocárdica na fase crônica da cardiopatia;

 Investigar a presença de miocárdio viável em regiões com defeitos de perfusão pelo emprego de imagens positrônicas com ¹⁸F-FDG;

- Investigar a presença e a intensidade de inflamação miocárdica detectada *in vivo* pelo emprego de imagens positrônicas com ¹⁸F-FDG;

- Analisar a correlação das alterações de função e morfologia do VE, com as alterações da perfusão e inflamação miocárdicas avaliadas por métodos *in vivo*.

- Analisar a correlação entre os achados *in vivo* dos parâmetros estudados da função, perfusão e inflamação com as alterações histopatológicas *ex-vivo*.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Anexo A), os experimentos foram realizados com hamsters sírios fêmeas (*Mesocricetus auratus*) de 12 semanas de idade, mantidos em alojamento climatizado no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com acesso livre à água e ração padrão, submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais:

- Grupo controle (n=12) = receberam inóculo de salina em igual volume e via de administração usada nos animais do grupos infectado com *T. cruzi*;
- 2- Grupo Chagas (n=40) = infectados intraperitonealmente com $3,5x10^4$ formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y;

3.2. Delineamento geral do estudo

Após a inoculação com *T. cruzi*, os animais foram observados quanto à confirmação da infecção (visualização de parasitas no sangue, sinais de infecção aguda, perda de peso e morte de alguns animais). Após a remissão da fase aguda da doença e em intervalos prédefinidos após a inoculação, os animais foram submetidos a exames de imagem para avaliação da função sistólica e remodelamento ventricular esquerdo (ecocardiograma), perfusão miocárdica (mini-SPECT de perfusão miocádica com ^{99m}Tc-Sestamibi), viabilidade e inflamação miocárdica (MicroPET - tomografia por emissão de pósitrons com ¹⁸F-FDG) *in vivo*. Os animais foram submetidos aos métodos de imagem 2, 4, 6, 8 e 10 meses após infecção com exceção do MicroPET, que somente foi realizado aos 10 meses pós-infecção (Figura 1). Ao final do período de observação os animais foram submetidos à eutanásia, retirada do soro e do coração para confirmação da infecção crônica por *Western blot* e estudo histopatológico para detecção de fibrose e inflamação.



Figura 1. Desenho experimental com infecção dos animais no mês 0, seguida por ecocardiograma-2D e SPECT aos 2, 4, 6, 8 e 10 meses após a infecção. Os animais controles e infectados foram estudados longitudinalmente como indicado. As imagens positrônicas foram realizadas no décimo mês após a infecção. Eco-2D= ecocardiograma 2D; ^{99m}Tc-MIBI= sestamibi marcado com tecnécio 99m; ¹⁸F-FDG= Fluorodesoxiglicose marcado com Flúor 18; SPECT= tomografia computadorizada por emissão de fótons singulares; PET= Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons.

3.3. Confirmação da infecção

A confirmação da infecção crônica pelo T. cruzi foi realizada pela detecção de anticorpo anti T. cruzi no soro dos animais infectados por ensaio de Western blot com fração TESA de antígenos de T. cruzi secretados empregando IgG anti-hamster conjugada à peroxidase de rábano como anticorpo secundário, conforme descrito previamente (UMEZAWA et al., 1996). A confirmação da infecção foi realizada no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) da FM-USP pelo Prof. Dr. Edécio Cunha Neto.

3.4. Métodos de imagem

3.4.1. Ecocardiograma bidimensional

Após a sedação com uma combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg), os animais foram submetidos à tricotomia da região anterior do tórax mediante aplicação de

creme depilatório comercial. Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo (Figura 2), em ventilação espontânea, e o ecodopplercardiograma foi realizado usando um sistema de ecocardiografia bi-dimensional de alta resolução Philips HD11XE (Best, DA, Netherlands), com transdutor linear de 15-MHz de frequência. Utilizando-se a janela paraesternal para obtenção de imagens do eixo curto do VE, em nível dos papilares, imagens em modo M foram obtidas para a medida da espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo, assim como das suas dimensões sistólica e diastólica. O diâmetro diastólico do VE foi medido na dimensão diastólica ventricular máxima e a dimensão sistólica do VE foi obtida durante a máxima movimentação anterior da parede posterior.

As imagens obtidas foram gravadas para análise "off-line" ao final do estudo. A coleta das imagens, assim como as suas análises, foi realizada por um ecocardiografista com experiência na obtenção e análise de ecocardiografias de pequenos animais e velado quanto ao grupo de estudo ao qual o animal pertencia. As dimensões obtidas no modo M (imagens de eixo curto) do VE em diástole e sístole foram utilizadas para determinação da fração de ejeção, conforme a fórmula:

Fração de Ejeção (FEVE) pelo método de Teichholz: = Volume diastólico-Vsistólico/Vdiastólico x 100. Onde cada volume é calculado a partir da dimensão linear do VE (D) da seguinte forma: $V = (7/2, 4 D) \times D^3$

As medidas representam sempre a média de, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos usando a mesma projeção, posição de transdutor e angulação e no mesmo quadro de imagem congelada.



Figura 2 – A - Animal anestesiado, submetido à tricotomia do tórax e posicionado em decúbito lateral esquerdo para aquisição das imagens ecocardiográficas; B - Avaliação da FE do VE pelo método Teichholz; C – Imagens bidimensionais obtidas do eixo curto em níveis basal e medioventricular, e paraesternal para visualização do eixo longo do coração.

3.4.2. Cintilografia de perfusão miocárdica com Mini-SPECT

A cintilografia de perfusão miocárdica foi realizada em uma gama câmara clínica (BrightView XCT; Philips Medical Systems Inc., Cleveland, Estados Unidos) adaptada pela construção de um sistema de blindagem (Figura 3) recentemente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (MEJIA *et al.*, 2009; MEJIA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esse sistema permite o encaixe de um colimador de orifício simples, com diâmetro de 1,5 mm e ângulo de abertura total de 150°. Esta blindagem é constituída por uma placa de alumínio recoberta com uma manta de chumbo de 6mm de espessura, adequada para fótons com energia na faixa de 150 keV. Adicionalmente, foi desenvolvido um suporte cilíndrico para o posicionamento do animal. Esse suporte é acoplado a um sistema motorizado que permite rotacionar o alvo para as diferentes posições angulares de acordo com o número de projeções

a serem registradas ao longo dos 360° da órbita de aquisição tomográfica. Sincronizada com o protocolo de aquisição dinâmico da gama câmara, a sequência de projeções é registrada e armazenada em formato DICOM.



Figura 3 - Sistema "mini-SPECT" posicionado em uma das duas cabeças da gama câmara clínica BrightView XCT. (1) – Detector da gama-câmara, (2) – Carro suporte do colimador pinhole, (3) – Suporte rotacional para conter o pequeno animal durante a aquisição acoplado a motor de passo.

Para a aquisição das imagens (Figura 4), os animais foram rapidamente anestesiados com isoflurano a 3% por 2 minutos (TAYLOR; MOOK, 2009) e uma atividade 555 MBq de ^{99m}Tc-Sestamibi foi injetada na veia sublingual e em seguida foi permitido que o animal despertasse. Noventa minutos após a injeção, os animais foram novamente anestesiados com uma combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg) e posicionados no sistema para a aquisição.

Quarenta projeções, igualmente espaçadas num ângulo de varredura de 360 graus, foram adquiridas em todos os protocolos de imagens. As projeções foram registradas em uma matriz de 128 x 128 elementos, cada elemento com uma área de 3,4 mm x 3,4 mm. Um fator

de magnificação de 6,3 X foi adotado para todos os experimentos, o que corresponde a uma dimensão lateral de elemento do volume do objeto (ou voxel) de 0,54 mm. Uma janela de energia simétrica de 20% foi centrada no fotopico de energia do ^{99m}Tc (140 keV). O tempo de aquisição por projeção foi de 30 segundos, totalizando aproximadamente 22 minutos por animal.



Figura 4 - Protocolo de aquisição de imagem de SPECT de perfusão miocárdica com ^{99m}Tc-Sestamibi. Iso = Isoflurano; MIBI= sestamibi.

Após a aquisição das projeções, as imagens foram exportadas em formato DICOM para um computador pessoal, onde foram processadas para obtenção do modelo tridimensional da distribuição do radiofármaco no órgão alvo (MEJIA *et al.*, 2010).

Para isso, utilizou-se um software desenvolvido localmente para reconstruções iterativas de imagens baseado no algoritmo de *ordered-subsets expectation maximization* (OSEM). A ferramenta foi implementada em Linguagem C, usando um compilador freeware Dev-C++ (Bloodshed Software). Para visualização final das reconstruções, foi utilizado o freeware AMIDE Medical Image Data Examiner (LOENING; GAMBHIR, 2003).

A acurácia desse sistema para detecção de fibrose miocárdica regional em modelo de cardiopatia isquêmica foi previamente (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

3.4.3. Imagens de tomografia positrônica com 18F-FDG

As imagens de ¹⁸F-FDG - PET foram adquiridas em um MicroPET dedicado para aquisição e reconstrução de imagens de tomografia positrônica para pequenos animais (General Electric Healthcare modelo LabPET 4 solo) na Unidade de Pesquisa de Radiofármacos do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear em Belo Horizonte, Brasil (Figura 5). Trata-se de um PET-scanner, totalmente digital, baseado em fotodiodos avalanche (APD). O Conjunto de detecção é constituído por pares de cristais LYSO/LGSO com dimensões de 2x2x12 mm. Cada par de cristais acoplado a um APD constitui um canal, ao todo são 1536 canais. O FOV (campo de visão) transverso mede 11,0 cm e os axiais 3,75 cm. Utilizando um algoritmo de apropriado o sistema pode resultar em uma resolução FWHM de cerca de 1 mm, no centro do FOV , enquanto permanece abaixo de 2,1 mm para uma distancia radial de 2,0 cm. A sensibilidade considerando uma janela de energia de 250-650 KeV é de aproximadamente 1,1%.

O protocolo de aquisição de imagens adotado foi semelhante ao protocolo descrito por Thackeray e colaboradores (2015). Nenhuma preparação metabólica baseada em dieta do animal foi realizada previamente e a ampliação ou supressão da captação miocárdica de ¹⁸F-FDG foi conseguida pelo emprego de diferentes anestésicos.

Para a avaliação da viabilidade miocárdica, os animais foram mantidos anestesiados com isoflurano (3% a 4% em oxigênio 100%) por vinte minutos para aumento da captação do FDG pelos miócitos cardíacos. Após esse período, uma dose de 70 MBq de ¹⁸F-FDG foi injetada na veia sublingual e então foi permitido que o animal despertasse. Após 60 minutos da injeção, o animal foi submetido a uma aquisição de imagem estática de 15 minutos novamente mantido sobre anestesia com isoflurano (3% a 4% em oxigênio 100% para indução e 2% para manutenção).



Figura 5 – Sistema de MicroPET dedicado (General Electric Healthcare modelo LabPET 4 solo) da Unidade de Pesquisa de Radiofármacos do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear em Belo Horizonte, Brasil.

Para a avaliação da atividade inflamatória miocárdica, os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg) e após vinte minutos, uma dose de 70 MBq de ¹⁸F-FDG foi injetada na veia sublingual. Após 60 minutos da injeção, o animal recebeu mais uma dose de Ketamina e Xilazina (50 e 5 mg/kg) e então realizou-se aquisição de imagem estática de 15 minutos.

Dessa forma, somente foram realizadas imagens estáticas com os animais posicionados em posição supina e o coração localizado no centro do campo de visão. Os sinais vitais foram monitorizados e os animais foram mantidos com frequência respiratória entre 15 e 25 incursões por minutos com temperatura corporal de 37°C, mantida por um sistema de aquecimento por fluxo de água aquecida. Cada imagem foi realizada em dias alternados e a glicemia sanguínea foi aferida logo após o início da anestesia inicial e ao final da aquisição da imagem.

As imagens foram reconstruídas por meio do software do próprio equipamento (LabPET 1.12.0, Gamma Medica-Ideas) em uma matriz de 128x128x159 (0,78x0,78x0,80 mm) utilizando 10 iterações do algoritmo MLEM-3D com correção de dispersão. Não foi aplicada correção de atenuação.

3.4.4. Processamento e análise das imagens

As imagens de ^{99m}Tc-Sestamibi em repouso foram usadas para definir os defeitos de perfusão miocárdica. A análise da perfusão miocárdica foi baseada na construção de mapa polar para avaliação quantitativa (planimetria) das áreas de defeitos graves considerando como limiar de captação as contagens abaixo de 50% em relação ao pixel de máxima contagem. A análise foi realizada utilizando o software MunichHeart® (Munique, Alemanha).

O software Munich Heart permite uma completa análise da distribuição nas paredes ventricular esquerda de radiotraçadores utilizados para imagens de PET e SPECT. Isto permite uma avaliação quantitativa (PET) ou semiquantitativa (SPECT) em todos os 17 segmentos do ventrículo esquerdo tanto no cenário clínico quanto no experimental (Figura 6).



Figura 6 - Mapa polar dos 17 segmentos do ventrículo esquerdo criados pelo software Munich Heart

A análise quantitativa da captação miocárdica de ¹⁸F-FDG sobre isoflurano para avaliação da viabilidade miocárdica também foi realizada através da construção de mapas

polares. Segmentos com captação menor que 50% do pixel de maior acúmulo foram considerados regiões de miocárdio não viável.

Devido à supressão de captação miocárdica de ¹⁸F-FDG nas imagens adquiridas sob efeito de ketamina/xilazina, a análise foi realizada utilizando ferramentas de coregistro de imagens com o software PMod (PMOD Technologies Ltd. Zurique, Suíça). Regiões de interesse (17 segmentos similares aos mapas polares) foram manualmente desenhados ao longo de todo o ventrículo esquerdo nas imagens de SPECT. Essas regiões de interesses, determinadas pelas imagens de perfusão miocárdica, foram alinhadas às imagens de PET com ¹⁸F-FDG sob efeito de ketamina/xilazina. Referências anatômicas incluindo a ponta do fígado foram usadas para posicionar as regiões de interesse. A porcentagem da dose injetada por grama de tecido (%DI/g), o *standardized uptake value* (SUV, g/cm³) e a razão alvo-fundo (TBR) foram avaliadas. A captação patológica de glicose nas imagens de PET foi definida como captação miocárdica focal de ¹⁸F-FDG com supressão de captação de glicose pelo miocárdio.

3.5. Histopatologia

Após anestesia, os animais foram sacrificados mediante abertura do tórax, sendo o coração rapidamente excisado e lavado em solução PBS. Em seguida os vasos da base assim como os átrios foram descartados e uma amostra do ventrículo direito foi retirada, de forma cuidadosa para não produzir lesão na parede ou cavidade ventricular esquerda, para futuras análises (não incluídas no presente trabalho). Para análise histopatológica, foram obtidos cortes em três níveis do coração (basal, medioventricular e apical) com o cuidado de se manter a mesma orientação para a correlação topográfica com as imagens *in vivo*. Amostras do tecido cardíaco foram fixadas em formaldeído a 10%, por 24 horas, e depois transferidas para álcool 70%. As amostras foram progressivamente desidratadas, embebidas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina-eosina e picrosírius-vermelho para quantificação de inflamação e fibrose, respectivamente.

3.5.1. Digitalização e análise histológica quantitativa

Os cortes histológicos foram escaneadas por um sistema de análise digital de imagens constituído por um escâner digital (Scanscope CS System; Aperio Tecnologies, Inc., CA, Estados Unidos), com uma objetiva Olympus UPlanSApo 20x acoplada ao escâner. Para todas as análises, foram utilizadas áreas de amostragens que variaram de 1,5 a 2 mm² mantendo correlação topográfica com os exames de imagem *in vivo*.

Pela coloração de Picrosírius vermelho, foi quantificada a extensão de fibrose, em que a macro do Software Image Scope identifica as áreas coradas em vermelho e contabiliza a extensão por milímetro quadrado em relação a área total analisada. Sendo portanto a fibose expressa em porcentagem de área.

Pela coloração de Hematoxilina e Eosina, foram realizadas análises qualitativas por uma patologista experiente e velada em relação a qual grupo pertenciam os animais. A análise quantitativa foi realizada manualmente. Imagens digitais das mesmas regiões foram exportadas e as células mononucleadas com tamanho e forma específicas foram contabilizadas utilizando o Software ImageJ, analisando-se dessa forma o número de células inflamatórias mononucleadas por milímetro quadrado.

3.6. Aspectos éticos de investigação animal

Os animais foram submetidos aos procedimentos sob anestesia, de forma a não induzir estresse ou dor. Não foram utilizados métodos cruentos ou que submetessem os animais a sofrimento ou dor. O projeto foi executado após a devida aprovação do projeto no comitê de ética em pesquisa animal da nossa instituição (Anexo A).

Este estudo recebeu apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP (Processos: 2015/25209-5 e 2016/16746-0) e da Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas (FAEPA).

3.7. Análise estatística

Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição das variáveis. As variáveis contínuas com distribuição normal são apresentadas como média ± desvio padrão da média e as variáveis contínuas com distribuição não normal são apresentadas como mediana e intervalo interquartil. As variáveis nominais foram expressas como frequência absoluta (n) e relativa (%).

Para melhor exploração dos fenômenos observados no estudo, diferentes análises foram realizadas. Na primeira, o desenho experimental apresentou como variáveis dependentes os defeitos de perfusão miocárdica e os parâmetros ecocardiográficos da função sistólica e morfologia ventricular esquerda. Cada variável foi analisada separadamente com medidas repetidas em intervalos pré-determinados até o décimo mês após a infecção. Os grupos foram divididos em animais controles e infectados pelo *T. cruzi*. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para modelos mistos de medidas repetidas em um dos fatores (*mixed* ANOVA ou *split-plot factorial* ANOVA). Dessa forma, pôde ser verificado o efeito resultante da interação (*main effect*) de duas variáveis independentes: tempo e infecção pelo *T. cruzi*. O fator tempo associa-se a efeitos e potenciais diferenças em um mesmo indivíduo (*within-subjects effects*), enquanto a infecção pelo *T. cruzi*, avaliada como variável categórica binária (infecção presente ou ausente), associa-se a efeitos e potenciais diferenças entre os indivíduos (*between-subjects effects*). O objetivo dessa análise foi avaliar se há interação significativa entre esses fatores sobre as variáveis dependentes. Apenas animais que sobreviram até o final do estudo foram incluídos nessa análise.

O óbito de animais durante o período de seguimento do estudo, principalmente entre os animais infectados, pode introduzir viés de sobrevivência no modelo experimental. Para avaliar a presença dessa potencial limitação, uma análise adicional (*sensitivity analysis*) foi realizada utilizando-se períodos progressivamente crescentes da avaliação seriada nas variáveis avaliadas.

Uma terceira análise foi realizada com base no acometimento cardíaco observado aos 10 meses de infecção. Para essa análise, os animais controles foram comparados a animais infectados sem disfunção sistólica do VE (Chagas S/D) e a animais infectados com disfunção sistólica do VE (Chagas C/D). Dessa forma, foi realizada uma análise de variância (*between*-

subjects effects) entre os grupos de animais para cada variável em cada janela temporal de evolução do estudo.

Para testar a diferença entre médias de dois grupos foi empregado o Teste t de Student, para variáveis com distribuição normal, e o Teste de Mann-Whitney, para as variáveis com distribuição não-normal. Para as análises de correlação, foi utilizado o teste de Pearson quando as variáveis apresentavam uma distribuição normal, e o teste de Spearman quando as variáveis não seguiam uma curva de distribuição normal.

A análise de *mixed* ANOVA foi realizada com o programa Stata versão 14.2 (StataCorp, TX, USA). As demais análises foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism, versão 6.01 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5% bicaudal (p < 0.05).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Mortalidade

A mortalidade dos animais infectados foi de 27,5% (n= 11) na fase aguda da infecção. Na fase crônica a mortalidade aos 2, 6 e 8 meses após a infecção foi de 2,5% (n= 1), 5% (n= 2) e 10% (n= 4), respectivamente. Somente dois animais controles morreram em consequência da anestesia durante os exames de imagem após 6 meses de infecção.

4.2. Função sistólica e remodelamento ventricular esquerdo

Os dados evolutivos da função sistólica e da morfologia do ventrículo esquerdo nos animais controles (n=10) e infectados (n=22) que sobreviveram até o final do estudo são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Sumário dos resultados da avaliação da função sistólica e morfologia ventricular esquerda dos animais controles e infectados.

Ecocardiograma	2m	4m	бm	8m	10m	p-tempo
FEVE (%)						
Controles	75,1±3,3	71,3±3,7	70,3±2,8*	69,7±3,1*	70,3±2,8*	0,0001
Infectados	74,5±4,9	72±4,4	72±5,9	66,4±8,9*§	63,9±9,7*#§	<0,0001
p-grupos	0,77	0,65	0,69	0,025	0,024	
DSVE (cm)						
Controles	$0,39{\pm}0,04$	$0,44\pm0,04$	$0,43\pm0,04*$	0,44±0,03*	0,46±0,03*	<0,0001
Infectados	$0,39{\pm}0,04$	$0,43\pm0,05*$	$0,46\pm0,05*$	0,51±0,08*#§	0,54±0,08*#§	<0,0001
p-grupos	0,87	0,75	0,13	0,001	0,001	
DDVE (cm)						
Controles	$0,62{\pm}0,05$	$0,67{\pm}0,04*$	$0,65\pm0,04$	$0,66\pm0,04$	0,69±0,03	0,01
Infectados	$0,61\pm0,06$	$0,66\pm0,05$	$0,70\pm0,05*$	0,75±0,07*#	0,76±0,06*#§	<0,0001
p-grupos	0,52	0,37	0,02	<0,001	0,001	

Valores apresentados como média±DP

DP: desvio padrão, FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. O valor *p-grupos* refere-se à interação entre grupos: Controles vs Infectados (*between-subjects effects*); O valor *p-tempo* refere-se ao fator tempo: diferenças em um mesmo indivíduo (*within-subjects effect*); * p< 0,05 vs 2m; # p< 0,05 vs 4m; § p < 0,05 vs 6m.

Na análise de variância mista foi observada uma queda da fração de ejeção progressiva em ambos os grupos de animais estudados (Figura 7) sem diferença significativa entre os grupos ao longo do período estudado (valor-p da interação grupos#tempo = 0,06). Foi observada diferença estatística na interação entre os grupos (*between-subjects effects*) somente aos 8 e 10 meses após a infecção (Chagas vs. Controle, 8m: p=0,02; 10m: p=0,02).



Figura 7 – Avaliação sequencial da FEVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

O diâmetro sistólico do VE do grupo Chagas apresentou comportamento significativamente diferente ao longo do tempo em comparação ao grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo < 0,001). A diferença entre os grupos foi verificada a partir do oitavo mês após a infecção pelo *T. cruzi* (Figura 8).



Figura 8 – Avaliação sequencial do DSVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DDVE= diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

O diâmetro diastólico do VE do grupo Chagas também apresentou um comportamento ao longo do tempo significativamente diferente do grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo < 0,001). A diferença entre os grupos foi observada a partir do oitavo mês após a infecção (Figura 9).



Figura 9 – Avaliação sequencial do DDVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DDVE= diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Os resultados obtidos na análise suplementar que incluiu os animais que morreram durante o estudo (*sensitivity analysis*) mostram evolução seriada dos parâmetros ecocardiográficos em ambos os grupos semelhante à análise principal, sugerindo que o potencial efeito de viés de sobrevivência não interferiu de forma significativa nos achados principais da investigação (figuras suplementares de 1 a 3).

Dos 22 animais infectados com *T. cruzi* que sobreviveram até o fim do estudo, 8 (36%) desenvolveram disfunção sistólica grave do VE ($\leq 64\%$, baseado num limiar inferior de 2 DP abaixo da FEVE média dos animais controles) no décimo mês pós-infecção.

Considerando o acometimento da função sistólica global, foi realizada uma análise de variância (*between-subjects effects*) entre os animais controles, animais infectados sem disfunção sistólica aos 10m (Chagas S/D) e animais infectados com disfunção sistólica aos 10m (Chagas C/D). A redução da função sistólica nos animais infectados foi observada a partir do oitavo mês pós-infecção (p= 0,007), quando comparados ao grupo de animais controles e aos animais infectados sem queda da fração de ejeção. A diferença foi ainda maior

RESULTADOS | 66

no décimo mês pós-infecção (p< 0,0001). Não foi observada diferença qualquer entre os animais controles e os animais infectados sem disfunção sistólica aos 10m em nenhuma janela temporal (Figura 10).



Figura 10 – Avaliação sequencial da FEVE ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

O diâmetro sistólico dos animais infectados que apresentaram fração de ejeção reduzida aos 10m foi significativamente maior quando comparado aos demais grupos de animais a partir do oitavo mês pós-infecção (p=0,0002) e progredindo até o décimo mês (p<0,0001). Não foi observada diferença significativa do DSVE entre os animais controles e os animais infectados com FEVE preservada (Figura 11).



Figura 11 – Avaliação sequencial do DSVE ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. DSVE= diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

O diâmetro diastólico dos animais infectados que apresentaram fração de ejeção reduzida foi significativamente maior quando comparado aos animais controles a partir do sexto mês pós-infecção (p= 0,02). Entretanto, nessa janela temporal não foi observada diferença entre os animais infectados com e sem disfunção sistólica global (Figura 12). A partir do oitavo mês pós-infecção, foi observada diferença significativa entre os 3 grupos de animais (p= 0,0001). O mesmo comportamento foi observado ao décimo mês pós-infecção (p= 0,0001).



Figura 12 – Avaliação sequencial do DDVE ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. DDVE= diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle; # = p<0,05 vs. Controle; # = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

4.3. Avaliação da perfusão miocárdica

Os animais controles apresentaram perfusão miocárdica homogênea apesar de pequenos DPM (1-5% da área de superfície do VE) terem sido observados no ápice do ventrículo esquerdo. Entretanto, como pode ser observado na tabela 2, esses defeitos de perfusão não aumentaram ao longo do tempo (valor p da interação tempo do grupo controle = 0,86).

Defeitos de perfusão	2m	4m	бm	8m	10m	p-tempo
Controles	2,6±3	3,1±2,2	3,4±2,8	3,2±2,9	3,3±2,9	0,86
Infectados	5±5,1	4,7±3,4	9±7,6	10±7,7*#	11,6±10,1*#	0,0005
p-grupos	0,32	0,5	0,022	0,005	0,001	

Tabela 2 - Sumário dos resultados da avaliação da perfusão miocárdica ventricular esquerda dos animais controles e infectados.

Valores apresentados como média±DP

DP: desvio padrão. O valor *p-grupos* refere-se à interação entre grupos: Controles vs Infectados (*between-subjects effects*); O valor *p-tempo* refere-se ao fator tempo: diferenças em um mesmo indivíduo (*within-subjects effect*); * p < 0.05 vs 2m; # p < 0.05 vs 4m.

Considerando os animais infectados, a área dos defeitos de perfusão miocárdica apresentou comportamento progressivo (valor p da interação tempo no grupo Chagas <0,0001). Na análise de variância mista do DPM, o grupo Chagas apresentou um comportamento ao longo do tempo significativamente diferente do grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo= 0,029). A diferença entre os grupos foi observada a partir do oitavo mês após a infecção (Figura 13). Além disso, foi observada diferença estatística na interação entre os grupos (*between-subjects effects*) a partir do sexto mês pós-infecção (p= 0,02).



Figura 13 – Avaliação sequencial do DPM dos dois grupos estudados ao longo do tempo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DPM= defeito de perfusão miocárdica.

Os resultados obtidos na análise suplementar que incluiu os animais que morreram durante o estudo (*sensitivity analysis*) mostram evolução seriada da perfusão miocárdica em ambos os grupos semelhante à análise principal, sugerindo que o potencial efeito de viés de sobrevivência não interferiu de forma significativa nos achados principais da investigação.

Considerando o acometimento da função sistólica global aos 10 meses, a análise de variância (*between-subjects effects*) entre os animais controles, animais infectados sem disfunção sistólica (Chagas S/D) e animais infectados com disfunção sistólica (Chagas C/D), o defeito de perfusão miocárdica foi significativamente maior nos animais infectados com fração de ejeção reduzida a partir do sexto mês pós-infecção (p=0,007), quando comparados aos animais controles. Não foi observada diferença significativa entre os animais infectados com e sem disfunção sistólica no sexto mês pós-infecção. Foi observado DPM significativamente maior nos animais controles e infectados com fração de ejeção reduzida quando comparados aos animais controles e infectados sem disfunção sistólica no oitavo (p=0,002) e décimo (p<0,0001) mês pós-infecção (Figura 14). Não foi observada diferença significativa no tamanho do defeito perfusional entre os animais controles e animais infectados sem redução da FEVE em nenhuma das janelas temporais do estudo.



Figura 14 – Avaliação sequencial do DPM ao longo do tempo segundo o acometimento da função sistólica global. DPM= defeito de perfusão miocárdica; S/D= sem disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; C/D= com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. * = p<0,05 vs. Controle; # = p<0,05 vs. Controle e Chagas S/D.

Foi observado DPM consistente em 13 dos 22 (59%) animais infectados aos 10 meses após infecção. A região apical apresentou DPM em todos os casos de animais com perfusão alterada em todas as janelas temporais. Evolutivamente, pode-se observar aumento da incidência de acometimento da perfusão nos segmentos anterior médio e basal a partir do sexto e oitavo mês pós-infecção (Figura 15). Aos 10 meses após a infecção, DPM também foram frequentemente detectados nos segmentos anterolateral médio e basal, posterolateral médio e basal sendo difuso e menos frequente o acometimento de outros segmentos do VE.



Figura 15 – Imagens ilustrativas mostrando as grades de segmentação do ventrículo esquerdo derivadas dos mapas polares, ilustrando a frequência relativa de acometimento dos segmentos pelos defeitos perfusionais em cada janela temporal. Aqui estão incluídos dados apenas dos animais que mostraram defeitos perfusionais ao final do estudo (janela temporal de 10 meses, n = 13) Pode-se observar a evolução topográfica e da incidência relativa dos defeitos de perfusão miocárdica a partir da região apical, estendendo-se progressivamente ao longo do tempo para as porções média e basal das paredes anterior, ântero-lateral e póstero-lateral do VE.

Alguns animais infectados apresentaram defeitos de perfusão miocárdica progressivos após o sexto mês de infecção. Um exemplo de animal infectado apresentando DPM progressivo é apresentando na figura 16.



Figura 16 – Mapa polar de perfusão miocárdica de um animal infectado demonstrando DPM progressivo. Respectivos mapas polares demonstrando área de DPM (%, 2m= 12, 4m= 8, 6m= 13, 8m= 18, 10m= 24) marcadas em azul (pixels com contagem menor do que 50% do pixel de maior acúmulo) envolvendo os segmentos apicais nas janelas temporais iniciais e com posterior progressão dos defeitos para as paredes anterior e anterolateral média.

4.3.1. Correlação entre defeitos de perfusão e função sistólica e morfologia do VE

Considerando os defeitos de perfusão miocárdica e a fração de ejeção na mesma janela temporal, correlações negativas significativas foram observadas aos 8m (r= -0,71, p< 0,001), 10m (r= -0,83, p< 0,0001, Figura 17).



Figura 17 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre valores individuais da área de defeito de perfusão miocárdica e a FEVE na mesma janela temporal. FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DPM: defeito de perfusão miocárdica.
RESULTADOS | 73

O DPM correlacionou-se significativamente com o DSVE na mesma janela temporal aos 6m, 8m e 10m. O mesmo comportamento (Figura 18) foi observado na análise de correlação do DPM com o DDVE na mesma janela temporal (6m, r= 0,48, p= 0,006; 8m, r= 0,68, p< 0,0001; 10m, r= 0,65, p< 0,0001).



Figura 18 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação dos valores individuais da área de defeito de perfusão miocárdica com o DSVE e o DDVE na mesma janela temporal. DPM: defeito de perfusão miocárdica; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

4.3.2. Correlação entre defeitos de perfusão em fases mais precoces e função sistólica e morfologia do VE tardias

A FEVE aos 10 meses após infecção se correlacionou significativamente com o DPM a partir do quarto mês pós-infecção (Tabela 3). Comportamento semelhante foi observado na correlação do DSVE aos 10m com o DPM aos 4m, 6m e 8m. Não foi observada correlação do DPM aos 2 meses após infecção com a FEVE e o DSVE aos 10m (p > 0.05).

DPM	FEVE	DSVE	DDVE
2 <i>m</i>	r= -0,27, p=0,13	r= 0,34, p=0,06	r=0,36, p=0,04
4m	r= -0,4, p=0,02	r=0,41, p=0,02	r=0,37, p=0,04
бт	r= -0,57, p=0,0007	r=0,59, p=0,0003	r=0,54, p=0,001
8m	r= -0,8, p<0,0001	r= 0,75, p<0,0001	r=0,66, p<0,0001

Tabela 3 - Análise de correlação entre a função sistólica e morfologia do VE aos 10 meses e o acometimento precoce dos defeitos de perfusão miocárdica.

DPM: defeito de perfusão miocárdica, FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Entretanto, como pode ser observado na tabela 2, o DDVE no décimo mês pósinfecção se correlacionou significativamente com a perfusão miocárdica desde o segundo mês pós-infecção.

Considerando a extensão da área de defeito perfusional no sexto mês pós-infecção, momento que a perfusão miocárdica passa a sofrer alterações significativas, observamos correlação positiva significativa com a queda da FEVE do sexto para o décimo mês pós-infecção (r= 0,56, p= 0,0008). A figura 19 exemplifica dois exemplos de animais que apresentavam DPM significativo aos 6 meses pós-infecção e FEVE ainda preservada mas que progrediu com queda importante até o décimo mês pós-infecção.



Figura 19 - Mapas polares de perfusão miocárdica de animais infectados e os respectivos valores da área de defeito de perfusão miocárdica e fração de ejeção; A- animal apresentando DPM aos 2m, progressiva deterioração da perfusão após 6m e queda da FEVE somente a partir do oitavo mês pós-infecção; B- animal apresentando DPM aos 2m, parcial melhora aos 4m e progressiva deterioração da perfusão a partir do 6m. A FEVE apresentou queda consistente a partir do oitavo mês pós-infecção. DPM= defeito de perfusão miocárdica; FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

4.4. Imagens de PET in vivo

4.4.1. Avaliação da viabilidade miocárdica in vivo

Considerando os 12 animais (controles, n=3; infectados: n=9) submetidos ao exame de PET com ¹⁸F-FDG utilizando o anestésico isoflurano, somente imagens de 6 animais (2 controles e 4 infectados) apresentaram qualidade técnica apropriada para análise da viabilidade miocárdica. Os problemas técnicos observados foram a pobre atividade específica no coração, baixa resolução espacial e o coração fora do campo de visão do detector.

Nas imagens analisáveis, animais controles apresentaram captação miocárdica de ¹⁸F-FDG homogênea. Nos animais infectados, os segmentos exibindo DPM somente demonstraram leve redução da captação miocárdica de ¹⁸F-FDG (captação >50% do máximo) indicando presença de miocárdio viável em áreas com hipoperfusão em repouso (Figura 20). Dessa forma, essas alterações caracterizam defeitos de *mismatch* entre perfusão e viabilidade.



Figura 20. SPECT de perfusão miocárdica de um animal infectado revelando um defeito de perfusão grave (captação <50% do máximo) envolvendo 28% da área de superfície do VE acometendo os seguimentos anterior e anterolateral médios, e apicais (painel inferior). Imagens correspondentes de PET com ¹⁸F-FDG com captação preservada demonstrando miocárdio viável em regiões de defeitos de perfusão (*mismatch*).

4.4.2. Avaliação da atividade inflamatória miocárdica in vivo

A combinação de ketamina e xilazina (100 e 10 mg/kg) promoveu nos animais controles supressão da captação miocárdica de ¹⁸F-FDG (Figura 21) levando a um aumento da glicose sanguínea (4,9±0,4 para 15,4±3,5µmol/ml, p=0,003). O aumento de glicose sanguínea também foi observado nos animais infectados (4,6±0,7 para 11,7±1,1µmol/ml, p<0,0001).



Figura 21 - Corregistro de imagens de PET e SPECT em um animal controle evidenciando supressão da captação miocárdica de ¹⁸F-FDG (painel superior) e perfusão miocárdica normal com ^{99m}Tc-sestamibi (painel central). O painel inferior evidencia a fusão das duas imagens.

Comparados aos animais controles, animais infectados apresentaram maior porcentagem da dose injetada por grama de tecido (%DI/g, 0,28±0,06 vs 0,18±0,04 g/cc, p= 0,03) e *standardized uptake value* (SUV, 0,5±0,1 vs 0,37±0,08 g/cc, p= 0,047) de ¹⁸F-FDG no ventrículo esquerdo (Figura 22). Esses animais apresentaram tendência a maior relação órgão



0,40

0,20

0,00

Controle

Chagas

0,20

0,10

0,00

0,10

0,05 0,00

Controle

Chagas

alvo/fundo (TBR, $1,05\pm0,17$ vs $0,88\pm0,02$, p= 0,06). Esses achados sugerem maior intensidade de inflamação nesses animais.

Figura 22 - Comparação da captação de ¹⁸F-FDG no ventrículo esquerdo entre os animais controles e animais infectados. DI/g = porcentagem da dose injetada por grama de tecido; SUV= *standardized uptake value*; TBR= relação órgão alvo/fundo; * = p <0,05.

Chagas

Controle

Na análise visual das imagens, como exemplificado na figura 23, alguns animais infectados com DPM apresentaram aumento de captação regional de ¹⁸F-FDG topograficamente correlacionadas com regiões de defeitos de perfusão miocárdica.



Figura 23 - Corregistro de imagens de PET e SPECT em um animal infectado evidenciando captação miocárdica regional de ¹⁸F-FDG sob efeito de Ketamina e xilazina (painel superior) topograficamente correlacionada com defeito de perfusão miocárdica ^{99m}Tc-sestamibi (painel central). O painel inferior evidencia a fusão das duas imagens.

Considerando todos os segmentos do VE dos animais submetidos às imagens de PET sob ketamina e xilazina, os segmentos hipoperfundidos, quando comparados aos segmentos sem defeitos de perfusão (Figura 24), apresentaram maior %DI/g (g/cc, $0,3\pm0,07$ vs $0,25\pm0,07$, p< 0,0001), SUV (g/cc, $0,56\pm0,12$ vs $0,45\pm0,11$, p<0,0001) e TBR ($1,11\pm0,2$ vs $0,98\pm0,2$, p< 0,0001), sugerindo maior intensidade de inflamação nesses segmentos.



Figura 24 - Comparação da captação de ¹⁸F-FDG entre segmentos com perfusão normal e segmentos hiporperfundidos. DPM= defeito de perfusão miocárdica; PN= Perfusão normal. %DI/g = porcentagem da dose injetada por grama de tecido; SUV= *standardized uptake value*; TBR= relação órgão alvo/fundo; * = p <0,0001.

Além disso, a captação segmentar de ¹⁸F-FDG se correlacionou negativamente com a captação segmentar de ^{99m}Tc-Sestamibi (Figura 25).



Figura 25 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre a captações regionais de ¹⁸F-FDG e ^{99m}Tc-Sestamibi.

4.5. Análise histopatológica

4.5.1. Avaliação qualitativa e quantitativa

A análise qualitativa revelou infiltrado de células mononucleares difuso e multifocal com degeneração consistente das fibras cardíacas e lesão miocitolítica variável associadas a importante edema e fibrose intersticial e perivascular nos animais infectados. A análise macroscópica revelou importante dilatação das câmaras cardíacas e afilamento das paredes ventriculares em alguns animais infectados que não foram observados nos animais controles (Figura 26). Não foi observada a presença de parasitas nas formas tripomastigotas ou amastigotas.

Comparados aos animais controles, os animais infectados apresentaram maior quantidade de células inflamatórias mononucleadas (1461 ± 274 vs 564 ± 105 n/mm², p<0,0001) e extensão de fibrose ($15,2\pm5,5$ vs $8,4\pm1,6\%$, p= 0,0007). Foi observada correlação

significativa entre a intensidade de inflamação e a extensão de fibrose (r= 0,61, p= 0,0002), ou seja, os animais mais inflamados apresentavam maior extensão de fibrose.



Figura 26. Análise histopatológica dos animais controles e infectados. A- Corte histológico de um animal controle marcado com picrosírus vermelho (PV) demonstrando morfologia preservada do VE e baixa intensidade de fibrose, B- Corte histológico de um animal infectado marcado com PV demonstrando dilatação importante e afilamento das paredes do VE e alta intensidade de fibrose. C- Cortes microscópicos marcados com PV e HE de um animal controle evidenciando baixa intensidade de fibrose, fibras preservadas e poucas células inflamatórias mononucleadas. D - Cortes microscópicos marcados com PV e HE de um animal infectado evidenciando alta intensidade de fibrose, fibras lesionadas, congestão intersticial e difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleadas. E – Comparação da extensão de fibrose entre os animais controles e infectados, F - Comparação da intensidade de inflamação entre os animais controles e infectados. * = p <0,05.

4.5.2. Correlação dos achados histopatológicos com as imagens in vivo

A extensão de fibrose se correlacionou significativamente com a FEVE, com o DSVE e o DDVE (Tabela 4). Foi observada correlação significativa entre a intensidade de inflamação e os DSVE e DDVE. Não foi observada correlação significativa da intensidade de inflamação com a FEVE.

Tabela 4 - Análise de correlação entre a função sistólica e morfologia do VE aos 10 meses e os achados histopatológicos.

Achados histopatológicos	FEVE - 10m	DSVE - 10m	DDVE - 10m
Fibrose	r= -0,45, p= 0,01	r=0,44, p=0,01	r= 0,43, p= 0,01
Inflamação	r= -0,23, p= 0,21	r=0,38, p=0,03	r= 0,45, p= 0,01

FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Os defeitos de perfusão miocárdica se correlacionaram significativamente com a intensidade de inflamação (r= 0,35, p= 0,049). Entretanto, os DPM se correlacionaram mais significativamente com a extensão de fibrose (r= 0,59, p= 0,0003). Além disso, a extensão de fibrose se correlacionou com a área de DPM aos 6 e 8 meses pós-infecção (Figura 27).



Figura 27 - Gráficos de dispersão ilustrando a correlação entre valores individuais da área de defeito de perfusão miocárdica em cada janela temporal e a extensão de fibrose miocárdica. DPM: defeito de perfusão miocárdica.

Considerando os animais submetidos ao estudo com PET (controles, n=3; infectados: n=9) para a avaliação da atividade inflamatória *in vivo*, quando comparados aos animais controles, os animais infectados apresentaram maior da intensidade de inflamação (564±128 vs 1432±187 n/mm², p= 0,009) e extensão de fibrose (7,6±1,8 vs 16,6±6,6 %, p= 0,02). Foi observada correlação significativa da intensidade de inflamação com a %DI/g (Figura 28A), ou seja, os animais com maior captação miocárdica de ¹⁸F-FDG apresentaram maio intensidade de inflamação no estudo histopatológico. Não foi observada correlação significativa da ¹⁸F-FDG no VE inteiro e a extensão de fibrose (r= 0,4, p= 0,19). Na análise baseada em segmentos, foi obervada ainda correlação significativa da %DI/g de ¹⁸F-FDG com a intensidade de inflamação (Figura 28B).



Figura 28 - Gráficos de dispersão ilustrando: A - correlação dos valores individuais entre a captação miocárdica de ¹⁸F-FDG e a intensidade de inflamação; B – correlação entre a captação regional miocárdica de ¹⁸F-FDG e a intensidade de inflamação em cada segmento do VE dos animais estudados.



5. DISCUSSÃO

5.1. Principais achados

Mediante emprego de métodos de imagens *in vivo* de maneira sequencial e subsequente análise histopatológica topograficamente correlacionada com as alterações encontradas nos exames de imagem *in vivo*, descrevemos algumas características relevantes da história natural do envolvimento miocárdico da cardiomiopatia chagásica crônica no hamster.

Demonstramos que a disfunção sistólica e as alterações da morfologia do VE neste modelo animal ocorrem com frequência semelhante ao observado em humanos com CCC em fases evolutivas comparáveis e essas alterações se correlacionam com maior extensão de fibrose e intensidade de inflamação.

Documentamos que defeitos perfusionais graves ocorrem em frequência e topografia comparável ao que se tem observado em humanos chagásicos. Esses defeitos apresentaram correlação significativa com as alterações da morfologia e da função sistólica do VE. É possível que o resultado mais impactante do estudo resida na observação original de que esses defeitos perfusionais ocorram mais precocemente e se correlacionem com o acometimento miocárdico tardio e com a queda da função sistólica do VE, reforçando a noção de que os defeitos perfusionais possam participar dos mecanismos que causam a ulterior deterioração da disfunção sistólica e da lesão tecidual do VE na CCC experimental.

No estudo com imagens positrônicas, realizadas mediante adequada modulação do uso de substrato energético miocárdico, documentamos que defeitos perfusionais ocorrem em regiões de miocárdio viável. Além disso, essas regiões de defeitos perfusionais apresentam correlação topográfica com captação elevada de ¹⁸F-FDG, demonstrando correlação entre a inflamação e a deterioração da perfusão miocárdica, confirmada pelo estudo histológico.

5.2. O modelo experimental de CCC no hamster

O modelo estudado neste trabalho mostrou consistente reprodução dos resultados encontrados em outros estudos descrevendo a evolução da CCC no hamster. Na presente investigação observamos uma mortalidade na fase aguda da doença de 27,5% e de 17,5% na fase crônica no grupo de animais infectados com 35.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* estudados até o décimo mês pós-infecção. Essa alta mortalidade na fase aguda da doença, pode ser explicada pela maior virulência da cepa Y de *T. cruzi* quando comparadas com outras cepas (Vicentina e Benedito) no modelo da doença de Chagas em hamster (RAMIREZ *et al.*, 1994). O mesmo comportamento pode ser observado em experimentos com outros modelos animais utilizando-se a cepa Y (CHAPADEIRO *et al.*, 1988). No entanto, nossos resultados se assemelham a resultados observados por Oliveira et al (2016) onde foi observada uma mortalidade de 33% na fase aguda e de 10% na fase crônica no mesmo modelo de CCC em hamsters (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Bilate et al (2003) também observou uma mortalidade de 30% na fase aguda e de 14% na fase crônica da doença utilizando a mesma cepa e quantidade inóculo de *T. cruzi* (BILATE *et al.*, 2003).

Observamos ainda neste modelo durante a fase crônica da doença uma variedade considerável de comprometimento da função cardíaca e de dano histológico, onde foram observados animais com função sistólica normal ou leve redução, até animais com grave disfunção sistólica e importante dilatação ventricular esquerda que se iniciou a partir do oitavo mês pós-infecção. O modelo também apresentou variado grau de dano histológico com infiltrado de células mononucleares, degeneração das fibras cardíacas e lesões miocitolíticas associadas a importante edema e fibrose intersticial e perivascular em animais infectados. Esses dados estão de acordo com estudos prévios e reforçam a noção que este modelo é especialmente útil para estudo de correlação entre os dados morfológicos e funcionais com os achados histológicos subjacentes (BILATE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2016; TANAKA *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que a fim de se estudar os mecanismos envolvidos na fisiopatogênese da CCC, vários modelos animais já foram utilizados: macacos (CARVALHO *et al.*, 2003), coelhos (FIGUEIREDO *et al.*, 1985) cães (DE LANA *et al.*, 1992), ratos (GUARITA-SOUZA *et al.*, 2006) e camundongos (CHANDRA *et al.*, 2002; JELICKS *et al.*, 2002). Os modelos em pequenos roedores têm sido preferidos pela redução da necessidade de espaço de

alojamento e experimentação e de recursos financeiros. Entretanto, alguns estudos mostraram que o camundongo pode não reproduzir de forma fidedigna as fases evolutivas da CCC, pois exibe alterações inflamatórias muito intensas na fase aguda evoluindo indistintamente para fases sub-aguda e crônica sem exibir uma fase de latência entre elas (MELLO *et al.*, 1979). Por sua vez, o rato exibe intensas alterações miocárdicas na fase aguda, mas, frequentemente falha em desenvolver a fase crônica da cardiopatia (ZELEDON *et al.*, 1988).

Dessa forma, o modelo de CCC no hamster parece reunir vantagens pelas semelhanças observadas com a doença em humanos como: miocardite detectável na fase aguda seguida de uma fase de quiescência (equivalente à fase indeterminada da doença) e consistente progressão da disfunção ventricular esquerda na fase crônica culminando em insuficiência cardíaca com alterações histopatológicas importantes (RAMIREZ *et al.*, 1994; BILATE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2016; TANAKA *et al.*, 2018).

Vale ainda ressaltar que no nosso estudo não foi identificada a presença de parasitas no tecido miocárdico na fase crônica da doença, mediante emprego de análise histológica convencional com coloração de hematoxilina e eosina. Esses dados corroboram os resultados de estudos anteriores no hospedeiro cronicamente infectado com *T. cruzi* que geralmente evidenciam infiltrados de células inflamatórias, que podem vir acompanhadas de fibrose, mas pouco ou nenhum parasita nos sítios de intensa inflamação (TARLETON; ZHANG, 1999; BILATE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2016; TANAKA *et al.*, 2018a).

De fato, desde 1909, nos estudos primordiais de Carlos Chagas, foi observado que na fase crônica da moléstia a inflamação que se observava não era acompanhada de proporcional presença de parasitas (CHAGAS, 1909; 1916).

Entretanto, técnicas mais sensíveis para a detecção do parasita ou do seu DNA, como a imunohistoquímica ou a bioluminescência, são capazes de detectar *T. cruzi* nos focos inflamatórios e no tecido miocárdico demonstrando que a lesão miocárdica também decorre da agressão direta do parasita com baixa intensidade, mas de forma incessante (HIGUCHI *et al.*, 1993; GUTIERREZ *et al.*, 2009; LEWIS *et al.*, 2014; SILBERSTEIN *et al.*, 2018). No nosso estudo essas técnicas não foram empregadas, de forma que não foi possível contribuir para maior esclarecimento sobre esses aspectos no modelo de hamster.

5.3. Disfunção ventricular esquerda

Avaliamos neste estudo a evolução temporal de diversas características morfológias e funcionais da cardiomiopatia chagásica no modelo de hamsters. Para isso, empregamos técnicas de imagens não invasivas de alta resolução espacial de forma sequencial desde a fase sub-aguda da doença até o nítido declínio tardio da função cardíaca em parcela significativa dos animais infectados.

Nas últimas décadas, métodos de imagens avaliando parâmetros da função e estrutura cardíaca *in vivo* têm sido amplamente utilizados para estudar mecanismos de disfunção ventricular em diferentes modelos de doenças cardíacas (CROTEAU *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DESROIS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Esses métodos permitem o estudo longitudinal dos animais, aumentando o poder estatístico e reduzindo os custos dos estudos. Em muitos modelos de cardiopatias, a função sistólica do VE é o parâmetro mais utilizado para acompanhar a progressão da doença ou o impacto de intervenções farmacológicas (FRANKEN *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Dentre as diversas técnicas utilizadas, o ecocardiograma tem sido o método de escolha para avaliar a função sistólica ventricular em ensaios clínicos e em estudos em pequenos animais devido a seu baixo custo, rápida aquisição e ampla disponibilidade. A ecocardiografia tem auxiliado o entendimento de fisiopatogênese da doença de Chagas tanto em estudos clínicos (ACQUATELLA, 2007) quanto em vários modelos experimentais (JELICKS *et al.*, 2002; GUARITA-SOUZA *et al.*, 2006) especialmente em hamsters (BILATE *et al.*, 2007; PIMENTEL *et al.*, 2012).

No nosso estudo, utilizando a ecocardiografia para avaliação sequencial da função e morfologia do VE, observamos uma queda da FEVE, porém não significativa na análise de variância com efeito misto (*p* da interação grupos#tempo = 0,06), dos animais infectados quando comparados ao grupo controle. Entretanto, foi observada diferença significativa na interação entre os grupos a partir do oitavo mês de infecção. A diferença na análise mista pode não ter sido observada pelo fato de que somente 36% dos animais cronicamente infectados apresentaram redução significativa da FEVE com importante alteração da morfologia do VE ao final do estudo quando comparados aos animais controles. No entanto, a redução da FEVE nesse subgrupo de animais que desenvolveu disfunção miocárdica foi

significativa a partir de 8 meses de infecção, seguida de importante piora no décimo mês, quando comparados aos animais controles ou animais infectados em disfunção ventricular.

Esses resultados corroboram os achados de Bilate et al (2003), que mediante estudo ecocardiográfico longitudinal em hamster cronicamente infectados com a mesma quantidade de *T. cruzi*, observaram porcentagem semelhante (28%) de animais com disfunção sistólica grave aos 8 meses pós-infecção com piora importante aos 12 meses (BILATE *et al.*, 2003). Oliveira et al (2016), estudando hamsters cronicamente infectados com *T. cruzi* aos 6 e 10 meses após a infecção, observaram que 29% dos animais apresentavam queda significativa da FEVE. Quando comparados aos animais com 6 meses de infecção, os animais com 10 meses de infecção apresentavam menor FEVE e maiores diâmetros sistólicos e diastólicos do VE (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Da mesma forma, Tanaka et al (2018) observaram no mesmo modelo de CCC que os animais infectados apresentavam valores de função sistólica e morfologia do VE aos 6 meses pós-infecção comparáveis aos respectivos animais controles. Além disso, neste estudo foi observada subsequente queda da FEVE no sétimo mês pós-infecção nos animais infectados que não foi observada nos animais controles (TANAKA *et al.*, 2018).

Esses dados reforçam a noção que o modelo de CCC no hamster apresenta muitas das características peculiares observadas na doença em humanos como uma fase de quiescência clínica após a fase aguda e prevalência semelhante de acometimento cardíaco com redução da função sistólica e dilatação do VE (ACQUATELLA *et al.*, 1980) de caráter progressivo na fase crônica da doença (HISS *et al.*, 2009). Vale salientar que a redução da função sistólica do VE é o mais consistente preditor independente de mortalidade na cardiomiopatia chagásica crônica em humanos (MADY *et al.*, 1994; RASSI *et al.*, 2007; BIOLO *et al.*, 2010).

Observamos que a FEVE não se correlacionou com a intensidade de inflamação. Por outro lado, foi observada correlação significativa do DSVE e do DDVE com a intensidade de inflamação. No entanto, a função sistólica assim como os diâmetros sistólico e diastólico do VE correlacionaram-se de forma mais importante com a extensão de fibrose. No conjunto esses resultados sugerem que a análise tecidual dos animais estudados tenha sido realizada em uma fase tardia de evolução da doença em que o componente de agressão inflamatória já tenha ultrapassado o momento de sua máxima intensidade e agora mostre-se menos saliente do que a fibrose reparativa que se torna mais intensa nessa fase da cardiopatia.

Nossos achados assemelham-se a estudos prévios em hamsters infectados com *T. cruzi* onde foi evidenciado o desenvolvimento de cardiopatia crônica com miocardite multifocal e fibrose, levando à dilatação ventricular esquerda em grande parte dos animais estudados

(RAMIREZ *et al.*, 1994; BILATE *et al.*, 2003). Demonstramos em estudo anterior no mesmo modelo que em estágios mais precoces do envolvimento miocárdico (6 meses após infecção) a função sistólica se correlaciona também com a extensão da fibrose, porém se correlaciona melhor e de forma independente com a intensidade de inflamação miocárdica (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Foi observada em todos esses estudos, assim como observado aqui, uma correlação significativa entre a intensidade de inflamação e a extensão de fibrose. Esses dados sugerem que o infiltrado inflamatório deve contribuir para o progressivo dano tecidual cardíaco desencadeando um remodelamento estrutural das fibras miocárdicas (COLMANETTI *et al.*, 2005) que culmina em extensa fibrose reparativa e consequente disfunção ventricular nas fases mais tardias.

Estes dados demonstram a ocorrência de uma cardiomiopatia dilatada semelhante ao descrito em pacientes chagásicos (PALACIOS-PRU *et al.*, 1989). Estudos clínicos mostram os mesmos achados vistos aqui, de que a presença de inflamação e fibrose correlaciona-se com a gravidade de disfunção ventricular esquerda. Através de um estudo com biópsia endomiocárdica em pacientes chagásicos em estágios diferentes da evolução da doença, Higuchi et al (1987), demonstraram que a intensidade de inflamação estava diretamente associada à gravidade da doença e que pacientes com IC apresentavam alta incidência de miocardite ativa (HIGUCHI *et al.*, 1987). Além disso, Mady et al (1999) observaram uma correlação significativa da gravidade da disfunção do VE com o grau de deposição de colágeno intersticial no miocárdio de pacientes com CCC (MADY *et al.*, 1999).

5.4. Perfusão miocárdica

Além de avaliar o curso natural da disfunção sistólica do VE mediante emprego da ecocardiografia, estudamos a perfusão miocárdica com o objetivo central de detectar presença de distúrbios de perfusão miocárdica e correlacionar sua evolução com o desenvolvimento da disfunção sistólica e ulterior lesão tecidual no modelo de CCC no hamster. Para isso, utilizamos um sistema de SPECT de alta resolução localmente desenvolvido que permite a avaliação acurada da perfusão miocárdica com ^{99m}Tc-Sestamibi.

Dessa forma, documentamos que defeitos perfusionais graves em repouso ocorrem em frequência e topografia comparável ao que se tem observado em modelo experimental de

CCC em hamsters e em pacientes chagásicos. A extensão desses defeitos apresentou correlação significativa com as alterações da morfologia e da função sistólica do VE indicando um mecanismo fisiopatológico subjacente e não artefatos meramente relacionados ao método de imagem.

5.5. Artefatos de atenuação e/ou captação

Um problema comum dos sistemas de imagens cintilográficas baseados em detecção de fótons singulares, como SPECT, é a ocorrência de artefatos de movimentação ou em consequência da atenuação da emissão de fótons que são absorvidos por partes moles (diafragma, mama, musculatura) podendo gerar falsos defeitos perfusionais em repouso (FRICKE et al., 2004). Entretanto, vários argumentos podem ser levantados para indicar que artefatos de atenuação não foram os responsáveis pelos defeitos perfusionais em repouso encontrados no nosso estudo. Inicialmente, as imagens obtidas em nosso estudo apresentaram boa relação órgão alvo/fundo com perfeita visualização dos limites das paredes e da cavidade do ventrículo esquerdo. Demonstramos em estudos prévios, utilizando o mesmo sistema de imagens (mini-SPECT), que defeitos de atenuação não foram capazes de promover defeitos com captação miocárdica abaixo de 50% (defeito grave) em relação ao pixel de máximo acúmulo em animais controles e que o sistema foi bastante acurado para quantificação da extensão da fibrose miocárdica em um modelo de infarto miocárdico experimental em ratos (OLIVEIRA, et al., 2013; DE MORAIS SDEL et al., 2015). Adicionalmente, as imagens dos animais controles não exibiram defeitos perfusionais extensos, apresentando distribuição uniforme do radiotraçador entre os diferentes seguimentos miocárdicos com leve redução de captação no ápice do VE. Essa leve redução de captação no ápice do coração pode estar relacionada a artefatos de movimentação devido a falta de sincronização das imagens com o eletrocardiograma. Em estudo independente realizado no nosso laboratório (dados não publicados), demonstramos que a movimentação do coração, especialmente o encurtamento do eixo longo do coração levaria a um artefato de movimentação em hamsters (Figura 29) e que algoritmos de correção para movimentação devem ser implementados no software de reconstrução das imagens. No entanto, os defeitos de perfusão em animais controles em nosso estudo não ultrapassaram 5% a área do VE. Além disso, a análise qualitativa visual, onde as imagens dos animais infectados são comparadas pixel a pixel com o banco de dados de normalidade dos animais controles, continuaram evidenciando defeitos perfusionais no ápice do VE em animais infectados sugerindo redução de captação ainda mais grave nos animais infectados nesses segmentos.

Outro fator que fala contra a interpretação de que os defeitos perfusionais encontrados possam se dever a artefatos é que evolutivamente os defeitos perfusionais foram observados nos mesmos segmentos do VE na imagens sequenciais. Além disso, foi observada significativa correlação entre os defeitos de perfusão e a intensidade de inflamação e extensão de fibrose. Essa correlação entre DPM e alterações histopatológicas teciduais já haviam sido descritas por nosso grupo nesse mesmo modelo de CCC em hamsters (OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

Dessa forma, consideramos que os defeitos de perfusão encontrados não eram artefactuais, mas correspondiam à alterações funcionais e tissulares reais e significativas.



Figura 29 - Imagem de Gated-SPECT de perfusão miocárdica demonstrando encurtamento do eixo longo do coração. Uma marca fiducial foi colocada no ápice do VE na diástole final (gate 7). Pode-se observar que a marca sai do VE durante a sístole final (gate 2). Isso levaria a artefatos de movimentação nas imagens.

5.6. Defeitos perfusionais se correlacionam com disfunção sistólica

Observamos na última janela temporal do estudo que 55% dos animais infectados apresentavam defeitos perfusionais significativos que se correlacionaram com a redução da função sistólica e com o aumento dos diâmetros sistólicos e diastólicos do VE. Além disso, a

DISCUSSÃO | 93

topografia de acometimento dos distúrbios de perfusão foi preferencialmente em segmentos apicais e de paredes anteriores e anterolaterais.

Esses dados estão de acordo com trabalhos prévios de nosso grupo, no mesmo no mesmo modelo de CCC em hamsters (OLIVEIRA *et al.*, 2018a; TANAKA *et al.*, 2018). Tanaka et al (2018) obsevaram que 52% dos animais investigados na fase crônica da doença (6 meses pós-infecção) apresentavam redução significativa da perfusão miocárdica e que os defeitos acometiam preferencialmente os segmentos apicais. No estudo de Oliveira et al (2018), 50% dos animais estudados na fase crônica da doença (6 ou 10 meses de infecção) exibiam defeitos perfusionais topograficamente correlacionados com alterações da mobilidade parietal segmentar e global, e que envolviam segmentos apicais e paredes anteriores e anterolaterais. No conjunto, esses dados indicam uma associação entre as alterações da perfusão miocárdica e a disfunção sistólica na CCC, corroborando achados de estudos clínicos (MARIN-NETO *et al.*, 1992; SIMOES *et al.*, 2000).

Várias evidências clínicas sugerem que a isquemia miocárdica microvascular participe dos mecanismos determinantes de várias manifestações clínicas na CCC. A dor torácica é uma queixa relativamente comum ocorrendo em 20 a 30% dos pacientes chagásicos (MARIN-NETO *et al.*, 2007). Adicionalmente, alterações eletrocardiográficas do segmento ST e zonas elétricas inativas podem estar presentes em pacientes chagásicos mimetizando a doença isquêmica cardíaca (FEIT *et al.*, 1983; SIMOES *et al.*, 1993). Entretanto, invariavelmente, esses pacientes apresentam coronárias epicárdicas normais ao estudo de cinecoronariografia (SIMOES *et al.*, 1995; PUNUKOLLU *et al.*, 2007). Mesmo em pacientes com a doença de Chagas com coronárias epicárdicas normais, vários estudos têm evidenciado distúrbios perfusionais, compatíveis com isquemia miocárdica, associados à disfunção sistólica (HAGAR; RAHIMTOOLA, 1991; MARIN-NETO *et al.*, 1992), reforçando a noção de que o acometimento da microcirculação exerça papel na gênese dessas manifestações.

Simões et al. (2000), estudando 37 pacientes chagásicos com diferentes níveis de disfunção miocárdica, identificaram defeitos regionais de miocárdica (fixos, reversíveis e paradoxais) em uma frequência um pouco maior do que o observado em hamsters (78% dos pacientes). Defeitos perfusionais reversíveis estiveram presentes em 46% dos pacientes, na vigência de coronárias angiograficamente normais, portanto, associadas à disfunção microvascular coronária (SIMOES *et al.*, 2000).

Assim como o trabalho supracitado, em um trabalho mais recente, onde foram estudados 40 pacientes na fase indeterminada da doença, defeitos de perfusão miocárdica identificados pelo *gated*-SPECT com ^{99m}Tc-Sestamibi, correlacionaram-se topograficamente

com alterações segmentares de mobilidade parietal identificadas pelo Doppler tecidual (PEIX *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores associaram essas alterações a alterações dos mecanismos regulatórios do fluxo coronariano em nível da microcirculação. A regulação anormal do fluxo compatível com disfunção endotelial e respostas anormais ao estímulo de hiperventilação foram descritas em pacientes com doença de Chagas (TORRES *et al.*, 1995; SIMOES *et al.*, 1998).

Mais recentemente, Rabelo et al. (2014), estudaram pacientes chagásicos na fase indeterminada da doença em comparação com indivíduos controles saudáveis, mediante a avaliação da Reserva de Fluxo Coronariano (RFC) utilizando-se Eco-Doppler de estresse. Demonstrou-se que a sorologia positiva para a doença de Chagas foi fator associado de forma independente à redução da RFC (RABELO *et al.*, 2014). Esses resultados confirmam os achados dos estudos anteriores indicando a presença de distúrbios de perfusão miocárdica por disfunção da microcirculação coronária, caracterizada por capacidade reduzida da microcirculação em responder com aumento adequado do fluxo coronariano frente a estímulo de vasodilação (TORRES *et al.*, 1995).

5.7. Defeitos de perfusão precedem a disfunção sistólica e a lesão tecidual do VE

Além da participação na gênese dos sintomas anginosos, outros estudos em humanos sugerem também que a isquemia microvascular coronária possa participar do mecanismo que determina o aparecimento da disfunção miocárdica na fase crônica da doença. Portanto, é bastante plausível a hipótese de que a disfunção microvascular coronariana possa ocupar um lugar importante na fisiopatologia da CCC. Neste sentido, considerando que um estudo clínico que contribuísse de forma esclarecedora sobre esse mecanismo encontra virtual impedimento devido ao longo tempo de seguimento (20 a 30 anos), estudos experimentais usando imagens sequenciais *in vivo* poderiam contribuir significativamente para o entendimento deste aspecto fisiopatológico.

Em nosso estudo sequencial avaliando a perfusão miocárdica no modelo de CCC em hamsters, defeitos perfusionais ocorreram mais precocemente e se correlacionaram com o

desenvolvimento da disfunção sistólica e das alterações da morfologia do VE nas fases mais tardias. Além disso, defeitos perfusionais evidenciados aos 6 meses de infecção, janela temporal onde os defeitos tornaram-se significativamente maiores em relação aos controles, correlacionaram-se com a subsequente queda da função sistólica do VE. Foi observada ainda correlação significativa da extensão fibrose miocárdica observada no final do estudo com os DPM observados precocemente na evolução do envolvimento da perfusão miocárdica. No conjunto esses dados reforçam a noção de que os defeitos perfusionais precedem e se correlacionam com a ulterior deterioração da disfunção sistólica e com a lesão tecidual irreversível do VE na CCC experimental.

Esses dados corroboram os resultados anteriormente observados em estudos experimentais e clínicos de nosso grupo de pesquisa. Oliveira et al. (2018) observaram maior extensão de defeitos perfusionais do VE em animais infectados aos 10 meses quando comparados a animais estudados aos 6 meses pós-infecção. Da mesma forma, os animais com maior tempo evolutivo da doença apresentavam menores valores de FEVE, sugerindo que a isquemia miocárdica pode contribuir para o declínio da função sistólica do VE. Tanaka et al. (2018), em estudo da perfusão e da função miocárdica no modelo de CCC em hamsters, evidenciaram que 52% dos animais infectados apresentavam DPM em repouso, mas com valores de FEVE comparáveis aos animais do grupo controle quando estudados no sexto mês pós-infecção. Foi obervada queda significativa da função sistólica no grupo de animais infectados aos 7 meses de infecção, o que não foi observado nos animais controles.

No cenário clínico, um estudo conduzido em nossa instituição, Hiss et al (2009) investigaram retrospectivamente 36 pacientes chagásicos, em seguimento longitudinal por um período médio de 5,6 anos. Na avaliação basal, defeitos perfusionais em repouso estavam presentes em 27 pacientes (75%). A proporção de segmentos acometidos aumentou de 16%, na condição inicial, para 25,8% na reavaliação desses indivíduos. Houve associação topográfica entre defeitos perfusionais e alterações regionais de mobilidade parietal. Além disso, na reavaliação foi vista uma alta frequência de defeitos perfusionais em repouso que haviam apresentado comportamento reversível (isquêmico) na avaliação inicial, ou seja, dos 47 segmentos apresentando defeitos reversíveis, 32 (68%) progrediram para defeitos fixos em repouso e dos 469 segmentos normais no início do estudo, somente 41 (8,7%) tiveram o mesmo destino(p< 0,0001, Teste exato de Fischer). Além disso, o aumento individual do tamanho dos defeitos de perfusão em repouso se correlacionou com a queda da FEVE. Dessa forma, os autores sugeriram que a progressão da disfunção ventricular esquerda tanto segmentar quanto global correlacione-se com o agravamento da extensão dos defeitos de

perfusão em repouso. Os autores desse trabalho sugeriram que os resultados observados estariam indicando possivelmente o aumento das áreas de fibrose miocárdica topográfica e quantitativamente associadas à presença de isquemia miocárdica nas fases mais iniciais do seguimento desses pacientes. Vale ressaltar que a força dessas evidências indicando a participação da isquemia na gênese da disfunção miocárdica na CCC fica reduzida frente ao desenho retrospectivo daquele estudo.

5.8. Alterações histopatológicas subjacentes

A correlação topográfica entre defeitos de perfusão em repouso e fibrose miocárdica tem sido descrita em pacientes com cardiomiopatia dilatada através de estudos com biópsias ou investigações de autópsia (LI et al., 1996). O ^{99m}Tc-Sestamibi é um agente marcador de perfusão miocárdica que é sequestrado pelo cardiomiócito e se distribui proporcionalmente ao fluxo sanguíneo coronário regional (GIBBONS et al., 1989), dependendo também da extração celular, refletindo portanto a viabilidade miocárdica (BEANLANDS et al., 1990). Concordante com esses conceitos, estudos experimentais e clínicos têm utilizado imagens de SPECT com ^{99m}Tc-Sestamibi como ferramenta altamente precisa para detecção e quantificação da extensão de infarto agudo do miocárdio (CHRISTIAN et al., 1990; SANTORO et al., 1990; SINUSAS et al., 1990; FREEMAN et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2013). Um estudo avaliando a perfusão miocárdica em pacientes isquêmicos que foram submetidos a transplante cardíaco demonstrou que para a presença de defeitos graves de captação (<60% de captação em relação ao máximo), seria necessária uma extensão menor ou igual a 30% de miocárdio viável, portanto 70% de extensão de fibrose transmural, em dado segmento da parede ventricular esquerda (MEDRANO et al., 1996). Concordante com esses conceitos, vários autores que identificaram defeitos perfusionais em repouso em pacientes com CCC, interpretaram tais alterações como decorrentes de extensa necrose ou fibrose regional (MARIN-NETO et al., 1992; HISS et al., 2009).

Entretanto, no melhor do nosso conhecimento nenhum estudo clínico realizou correlação topográfica dos achados histopatológicos associados aos defeitos perfusionais *in vivo* na CCC.

Em nosso trabalho, o tamanho dos defeitos perfusionais se correlacionaram com a intensidade de inflamação e com a extensão de fibrose miocárdica intersticial e perivascular. Entretanto é importante salientar que não foram observadas regiões de fibrose transmural topograficamente correlacionadas a regiões desses defeitos perfusionais. Na análise regional, os segmentos apresentando hipocaptação grave de ^{99m}Tc-Sestamibi corresponderam a valores médios de 18% de fibrose. Portanto, os DPM graves observados foram interpretados como regiões de miocárdio viável com hipoperfusão em repouso.

Estes resultados corroboram dois trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa que investigaram as alterações histológicas subjacentes aos defeitos de perfusão miocárdica em hamsters infectados com *T. cruzi*.

No trabalho de Tanaka et al (2018), a análise histológica de animais chagásicos apresentando DPM aos 7 meses de infecção não evidenciou áreas transmurais ou coalescentes de fibrose na mesma topografia dos defeitos. Embora os animais infectados apresentassem maior extensão de fibrose intersticial e perivascular difusa quando comparados aos animais controles, o valor médio da extensão de fibrose foi muito discreto, em torno de somente 5%, mas ainda assim correspondendo a um amento em torno de duas vezes do valor observado nos animais controles. Mas, novamente, não se observaram áreas de fibrose miocárdica coalescente transmural nas regiões exibindo DPM. Por outro lado, foi observado neste estudo que animais infectados apresentavam aumento da intensidade de infiltrado de células inflamatórias mononucleadas em torno de 4,5 vezes da quantidade de células observadas nos animais controles (TANAKA *et al.*, 2018).

Oliveira et al (2018), estudando hamsters com 6 ou 10 meses de infecção, observaram que DPM se correlacionaram com a disfunção sistólica global e exibiam correlação topográfica com alterações da mobilidade parietal. Entretanto, apesar de serem observados em repouso, esses de defeitos perfusionais não correspondiam a regiões de fibrose transmural ou alterações estruturais da microcirculação. Os DPM se correlacionaram com a gravidade de inflamação sugerindo a presença de miocárdio viável hipoperfundido e metabolicamente alterado (OLIVEIRA *et al.*, 2018a). Vale ressaltar ainda que a extensão da fibrose observada em regiões com defeitos perfusionais atingiu valores médios de 10,5% sendo, portanto insuficientes para causarem magnitude significativa de redução de captação do radiotraçador detectado por métodos *in vivo*, utilizando-se imagens de SPECT (MEDRANO *et al.*, 1996).

Vale ressaltar aqui que os resultados da análise tecidual dos animais estudados em nosso trabalho mostram uma fase mais tardia de evolução da doença onde a fibrose reparativa tona-se mais saliente como consequência da agressão inflamatória.

5.9. Hipoperfusão e inflamação

Umas das características anatomopatológicas principais da lesão miocárdica da CCC é a necrose miocitolítica associada topograficamente a lesões vasculares, infiltrado inflamatório de células mononucleares e fibrose reparativa (TORRES, 1958; 1960; ROSSI, 1990). A necrose miocitolítica classicamente é interpretada como lesão celular por fenômenos hipóxicos e isquêmicos repetitivos e de baixa intensidade (ROSSI; RAMOS, 1996). Várias evidências derivadas de estudos necroscópicos (TORRES, 1960) e experimentais (ROSSI *et al.*, 1984; FACTOR *et al.*, 1985) suportam a hipótese de que anormalidades estruturais e funcionais da microcirculação associadas à inflamação ocorram na cardiomiopatia chagásica e que estas possam contribuir na fisiopatogenia da fibrose intersticial em consequência de dano hipóxico crônico (ROSSI, 1990; MARIN-NETO *et al.*, 2013).

No nosso trabalho, mediante adequada modulação do uso de substrato energético miocárdico, documentamos que defeitos perfusionais ocorrem em regiões de miocárdio viável. Além disso, essas mesmas regiões no estudo histológico demonstraram claramente ausência de necrose ou fibrose regional significativa suficientes para produzir uma redução detectável de captação do radiotraçador.

Esses resultados corroboram os resultados de trabalhos prévios no mesmo modelo animal onde regiões de defeito perfusional grave em repouso, topograficamente associadas a alterações da mobilidade parietal, correspondiam histologicamente a áreas de miocárdio estruturalmente preservado, porém inflamado (OLIVEIRA *et al.*, 2018a). Além disso, esses defeitos perfusionais apresentaram melhora significativa após tratamento com dipiridamol, agente antiagregante plaquetário e vasodilatador da microcirculação coronariana (TANAKA *et al.*, 2018), reforçando a noção da presença de miocárdio vivo e hipoperfundido nessas regiões de DPM.

Portanto, é plausível considerar que, no presente estudo, os defeitos perfusionais detectados em repouso nas áreas miocárdicas plenamente viáveis, como demonstradas pelas imagens positrônicas e pela histopatologia, correspondam a regiões de hipoperfusão miocárdica. Dessa forma, esta situação é semelhante àquela vista em pacientes com síndrome coronariana aguda que recebem a injeção do radiotraçador na vigência da dor precordial e demonstram defeitos perfusionais em repouso em regiões supridas por artérias coronárias

DISCUSSÃO | 99

transitoriamente obstruídas, ainda passíveis de recuperação funcional após tratamento de reperfusão/revascularização (SANTORO *et al.*, 1990; JAVADI *et al.*, 2011).

Uma vez que não encontramos relatos na literatura que demonstrem a ocorrência de espasmo de vasos arteriais coronários epicárdicos em hamsters, que poderiam levar à hipoperfusão miocárdica em repouso é plausível supor que os distúrbios de perfusão miocárdica regional em repouso nesse modelo ocorram em consequência de disfunção microvascular coronária.

Vários mecanismos envolvendo alterações estruturais ou funcionais da microcirculação coronária podem ser aventados para explicar a presença dessa disfunção microvascular coronária na CCC. Dentre as alterações estruturais destacam-se a proliferação de camada íntima e obstrução luminal (TORRES, 1958), formação de plugs plaquetários (ROSSI *et al.*, 1984), espasmos arteriolar (TANOWITZ *et al.*, 1996), vasodilatação grave da microcirculação (HIGUCHI *et al.* 1998) e rarefação vascular (JORG, 1974; FERREIRA *et al.*, 1980).

No nosso estudo, técnicas endereçadas à análise estrutural da microcirculação não foram empregadas de forma que não foi possível contribuir para maior esclarecimento sobre esses aspectos no modelo de hamster.

Entretanto, trabalho recente do nosso grupo falhou em mostrar redução da densidade dos vasos intramurais de fino calibre em áreas de DPM neste mesmo modelo de CCC no hamster (OLIVEIRA *et al.*, 2018a). A ausência dessas alterações estruturais na microcirculação coronariana indiretamente suporta a hipótese alternativa de que alterações funcionais no controle do fluxo sanguíneo miocárdico associadas ao infiltrado inflamatório na vizinhança da microcirculação seja o mecanismo predominante para presença dos DPM neste modelo de CCC (OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

No mesmo sentido, resultados da presente investigação, utilizando imagens positrônicas com ¹⁸F-FDG em miocárdio metabolicamente suprimido para captação de glicose, mostram relevante associação topográfica dos distúrbios de perfusão miocárdica com alterações inflamatórias que foram confirmadas no estudo histológico. Esses achados sugerem fortemente que o distúrbio perfusional ocorra por alterações funcionais do controle do fluxo sanguíneo a nível microvascular secundárias ao próprio processo inflamatório. Contudo não é possível descartar uma relação causal inversa, com a possibilidade de que alterações vasculares primárias possam causar isquemia miocárdica e induzir alterações inflamatórias secundárias. De fato, nossos resultados não nos permite estabelecer de forma clara a relação de causa e efeito entre as alterações perfusionais e as inflamatórias.

Apesar dessas considerações, levando em conta o fato de que a CCC é fundamentalmente fruto de uma processo de miocardite crônica de baixa intensidade, é mais plausível que as alterações perfusionais surjam em consequência à inflamação e não o contrário.

Os resultados apresentados aqui corroboram, em parte, trabalho anterior demonstrando captação elevada de ¹⁸F-FDG no miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi* quando comparados aos animais controles. Prado et al (2009) sugeriram que o aumento de captação de ¹⁸F-FDG possa ter ocorrido como consequência da difusa e intensa inflamação miocárdica e fibrose reparativa na fase crônica da infecção (PRADO *et al.*, 2009). Entretanto, as imagens adquiridas neste estudo foram realizadas com os animais anestesiados com isoflurano. Thackeray et al (2015) demonstraram recentemente que a aquisição de imagens positrônicas com ¹⁸F-FDG em camundongos anestesiados com isoflurano induz alta taxa de captação de glicose pelos cardiomiócitos, mascarando dessa forma a captação isolada de ¹⁸F-FDG pelas células inflamatórias em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio (THACKERAY *et al.*, 2015). Dessa forma, técnicas de supressão de captação de glicose pelos cardiomiócitos devem ser aplicadas para melhor visualização de atividade inflamatória ativa com o emprego de ¹⁸F-FDG PET.

Dois recentes relatos de casos provenientes dos EUA mostraram a detecção de inflamação miocárdica *in vivo* por meio de imagens positrônicas com ¹⁸F-FDG em pacientes chagásicos. No primeiro estudo, Salimy et al (2017) avaliaram um paciente proveniente do México apresentando episódios recorrentes de taquicardia ventricular sem histórico de doença arterial coronariana. Na avaliação ecocardiográfica foi observada hipocinesia difusa, discesia apical e presença de aneurisma apical do VE. Nas imagens positrônicas, utilizando Rubídio-82 (⁸²Rb), foram observados defeitos perfusionais fixos em paredes septal e lateral basal, assim como no ápice do VE. As imagens com ¹⁸F-FDG, mediante aplicação de protocolo adequado para supressão de captação de glicose pelos cardiomiócitos, documentaram elevada captação do radiotraçador parcialmente sobrepondo os seguimentos exibindo defeitos perfusionais, sugerindo inflamação miocárdica (SALIMY *et al.*, 2017).

Garg et al (2015) avaliaram um paciente proveniente de El Salvador com queixas de dispneia, pressão torácica aguda e elevação de troponina. Foi observado bloqueio de ramo direito e ectopias ventriculares no eletrocardiograma e na avaliação ecocardiográfica, além de redução importante da fração de ejeção (35%), documentou-se acinesia e aneurisma apical e de parede posterolateral basal. A cineangiocoronariografia documentou a ausência de lesão coronariana e a ressonância nuclear cardíaca documentou ainda realce tardio nos aneurismas

assim como realce tardio em diferentes graus em todas outras regiões do miocárdio, mas especialmente na parede lateral sugerindo processo inflamatório. Na avaliação de imagens positrônicas com amônia (¹³NH₃), foi observado defeito de perfusão miocárdica no ápice, parede inferolateral basal e na parede lateral. Mediante preparação adequada do metabolismo energético miocárdico, foi observado importante aumento de captação de ¹⁸F-FDG topograficamente correlacionados com defeitos perfusionais e, especialmente, captação mais intensa adjacente aos defeitos perfusionais e aos aneurismas do VE (GARG *et al.*, 2015).

No conjunto, esses dados corroboram as várias evidências derivadas de estudos clínicos (TORRES, 1960) e experimentais (ROSSI *et al.*, 1984; FACTOR *et al.*, 1985) que suportam a hipótese de que anormalidades estruturais e funcionais da microcirculação associadas à inflamação ocorram na cardiomiopatia chagásica e que estas possam contribuir para progressão da disfunção miocárdica.

Estudos prévios documentaram também defeitos perfusionais em miocardite ativa de outras etiologias. Sun et al (2003) evidenciaram hipoperfusão miocárdica em todos os pacientes investigados com miocardite viral por Coxsackie vírus. Foi observado ainda defeitos perfusionais grave em repouso em 28% dos pacientes sugerindo que a redução de captação de ^{99m}Tc-Sestamibi poderia ser um marcador de inflamação e necrose miocárdica (SUN *et al.*, 2003). Semelhantemente, 75% dos pacientes apresentando miocardite por Lúpus Eritematoso Sistêmico apresentaram defeitos de perfusão miocárdica fixos e reversíveis quando avaliados por SPECT com ^{99m}Tc-Sestamibi (SCHILLACI *et al.*, 1999).

Cabe salientar que um mecanismo alternativo relacionado à inflamação miocárdica pode levar a redução da captação ^{99m}Tc-Sestamibi pelo miocárdio. O acúmulo do ^{99m}Tc-Sestamibi no cardiomiócito é proporcional ao potencial elétrico celular. Como a membrana celular a nível mitocôndrial é eletogrativamente mais densa do que ao nível do sarcolema, aproximadamente 90% do radiofármaco se acumula na membrana interna da mitocôndria (CARVALHO *et al.*, 1992). Alterações do metabolismo celular que afetam os potenciais elétricos das membranas plasmática e mitocondrial podem afetar a cinética do ^{99m}Tc-Sestamibi (ARBAB *et al.*, 1998). Dessa forma, o acúmulo e a retenção do ^{99m}Tc-Sestamibi no miocárdio é altamente dependente da integridade funcional e estrutural da mitocôndria (HAYASHI *et al.*, 2013; MASUDA *et al.*, 2016).

A miocardite da CCC tem como característica histopatológica essencial o infiltrado de células mononucleares que são ativadas na fase aguda da infecção, mas que perpetuam sua atividade na fase crônica resultando na manutenção de uma resposta imune de perfil Th1 com produção local de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α por linfócito T e outras

células mononucleadas (REIS *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 1997; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , são potentes indutores da expressão de iNOS por cardiomiócitos. Esse aumento da expressão de NO em cardiomiócitos estimulados por citocinas inflamatórias está associado ao aumento do consumo de glicose com liberação de ácido lático (LUSS *et al.*, 1995) como consequência da inibição da respiração mitocondrial (GENG *et al.*, 1992). Dessa forma, a produção energética é essencialmente reduzida à glicólise anaeróbica resultando em depleção energética, disfunção eletrofisiológica e inibição da contratilidade miocárdica (TATSUMI *et al.*, 2000). Além disso, IFN- γ é capaz induzir profundas mudanças dos padrões de expressão gênica levando a hipertrofia dos cardiomiócitos (CUNHA-NETO *et al.*, 2005; COSPER *et al.*, 2012). Portanto, os defeitos de captação de ^{99m}Tc-Sestamibi poderiam refletir a presença de inflamação miocárdica mas não defeitos perfusionais reais.

Seguindo este conceito, um trabalho de nosso grupo, em parceira com o grupo do Prof. Frank Bengel (Alemanha), está investigando os efeitos da estimulação de citocinas próinflamatórias no acúmulo e na retenção do ^{99m}Tc-Sestamibi em cardiomiócitos e fibroblastos primários isolados. Além disso, este trabalho inclui a investigação da relação entre a taxa de *washout* do ^{99m}Tc-Sestamibi (avaliado pela diferença na captação global de ^{99m}Tc-Sestamibi entre uma imagem precoce e uma imagem tardia, ou seja, 30 e 90 minutos após a injeção do radiotraçador), defeitos perfusionais e o infiltrado de células mononucleadas no modelo de CCC em hamsters.

Até o momento, observamos que o estresse dos cardiomiócitos induzidos por IFN- γ diminui o acúmulo e aumenta a taxa de *washout* do ^{99m}Tc-Sestamibi, provavelmente refletindo disfunção mitocondrial. Esses achados sugerem que a captação e a retenção de ^{99m}Tc-Sestamibi pelos cardiomiócitos são particularmente sensíveis à inflamação (OLIVEIRA *et al.*, 2018b). No estudo com hamsters cronicamente infectados com *T. cruzi* estudados 8 meses após infecção, foi observado que a taxa de *washout* correlaciona-se com o tamanho do defeito de perfusão miocárdica e com a função sistólica do VE devido à inflamação miocárdica na CCC (dados não publicados).

Embora este estudo demonstre um valor adicional para a utilização da cinética do ^{99m}Tc-Sestamibi para detecção *in vivo* de disfunção mitocondrial causada por inflamação miocárdica na CCC, foi observado que os defeitos perfusionais foram consistentes nas imagens precoces e não aumentaram significativamente nas imagens tardias reforçando a noção de que o processo inflamatório está intimamente associado ao distúrbio perfusional contribuindo nas alterações funcionais do controle do fluxo sanguíneo a nível microvascular.

Portanto, os nossos achados reforçam fortemente a hipótese levantada em outras ocasiões de que a disfunção microvascular possa ser um marcador indireto da presença de inflamação na CCC (MARIN-NETO *et al.*, 2007). A figura 30, adaptada a partir de revisão publicada recentemente (MARIN-NETO *et al.*, 2013), ressalta o conjunto do modelo fisiopatológico da CCC com ênfase ao papel da disfunção e isquemia microvascular como consequência da inflamação na doença.



Figura 30 - Esquema dos principais mecanismos patogênicos na cardiomiopatia chagásica crônica utilizado por Marin-Neto et al. (2007).

Vale ressaltar ainda, para uma melhor compreensão da tradução dos resultados desta investigação experimental para o contexto clínico que, diferente do que acontece nos humanos em que a disfunção microvascular coronariana é documentada *in vivo* pela presença de defeito perfusional reversível durante estresse na vigência de artérias coronárias normais (CREA *et al.*, 2013), a presença de disfunção microvascular é indicada neste modelo experimental pelo

achado de defeito perfusional em repouso em regiões de miocárdio viável, confirmado pela histopatologia. Resta ainda mencionar o fato de que ao realizarmos aquisição de imagens apenas na condição de repouso, implica em desconsiderar a potencial presença de defeitos perfusionais reversíveis, subestimando-se dessa forma a magnitude dos distúrbios de perfusão presentes na CCC do hamster.

5.10. Limitações do estudo

A avaliação funcional e estrutural do ventrículo esquerdo foi realizada a partir de parâmetros clássicos como FEVE, DSVE e DDVE. Sabe-se que alterações segmentares da função sistólica, métodos mais acurados da avaliação da deformação miocárdica como o *speckle tracking* e avaliação da função sistólica do ventrículo direito podem detectar alterações mínimas que possuem valor na avaliação prognóstica da doença. Entretanto, a redução da FEVE é o mais consistente preditor independente de mortalidade na cardiomiopatia chagásica crônica.

Além disso, a avaliação da perfusão miocárdica utilizando imagens de SPECT são semiquantitativas, sendo que as regiões apresentando defeitos perfusionais podem corresponder a regiões mais gravemente hipoperfundidas quando comparadas a regiões sem DPM. Portanto, não podemos excluir a hipótese que áreas consideradas normais possam também apresentar redução da perfusão sanguínea se avaliadas por outras técnicas quantitativas como imagens positrônicas com amônia ¹³NH₃. Entretanto, regiões de heterogeneidade observadas nas imagens de SPECT indicam hipoperfusão mais significativas nas regiões acometidas. Além disso, o SPECT é a modalidade mais amplamente disponível e rotineiramente utilizada, suportando a tradução clínica dos presentes achados.

Outro ponto a ser mencionado foi o fato de termos realizado a avaliação da perfusão miocárdica utilizando somente imagens em repouso. Uma vez que não se incluiu neste estudo a investigação dos defeitos perfusionais durante estresse, o que que poderia permitir a eventual detecção de defeitos isquêmicos/reversíveis e paradoxais, é relevante considerar que devemos ter subestimado, a extensão dos defeitos perfusionais miocárdicos neste modelo de CCC.

DISCUSSÃO |105

5.11. Implicações dos resultados do presente estudo

A doença de Chagas ainda é sério problema de saúde pública, acometendo em torno de 6 a 7 milhões de pessoas o redor do mundo levando a alta morbidade e mortalidade (CUCUNUBA *et al.*, 2016). Embora a maioria dos indivíduos afetados nunca apresentem sintomas, aproximadamente 30% deles evolui com cardiomiopatia chagásica crônica que possui um amplo espectro de manifestações como cardiomiopatia dilatada com insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas, eventos tromboembólicos e morte súbita (MADY; NACRUTH, 1995).

Vários marcadores de risco foram identificados como a disfunção sistólica do VE, classe funcional III/V (NYHA), cardiomegalia e taquicardia ventricular (RASSI *et al.*, 2006) e apresentam resultados satisfatórios para estimar a chance de sobrevida dos pacientes portadores de CCC (RASSI *et al.*, 2007). Entretanto, esses marcadores de risco estão alterados somente em estágios mais avançados da doença. Dessa forma, considerando o longo tempo de evolução e a imprevisibilidade dos indivíduos que poderão evoluir com acometimento cardíaco grave, torna-se de grande interesse o desenvolvimento de exames diagnósticos que possam detectar alterações precoces envolvidas na fisiopatogenia da doença.

Dessa forma, os resultados reportados aqui suportam a hipótese de que defeitos perfusionais vistos na CCC estejam relacionados com a presença de inflamação miocárdica. Além disso, os defeitos de perfusão precedem e se correlacionam com a ulterior deterioração da função sistólica e da lesão tecidual. Esses resultados sugerem que defeitos de perfusão miocárdica possam ser um marcador substituto para a presença de inflamação, com potencial papel na monitorização e na estratificação de risco na CCC.

Adicionalmente, a detecção de defeitos de perfusão em repouso em regiões de miocárdio viável, porém inflamado, levanta a hipótese de que intervenções terapêuticas voltadas para redução da isquemia miocárdica possa impactar positivamente na evolução natural da doença.

Dessa forma, torna-se evidente que nosso resultado, ao evidenciar a detecção de defeitos perfusionais topograficamente associados à inflamação detectada *in vivo* com imagens positrônicas, fornece fundamentos para maiores estudos endereçados à detecção e monitorização da inflamação miocárdica em pacientes com CCC.

DISCUSSÃO |106

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster nos permitem concluir que:

1. A disfunção sistólica e alterações da morfologia do VE ocorrem tardiamente, após período de quiescência, com frequência semelhante ao observado em humanos com CCC e essas alterações se correlacionam com maior extensão de fibrose e intensidade de inflamação.

2. Defeitos perfusionais miocárdicos graves ocorrem com frequência e topografia semelhantes às que se tem observado em humanos chagásicos, em regiões de miocárdio viável e correlacionando-se com as alterações da morfologia e da função sistólica do VE.

3. Os distúrbios perfusionais precedem o desenvolvimento e se correlacionam com a ulterior deterioração da disfunção sistólica e da lesão tecidual do VE.

4. Regiões de defeitos perfusionais apresentam correlação topográfica com captação elevada de ¹⁸F-FDG sob efeito de ketamina/xilazina, demonstrando correlação topográfica entre inflamação e distúrbios da perfusão miocárdica neste modelo de CCC.

Referências bibliográficas
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. C.; KALIL, J.; CUNHA NETO, E. Molecular mimicry between cardiac myosin and Trypanosoma cruzi antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 11, p. 1305-8, Nov 1997. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=9532238 >.

ABRAHAMSOHN, I. A.; DA SILVA, A. P.; COFFMAN, R. L. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to Trypanosoma cruzi. **Infect Immun,** v. 68, n. 4, p. 1975-9, Apr 2000. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722591</u> >.

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124-31, Mar 6 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=17339570 >.

ACQUATELLA, H. et al. M-mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chages' heart disease. A clinical and pathologic study. **Circulation**, v. 62, n. 4, p. 787-99, Oct 1980. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation</u> <u>&list_uids=7408151</u> >.

ALIBERTI, J. C. et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during Trypanosoma cruzi infection. **Am J Pathol,** v. 158, n. 4, p. 1433-40, Apr 2001. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=11290561 >.

ALMEIDA-FILHO, O. C. et al. Minor segmental dyssynergy reflects extensive myocardial damage and global left ventricle dysfunction in chronic Chagas disease. **J Am Soc Echocardiogr,** v. 15, n. 6, p. 610-6, Jun 2002. ISSN 0894-7317 (Print) 0894-7317 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=12050602 >.

ALVAREZ, M. N. et al. Intraphagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-derived Cytotoxin against Internalized Trypanosoma cruzi. Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6627-6640, Feb 25 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287476400071 >.

ANDRADE, S. G. et al. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi, under specific chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 86, n. 2, p. 187-200, Apr-Jun 1991. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1842413 >.

ANDRADE, Z. A. Mechanisms of myocardial damage in Trypanosoma cruzi infection. **Ciba Found Symp,** v. 99, p. 214-33, 1983. ISSN 0300-5208 (Print) 0300-5208 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=6416769 >.

ANDRADE, Z. A. et al. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. **Am J Trop Med Hyg,** v. 57, n. 3, p. 328-36, Sep 1997. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=9311645 >.

ANEZ, N. et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am J Trop Med Hyg,** v. 60, n. 5, p. 726-32, May 1999. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=10344642 >.

ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from nonendemic countries. **Blood Transfus,** v. 13, n. 4, p. 540-50, Oct 2015. ISSN 1723-2007 (Print) 1723-2007 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=26513769 >.

ANTUNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental Trypanosoma cruzi infections. **Immunol Lett,** v. 71, n. 2, p. 103-9, Feb 1 2000. ISSN 0165-2478 (Print)

0165-2478 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714437</u> >.

_____. Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental Trypanosoma cruzi infections. **Immunol Lett,** v. 79, n. 3, p. 189-96, Dec 3 2001. ISSN 0165-2478 (Print) 0165-2478 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600197 >.

ARAUJO, F. F. et al. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 768-77, Aug 2012. ISSN 1878-3279 (Electronic)

0171-2985 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672991</u> >.

ARAUJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 5, n. 5, p. e992, 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655351</u> >.

ARBAB, A. S. et al. Technetium-99m-tetrofosmin, technetium-99m-MIBI and thallium-201 uptake in rat myocardial cells. **J Nucl Med,** v. 39, n. 2, p. 266-71, Feb 1998. ISSN 0161-5505 (Print)

0161-5505 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476934</u> >.

ARGUELLO, R. J. et al. Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 8, n. 8, p. e2989, Aug 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=25144227 >.

ASHTON, A. W. et al. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 929-40, Apr 16 2007. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=17420269 >.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol,** v. 177, n. 6, p. 3515-9, Sep 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951309</u> >.

BEANLANDS, R. S. et al. Are the kinetics of technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile affected by cell metabolism and viability? **Circulation**, v. 82, n. 5, p. 1802-14, Nov 1990. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2225377 >.

BELLOTTI, G. et al. In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. **Am Heart J,** v. 131, n. 2, p. 301-7, Feb 1996. ISSN 0002-8703 (Print)

0002-8703 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8579025 >.

BEN YOUNES-CHENNOUFI, A. et al. Persistence of Trypanosoma cruzi antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v. 82, n. 1, p. 77-83, 1988. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3140446 >.

BENGEL, F. M. et al. Cardiac positron emission tomography. **J Am Coll Cardiol,** v. 54, n. 1, p. 1-15, Jun 30 2009. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=19555834 >.

BENVENUTI, L. A. et al. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Ann Trop Med Parasitol,** v. 102, n. 6, p. 481-7, Sep 2008. ISSN 0003-4983 (Print) 0003-4983 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782487</u> >.

BERGERON, M.; OLIVIER, M. Trypanosoma cruzi-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 6271-80, Nov 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056557</u> >.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis,** v. 49, n. 5, p. e52-4, Sep 1 2009. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=19640226 >.

BILATE, A. M. et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes Infect,** v. 9, n. 9, p. 1104-13, Jul 2007. ISSN 1286-4579 (Print) 1286-4579 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=17644389 >.

BILATE, A. M. et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. **Microbes Infect,** v. 5, n. 12, p. 1116-24, Oct 2003. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=14554253 >.

BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSELL, N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years? **Prog Cardiovasc Dis,** v. 52, n. 4, p. 300-16, Jan-Feb 2010. ISSN 1873-1740 (Electronic)

0033-0620 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109600</u> >.

BOHME, J. et al. Epstein-Barr virus-induced gene 3 suppresses T helper type 1, type 17 and type 2 immune responses after Trypanosoma cruzi infection and inhibits parasite replication by interfering with alternative macrophage activation. **Immunology**, v. 147, n. 3, p. 338-48, Mar 2016. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26694585</u> >.

BORDA, E. S.; STERIN-BORDA, L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. **Int J Cardiol,** v. 54, n. 2, p. 149-56, May 1996. ISSN 0167-5273 (Print)

0167-5273 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8803679</u> >.

BORGES, D. C. et al. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental Trypanosoma cruzi infection. **Immunology**, v. 138, n. 2, p. 145-56, Feb 2013. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23113506</u> >.

CALDERON, J. et al. The receptor Slamf1 on the surface of myeloid lineage cells controls susceptibility to infection by Trypanosoma cruzi. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 7, p. e1002799, 2012. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22807679</u> >.

CAMICI, P. G.; PRASAD, S. K.; RIMOLDI, O. E. Stunning, hibernation, and assessment of myocardial viability. **Circulation**, v. 117, n. 1, p. 103-14, Jan 1 2008. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172050</u> >.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in Trypanosoma cruzi infection. **Pathog Dis,** v. 73, n. 9, p. ftv082, Dec 2015. ISSN 2049-632X (Electronic) 2049-632X (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26438729</u> >.

CARRASCO GUERRA, H. A. et al. Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. **Am Heart J,** v. 113, n. 3, p. 716-24, Mar 1987. ISSN 0002-8703 (Print) 0002-8703 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3825861 >.

CARVALHO, C. M. E. et al. Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (Macaca mulatta): Evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography, and radiology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 68, n. 6, p. 683-691, Jun 2003. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <Go to ISI>://000184075500014 >.

CARVALHO, P. A. et al. Subcellular distribution and analysis of technetium-99m-MIBI in isolated perfused rat hearts. **J Nucl Med**, v. 33, n. 8, p. 1516-22, Aug 1992. ISSN 0161-5505 (Print)

0161-5505 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1634944</u> >.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 1, p. 159-218, 1909. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <u>http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&nrm=iso</u> >.

CHAGAS, C. Processos patojenicos da tripanozomiase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 8, p. 5-36, 1916. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <u>http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-</u> <u>02761916000200002&nrm=iso</u> >.

CHANDRA, M. et al. Cardioprotective effects of verapamil on myocardial structure and function in a murine model of chronic Trypanosoma cruzi infection (Brazil Strain): an

echocardiographic study. **Int J Parasitol,** v. 32, n. 2, p. 207-15, Feb 2002. ISSN 0020-7519 (Print)

0020-7519 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=11812498 >.

CHAPADEIRO, E. et al. [Cardiac lesions in Wistar rats inoculated with various strains of Trypanosoma cruzi]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 21, n. 3, p. 95-103, Jul-Sep 1988. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3151135 >.

CHIRIBAO, M. L. et al. Early Trypanosoma cruzi infection reprograms human epithelial cells. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 439501, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812617</u> >.

CHRISTIAN, T. F. et al. Mismatch of left ventricular function and infarct size demonstrated by technetium-99m isonitrile imaging after reperfusion therapy for acute myocardial infarction: identification of myocardial stunning and hyperkinesia. **J Am Coll Cardiol**, v. 16, n. 7, p. 1632-8, Dec 1990. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2147706 >.

COLMANETTI, F. H. et al. Myocardiocyte ultrastructure and morphometrical analysis in hamsters experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Ultrastruct Pathol,** v. 29, n. 2, p. 139-47, Mar-Apr 2005. ISSN 0191-3123 (Print)

0191-3123 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16028670 >.

COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection. **J Biol Chem,** v. 280, n. 25, p. 24085-94, Jun 24 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=15843370 >.

CORDEIRO, F. D. et al. Anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. **Clin Diagn Lab Immunol,** v. 8, n. 1, p. 112-8, Jan 2001. ISSN 1071-412X (Print)

1071-412X (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139203</u> >.

COREY, A. B. et al. Transmission of Donor-Derived Trypanosoma cruzi and Subsequent Development of Chagas Disease in a Lung Transplant Recipient. **Case Rep Infect Dis,** v. 2017, p. 5381072, 2017. ISSN 2090-6625 (Print). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28912986</u> >.

COSPER, P. F.; HARVEY, P. A.; LEINWAND, L. A. Interferon-gamma causes cardiac myocyte atrophy via selective degradation of myosin heavy chain in a model of chronic myocarditis. **Am J Pathol,** v. 181, n. 6, p. 2038-46, Dec 2012. ISSN 1525-2191 (Electronic) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23058369</u> >.

COSSIO, P. M. et al. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. **Circulation**, v. 49, n. 1, p. 13-21, Jan 1974. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=4128626 >.

CREA, F.; CAMICI, P. G.; BAIREY MERZ, C. N. Coronary microvascular dysfunction: an update. **Eur Heart J**, Dec 23 2013. ISSN 1522-9645 (Electronic) 0195-668X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=24366916 >.

CROTEAU, E. et al. Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. **J Nucl Med,** v. 44, n. 10, p. 1655-61, Oct 2003. ISSN 0161-5505 (Print) 0161-5505 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=14530482 >.

CUCUNUBA, Z. M. et al. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasit Vectors,** v. 9, n. 1, p. 42, 2016. ISSN 1756-3305 (Electronic)

1756-3305 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=26813568 >.

CUERVO, H. et al. Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute Trypanosoma cruzi infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. **J Infect Dis,** v. 197, n. 12, p. 1772-82, Jun 15 2008. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473687</u> >.

CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, v. 39, n. 1, p. 41-54, Feb 2006. ISSN 0891-6934 (Print)

0891-6934 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16455581 >.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators Inflamm,** v. 2014, p. 683230, 2014. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=25210230 >. CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J Clin Invest**, v. 98, n. 8, p. 1709-12, Oct 15 1996. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8878420>.

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 92, n. 8, p. 3541-5, Apr 11 1995. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=7536937 >.

CUNHA-NETO, E. et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **Am J Pathol**, v. 167, n. 2, p. 305-13, Aug 2005. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16049318 >.

DE LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 87, n. 1, p. 59-71, Jan-Mar 1992. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1308556 >.

DE MORAIS SDEL, B. et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Heart Rate Variability and Baroreflex Sensitivity in Rats with Chronic Heart Failure. **Stem Cells Dev,** v. 24, n. 18, p. 2181-92, Sep 15 2015. ISSN 1557-8534 (Electronic) 1547-3287 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=26059001 >.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. The role of CCR5 in Chagas disease - a systematic review. **Infect Genet Evol,** v. 45, p. 132-137, Nov 2016. ISSN 1567-7257 (Electronic) 1567-1348 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27539514</u> >.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**, v. 174, n. 5, p. 1209-20, Nov 1 1991. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1940799</u> >.

DEMEURE, F. et al. A randomized trial on the optimization of 18F-FDG myocardial uptake suppression: implications for vulnerable coronary plaque imaging. **J Nucl Med,** v. 55, n. 10, p. 1629-35, Oct 2014. ISSN 1535-5667 (Electronic)

0161-5505 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082852</u> >.

DESROIS, M. et al. Effect of isoproterenol on myocardial perfusion, function, energy metabolism and nitric oxide pathway in the rat heart - a longitudinal MR study. **NMR Biomed,** v. 27, n. 5, p. 529-38, May 2014. ISSN 1099-1492 (Electronic) 0952-3480 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=24677605 >.

DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates Trypanosoma cruziinduced myocarditis during Chagas disease. **J Pathol**, v. 225, n. 4, p. 583-96, Dec 2011. ISSN 1096-9896 (Electronic)

0022-3417 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952987</u> >.

_____. P47phox-/- mice are compromised in expansion and activation of CD8+ T cells and susceptible to Trypanosoma cruzi infection. **PLoS Pathog,** v. 10, n. 12, p. e1004516, Dec 2014. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25474113</u> >.

DHIMAN, M. et al. Cardiac-oxidized antigens are targets of immune recognition by antibodies and potential molecular determinants in chagas disease pathogenesis. **PLoS One,** v. 7, n. 1, p. e28449, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238578</u> >.

DI CARLI, M. F. et al. Value of metabolic imaging with positron emission tomography for evaluating prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction. **Am J Cardiol,** v. 73, n. 8, p. 527-33, Mar 15 1994. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147295</u> >.

DIAS, L. et al. Trypanosoma cruzi tryparedoxin II interacts with different peroxiredoxins under physiological and oxidative stress conditions. **Exp Parasitol**, v. 184, p. 1-10, Jan 2018. ISSN 1090-2449 (Electronic)

0014-4894 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29162347</u> >.

DIAS, W. B. et al. Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from Trypanosoma cruzi. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 88-99, Jan 2008. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17672865</u> >.

DIVEU, C. et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. **J Immunol**, v. 182, n. 9, p. 5748-56, May 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380822</u> >.

FACTOR, S. M. et al. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg,** v. 34, n. 2, p. 246-53, Mar 1985. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3985268 >.

FEARON, M. A. et al. A case of vertical transmission of Chagas disease contracted via blood transfusion in Canada. **Can J Infect Dis Med Microbiol,** v. 24, n. 1, p. 32-4, Spring 2013. ISSN 1712-9532 (Print)

1712-9532 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421790</u> >.

FEIT, A.; EL-SHERIF, N.; KOROSTOFF, S. Chagas' disease masquerading as coronary artery disease. **Arch Intern Med,** v. 143, n. 1, p. 144-5, Jan 1983. ISSN 0003-9926 (Print) 0003-9926 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=6849594 >.

FERREIRA, C. S. et al. Post-mortem coronary angiography in chronic Chagas carditis, Anatomo-radiologic correlation. **Arq Bras Cardiol**, v. 34, n. 2, p. 81-6, Feb 1980. ISSN 0066-782X (Print)

0066-782X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=6773509 >.

FERREIRA, L. R. et al. Interferon-gamma and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World J Cardiol,** v. 6, n. 8, p. 782-90, Aug 26 2014. ISSN 1949-8462 (Electronic). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=25228957</u> >.

FIGUEIREDO, F.; ROSSI, M. A.; SANTOS, R. R. Evolução da cardiopatia experimentalmente induzida em coelhos infectados com Trypanosoma cruzi. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical,** v. 18, p. 133-141, 1985. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <u>http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-</u> <u>86821985000300003&nrm=iso</u> >.

FRANCO, M. F. D. Cardite experimental do cobaio pela cepa y do Trypanosoma cruzi: correlação entre a histopatologia e a presença de antígenos parasitários identificados por imunofluorescência indireta. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical,** v. 23, p. 187-189, 1990. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <u>http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-</u> 86821990000300013&nrm=iso >.

FRANKEN, N. A. et al. Comparison of in vivo cardiac function with ex vivo cardiac performance of the rat heart after thoracic irradiation. **Br J Radiol,** v. 70, n. 838, p. 1004-9, Oct 1997. ISSN 0007-1285 (Print)

0007-1285 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=9404203 >.

FREEMAN, I. et al. Effect of coronary occlusion and myocardial viability on myocardial activity of technetium-99m-sestamibi. **J Nucl Med**, v. 32, n. 2, p. 292-8, Feb 1991. ISSN 0161-5505 (Print)

0161-5505 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1825111 >.

FRESNO, M.; GIRONES, N. Regulatory Lymphoid and Myeloid Cells Determine the Cardiac Immunopathogenesis of Trypanosoma cruzi Infection. **Front Microbiol,** v. 9, p. 351, 2018. ISSN 1664-302X (Print)

1664-302X (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29545782</u> >.

FRICKE, H. et al. A method to remove artifacts in attenuation-corrected myocardial perfusion SPECT Introduced by misalignment between emission scan and CT-derived attenuation maps. **J Nucl Med,** v. 45, n. 10, p. 1619-25, Oct 2004. ISSN 0161-5505 (Print) 0161-5505 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=15471824 >.

GARCIA, M. N. et al. Evidence of autochthonous Chagas disease in southeastern Texas. **Am J Trop Med Hyg,** v. 92, n. 2, p. 325-30, Feb 2015. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=25371187 >.

GARCIA, M. N. et al. Development of chagas cardiac manifestations among Texas blood donors. **Am J Cardiol**, v. 115, n. 1, p. 113-7, Jan 1 2015. ISSN 1879-1913 (Electronic) 0002-9149 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=25456877 >.

GARCIA, S. et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1521-8, Apr 2005. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=15793134 >.

GARG, G. et al. Cardiac F-FDG uptake in chagas disease. **J Nucl Cardiol**, Jun 30 2015. ISSN 1532-6551 (Electronic)

1071-3581 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=26122883 >.

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxidemediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol,** v. 22, n. 10, p. 2501-6, Oct 1992. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396957 >.

GAZZINELLI, R. T. et al. Direct lysis of Trypanosoma cruzi: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. **Parasite Immunol**, v. 13, n. 4, p. 345-56, Jul 1991. ISSN 0141-9838 (Print)

0141-9838 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717927</u> >.

GENG, Y.; HANSSON, G. K.; HOLME, E. Interferon-gamma and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. **Circ Res,** v. 71, n. 5, p. 1268-76, Nov 1992. ISSN 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1394884</u> >.

GIBBONS, R. J. et al. Feasibility of tomographic 99mTc-hexakis-2-methoxy-2methylpropyl-isonitrile imaging for the assessment of myocardial area at risk and the effect of treatment in acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 80, n. 5, p. 1277-86, Nov 1989. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2530004 >.

GIORDANENGO, L. et al. Anti-galectin-1 autoantibodies in human Trypanosoma cruzi infection: differential expression of this beta-galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. **Clin Exp Immunol,** v. 124, n. 2, p. 266-73, May 2001. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=11422204 >.

GOIN, J. C. et al. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. **J Auton Nerv Syst**, v. 47, n. 1-2, p. 45-52, Apr 1994. ISSN 0165-1838 (Print)

0165-1838 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8188983</u> >.

GOIN, J. C.; PEREZ LEIROS, C.; STERIN BORDA, L. [Identification of antibodies against cardiac muscarinic cholinergic receptors (CMCR) in blood from chagasic patients. Pathogenic implications]. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, v. 43, n. 3-4, p. 66-72, 1993. ISSN 0327-6309 (Print)

0327-6309 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7780185</u> >.

GOMES, J. A. et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7960-6, Dec 2005. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16299288 >.

GOMES, J. A. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1185-93, Mar 2003. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=12595431 >.

GOMEZ, P. C.; MANTILLA, H. J.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Fatal chagas disease among solid-organ transplant recipients in Colombia. **Open Forum Infect Dis,** v. 1, n. 1, p. ofu032, Mar 2014. ISSN 2328-8957 (Electronic)

2328-8957 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=25734103 >.

GUARITA-SOUZA, L. C. et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. **Circulation**, v. 114, n. 1 Suppl, p. I120-4, Jul 4 2006. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16820560 >.

GUTIERREZ, F. R. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunol,** v. 31, n. 11, p. 673-85, Nov 2009. ISSN 1365-3024 (Electronic) 0141-9838 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=19825107 >.

HAGAR, J. M.; RAHIMTOOLA, S. H. Chagas' heart disease in the United States. **N Engl J Med,** v. 325, n. 11, p. 763-8, Sep 12 1991. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1870649 >.

HALL, B. S. et al. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite Trypanosoma cruzi promotes resistance to intracellular infection. **Mol Biol Cell,** v. 11, n. 1, p. 153-60, Jan 2000. ISSN 1059-1524 (Print)

1059-1524 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637298</u> >.

HAYASHI, D. et al. Increased (99m)Tc-sestamibi washout reflects impaired myocardial contractile and relaxation reserve during dobutamine stress due to mitochondrial dysfunction in dilated cardiomyopathy patients. **J Am Coll Cardiol**, v. 61, n. 19, p. 2007-17, May 14 2013. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23501381</u> >.

HEINEMANN, C. et al. IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4+ T cells by inducing Blimp1. **Nat Commun**, v. 5, p. 3770, May 6 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796719</u> >.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clin Microbiol Rev,** v. 14, n. 4, p. 659-88, table of contents, Oct 2001. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=11585780 >.

HEYNDRICKX, G. R. et al. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. **J Clin Invest**, v. 56, n. 4, p. 978-85, Oct 1975. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1159098</u> >.

HIGUCHI, M. D. et al. Correlation between Trypanosoma-Cruzi Parasitism and Myocardial Inflammatory Infiltrate in Human Chronic Chagasic Myocarditis - Light-Microscopy and Immunohistochemical Findings. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101-106, Apr-Jun 1993. ISSN 1054-8807. Disponível em: < <Go to ISI>://A1993LL96000001 >.

HIGUCHI MDE, L. et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol,** v. 423, n. 3, p. 157-60, 1993. ISSN 0174-7398 (Print)

0174-7398 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=7901937 >.

HIGUCHI, M. L. et al. Severe arteriolar dilatation and ischemic lesions in chronic Chagas' cardiopathy: a 3D confocal laser microscopic study. **J Am Coll Cardiol**, v. 31, p. 382, 1998.

HIGUCHI, M. L. et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clin Cardiol,** v. 10, n. 11, p. 665-70, Nov 1987. ISSN 0160-9289 (Print)

0160-9289 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3677499 >.

HISS, F. C. et al. Changes in myocardial perfusion correlate with deterioration of left ventricular systolic function in chronic Chagas' cardiomyopathy. **JACC Cardiovasc Imaging,** v. 2, n. 2, p. 164-72, Feb 2009. ISSN 1876-7591 (Electronic). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=19356551</u> >.

HUANG, H. et al. Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine Chagasic myocarditis. **Infect Immun,** v. 71, n. 5, p. 2859-67, May 2003. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704159</u> >.

IWAI, L. K. et al. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between Trypanosoma cruzi B13 and cardiac myosin heavy chain. **J Autoimmun**, v. 24, n. 2, p. 111-7, Mar 2005. ISSN 0896-8411 (Print)

0896-8411 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=15829403 >.

JACKSON, Y. et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 4, n. 2, p. e592, 2010. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=20126397 >. JACKSON, Y. et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. **Emerg Infect Dis,** v. 15, n. 4, p. 601-3, Apr 2009. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19331743</u> >.

JAMAR, F. et al. EANM/SNMMI guideline for 18F-FDG use in inflammation and infection. **J Nucl Med,** v. 54, n. 4, p. 647-58, Apr 2013. ISSN 1535-5667 (Electronic) 0161-5505 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=23359660 >.

JAVADI, H. et al. Scintigraphic parameters with emphasis on perfusion appraisal in rest 99mTc-sestamibi SPECT in the recovery of myocardial function after thrombolytic therapy in patients with ST elevation myocardial infarction (STEMI). **Perfusion**, v. 26, n. 5, p. 394-9, Sep 2011. ISSN 1477-111X (Electronic)

0267-6591 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=21593086 >.

JELICKS, L. A. et al. Cardioprotective effects of phosphoramidon on myocardial structure and function in murine Chagas' disease. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 12, p. 1497-506, Nov 2002. ISSN 0020-7519 (Print)

0020-7519 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=12392915 >.

JONES, E. M. et al. Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 348-57, Mar 1993. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8470772 >.

JORG, M. E. Trypanosomiasis Cruzi (Chagas Disease) - Angiotopographic Anarchy Due to Mesenchymoreactive Decapillarisation - Pathogenic Cofactor of Chronic Myocardiopathy. **Prensa Medica Argentina,** v. 61, n. 3, p. 94-106, 1974. ISSN 0032-745X. Disponível em: < <Go to ISI>://A1974S797300003 >.

KNUUTI, J.; SCHELBERT, H. R.; BAX, J. J. The need for standardisation of cardiac FDG PET imaging in the evaluation of myocardial viability in patients with chronic ischaemic left ventricular dysfunction. **Eur J Nucl Med Mol Imaging,** v. 29, n. 9, p. 1257-66, Sep 2002. ISSN 1619-7070 (Print)

1619-7070 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=12192570 >.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, v. 6, p. 63-116, 1968. ISSN 0065-308X (Print)

0065-308X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list uids=4239747 >.

LEWIS, M. D. et al. Bioluminescence imaging of chronic Trypanosoma cruzi infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. Cell Microbiol, v. 16, n. 9, p. 1285-300, Sep 2014. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712539 >.

LI, L. X. et al. Comparative study of 201Tl-scintigraphic image and myocardial pathologic findings in patients with dilated cardiomyopathy. Ann Nucl Med, v. 10, n. 3, p. 307-14, Aug 1996. ISSN 0914-7187 (Print)

0914-7187 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation <u>&list_uids=8883706 >.</u>

LIU, J.; GUAN, X.; MA, X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. J Exp Med. v. 204, n. 1, p. 141-52, Jan 22 2007. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227910 >.

LOENING, A. M.; GAMBHIR, S. S. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. Mol Imaging, v. 2, n. 3, p. 131-7, Jul 2003. ISSN 1535-3508 (Print) 1535-3508 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation

&list_uids=14649056 >.

LOPES, E. R. et al. Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, v. 9, p. 269-282, 1975. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci arttext&pid=S0037-86821975000600001&nrm=iso >.

LOPEZ, M.; TANOWITZ, H. B.; GARG, N. J. Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. Curr Clin Microbiol Rep, v. 5, n. 1, p. 45-54, Mar 2018. ISSN 2196-5471 (Print) 2196-5471 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29868332 >.

LUCAS, S. et al. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1dependent and -independent mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100, n. 25, p. 15047-52, Dec 9 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657353 >.

LUSS, H. et al. Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiac myocytes in vivo and following cytokine exposure in vitro. J Mol Cell Cardiol, v. 27, n. 9, p. 2015-29, Sep 1995. ISSN 0022-2828 (Print) 0022-2828 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8523461 >.

MACHAC, J. et al. Positron emission tomography myocardial perfusion and glucose metabolism imaging. **J Nucl Cardiol,** v. 13, n. 6, p. e121-51, Nov 2006. ISSN 1532-6551 (Electronic)

1071-3581 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=17174789 >.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012. ISSN 1863-2300 (Electronic)

1863-2297 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=23076807 >.

MACHADO, F. S. et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003-8, Dec 12 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113053 >.

MADY, C. et al. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, n. 6, p. 3098-102, Dec 1994. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7994859</u> >.

MADY, C. et al. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. **Am J Cardiol**, v. 84, n. 3, p. 354-6, A9, Aug 1 1999. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=10496454 >.

MADY, C.; NACRUTH, R. Natural history of chronic Chagas' heart disease: prognosis factors. **Sao Paulo Med J,** v. 113, n. 2, p. 791-6, Mar-Apr 1995. ISSN 1516-3180 (Print) 1516-3180 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8650478 >.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 6 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=17339569 >.

MARIN-NETO, J. A. et al. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. **Am J Cardiol,** v. 69, n. 8, p. 780-4, Mar 15 1992. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1546653 >. MARIN-NETO, J. A. et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **Am Heart J,** v. 156, n. 1, p. 37-43, Jul 2008. ISSN 1097-6744 (Electronic)

0002-8703 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18585495</u> >.

MARIN-NETO, J. A. et al. Studies of the coronary circulation in Chagas' heart disease. **Sao Paulo Med J,** v. 113, n. 2, p. 826-34, Mar-Apr 1995. ISSN 1516-3180 (Print) 1516-3180 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8650483 >.

MARIN-NETO, J. A.; SIMOES, M. V.; RASSI JUNIOR, A. Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 46, p. 536-541, Jul 12 2013a. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=23904079 >.

MASUDA, A. et al. Accelerated (99m)Tc-sestamibi clearance associated with mitochondrial dysfunction and regional left ventricular dysfunction in reperfused myocardium in patients with acute coronary syndrome. **EJNMMI Res,** v. 6, n. 1, p. 41, Dec 2016. ISSN 2191-219X (Print). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169534</u> >.

MATSUMOTO, A. Y. et al. [Echocardiography: III--Myocardiopathies]. **Arq Bras Cardiol,** v. 33, n. 4, p. 293-7, Oct 1979. ISSN 0066-782X (Print) 0066-782X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=161966 >.

MEDEIROS, G. A. et al. Treatment of chronically Trypanosoma cruzi-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. **Microbes Infect,** v. 11, n. 2, p. 264-73, Feb 2009. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100857</u> >.

MEDINA, T. S. et al. Ebi3 Prevents Trypanosoma cruzi-Induced Myocarditis by Dampening IFN-gamma-Driven Inflammation. **Front Immunol,** v. 8, p. 1213, 2017. ISSN 1664-3224 (Print)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29033934</u> >.

MEDRANO, R. et al. Assessment of myocardial viability with 99mTc sestamibi in patients undergoing cardiac transplantation. A scintigraphic/pathological study. **Circulation**, v. 94, n. 5, p. 1010-7, Sep 1 1996. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8790039 >.

MEJIA, J. et al. Methodological approaches to planar and volumetric scintigraphic imaging of small volume targets with high spatial resolution and sensitivity. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 8, p. 692-9, Aug 2009. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=19649396 >.

MEJIA, J. et al. A clinical gamma camera-based pinhole collimated system for high resolution small animal SPECT imaging. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 12, p. 1160-6, Dec 2010. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=21085887 >.

MELLO, D. A.; VALIN, E.; TEIXEIRA, M. L. Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres de Trypanosoma cruzi em camundongos e Calomys callosus (Rodentia). **Revista de Saúde Pública,** v. 13, p. 314-325, 1979. ISSN 0034-8910. Disponível em: < <u>http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101979000400006&nrm=iso</u> >.

MENGEL, J. O.; ROSSI, M. A. Chronic chagasic myocarditis pathogenesis: dependence on autoimmune and microvascular factors. **Am Heart J**, v. 124, n. 4, p. 1052-7, Oct 1992. ISSN 0002-8703 (Print)

0002-8703 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1529879 >.

MIYAGAWA, M. et al. Positron emission tomography-computed tomography for imaging of inflammatory cardiovascular diseases. **Circ J**, v. 78, n. 6, p. 1302-10, 2014. ISSN 1347-4820 (Electronic)

1346-9843 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817762</u> >.

MOCHIZUKI, T. et al. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. **J Nucl Med**, v. 42, n. 10, p. 1551-5, Oct 2001. ISSN 0161-5505 (Print)

0161-5505 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585872</u> >.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann Trop Med Parasitol,** v. 100, n. 8, p. 663-77, Dec 2006. ISSN 0003-4983 (Print)

0003-4983 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=17227647 >.

MORGAN, E. E. et al. Validation of echocardiographic methods for assessing left ventricular dysfunction in rats with myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 5, p. H2049-53, Nov 2004. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=15475530 >.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 373, n. 14, p. 1295-306, Oct 2015. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323937</u> >.

MUNIZ, J.; AZEVEDO, A. P. Novo conceito da patogenia da "doença de Chagas" "Tripanosomiasis americana": inflamação alérgica granulomatóide (A), e miocardite hiperérgica (B) produzidas em "rhesus" "Macacca mulatta" inoculados com formas mortas de cultivo do "Schizotrypanum cruzi" (Nota prévia). **O Hospital**, v. 32, p. 165-183, 1947.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunol Lett,** v. 33, n. 1, p. 35-40, Jun 1992a. ISSN 0165-2478 (Print)

0165-2478 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1330900</u> >.

_____. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol,** v. 22, n. 2, p. 301-7, Feb 1992b. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537373</u> >.

MUNOZ, J. et al. Prevalence and vertical transmission of Trypanosoma cruzi infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. **Clin Infect Dis,** v. 48, n. 12, p. 1736-40, Jun 15 2009. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19438393</u> >.

NAGAJYOTHI, F. et al. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 104 Suppl 1, p. 219-25, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753477</u> >.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol,** v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309180</u> >.

NAHRENDORF, M. et al. Imaging systemic inflammatory networks in ischemic heart disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 15, p. 1583-91, Apr 21 2015. ISSN 1558-3597 (Electronic) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881940 >.

NENSA, F. et al. Feasibility of FDG-PET in myocarditis: Comparison to CMR using integrated PET/MRI. **J Nucl Cardiol**, v. 25, n. 3, p. 785-794, Jun 2018. ISSN 1532-6551 (Electronic)

1071-3581 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638745</u> >.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 6, n. 10, p. e1867, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=23150742 >.

NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. J Am Coll Cardiol, v. 62, n. 9, p. 767-76, Aug 27 2013. ISSN 1558-3597 (Electronic) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770163</u> >.

OLIVEIRA, L. F.L. et al. Proinflammatory cytokines lower 99mTc sestamibi retention and enhance the washout in isolated cardiomyocytes. **Journal of Nuclear Medicine,** v. 59, n. supplement 1, p. 107, May 1, 2018b. Disponível em: < <u>http://jnm.snmjournals.org/content/59/supplement_1/107.abstract</u> >.

OLIVEIRA, L. F. L. et al. Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats. **Arq Bras Cardiol,** v. 101, n. 1, p. 59-67, Jul 2013. ISSN 1678-4170 (Electronic)

0066-782X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=23917507 >.

OLIVEIRA, L. F. L. et al. Comparison between Radionuclide Ventriculography and Echocardiography for Quantification of Left Ventricular Systolic Function in Rats Exposed to Doxorubicin. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia,** v. 108, n. 1, p. 12-20, Jan 2017. ISSN 0066-782x. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000394142800003 >.

OLIVEIRA, L. F. L. et al. Histopathological correlates of global and segmental left ventricular systolic dysfunction in experimental chronic Chagas cardiomyopathy. **J Am Heart Assoc,** v. 5, n. 1, p. e002786,, Jan 2016. ISSN 2047-9980 (Electronic) 2047-9980 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=26796255 >.

OLIVEIRA, L. F. L. et al. Regional myocardial perfusion disturbance in experimental chronic Chagas cardiomyopathy. **J Nucl Med**, Apr 26 2018a. ISSN 1535-5667 (Electronic) 0161-5505 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29700129</u> >.

OSBORNE, M. T. et al. Patient preparation for cardiac fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of inflammation. **J Nucl Cardiol**, v. 24, n. 1, p. 86-99, Feb 2017. ISSN 1532-6551 (Electronic)

1071-3581 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27277502</u> >.

PALACIOS-PRU, E. et al. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg,** v. 41, n. 1, p. 29-40, Jul 1989. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2504067 >.

PAZIN-FILHO, A. et al. Minor segmental wall motion abnormalities detected in patients with Chagas' disease have adverse prognostic implications. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 4, p. 483-7, Apr 2006. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16612471 >.

PEIX, A. et al. Myocardial perfusion imaging and cardiac involvement in the indeterminate phase of Chagas disease. **Arq Bras Cardiol,** v. 100, n. 2, p. 114-7, Feb 2013. ISSN 1678-4170 (Electronic)

0066-782X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=23503819 >.

PEREIRA BARRETTO, A. C. et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. **Am Heart J,** v. 111, n. 2, p. 307-12, Feb 1986. ISSN 0002-8703 (Print) 0002-8703 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3946173 >.

PEREIRA, J. B.; WILCOX, H. P.; COURA, J. R. [The evolution of chronic chagasic cardiopathy. I. The influence of parasitemia]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 25, n. 2, p. 101-8, Apr-Jun 1992. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1308935 >.

PIACENZA, L. et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J,** v. 410, n. 2, p. 359-68, Mar 1 2008. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17973627 >.

PIACENZA, L. et al. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 13, p. 1455-1464, Nov 2009. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270495800005 >.

PIERROTTI, L. C. et al. Chagas Disease Recommendations for Solid-Organ Transplant Recipients and Donors. **Transplantation**, v. 102, n. 2S Suppl 2, p. S1-S7, Feb 2018. ISSN 1534-6080 (Electronic)

0041-1337 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29381572</u> >.

PIMENTEL WDE, S. et al. The effect of beta-blockade on myocardial remodelling in Chagas' cardiomyopathy. **Clinics (Sao Paulo),** v. 67, n. 9, p. 1063-9, Sep 2012. ISSN 1980-5322 (Electronic) 1807-5932 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=23018305 >. PINTO, A. M. et al. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF-kappaB activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by Trypanosoma cruzi. **Cell Microbiol,** v. 13, n. 10, p. 1518-29, Oct 2011. ISSN 1462-5822 (Electronic)

1462-5814 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749603</u> >.

PONCE, N. E. et al. CD73 Inhibition Shifts Cardiac Macrophage Polarization toward a Microbicidal Phenotype and Ameliorates the Outcome of Experimental Chagas Cardiomyopathy. **J Immunol,** v. 197, n. 3, p. 814-23, Aug 1 2016. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27335499</u> >.

PRADO, C. M. et al. Micro-positron emission tomography in the evaluation of Trypanosoma cruzi-induced heart disease: Comparison with other modalities. **Am J Trop Med Hyg,** v. 81, n. 5, p. 900-5, Nov 2009. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861629 >.

0002-9037 (Linking). Disponiver ent: < <u>http://www.iicot.infl.nin.gov/publied/19801029</u> >.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001. ISSN 1473-3099 (Print)

1473-3099 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=11871482 >.

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, v. 115, n. 3, p. 279-83, Feb 14 2007. ISSN 1874-1754 (Electronic) 0167-5273 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16769134 >.

RABELO, D. R. et al. Impaired coronary flow reserve in patients with indeterminate form of Chagas' disease. **Echocardiography**, v. 31, n. 1, p. 67-73, 2014. ISSN 1540-8175 (Electronic)

0742-2822 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=24103102 >.

RAMIREZ, L. E. et al. The hamster (Mesocricetus auratus) as experimental model in Chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of Trypanosoma cruzi infection. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 27, n. 3, p. 163-9, Jul-Sep 1994. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=7972946 >.

RASSI, A., JR. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med,** v. 355, n. 8, p. 799-808, Aug 24 2006. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=16928995 >.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1101-8, Mar 6 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339568</u> >.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg,** v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8517482</u> >.

REIS, M. M. et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R(+) in chronic human chagasic myocarditis: Correlation with the presence of myocardial Trypanosoma cruzi antigens. **Clinical Immunology and Immunopathology,** v. 83, n. 2, p. 165-172, May 1997. ISSN 0090-1229. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997WW05600008 >.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. [Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 31, n. 3, p. 301-14, May-Jun 1998. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612022</u> >.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. et al. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. **Tropenmed Parasitol,** v. 30, n. 1, p. 19-23, Mar 1979. ISSN 0303-4208 (Print) 0303-4208 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=108824 >.

RIES, J. et al. A Case of Possible Chagas Transmission by Blood Transfusion in Switzerland. **Transfus Med Hemother**, v. 43, n. 6, p. 415-417, Nov 2016. ISSN 1660-3796 (Print)

1660-3796 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27994528</u> >.

RIZZO, L. V.; CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, A. R. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. **Infect Immun,** v. 57, n. 9, p. 2640-4, Sep 1989. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2474498 >.

ROFFE, E. et al. Role of CCL3/MIP-1alpha and CCL5/RANTES during acute Trypanosoma cruzi infection in rats. **Microbes Infect,** v. 12, n. 8-9, p. 669-76, Aug 2010. ISSN 1769-714X (Electronic)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452453</u> >.

ROSSI, M. A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. **Am Heart J,** v. 120, n. 1, p. 233-6, Jul 1990. ISSN 0002-8703 (Print)

0002-8703 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2113762 >.

ROSSI, M. A.; GONCALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental Trypanosoma cruzi cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **Am J Pathol,** v. 114, n. 2, p. 209-16, Feb 1984. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=6230012 >.

ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. **Am Heart J,** v. 132, n. 1 Pt 1, p. 207-10, Jul 1996. ISSN 0002-8703 (Print) 0002-8703 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation</u> <u>&list_uids=8701871</u> >.

SABY, L. et al. Positron emission tomography/computed tomography for diagnosis of prosthetic valve endocarditis: increased valvular 18F-fluorodeoxyglucose uptake as a novel major criterion. **J Am Coll Cardiol,** v. 61, n. 23, p. 2374-82, Jun 11 2013. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583251</u> >.

SALIMY, M. S. et al. Abnormal 18F-FDG and 82Rb PET Findings in Chagas Heart Disease. **Clin Nucl Med,** v. 42, n. 5, p. e265-e268, May 2017. ISSN 1536-0229 (Electronic) 0363-9762 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28263213</u> >.

SALOMAKI, S. P. et al. Visualization of pericarditis by fluorodeoxyglucose PET. **Eur Heart J Cardiovasc Imaging,** v. 15, n. 3, p. 291, Mar 2014. ISSN 2047-2412 (Electronic) 2047-2404 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114575</u> >.

SALVADOR, F. et al. Immunosuppression and Chagas disease; experience from a nonendemic country. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 9, p. 854-60, Sep 2015. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=26055418 >.

SANMARCO, L. M. et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during Trypanosoma cruzi infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 4, p. 857-869, Apr 2017. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087471</u> >.

SANOJA, C. et al. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental Trypanosoma cruzi infection. **PLoS One,** v. 8, n. 6, p. e65820, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23776551</u> >.

SANTIAGO, H. C. et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control Trypanosoma cruzi proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 6, n. 2, p. e1492, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348160</u> >.

SANTORO, G. M. et al. Single photon emission computed tomography with technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile in acute myocardial infarction before and after thrombolytic treatment: assessment of salvaged myocardium and prediction of late functional recovery. **J Am Coll Cardiol,** v. 15, n. 2, p. 301-14, Feb 1990. ISSN 0735-1097 (Print) 0735-1097 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2137147 >.

SANTOS, A. L. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Exp Parasitol,** v. 167, p. 67-75, Aug 2016. ISSN 1090-2449 (Electronic) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223816</u> >.

SANTOS, R. R. et al. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. **J Exp Med,** v. 175, n. 1, p. 29-39, Jan 1 1992. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730921</u> >.

SCHATKA, I.; BENGEL, F. M. Advanced imaging of cardiac sarcoidosis. **J Nucl Med,** v. 55, n. 1, p. 99-106, Jan 2014. ISSN 1535-5667 (Electronic) 0161-5505 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24232870 >.

SCHELBERT, H. R. et al. N-13 ammonia as an indicator of myocardial blood flow. **Circulation**, v. 63, n. 6, p. 1259-72, Jun 1981. ISSN 0009-7322 (Print) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation

<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation</u> <u>&list_uids=7226473</u> >.

SCHILLACI, O. et al. Technetium-99m sestamibi single-photon emission tomography detects subclinical myocardial perfusion abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. **Eur J Nucl Med,** v. 26, n. 7, p. 713-7, Jul 1999. ISSN 0340-6997 (Print) 0340-6997 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398819</u> >.

SCHINDLER, H. et al. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **J Immunol**, v. 166, n. 5, p. 3075-82, Mar 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207258</u> >.

SCHINKEL, A. F. et al. Assessment of myocardial viability in patients with heart failure. **J Nucl Med,** v. 48, n. 7, p. 1135-46, Jul 2007. ISSN 0161-5505 (Print) 0161-5505 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574986</u> >. SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop,** v. 115, n. 1-2, p. 14-21, Jul-Aug 2010. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=19932071 >.

SCHWAIGER, M. et al. Noninvasive evaluation of sympathetic nervous system in human heart by positron emission tomography. **Circulation**, v. 82, n. 2, p. 457-64, Aug 1990. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2372893 >.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis,** v. 54, n. 6, p. 845-52, Mar 2012. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=22238161 >.

SILBERSTEIN, E. et al. A novel nanoluciferase-based system to monitor Trypanosoma cruzi infection in mice by bioluminescence imaging. **PLoS One,** v. 13, n. 4, p. e0195879, 2018. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29672535</u> >.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-74, Jan 1 1992. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730915</u> >.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med**, v. 174, n. 3, p. 539-45, Sep 1 1991. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908509 >.

SIMOES, M. V. et al. Detection of myocardial ischemia in chronic Chagas disease patients with atypic precordial pain by exercise and Holter tests. **Arq Bras Cardiol,** v. 60, n. 5, p. 315-9, May 1993. ISSN 0066-782X (Print)

0066-782X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8311747 >.

SIMOES, M. V. et al. Esophageal origin of precordial pain in chagasic patients with normal subepicardial coronary arteries. **Arq Bras Cardiol**, v. 64, n. 2, p. 103-8, Feb 1995. ISSN 0066-782X (Print) 0066-782X (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation</u> &list_uids=7575153 >.

SIMOES, M.V. et al. Exacerbated coronary artery constrictor responses and autonomic dysfunction in vasotonic angina: a comparative study with Chagas' heart disease. **J Am Coll Cardiol,** v. 31, p. 340C, 1998.

SIMOES, M. V. et al. Relation of regional sympathetic denervation and myocardial perfusion disturbance to wall motion impairment in Chagas' cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v. 86, n. 9, p. 975-81, Nov 1 2000. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=11053710 >.

SIMOES, M. V.; SOARES, F. A.; MARIN-NETO, J. A. Severe myocarditis and esophagitis during reversible long standing Chagas' disease recrudescence in immunocompromised host. **Int J Cardiol,** v. 49, n. 3, p. 271-3, May 1995. ISSN 0167-5273 (Print) 0167-5273 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=7649674 >.

SINUSAS, A. J. et al. Quantification of area at risk during coronary occlusion and degree of myocardial salvage after reperfusion with technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile. **Circulation,** v. 82, n. 4, p. 1424-37, Oct 1990. ISSN 0009-7322 (Print) 0009-7322 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2401074 >.

SOUZA, P. E. et al. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infect Immun,** v. 75, n. 4, p. 1886-94, Apr 2007. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283096</u> >.

SOUZA, P. E. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5283-91, Sep 2004. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=15322024 >.

STEMPIN, C. C. et al. Arginase induction promotes Trypanosoma cruzi intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. **Eur J Immunol,** v. 34, n. 1, p. 200-9, Jan 2004. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14971046</u> >.

SUN, Y. et al. 99mTc-MIBI myocardial perfusion imaging in myocarditis. **Nucl Med Commun**, v. 24, n. 7, p. 779-83, Jul 2003. ISSN 0143-3636 (Print) 0143-3636 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813196</u> >.

TANAKA, D. M. et al. Prolonged dipyridamole administration reduces myocardial perfusion defects in experimental chronic Chagas cardiomyopathy. **J Nucl Cardiol**, Feb 1 2018. ISSN 1532-6551 (Electronic)

1071-3581 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29392628</u> >.

TANAKA, D. M. et al. Effect of different anesthetic agents on left ventricular systolic function assessed by echocardiography in hamsters. **Braz J Med Biol Res,** v. 49, n. 10, p. e5294, Aug 25 2016. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27580004 >.

TANOWITZ, H. B. et al. Compromised microcirculation in acute murine Trypanosoma cruzi infection. **J Parasitol,** v. 82, n. 1, p. 124-30, Feb 1996. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8627481 >.

TANOWITZ, H. B. et al. Effect of verapamil on the development of chronic experimental Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg,** v. 41, n. 6, p. 643-9, Dec 1989. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=2518281 >.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 550-4, May 1 2001. ISSN 0020-7519 (Print) 0020-7519 (Linking). Disponível em: <

<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation</u> <u>&list_uids=11334941</u> >.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol Today,** v. 15, n. 3, p. 94-9, Mar 1999. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=10322321 >.

TATSUMI, T. et al. Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. **J Am Coll Cardiol,** v. 35, n. 5, p. 1338-46, Apr 2000. ISSN 0735-1097 (Print) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758978</u> >.

TAYLOR, D. K.; MOOK, D. M. Isoflurane waste anesthetic gas concentrations associated with the open-drop method. **J Am Assoc Lab Anim Sci,** v. 48, n. 1, p. 61-4, Jan 2009. ISSN 1559-6109 (Print)

1559-6109 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245753</u> >.

TER-POGOSSIAN, M. M. et al. A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). **Radiology,** v. 114, n. 1, p. 89-98, Jan 1975. ISSN 0033-8419 (Print) 0033-8419 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=1208874 >.

THACKERAY, J. T. et al. Targeting post-infarct inflammation by PET imaging: comparison of (68)Ga-citrate and (68)Ga-DOTATATE with (18)F-FDG in a mouse model. **Eur J Nucl Med Mol Imaging,** v. 42, n. 2, p. 317-27, Feb 2015. ISSN 1619-7089 (Electronic) 1619-7070 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=25112398 >.

THACKERAY, J. T. et al. Clinically relevant strategies for lowering cardiomyocyte glucose uptake for 18F-FDG imaging of myocardial inflammation in mice. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 42, n. 5, p. 771-80, Apr 2015. ISSN 1619-7089 (Electronic) 1619-7070 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation

&list_uids=25389013 >.

TILLISCH, J. et al. Reversibility of cardiac wall-motion abnormalities predicted by positron tomography. **N Engl J Med,** v. 314, n. 14, p. 884-8, Apr 3 1986. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3485252 >.

TORRES, C. M. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 36, p. 391-404, 1941. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <u>http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-</u> <u>02761941000300015&nrm=iso</u> >.

TORRES, C. M. Arteriosclerosis of the fine arterial branches of the myocardium (Chagas' coronaritis) & focal myocytolysis in chronic Chagas' heart disease. **Hospital**, v. 54, n. 5, p. 597-610, Nov 1958. ISSN 0018-5469 (Print)

0018-5469 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=13610337 >.

TORRES, C. M. Myocytolysis and fibrosis of the myocardium in Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 58, p. 161-82, Nov 1960. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation</u> <u>&list_uids=13777558</u> >.

TORRES, F. W. et al. Coronary vascular reactivity is abnormal in patients with Chagas' heart disease. **Am Heart J,** v. 129, n. 5, p. 995-1001, May 1995. ISSN 0002-8703 (Print) 0002-8703 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=7732990 >.

UMEZAWA, E. S. et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of Trypanosoma cruzi in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol, v. 34, n. 9, p. 2143-7, Sep 1996. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8862574 >.

UREN, N. G. et al. Relation between myocardial blood flow and the severity of coronaryartery stenosis. **N Engl J Med,** v. 330, n. 25, p. 1782-8, Jun 23 1994. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=8190154 >.

Validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 18, p. 46-46, 1985. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <u>http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-</u> <u>86821985000100010&nrm=iso</u> >.

VAN EMPEL, V. P. et al. Myocyte apoptosis in heart failure. **Cardiovasc Res,** v. 67, n. 1, p. 21-9, Jul 1 2005. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896727 >.

VILLAR, J. C. et al. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic Trypanosoma cruzi infection. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD003463, 2002. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869663</u> >.

VILLAR, J. C. et al. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic Trypanosoma cruzi infection. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 5, p. CD003463, May 27 2014. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867876</u> >.

VINCENDEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 1, p. 9-12, Jan 2003. ISSN 1471-4922 (Print) 1471-4922 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488215 >.

VIOTTI, R. et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann Intern Med,** v. 144, n. 10, p. 724-34, May 16 2006. ISSN 1539-3704 (Electronic) 0003-4819 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702588 >.

WAN, X. et al. SIRT1-PGC1alpha-NFkappaB Pathway of Oxidative and Inflammatory Stress during Trypanosoma cruzi Infection: Benefits of SIRT1-Targeted Therapy in Improving Heart Function in Chagas Disease. **PLoS Pathog,** v. 12, n. 10, p. e1005954, Oct 2016. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27764247</u> >.

WANG, H. et al. IL-27 induces the differentiation of Tr1-like cells from human naive CD4+ T cells via the phosphorylation of STAT1 and STAT3. **Immunol Lett,** v. 136, n. 1, p. 21-8, Apr 30 2011. ISSN 1879-0542 (Electronic)

0165-2478 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115047</u> >.

WERNER, R. A. et al. Longitudinal 18F-FDG PET imaging in a rat model of autoimmune myocarditis. **Eur Heart J Cardiovasc Imaging**, Aug 8 2018. ISSN 2047-2412 (Electronic) 2047-2404 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30102319</u> >.

ZAGO, M. P. et al. TcI Isolates of Trypanosoma cruzi Exploit the Antioxidant Network for Enhanced Intracellular Survival in Macrophages and Virulence in Mice. **Infect Immun**, v. 84, n. 6, p. 1842-1856, Jun 2016. ISSN 1098-5522 (Electronic) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27068090</u> >.

ZELEDON, R. et al. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 21, n. 1, p. 15-20, Jan-Mar 1988. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation &list_uids=3148163 >.

Anexos

8. Anexo A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 034/2011, sobre o projeto intitulado "Estudo das alterações da inervação simpática cardíaca e da perfusão miocárdica e sua correlação com a progressão da disfunção ventricular esquerda em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster", sob a responsabilidade do Professor Doutor Marcos Vinícius Simões está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO em reunião de 27 de junho de 2011.

(We certify that the protocol n° 034/2011, about "Study of the myocardial sympathetic innervations disturbance and myocardial perfusion changes and their correlation with the progression of the left ventricular dysfunction in an experimental model of chronic changes cardiomyopathy", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 06/27/2011.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2011.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal, em exercício

ANEXO A: Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

9. Figuras Suplementares



Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

Figura Suplementar 1 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva da FEVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. FEVE= fração de ejeção ventrículo esquerdo.



Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo

Figura Suplementar 2 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva do DSVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DSVE= diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.


Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo

Figura Suplementar 3 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva do DDVE dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DDVE= diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.



Defeito de Perfusão

Figura Suplementar 4 – sensitivity analysis com avaliação sequencial progressiva do DPM dos dois grupos estudados ao longo do tempo incluindo os animais que vieram a óbito durante o estudo. Dados apresentados como média e intervalos de predição de 95% para essa variável. DPM= defeito de perfusão.