UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARIANNE LANES DELARISSE

Padronização de protocolo de estresse cardíaco com dobutamina em modelo de
cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters

Ribeirão Preto
2020

Marianne Lanes Delarisse

Padronização de protocolo de estresse cardíaco com dobutamina em modelo de
cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Clínica Médica
Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Marcus Vinicius Simões

Ribeirão Preto
2020

Autorizo a reprodução e a 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

Delarisse, Marianne Lanes

Padronização de protocolo de estresse cardíaco com dobutamina em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters / Marianne Lanes Delarisse; orientador Marcus Vinicius Simões. Ribeirão Preto, 2020.

77f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Simões

1. Miocardiopatia chagásica. 2. Dobutamina. 3. Disfunção ventricular. 4. Hamsters.

Nome: DELARISSE, Marianne Lanes

Título: Padronização de protocolo de estresse cardíaco com dobutamina em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Doutor: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Doutor: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Doutor: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Dedicatória

Aos meus pais, Cecília e Luiz, por me
apoiarem a conquistar meus sonhos e
seguir em frente,
Ao meu eterno namorado e amigo, Valter,
À minha família e amigos.

Agradecimentos

Agradeço,

A Deus, por sempre me guiar nas horas difíceis, principalmente nos momentos de dúvidas em que ameacei desistir;

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Cecília e Luiz, meus tios Alessandro e Régia, minha prima Ana Júlia, meus sogros Valter e Telma, minhas cunhadas Lara e Mariana, e meu cunhado Igor;

Ao meu namorado, companheiro dessa e de outras existências, por toda paciência, compreensão e carinho. Você foi incansável durante este processo. Agradeço por me fazer, diariamente, uma pessoa mais feliz;

Aos amigos da Casa de Caridade Mãe Maria, principalmente à Suzi e Ademir, por serem exemplos de pessoas a serem seguidas. Meu eterno carinho e gratidão;

Ao meu orientador, Marcus Vinicius Simões, por todos os ensinamentos e compreensão nessa jornada. Agradeço imensamente pelo acolhimento e por não ter me deixado desistir; o meu respeito, admiração e eterna gratidão pela sua serenidade e apoio à realização deste trabalho;

Aos amigos de laboratório, Denise Mayumi Tanaka, Camila Godoy Fabrício e Luciano Fonseca por todo companheirismo, ensinamentos, conselhos e exemplos profissionais;

Aos queridos supervisores e amigos da época de aprimoramento, Lívia Arcêncio, Michele Hiss e Júlio Crescêncio por todas as conversas, risadas e conselhos. Vocês são pessoas incríveis;

A todos os funcionários da cardiologia e clínica médica;

A todos os colaboradores desse projeto;

Aos meus amigos e colegas.

Resumo

RESUMO

DELARISSE, M, L. Padronização de protocolo de estresse cardíaco com dobutamina em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters. 2020. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A doença de Chagas ainda é um importante problema de saúde pública em regiões endêmicas da América Latina, onde estima-se 8 milhões de infectados. A isquemia microvascular é frequente na cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e pode estar envolvida em processos fisiopatogênicos que levam a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. A obtenção de imagens cintilográficas de perfusão (CMP) em estresse e repouso pode ser ferramenta útil na investigação de modelos experimentais de cardiopatia, tendo sido padronizada em ratos e camundongos, mas sem relatos em hamsters. Desta forma, nosso objetivo foi padronizar um protocolo de estresse farmacológico com uso de dobutamina através da curva dose-resposta do efeito da infusão endovenosa de dobutamina sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca em hamsters sírios normais. Na etapa 1, os animais passaram por procedimento cirúrgico para a canulação da artéria carótida e veia jugular para os registros da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), respectivamente. As doses de dobutamina endovenosa nessa etapa foram de 2,5 à 40 µg/kg/min. A partir dos dados obtidos da curva de dose-resposta na etapa 1, foi estabelecido uma faixa de taxa de infusão de dobutamina de 2,5 a 17,5 µg/kg/min com a obtenção de imagens de perfusão miocárdica in vivo no repouso e estresse com dobutamina (Etapa 2-A). Contudo, as imagens de cintilografia miocárdica de perfusão revelaram dilatação da cavidade ventricular esquerda (VE) e defeitos perfusionais reversíveis nos animais do grupo controle, indicando efeitos cardiotóxicos. Após analisar as curvas dose-respostas da FC e da PA do grupo da etapa 2-A, optamos por realizar uma única infusão com dose única de 12,5 µg/kg/min (Etapa 2-B). Nesta etapa, os animais realizaram imagens de SPECT em repouso e após uma semana foi feita a infusão de dobutamina durante 1 minuto, com a dose de 12,5 µg/kg/min, seguida da aquisição das imagens cintilográficas de estresse. Após padronização deste regime de dose única, 23 animais chagásicos foram submetidos à infusão de dobutamina com dose de 12,5 µg/kg/min durante 1 minuto. O emprego do protocolo de dose única em 23 hamsters cronicamente infectados com *T. cruzi* ($3,5 \times 10^4$ formas

tripomastigotas da cepa Y), foi efetivo em promover defeitos perfusionais reversíveis em 9 animais (39%). Conclui-se, então, que o protocolo especialmente padronizado no nosso projeto se mostrou efetivo em produzir aumento significativo da FC e da PA em animais controles normais, sem produzir defeitos perfusionais isquêmicos ou sinais de disfunção miocárdica transitória durante o estresse. O protocolo de estresse com dobutamina foi capaz de induzir defeitos perfusionais reversíveis em significativa proporção de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, em taxas dentro do que se tem descrito nos estudos conduzidos no cenário clínico.

Palavras-chave: Miocardiopatia chagásica; Dobutamina; Disfunção ventricular; Hamsters.

Abstract

DELARISSE, M, L. **Standardization of a dobutamine cardiac stress protocol in a model of chronic Chagas cardiomyopathy in hamsters.** 2020. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Chagas disease is still an important public health problem in endemic regions of Latin America, where an estimated 8 million are infected. Microvascular ischemia is frequent in chronic cardiomyopathy (CCC) and may be involved in pathophysiological processes that lead to left ventricular systolic dysfunction. The use of scintigraphic perfusion images (CMP) in stress and rest can be useful in the investigation of experimental models of heart disease, having been standardized in rats and mice, but not related to hamsters. Thus, our objective was to standardize a pharmacological stress protocol using dobutamine through the dose-response curve of the effect of intravenous dobutamine infusion on blood pressure and heart rate in normal Syrian hamsters. In step 1, the animals undergo the surgical procedure for cannulation of the carotid artery to record blood pressure (BP) and heart rate (HR), and jugular vein, for drug infusion. As intravenous dobutamine doses in this step, they were 2.5 to 40 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{min}$. From the data captured by the dose response curve in step 1, a range of dobutamine infusion rate from 2.5 to 17.5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{min}$ was established to be used for the subsequent stress myocardial perfusion images acquisition (Step 2-A). However, the myocardial perfusion scintigraphy images revealed dilation of the left ventricular (LV) cavity and reversible perfusion defects in animals in the control group, indicating the presence of catecholamine induced cardiotoxic effects. After analyzing how the responses to the HR and PA doses of the group in step 2-A, we chose to perform a single infusion with a single dose of 12.5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{min}$ (Step 2-B). In this step, the animals underwent SPECT imaging at rest and after a week the imaging was repeated under dobutamine infusion for 1 minute, with a dose of 12.5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{min}$. By using this modified stress protocol, the SPECT images showed no reversible perfusion defects in control animals. After that, in the step 3, 23 hamsters chronically infected with *T. cruzi* (3.5×10^4 trypomastigote forms of strain Y) were submitted to dobutamine infusion using this single dose regimen at a dose of 12.5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{min}$ for 1 minute. The use of a single dose protocol was effective in promoting reversible perfusion defects in 9 animals (39%). It was concluded, then, which personalized protocol in the project is effective in significantly increasing HR and BP in normal control animals, without producing ischemic

perfusion damage or signs of transient myocardial dysfunction during stress. The dobutamine stress protocol was able to induce reversible perfusion defects in animals with chronic *T. cruzi* infection, at similar rates that were described previously in clinical studies investigating CCC patients.

Key-words: Chagasic Cardiomyopathy; dobutamine; ventricular dysfunction; hamsters.

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A: Imagem ilustrativa do mapa polar de um animal controle. B: Comparação das áreas de captação do radiotraçador com um banco de dados de animais controles; C: Regiões com limiar de captação abaixo de 2,5 desvios padrões (0%). Fonte: Tanaka, D.M. (2019).....44

Figura 2- Imagem ilustrativa de um animal controle. A: São representados os raios de varredura utilizados pelo software para a construção do mapa polar. B: São mostrados os cortes representativos das imagens tomográficas (SPECT) obtidas da cavidade ventricular esquerda (basal, médio cavitário e apical) e eixos longos vertical e horizontal, com o mapa polar resultante mostrado na extremidade direita da figura.....45

Figura 3 – Imagem representativa do estudo de perfusão miocárdica na condição repouso (A) e estresse (B).....51

Figura 4: Imagem ilustrativa do mapa polar de um animal chagásico com defeito de perfusão reversível. A: Repouso. B: Estresse.....56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva dose-reposta representando a média do duplo produto dos valores basal à 40 ug/ml/min e repouso final dos animais da etapa 1.....	47
Gráfico 2 - Curva dose-reposta representando a média da frequência cardíaca dos valores basal à 40 ug/ml/min e repouso final dos animais da etapa 1.....	48
Gráfico 3 – Curva dose-resposta representando a média da PAS dos valores basal à 40 µg/kg/min e repouso final dos animais da etapa 1.....	48
Gráfico 4 – Curva dose-resposta representando a média do duplo produto dos valores basal à 17,5 µg/kg/min e repouso final dos animais da etapa 2-A.....	49
Gráfico 5 – Curva dose-resposta representando a média FC dos valores basal à 17,5 µg/kg/min e repouso final dos animais da etapa 2-A.....	50
Gráfico 6 - Curva dose-reposta representando a média da PAS dos valores basal à 17,5 ug/kg/min e repouso final dos animais da etapa 2-A.....	50
Gráfico 7 - Curva dose-reposta representando o duplo produto da dose 12,5 µg/kg/min, dos valores basal ao pico de 1 minuto.....	52
Gráfico 8 - Curva dose-reposta representando a FC da dose 12,5 µg/kg/min, dos valores basal ao pico de 1 minuto.....	53
Gráfico 9 - Curva dose-reposta representando a PAS da dose 12,5 µg/kg/min, dos valores basal ao pico de 1 minuto.....	53
Gráfico 10 – A: Frequência (%) de acometimento dos segmentos com defeitos de perfusão dos 23 animais na cintilografia de repouso. B: Frequência (%) de acometimentos dos segmentos com defeitos de perfusão dos 23 animais na cintilografia de estresse.....	54

Gráfico 11 – A: Frequência de acometimento dos segmentos com defeitos de perfusão reversíveis em 10 animais chagásicos.....55

Gráfico 12 – Curva dose-reposta da frequência cardíaca de animais chagásicos e controles durante a infusão da dose única de 12,5 µg/kg/min.....55

Sumário

SUMÁRIO

1.0.	Introdução.....	24
1.1.	A doença de Chagas e sua história natural.....	24
1.2.	Fisiopatologia da doença de Chagas.....	25
1.3.	Distúrbios microvasculares.....	27
1.4.	Modelos experimentais in vivo na CCC.....	28
1.5.	Isquemia miocárdica e métodos para a sua indução.....	31
1.6.	Teste de estresse farmacológico com dobutamina.....	33
2.0.	Objetivos.....	36
2.1.	Objetivos gerais.....	36
2.2.	Objetivos específicos.....	36
3.0.	Métodos.....	38
3.1.	Animais experimentais.....	38
3.2.	Delineamento geral do estudo.....	38
3.3.	Descrição das etapas e experimentos.....	39
3.3.1.	Etapa 1.....	39
3.3.2.	Etapa 2-A.....	39
3.3.3.	Etapa 2-B.....	40
3.3.4.	Etapa 3.....	41
3.4.	Métodos de imagem.....	41
3.4.1.	Cintilografia (SPECT) de perfusão miocárdica de alta resolução.....	41
3.4.1.1.	Sistema de aquisição de imagens tomográficas.....	41
3.4.1.2.	Aquisição de imagens de perfusão miocárdica.....	41
3.4.1.3.	Processo e análise das imagens.....	42
4.0.	Resultados.....	47
4.1.	Etapa 1.....	47
4.2.	Etapa 2-A.....	49
4.3.	Etapa 2-B.....	52
4.4.	Etapa 3.....	53
5.0.	Discussão.....	58
6.0.	Conclusão.....	65

7.0.	Referências bibliográficas.....	67
8.0.	Anexos.....	77
8.1.	Anexo 1 – COMITÊ DE ÉTICA.....	77

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Chagas e sua história natural

A doença de Chagas (DC) humana foi descrita na literatura pela primeira vez em 1909 pelo médico e pesquisador Carlos Chagas. É uma condição infecciosa causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

A transmissão aos humanos pode ocorrer de diferentes formas. A forma mais comum é através do contato com as fezes contaminadas do parasita, que habitualmente defeca após o repasto com o sangue do hospedeiro, que é transmitida à corrente sanguínea. Outros modos de transmissão são descritos na literatura, tais como: transfusão sanguínea e transplante de órgãos, congênita, ou por via digestiva através da ingestão de alimentos contaminados. (MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

A Doença de Chagas, antes vista apenas em áreas rurais da América do Sul e Central, apresenta-se atualmente em áreas urbanas devido ao êxodo rural. A doença pode ainda ser encontrada nos Estados Unidos e alguns países da Europa devido às correntes migratórias internacionais a partir dos países onde a doença é endêmica (Perez-Molina et al., 2011; Rodriguez-Guardado et al., 2011). Mundialmente, estima-se que a doença de Chagas cause 10 mil mortes a cada ano e que afete cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2015). Calcula-se que cerca de 65 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença. Estimativas recentes na América Latina indicam que o custo anual com a doença seja de aproximadamente US \$ 500 milhões (Pan American Health Organization, 2019).

A situação epidemiológica desta doença no Brasil mudou durante os últimos anos, como resultado das ações de controle, das transformações ambientais e de ordem econômica e social (Dias et al., 2016). Estima-se que haja no país cerca de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* (Hotez e Fujiwara, 2014; Martins-Melo et al., 2014a). Como reflexo, permanece elevada a carga de mortalidade no país secundária à DC, sendo uma das quatro maiores causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias, além de ser a principal doença negligenciada no Brasil (Martins-Melo et al., 2016). A DC representa ainda uma das maiores causas de insuficiência cardíaca e morte súbita (Who, 2015).

A DC é caracterizada por duas fases: aguda e crônica. A primeira ocorre logo após curto período de incubação após a infecção e normalmente tem curso clínico benigno e duração curta, de 4 a 8 semanas, podendo ser assintomática ou apresentar manifestações clínicas gerais como febre, fraqueza, mal-estar geral e, eventualmente, a presença do “chagoma” de inoculação. Numa minoria dos casos, envolvimento cardíaco pode ocorrer com desenvolvimento de derrame pericárdico, miocardite aguda. Meningoenfelite é complicação rara, podendo ocorrer em menos de 1% dos casos, ainda que exiba alta letalidade. Nesta fase as manifestações cardiovasculares são consequência de uma intensa reação inflamatória no coração secundária ao parasitismo das fibras cardíacas por ninhos da forma amastigota do *T.cruzi* (Prata, 2001). Nos raros casos que evento fatal decorre da miocardite aguda, relatos necroscópicos descrevem um coração é flácido e globular com intensa reação inflamatória.

Assim que a fase aguda cessa, a doença entra em sua forma crônica, de longa duração, podendo ser assintomática e sem evidência de qualquer lesão orgânica (forma indeterminada da doença) ou sintomática, com comprometimento cardíaco e/ou digestivo.

A forma indeterminada é caracterizada pela ausência de sintomas e ausência de sinais radiológicos ou eletrocardiográficos de acometimento cardíaco e/ou digestivo, sendo, porém, positivos os testes sorológicos ou parasitológicos para detecção da infecção (Moncayo; Ortiz Yanine, 2006). Pacientes que apresentam esta forma da doença tem bom prognóstico e sobrevida semelhante a indivíduos saudáveis (Ribeiro e Rocha, 1998). Contudo, Pazin-Filho e colaboradores (2006) descreveram que nessa fase podem ser encontradas alterações de mobilidade segmentar da parede do ventrículo esquerdo. A presença dessas alterações e/ou de aneurisma de ponta, podem estar relacionados com o desenvolvimento da disfunção ventricular esquerda e pior prognóstico da doença.

Estima-se que um terço dos pacientes infectados desenvolverão a forma crônica sintomática, duas a três décadas após a infecção inicial. Os sintomas nessa etapa são relacionados ao órgão envolvido, como coração, colón e esôfago. A forma cardíaca é a mais frequente e grave (RIBEIRO et al., 2013). A lesão do miocárdio geralmente é progressiva, o que leva à cardiomiopatia chagásica crônica (CCC).

1.2. Fisiopatologia da CCC

Apesar de sua grande relevância clínica e epidemiológica, a fisiopatogênese da CCC ainda não está bem compreendida. Um terço dos pacientes infectados irão desenvolver a forma crônica com envolvimento orgânico somente duas a três décadas após a infecção inicial, caracterizada por uma cardiomiopatia dilatada com manifestações de insuficiência cardíaca (IC), arritmias cardíacas, eventos tromboembólicos e morte súbita (Nunes *et al.*, 2013). Nesta fase, as lesões histopatológicas cardíacas se apresentam como uma miocardite focal difusa e de baixa intensidade, com infiltrados predominante de células mononucleares, associados à destruição de fibras musculares cardíacas e fibrose intersticial reparativa, caracteristicamente com parasitismo de fibras cardíacas de muito baixa intensidade ou mesmo indetectável quando se utiliza técnicas de microscopia convencional (Higuchi *et al.*, 1987).

Ao longo dos anos de pesquisas da doença, foram descobertos dois mecanismos fisiopatogênicos como eixos centrais para explicar o curso da CCC: dano miocárdico causado pelo parasitismo de baixa intensidade (Benvenuti, *et al.*, 2008) e agressão miocárdica inflamatória exacerbada por mecanismos de autoimunidade (Borges *et al.*, 2013).

Durante a fase aguda, observa-se parasitismo intenso das fibras cardíacas por formas amastigotas do *T. cruzi*, o que provoca grande resposta imune celular e humoral contra o parasita. Este tipo de reação leva ao controle biológico do parasita, porém não à sua eliminação completa, que persiste em baixo grau e de forma incessante na fase crônica. Porém, na fase crônica ninhos de parasitas são raros ou praticamente indetectáveis quando se utiliza a microscopia convencional (Marin-Neto *et al.*, 2007; Prata, 2001; Gutierrez *et al.*, 2009). Estudos mais recentes, utilizando métodos de imunohistoquímica ou detecção do genoma do parasita por técnicas de biologia molecular, mostram que os focos inflamatórios são dirigidos contra antígenos do parasita, indicando a participação do parasita nos mecanismos que determinam a lesão miocárdica na fase crônica da doença.

O processo lesivo histopatológico fundamental nas diferentes fases da doença de Chagas é a miocardite. Estudos sugerem que, apesar de ser mais visível na fase aguda, mantém-se permanente nas formas indeterminada e crônica, correlacionando com a gravidade da insuficiência cardíaca (Higuchi *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1987).

Torna-se razoável supor que a ativação exacerbada do sistema imune cause danos teciduais, levando a importantes danos ao miocárdio na fase crônica. Porém, o papel da agressão imune induzida pela persistência do próprio parasita precisa ainda ser completamente conhecida (Marin-Neto, 2007; Gutierrez *et al.*; Soares *et al.*, 2007). Pesquisadores detectaram DNA *T.cruzi* em tecidos cardíacos de pacientes com a forma indeterminada da doença. Além disso, células parasitadas do miocárdio através de amastigotas permanecem livres de inflamação apesar do intenso parasitismo do tecido cardíaco. Esses achados indicam que a intensidade da parasitemia não está diretamente relacionada à evolução clínica dos pacientes na fase crônica da DC.

Além dos mecanismos centrais citados acima, também são descritos na literatura mecanismos lesivos auxiliares, ou amplificadores de lesão, que podem contribuir para a fisiopatogênese da doença de Chagas crônica, tendo entre eles destaque para a disfunção microvascular coronária.

1.3. Distúrbios microvasculares

Evidências derivadas de estudos experimentais e clínicos reforçam a noção de que distúrbios da microcirculação coronária estão associados à isquemia e à lesão miocárdica na doença de Chagas na fase crônica. Estudos indicam que desenvolvimento dos danos miocárdicos podem ser consequência de um progressivo processo de necrose celular causada por isquemia miocárdica e iniciada por alterações na microcirculação. Essas repercussões podem estar associadas à inflamação, o que pode acarretar alterações na perfusão miocárdica regional e, consequentemente, a produção de miócitolise e fibrose reparativa na CCC (Rossi, 1990; Rossi *et al.*, 2010; Marin-Neto *et al.*, 2013).

As anormalidades da microcirculação na doença de Chagas começaram a ser descritas em estudos necroscópicos de casos de pacientes falecidos em decorrência da doença. Foram observadas em estudos necroscópicos de corações chagásicos, alterações microvasculares coronárias com hiperproliferação da camada íntima, espessamento de parede arteriolar e obstrução de finos ramos arteriulares coronários. Esses processos obstrutivos estavam associados topograficamente a focos de necrose miocitolítica, forma de morte celular intimamente vinculada à isquemia miocárdica. Esses achados sugeriram a participação da isquemia

microvascular na formação de focos de inflamação, de miócitolise e posterior fibrose reparativa na fase crônica da cardiomiopatia da DC. (Torres, 1958; Torres, 1960).

No cenário experimental, observou-se que o desenvolvimento das lesões do miocárdio, é, em parte, consequência de um processo de necrose celular causadas pelas alterações na microcirculação associadas ao processo inflamatório (Rossi, 1990).

Rossi e colaboradores (1984) mostraram evidências em modelos experimentais de alterações microvasculares, incluindo microtrombos com espasmos microcirculatórios, disfunção endotelial e “plugs” plaquetários. Estudos histopatológicos em modelo murino também demonstraram achados significativos de anormalidades estruturais da microcirculação, além da obstrução, aumento da vasorreatividade e espasmo arteriolar coronários (Factor *et al.*, 1985).

Em contrapartida, no cenário clínico, estudos evidenciaram alta frequência de defeitos perfusionais isquêmicos (30 a 50%) em pacientes chagásicos com artérias coronárias subepicárdicas normais. Esses achados sugeriram que os distúrbios perfusionais miocárdicos possam ocorrer devido à regulação anormal do fluxo sanguíneo miocárdico em nível microvascular (Hagar; Rahimtoola, 1991; Marin-Neto *et al.*, 1992; Hiss *et al.*, 2009).

Hiss e colaboradores (2009) observaram em um estudo longitudinal retrospectivo, utilizando cintilografia miocárdica de perfusão, que o aparecimento de fibrose regional miocárdica durante o processo de evolução da doença se correlacionava topograficamente com as regiões exibindo isquemia microvascular. Dos segmentos que apresentavam defeitos isquêmicos na condição inicial, 68% evoluíram para defeitos fixos em repouso, após o seguimento médio de 5 anos, indicando o desenvolvimento de fibrose regional nestas regiões. Em contrapartida, dos segmentos que não apresentaram isquemia, somente 10% evoluíram para fibrose regional.

No conjunto, esses resultados de estudo clínicos, necroscópicos e experimentais reforçam a hipótese de que isquêmica miocárdica seja um mecanismo atuante no processo fisiopatogênico que leva à disfunção ventricular na CCC.

1.4. Modelos experimentais in vivo na CCC

O emprego de modelos experimentais animais para o estudo da doença de Chagas tem permitido observar as diversas fases de progressão da doença até o desenvolvimento da dilatação e disfunção sistólica ventricular esquerda em intervalo de tempo razoável para estudos fisiopatológicos, como no modelo de hamster sírios que exibem CCC cerca de 8 a 10 meses após a infecção. Vale ressaltar que em humanos o tempo de observação entre a fase indeterminada e a fase crônica seria extremamente longo, cerca de 2 a 3 décadas, o que praticamente impede a realização de um estudo de coorte voltado para investigar os mecanismos fisiopatogênicos atuantes na doença.

Em anos recentes, dados histopatológicos, imunológicos e parasitológicos têm indicado que o hamster sírio inoculado pelo *T. cruzi* desenvolve uma cardiopatia com características parasitológicas e histopatológicas muito semelhantes à cardiopatia chagásica humana (Ramirez *et al.*, 1994).

Bilate (2003) em seu estudo, demonstrou que a infecção de hamsters sírios fêmeas com $3,5 \times 10^4$ ou 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y produziu graus variáveis de disfunção ventricular e miocardite difusa ou multifocal, após um período sem anormalidades significantes (fase indeterminada), na quase totalidade dos animais investigados entre 8 e 12 meses após a infecção inicial. O mesmo modelo foi também objeto de outros estudos, demonstrando que a cardiomiopatia chagásica crônica produzida nesses animais se assemelha àquela encontrada em humanos (Bilate *et al.*, 2007).

Além disso, estudos recentes desenvolvidos na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto com hamsters sírios cronicamente infectados com *T. cruzi*, com idade entre 6 a 10 meses, sugerem que a disfunção sistólica e as alterações morfológicas do VE ocorrem de forma tardia, após um período de quiescência da doença, o que acontece de forma semelhante em humanos com CCC (Oliveira *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que este modelo animal se torna bastante útil para estudos de correlação de achados funcionais e morfológicos devido a extensa variedade de comprometimento da função cardíaca e danos histológicos, ou seja, é possível encontrar animais com função sistólica normal ou mínimo comprometimento, até animais com grave e importante disfunção cardíaca.

Estudo conduzido na FMRP-USP, utilizando o modelo experimental de CCC no hamster mostrou que alterações da mobilidade parietal segmentar são frequentes em fases intermediárias de evolução da CCC, encontrando-se correlação

topográfica significativa dessas alterações regionais da função miocárdica com alterações inflamatórias e não com fibrose regional (Oliviera et al. 2016).

Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, (Oliveira et al. 2018), utilizando o modelo experimental de hamsters sírios cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, com a finalidade de investigar as alterações histológicas relacionadas aos defeitos de perfusão detectadas *in vivo* mediante emprego da cintilografia miocárdica de perfusão pelo método tomográfico de emissão de alta resolução (SPECT) com Sestamibi-Tc99m. Os resultados dessa pesquisa mostraram defeitos perfusionais miocárdicos graves em repouso em cerca de 50% dos animais após 8 meses de infecção. Essas regiões com defeito de perfusão se correlacionaram topograficamente com alterações da mobilidade parietal segmentar do ventrículo esquerdo detectadas pelo emprego da ecocardiografia. Adicionalmente, observou-se que as áreas com defeitos de perfusão miocárdica em repouso não exibiam correlação topográfica com fibrose regional transmural, porém apresentavam maior intensidade de infiltrado inflamatório, confirmados por achados histológicos e por imagens *in vivo* utilizando FDG-PET. Esses resultados indicaram que as alterações de perfusão miocárdica em repouso encontradas nesse grupo de animais correspondam a miocárdio viável exibindo hipoperfusão persistente em repouso correspondendo à isquemia miocárdica.

Outro estudo realizado na FMRP-USP estudou animais cronicamente infectados com *T. cruzi* e tratados com dipiridamol, agente vasodilatador da microcirculação coronariana e anti-agregante plaquetário (Tanaka et al., 2018). Os animais foram divididos em dois grupos: grupo placebo e grupo tratado com dipiridamol. Os grupos foram tratados com salina ou dipiridamol durante 30 dias. Os resultados demonstraram que os defeitos de perfusão em hamsters são frequentes e precedem o desenvolvimento da função sistólica do VE. Entretanto, as áreas com tais defeitos perfusionais não estavam topograficamente relacionadas com a fibrose miocárdica transmural regional na histopatologia. A administração do dipiradamol foi associada a uma significativa redução dos defeitos de perfusão miocárdica em repouso, o que reforçou a noção de que as áreas de defeito de captação de sestamibi corresponderiam à miocárdio viável e hipoperfundido (Tanaka et al., 2018).

Vale ressaltar aqui que os estudos experimentais citados acima que investigaram imagens perfusionais *in vivo*, limitaram-se a investigar a presença de

distúrbios perfusionais em repouso, analisando as correlações desses achados com outras alterações funcionais e histopatológicas.

No cenário clínico, a demonstração de disfunção microvascular por meio do emprego do método cintilográfico é classicamente definida a partir de imagens adquiridas nas condições de estresse e repouso, permitindo dessa forma a detecção de regiões miocárdicas com defeitos perfusionais reversíveis, ou seja, detectáveis no estresse, mas ausentes no repouso, na vigência de artérias coronárias angiograficamente normais. É plausível supor que também no cenário das correlações histopatológicas e funcionais no modelo experimental de CCC no hamster, a investigação de defeitos perfusionais reversíveis, além do que se pode avaliar em repouso, poderia estender de forma muito significativa o nosso entendimento sobre a participação da isquemia microvascular no contexto da fisiopatologia da CCC.

Contudo, ainda que sejam muito relevantes para o entendimento da fisiopatologia da CCC, estudos envolvendo o emprego imagens cintilográficas de perfusão em estresse e repouso em modelos experimentais de CCC em pequenos roedores ainda não foram relatados na literatura médica especializada.

Vale ressaltar aqui que estudos recentes utilizando imagens de alta resolução utilizando a técnica de Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) em equipamentos dedicados (micro-PET), tem demonstrado a exequibilidade da investigação da perfusão miocárdica de forma não invasiva em pequenos roedores, incluindo investigação em estresse e repouso (Thackeray, *et al.*, 2015). Contudo, o uso das técnicas de SPECT de alta resolução são mais limitadas e no melhor do nosso entendimento, não há estudos utilizando imagens de perfusão miocárdica por esta técnica em modelos experimentais de miocardiopatia em pequenos roedores

1.5. Isquemia miocárdica e métodos para sua indução

Na situação fisiológica, a circulação coronariana permite adequar o fluxo sanguíneo miocárdico, e, portanto, a oferta de oxigênio às necessidades metabólicas do miocárdio, por meio do controle da resistência microvascular coronária, onde o endotélio da microcirculação desempenha um papel importante ao liberar várias substâncias vasodilatadoras (Shimokawa, H., & Yasuda, S. 2008). Dessa forma, aumento do trabalho cardíaco e, conseqüentemente, do consumo de

oxigênio miocárdico durante estresse acopla-se a aumento do fluxo sanguíneo miocárdico fundamentalmente pela vasodilatação dos vasos de resistência da microcirculação coronária, induzida pela liberação de adenosina, um potente vasodilatador endógeno.

Contudo, em situações patológicas pode ocorrer desequilíbrio deste mecanismo de acoplamento, com redução relativa do fluxo sanguíneo miocárdico e da oferta de oxigênio frente a situações de aumento da demanda de oxigênio do miocárdio, caracterizando a isquemia miocárdica (Braunwald E., 2000). A isquemia miocárdica pode acarretar repercussões sobre a função cardíaca, como disfunção diastólica e sistólica, bem como sintomas como angina e dispneia aos esforços (Vasan, *et al.*, 1999). Em situações de isquemia mais grave ou continuada, pode ocorrer lesão e necrose dos cardiomiócitos levando a regiões de infarto miocárdico (Topol, E, Yadav, J., 2000).

A situação mais comumente associada à isquemia miocárdica na prática clínica é a doença arterial coronária aterosclerótica, em que uma obstrução luminal significativa de artérias subepicárdicas coronárias pode limitar o aumento de fluxo sanguíneo miocárdico frente ao aumento de consumo miocárdico de oxigênio durante o exercício físico (Hackam, Anand, 2003). Na angina microvascular, a mesma situação de limitação de aumento de fluxo sanguíneo miocárdico pode ocorrer durante estresse, mas decorrente da disfunção da microcirculação arterial coronária que não permite vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo coronário (Chauan, 1995).

Nas últimas décadas, muito conhecimento se acumulou sobre o emprego de métodos de imagem para detecção de forma não invasiva da isquemia miocárdica, principalmente como método de triagem para detecção de doença arterial coronária e para avaliação do significado funcional de lesões obstrutivas coronárias ateroscleróticas (Kocke, *et al.*, 2003).

No cenário clínico da isquemia microvascular, vários métodos de imagem também se mostraram efetivos em mostrar a limitação da reserva vasodilatadora coronária, como a ressonância nuclear magnética, a ecodopplercardiografia e a cintilografia miocárdica de perfusão. Em todas essas técnicas, emprega-se um método provocativo para aumento do consumo miocárdico de oxigênio e eventual indução de isquemia miocárdica. Ainda que esforço físico seja o método padrão, em algumas situações pode-se utilizar métodos alternativos como o estímulo dos

receptores beta-adrenérgicos, mediante infusão endovenosa de dobutamina (Dolan *et al.*, 2001). Em ambas as situações, esforço físico e dobutamina, o aumento do consumo miocárdico de oxigênio pode ser estimado pelo aumento do duplo produto entre a frequência cardíaca e a pressão arterial sistólica (La Canna *et al.*, 1994).

Vale lembrar que algumas drogas vasodilatadoras da microcirculação coronária, dipiridamol e adenosina, podem também ser empregados como testes farmacológicos para detecção de redução da reserva vasodilatadora coronária e são também empregadas como testes de estresse farmacológico (Picano, *et al.*, 2000).

No cenário dos estudos experimentais em pequenos roedores, o emprego de estresse farmacológico, particularmente com dobutamina, torna-se a opção preferencial como teste provocativo de isquemia miocárdica, pela sua praticidade e questões logísticas de manejo de pequenos animais.

1.6. Teste de estresse farmacológico com dobutamina

A dobutamina é uma catecolamina sintética desenvolvida nos anos 70, com atividade predominante de agonista de receptores adrenérgicos beta-1, aumentando o inotropismo e cronotropismo cardíacos (Ruffolo *et al.*, 1981), sendo inicialmente utilizada no tratamento do choque cardiogênico e insuficiência cardíaca aguda (Connors, *et al.*, 1996). Posteriormente, descreveu-se seu emprego como estratégia farmacológica para provocar aumento do consumo miocárdico de oxigênio em testes provocativos de isquemia miocárdica (Burger, *et al.*, 2000).

No cenário clínico, o protocolo padrão de teste provocativo de isquemia utilizando métodos de imagem como o ecocardiograma ou SPECT de perfusão consiste na infusão de dobutamina na dose inicial de 5 mcg/kg/min, com incrementos para 10, 20, 30 e 40 mcg/kg/min, a cada 3 minutos. Durante todo o exame, os sintomas do paciente, o ritmo e frequência cardíaca são monitorizados, assim como a pressão arterial e o eletrocardiograma de 12 derivações são registrados a cada estágio da infusão da droga (Candell-Riera, *et al.*, 2008).

Em animais saudáveis, a dobutamina primariamente aumenta o volume sistólico e o débito cardíaco, por conta de seus efeitos inotrópicos positivos. O débito cardíaco aumentado induz à elevação da pressão arterial e a uma diminuição reflexa da resistência vascular sistêmica (Robie N.W. *et al.*, 1974; Ruffolo, R., Ruffolo Jr.; Messick, K., 1985).

No cenário experimental, estudos trazem o uso do fármaco em ratos, porcos e cães (Parker, *et al.*, 2014; Reant, *et al.*, 2010; Hazari *et al.*, 2012). Schmidt *et al.* (2001), comparou os efeitos da dobutamina, dipiridamol e ecocardiografia de estresse para detecção de isquemia miocárdica em cães por meio da angiografia coronária. Os autores induziram a isquemia através de estenose coronariana. As doses de dobutamina foram infundidas a partir de 5 à 40 µg/kg/min. O teste de estresse com dobutamina e dipiridamol demonstraram sensibilidade parecida para a detecção de isquemia, enquanto o teste de esforço foi menos sensível.

Em artigo recente, o teste de estresse com dobutamina foi utilizado em modelo experimental para avaliar a reserva de fluxo coronariano em modelo de isquemia e reperfusão em ratos, usando ecocardiografia com doppler transtorácico. Para medir a velocidade máxima do fluxo coronário na artéria descendente anterior, durante o estresse, o animal foi anestesiado com isoflurano e dobutamina administrada uma dose de 20 µg/kg/min pela veia da cauda por até 8 minutos, com monitoramento contínuo da frequência cardíaca. Os resultados deste estudo mostraram que, embora a função sistólica tenha sido preservada após a reperfusão, a reserva de fluxo coronariano foi significativamente menor, confirmando que a presença de disfunção microvascular coronária neste modelo de isquemia/reperfusão. (Kelm, N.Q., J.E., Beare, J.E., LeBlanc, A.J, 2019)

Após extensa busca na literatura médica especializada, não encontramos descrições do uso da dobutamina em hamsters sírio teste de estresse para provocação de isquemia miocárdica.

Desta forma, o presente estudo se propôs a padronizar um teste de estresse farmacológico com dobutamina em hamsters sírios e utilizá-lo para investigação de isquemia miocárdica em hamsters com CCC, utilizando imagens de cintilografia miocárdica de alta-resolução.

Objetivos

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é padronizar um protocolo de estresse farmacológico com uso de dobutamina em hamsters sírios, adequado para aquisição de imagens cintilográficas de perfusão miocárdica.

2.2. Objetivos específicos

- Obter uma curva “dose-resposta” do efeito da infusão endovenosa de dobutamina sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca em hamsters sírios normais;
- A partir dos dados obtidos a partir da curva de dose-resposta, estabelecer uma taxa de infusão de dobutamina a ser empregada em hamsters para obtenção de imagens de perfusão miocárdica in vivo;
- Investigar a detecção de defeitos cintilográficos de perfusão miocárdica reversíveis em hamsters sírios cronicamente infectados com *T cruzi*.

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.0. Animais experimentais

Após a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, os experimentos foram realizados em hamsters 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 livre acesso a água e ração padrão, submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra.

Os animais do grupo chagásico foram infectados intraperitonealmente com $3,5 \times 10^4$ formas de *T.cruzi*. Os animais controles foram injetados com solução salina em igual volume.

3.1. Delineamento geral do estudo

O presente estudo se desdobrou em várias etapas sucessivas, conforme os objetivos específicos previamente delineados.

Etapa 1 - Inicialmente, procedemos à obtenção de uma curva dose-resposta da pressão arterial e da frequência cardíaca em hamsters sírios controles, para conhecimento da resposta fisiológica desses animais durante a infusão de dobutamina. Nesta etapa, utilizamos 8 animais controles.

Etapa 2-A - Após a análise da curva dose-resposta, foi escolhida a dose estimada em que se atingiu o platô de resposta ($17,5 \mu\text{g/Kg/min}$) e a seguir aplicada em 7 animais controles, recebendo infusão contínua em doses crescentes de 2,5 a $17,5 \mu\text{g/Kg/min}$. Esses animais realizaram exame de cintilografia de perfusão miocárdica em repouso, antes da infusão de dobutamina, e em estresse com dobutamina, com intervalo de uma semana entre as imagens.

Etapa 2-B - Após análise das imagens de perfusão miocárdica in vivo e da curva de resposta da FC da etapa anterior, foi realizada a infusão de dobutamina com dose de $12,5 \mu\text{g/Kg/min}$ em 3 animais controles para registro da pressão arterial e da frequência cardíaca. Nesta etapa também foi realizada a aquisição de imagens cintilográficas de perfusão em repouso e estresse.

Etapa 3 - Ao final do protocolo de padronização do teste de estresse com dobutamina na dose julgada ideal, 25 hamsters sírios chagásicos foram submetidos a infusão de dobutamina com a dose única de 12,5 $\mu\text{g/Kg/min}$, com aquisição de imagens de cintilografia de perfusão miocárdica em repouso e em estresse.

3.2. Descrição das etapas e experimentos

3.2.1. Etapa 1

A princípio, foi realizada cirurgia para canulação da artéria carótida e veia jugular em 8 animais controles normais para obtenção da curva dose-resposta de dobutamina. Para isso, os animais foram anestesiados mediante injeção intramuscular de mistura de ketamina e xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente), seguindo-se o procedimento cirúrgico de dissecação e introdução de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm conectadas a uma peça de PE-50 com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram posicionadas no interior da artéria carótida para registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC), e da veia jugular para administração da dobutamina. Os parâmetros foram registrados em repouso durante 3 minutos.

A dobutamina foi infundida em doses crescentes, de 2,5 a 40 $\mu\text{g/min}$ em estágios de 3 minutos e registro contínuo da resposta da PA e da FC, mediante emprego de bomba de infusão Harvard Apparatus, Infusion/Withdrawal Pump, Modelo 944. Os dados foram registrados através do software Windaq® e analisados a partir do uso do programa LabChart®.

Após o registro dos dados, os animais foram suturados, com administração de 0,1 ml de dipirona injetável para controle da dor e observados no biotério do departamento de Clínica Médica.

3.2.2. Etapa 2-A

Nesta etapa, 7 animais controles foram avaliados. Imagens de perfusão miocárdica através da cintilografia de alta resolução (SPECT) foram obtidas inicialmente na condição de repouso. Para a aquisição em repouso, os animais foram anestesiados com isoflurano a 3% por 1 minuto e realizada a injeção de 555

MBq de Sestamibi-Tc-99m, por via sublingual. Em seguida, foi permitido que os animais acordassem do efeito da anestesia. Após 90 minutos da injeção do radiofármaco, os animais foram novamente anestesiados mediante injeção intramuscular de mistura de ketamina e xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente), por via intramuscular e posicionados no sistema para a aquisição de imagens.

Uma semana após a aquisição das imagens em repouso, o grupo foi submetido a infusão de dobutamina seguindo o mesmo protocolo de canulação descrito anteriormente para registro de PA, FC e infusão da dobutamina. As variáveis foram registradas em repouso pré-infusão farmacológica por 3 minutos e as doses de dobutamina foram infundidas de forma crescente, de 2,5 $\mu\text{g}/\text{min}$ a 17,5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$, com estágios de 3 minutos em cada etapa. A dose máxima de 17,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ foi escolhida a partir da identificação de um plateau de resposta da FC na etapa anterior. Após atingir a dose de 17,5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$, foi injetado o Sestamibi-TC99m pela veia sublingual do animal. Em seguida, os animais permaneceram em repouso para registro pós-infusão durante 3 minutos. A aquisição das imagens de SPECT foi realizada após 90 minutos da injeção do radiofármaco e as imagens foram analisadas seguindo os métodos descritos abaixo. Os animais foram submetidos ao sacrifício com retirada de tecido miocárdico assim que concluída a aquisição das imagens de estresse.

Os dados foram registrados através do software Windaq® e analisados a partir do uso do programa LabChart®.

3.2.3. Etapa 2-B

Após análise dos dados colhidos na etapa anterior, em que observou defeitos perfusionais e dilatação cavitária ventricular esquerda nas imagens de SPECT dos animais controles normais, optamos por realizar o registro das curvas de PA e FC em 4 animais controles utilizando uma única dose de dobutamina de 12,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$, infundida por tempo mais curto (1 minuto).

Os animais foram submetidos a avaliação da perfusão miocárdica pela aquisição de imagens de SPECT em repouso, como descrito acima, antes de realizar o protocolo de estresse, com intervalo de uma semana entre os exames.

Para a canulação, foi utilizado o mesmo processo descrito na etapa 1. Nesta etapa, foi registrado repouso pré-infusão por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a

infusão de dobutamina por 1 minuto mediante bomba de infusão com dose de 12,5 µg/kg/min. Após atingir 1 minuto de infusão, foi realizada injeção intravenosa de 15 mCi de Sestamibi-Tc-99m. Logo depois, os animais permaneceram em repouso por mais 3 minutos para registro das variáveis. As imagens cintilográficas em estresse foram adquiridas após 90 minutos da injeção do radiofármaco. Os animais foram submetidos ao sacrifício com retirada de tecido miocárdico assim que concluídas as imagens.

Os dados foram registrados através do software Windaq® e analisados a partir do uso do programa LabChart®.

3.2.4. Etapa 3

Esta etapa constituiu na aplicação da dose única de 12,5 µg/min em 23 animais chagásicos cronicamente infectados com *T.cruzi*, na janela temporal de 6 meses após infecção experimental, e em 10 hamsters controles não chagásicos.

Os animais foram submetidos a avaliação da perfusão miocárdica pela captura de imagens de SPECT em repouso seguindo o mesmo protocolo descrito acima. Após intervalo de uma semana, foi realizado o teste de estresse farmacológico com a dose única estabelecida na etapa 2-B.

Nesta etapa, foi registrada apenas a resposta da frequência cardíaca. Para isso, a dose de 12,5 µg/min de dobutamina foi infundida através da veia safena do animal durante 1 minuto mediante bomba de infusão utilizada durante todo o experimento. Ao atingir o pico da dose, foi injetado o Sestamibi-TC99m por via sublingual. As imagens foram adquiridas após 90 minutos da injeção do radiofármaco. A curva de frequência cardíaca foi obtida através de um eletrocardiograma subcutâneo, registradas pelo software Windaq® e analisadas no programa LabChart®.

3.3. Métodos de imagem

3.3.1. Cintilografia (SPECT) de perfusão miocárdica de alta resolução

3.3.1.1. Sistema de aquisição de imagens tomográficas

A cintilografia de perfusão miocárdica foi realizada em uma gama câmara clínica (BrightView XCT; Philips Medical Inc., Cleveland, Estados Unidos), adaptada a um sistema de blindagem desenvolvido localmente pelo nosso grupo de pesquisa (Mejia *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013). O sistema permite o encaixe de um colimador de orifício simples, com diâmetro de 1,5 mm e ângulo de abertura total de 150° (Figura 1). Esta blindagem é constituída por uma placa de alumínio recoberta por uma manta de chumbo de 6 mm de espessura, adequada para fótons com energia na faixa de 150 keV. De forma complementar, um suporte cilíndrico é utilizado para o posicionamento do animal, acoplado a um sistema motorizado que permite a rotação do animal para diferentes rotações angulares de acordo com o número de projeções a serem capturadas ao longo de 360 graus da aquisição tomográfica. Sincronizada com o protocolo de aquisição dinâmico da gama câmara, a sequência de projeções é registrada e armazenada em formato DICOM.

3.3.1.2. Aquisição de imagens de perfusão miocárdica

Para a aquisição de imagem, os animais foram anestesiados com isoflurano a 3% por 1 minuto e realizado a injeção de Sestabimi-TC99m com uma atividade de 555 MBq de Sestamibi-Tc-99m, por via sublingual. Em seguida, acordaram do efeito da anestesia. Após 90 minutos da injeção do radiofármaco, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente), por via intramuscular e posicionados no sistema para a aquisição de imagens.

Em todos os protocolos que utilizaram a cintilografia de perfusão miocárdica, foram adquiridas 40 projeções, igualmente espaçadas em 360 graus. As projeções foram registradas em uma matriz 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. O tempo de aquisição de cada projeção foi de 30 segundos, totalizando 23 minutos aproximadamente para cada animal.

3.3.1.3. Processamento e análise das imagens

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, foi utilizado um software de 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 e Gambhir, 2003).

As imagens de Sestamibi-Tc99m em repouso foram usadas para definir as regiões com defeito de perfusão miocárdica. Para essa análise, foi utilizando o software MunichHeart® (Munique, Alemanha). O software MunichHeart® permite uma análise completa da distribuição do radiotraçador nas paredes do ventrículo esquerdo. Isto permite uma avaliação semiquantitativa em todos os 13 segmentos do ventrículo esquerdo, aplicável tanto no cenário clínico quanto no experimental.

A análise da perfusão miocárdica foi baseada na construção de mapas polares da distribuição relativa do radiofármaco em relação ao pixel de máxima contagem para avaliação quantitativa (planimetria) das áreas de defeitos, figura 1A. Considerando-se áreas de defeitos aquelas exibindo densidade de contagens abaixo de 2,5 desvios padrões em relação ao valor médio de captação do respectivo pixel obtido em um banco de dados de normalidade de hamsters, figura 1B e 1C. As áreas de defeito foram expressas como área percentual em relação à superfície total do ventrículo esquerdo.

Figura 1 – Mapa polar

Figura 1 - A: Imagem ilustrativa do mapa polar de um animal controle. B: Comparação das áreas de captação do radiotraçador com um banco de dados de animais controles; C: Regiões com limiar de captação abaixo de 2,5 desvios padrões (0%). Fonte: Tanaka, D.M. (2019).

Figura 2- Imagem ilustrativa de um animal controle. A: São representados os raios de varredura utilizados pelo software para a construção do mapa polar. B: São mostrados os cortes representativos das imagens tomográficas (SPECT) obtidas da cavidade ventricular esquerda (basal, médio cavitário e apical) e eixos longos vertical e horizontal, com o mapa polar resultante mostrado na extremidade direita da figura.

Foram considerados defeitos perfusionais reversíveis aqueles detectados nas imagens de estresse, mas não presentes nas imagens obtidas em repouso. Segmentos da parede ventricular esquerda exibindo > 50% de área acometida por defeito reversível foram julgados como segmentos com reversibilidade para uma análise visual topográfica descritiva.

Resultados

4.0. RESULTADOS

4.1. Etapa 1

Na etapa 1, 8 animais controles foram submetidos à infusão farmacológica de dobutamina com doses de 2,5 a 40 $\mu\text{g}/\text{min}$.

Os valores médios de duplo produto ao longo das doses de 2,5 à 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ são apresentados no gráfico 1. As doses de 10, 12,5, 15, 17,5 e 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ apresentaram significamente maiores valores quando comparadas aos valores basais, com $*p<0,05$, (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p=0,0026$).

Gráfico 1 - Curva dose-reposta representando a média do duplo produto dos valores basal à 40 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$ e repouso final dos animais da etapa 1, $p<0,05$.

Os valores médios de frequência cardíaca ao longo das doses de 2,5 à 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ são apresentados no gráfico 2. A partir da infusão de 7,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ todas as doses apresentaram valores significamente maiores quando comparadas com valores basais, com $p<0,001$.

Gráfico 2 - Curva dose-reposta representando a média da frequência cardíaca dos valores basal à 40 ug/ml/min e repouso final dos animais da etapa 1, $p < 0,05$.

Gráfico 3 – Curva dose-resposta representando a média da PAS dos valores basal à 40 $\mu\text{g/kg/min}$ e repouso final dos animais da etapa 1, $p < 0,05$.

No gráfico 3, estão representados os valores da pressão arterial sistólica (PAS). As doses de 17,5 a 40 $\mu\text{g/Kg/min}$ apresentaram valores significativamente menores quando comparado com valores basais, com $p < 0,05$ (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p < 0,001$).

4.2. Etapa 2-A

A - Resposta da FC e da PA:

A partir dos resultados da curva de dose-resposta, levando em consideração principalmente o comportamento da FC, foi escolhida a taxa de infusão de 17,5 $\mu\text{g/Kg/min}$, tomada como sendo a dose em que se atingiu o plateau de resposta. Portanto, na etapa 2-A, 7 animais foram submetidos à infusão farmacológica de dobutamina com doses crescentes de 2,5 à 17,5 $\mu\text{g/Kg/min}$, com 3 minutos de duração da infusão por “degrau” de dose.

Os valores médios de duplo produto das doses 2,5 à 17,5 $\mu\text{g/Kg/min}$ são apresentados no gráfico 4. A dose de 10 à 17,5 $\mu\text{g/kg/min}$ apresentaram grande significância $p < 0,05$ (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p < 0,001$).

Gráfico 4 – Curva dose-resposta representando a média da duplo produto dos valores basal à 17,5 $\mu\text{g/kg/min}$ e repouso final dos animais da etapa 2-A, $p < 0,05$.

Gráfico 5 – Curva dose-resposta representando a média FC dos valores basal à 17,5 µg/kg/min e repouso final dos animais da etapa 2-A, $p < 0,05$.

No gráfico 5, estão representados os valores da FC ao longo das doses de 2,5 a 17,5 µg/kg/min. As doses de 7,5 a 17,5 µg/Kg/min apresentaram valores significativamente maiores quando comparado com valores basais, com $p < 0,05$ (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p < 0,001$).

No gráfico 6, estão representados os valores da PAS ao longo das doses de 2,5 a 17,5 µg/kg/min. As doses apresentaram valores significativamente maiores quando comparado com valores basais, com $p < 0,05$ (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p = 0,0430$).

Gráfico 6 - Curva dose-reposta representando a média da PAS dos valores basal à 17,5 µg/kg/min e repouso final dos animais da etapa 2-A, $p < 0,05$.

B – Análise das imagens

Nesta etapa, as imagens de perfusão com o uso da cintilografia miocárdica foram analisadas de forma visual. Dos 7 animais, 2 foram a óbito antes do início da imagem de estresse. Dos 5 animais que realizaram a infusão de dobutamina seguido das imagens cintilográficas, 4 apresentaram defeitos extensos reversíveis, 3 animais apresentaram dilatação cavitária transitória ventrículo esquerdo e defeito reversível e parede anterior, apical e septal durante o estresse. A figura 3 representa o estudo de perfusão de um animal na condição de repouso e estresse.

Na imagem é possível observar defeito de perfusão reversível em ápice, parede anterior média, anterior apical e lateral-apical, além de dilatação cavitária do ventrículo esquerdo transitória durante as imagens de estresse.

Figura 3 – Imagem representativa do estudo de perfusão miocárdica na condição repouso (A) e estresse (B).

4.3. Etapa 2-B

Na etapa 2-B, 3 animais foram submetidos à infusão farmacológica de dobutamina durante 1 minuto com dose única de 12,5 $\mu\text{g/kg/min}$.

No gráfico 7, estão representados os valores de duplo produto durante 1 minuto de infusão da dose de 12,5 $\mu\text{g/kg/min}$. Os valores de duplo produto do basal comparado com o pico da resposta (1 minuto) e basal comparado com o repouso final apresentaram valores significativamente maiores, com $p < 0,05$ (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p < 0,003$).

Gráfico 7 - Curva dose-reposta representando o duplo produto da dose 12,5 $\mu\text{g/kg/min}$, dos valores basal ao pico de 1 minuto, $p < 0,05$

Os valores da frequência cardíaca durante 1 minuto de infusão com dose de 12,5 $\mu\text{g/kg/min}$ estão representados no gráfico 8. Os valores do pico de resposta foram significativamente maiores comparados com o basal, com $p < 0,05$. (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p = 0,0170$).

Gráfico 8 - Curva dose-reposta representando a FC da dose 12,5 µg/kg/min, dos valores basal ao pico de 1 minuto, $p < 0,05$.

Gráfico 9 - Curva dose-reposta representando a PAS da dose 12,5 µg/kg/min, dos valores basal ao pico de 1 minuto, $p < 0,05$

O gráfico 9 representa a curva dose-resposta da pressão arterial sistólica (PAS) durante a infusão de 12,5 µg/kg/min. Os valores foram significativamente maiores comparados com o basal, com $p < 0,05$ (ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, $p = 0,0278$).

4.4. Etapa 3

Na etapa 3, 23 animais com 8 meses de idade e cronicamente infectados com *T. cruzi* (janela temporal de 6 meses após infecção experimental) foram submetidos à infusão farmacológica de dobutamina durante 1 minuto com dose única de 12,5 ug/ml/min. Também foram investigados 10 hamsters controles normais não infectados.

Nenhum dos 10 controles exibiu defeitos perfusionais reversíveis nas imagens de estresse-repouso.

Dos 23 hamsters chagásicos avaliados, 9 (39%) apresentaram defeitos de perfusão reversíveis. Os segmentos com maior frequência de acometimento foram: ântero-septal-basal (36%), ântero-lateral-basal (36%), ântero-lateral-médio (32%) e apical (27%), gráfico 10.

Gráfico 10 – A: Frequência (%) de acometimento dos segmentos com defeitos de perfusão dos 23 animais na cintilografia de repouso. B: Frequência (%) de acometimentos dos segmentos com defeitos de perfusão dos 23 animais na cintilografia de estresse.

Gráfico 11 – A: Frequência de acometimento dos segmentos com defeitos de perfusão reversíveis no 9 animais chagásicos que exibiram esse tipo de defeito perfusional.

Os valores de FC dos animais nesta etapa foram colhidos através de eletrocardiograma subcutâneo. A curva dose-resposta da frequência cardíaca dos 23 animais chagásicos e controles 10 animais controles estão representados no gráfico 12.

Gráfico 12 – Curva dose-reposta da frequência cardíaca de animais chagásicos e controles durante a infusão da dose única de 12,5 µg/kg/min.

Figura 4: Imagem ilustrativa do mapa polar de um animal chagásico com defeito de perfusão reversível. A: Repouso. B: Estresse.

Discussão

5.0. DISCUSSÃO

Nosso estudo se propôs a validar e padronizar um protocolo de estresse farmacológico com o uso de dobutamina para obtenção de imagens cintilográficas de alta-resolução da perfusão miocárdica em hamsters sírios, além de investigar, a partir do uso desse protocolo de imagem, a existência de defeitos perfusionais reversíveis em hamsters sírios cronicamente infectados com *T cruzi*.

Vale ressaltar aqui, brevemente, a importância desse refinamento metodológico dentro do cenário dos estudos fisiopatológicos envolvendo os distúrbios da microcirculação na CCC.

Estudos em humanos sugerem que a isquemia microvascular coronária possa participar do mecanismo que determina o aparecimento da disfunção miocárdica na fase crônica da doença de Chagas. Achados de estudos clínicos mostram defeitos perfusionais presentes nas imagens de estresse e reversíveis no repouso, na vigência de coronárias normais, em 30 - 50% dos pacientes com CCC com diferentes perfis de gravidade da cardiopatia. (Marin-Neto *et al.*, 1992; Simões, *et al.*, 2000; Hiss, *et al.*, 2009). Além disso, defeitos perfusionais reversíveis são topograficamente relacionados com áreas de dissinergia contrátil regional do ventrículo esquerdo. Essas alterações de perfusão ocorrem precocemente ao longo da evolução da CCC, sugerindo que a isquemia microvascular seja um distúrbio precoce na evolução da doença, podendo estar associado a fenômenos de hibernação ou “stunning” miocárdico, com desenvolvimento tardio de fibrose regional nas regiões acometidas (Simões *et al.*, 2000; Hiss *et al.*, 2009).

Sendo assim, lança-se a hipótese que a isquemia microvascular coronariana possa ocupar um importante papel na fisiopatologia da CCC. Porém, um estudo clínico que contribuísse de forma elucidativa sobre este aspecto encontra um impedimento virtual devido ao longo tempo de seguimento necessário para observar o desenvolvimento da disfunção miocárdica grave a partir da fase indeterminada (20 a 30 anos). Sendo assim, estudos experimentais usando imagens *in vivo* tornam-se alternativa válida e muito atraente para avançarmos no entendimento deste mecanismo fisiopatológico.

Seguindo esse direcionamento, recentemente, nosso grupo de pesquisa produziu contribuições originais empregando imagens cintilográficas de perfusão miocárdica *in vivo* com SPECT de alta-resolução no modelo de CCC no hamster sírio.

Demostramos que os defeitos de perfusão miocárdica em repouso são frequentes na fase crônica da infecção e que esses defeitos se correlacionam com miocárdio vivo exibindo maior intensidade de inflamação, além da correlação com o grau de disfunção sistólica regional e global (Oliveira, *et al.*, 2018). Adicionalmente, mostrou-se também que o emprego prolongado de agente farmacológico com ação vasodilatadora coronária associa-se à significativa reversão desses defeitos de perfusão em repouso, confirmando que essas áreas correspondiam à miocárdio viável com grave hipoperfusão em repouso, vislumbrando-se aqui uma oportunidade terapêutica (Tanaka, *et al.*, 2019).

A limitação metodológica mais evidente dessas peças de conhecimento citadas acima reside no fato de que as informações de perfusão miocárdica estavam restritas à resultados colhidos na condição de repouso. Para que pudéssemos perseguir o mais amplo entendimento sobre o significado da “isquemia microvascular” nos modelos experimentais da CCC, tornava-se fundamental reproduzirmos aquilo que se observa no cenário clínico, ou seja, ampliarmos nossas investigações com a obtenção de imagens em estresse que permitissem a pesquisa de defeitos perfusão reversíveis, classicamente ligados à documentação de “isquemia miocárdica”.

Contudo, a obtenção dessas imagens em estresse esbarra na necessidade de padronização do protocolo de estresse no hamster. No melhor do nosso conhecimento, não havia estudos descritos na literatura médica especializada, até o presente momento, que tenham endereçado a padronização de um teste de estresse farmacológico em hamsters acoplado com obtenção de imagens cintilográficas de perfusão.

A necessidade desta padronização fica clara a partir de observações prévias mostrando que há significativa variabilidade da resposta de parâmetros cardiovasculares a diferentes agentes farmacológicos nas diversas espécies de roedores usadas nos estudos experimentais, mais comumente ratos, camundongos e hamsters. Exemplo vivo disso está espelhado em publicação recente de nosso grupo, mostrando efeitos deferentes daqueles descritos em camundongos e ratos sobre a função sistólica ventricular esquerda de vários anestésicos quando aplicados em hamsters. (Tanaka, *et al.*, 2016).

Os resultados do presente estudo, colhidos na etapa 1, mostraram uma curva dose-resposta da FC a doses crescentes de dobutamina, atingindo um plateau de

resposta estimado na dose de 17,5 $\mu\text{g/Kg/min}$. Essa dose encontra-se um pouco abaixo da dose de 20 $\mu\text{g/Kg/min}$, que foi utilizada em estudos recentes utilizando estresse com dobutamina para investigação da reserva vasodilatadora coronária em ratos utilizando Ecodopplercardiografia, (Kelm et al 2019) e mais previamente em estudos de perfusão com micro-PET (Croteau et al., 2004). Sugerindo uma maior sensibilidade do hamster ao estímulo adrenérgico produzido pela dobutamina, ainda que não tenhamos realizadas comparações diretas com a resposta de outros roedores no nosso estudo.

Vale ressaltar que nesta etapa nos baseamos mais propriamente na resposta da FC para escolher a dose de plateau, a ser usada na etapa seguinte do projeto, por 2 motivos. Inicialmente, porque a FC seria a única variável a ser monitorada nas etapas tardias do projeto, e em estudos longitudinais no futuro, em que não seria possível a canulação arterial dos animais que teriam que sobreviver após a instrumentação. Adicionalmente, a resposta do duplo produto durante infusão continuada de dobutamina encontrava-se atenuada em doses mais altas, principalmente pelo efeito de queda da PA que apresenta queda nas doses crescentes a partir de 10 micg/Kg/min . Comportamento diverso daquele observado na FC que se elevava até doses mais altas, mantendo-se em plateau, sem comportamento de queda em doses mais altas. É curioso observar que esse efeito sobre a PA não ocorreu quando nas etapas seguintes do estudo a dobutamina foi infundida em dose única durante 1 minuto, em que se observou resposta mais uniforme de aumento significativo da PA e, conseqüentemente, do duplo produto. É provável que essa queda progressiva da PA reflita o efeito da dobutamina na vasculatura venosa que predomina em doses mais altas, produzindo vasodilatação, com redução do retorno venoso e conseqüente queda do volume de ejeção sistólica e da pressão sistólica (Schmidt et al. 2001). Vale lembrar que esse efeito foi percebido nos hamsters em doses relativamente baixas, o que reforça a noção de que essa espécie de roedor é mais sensível à ação da dobutamina.

A etapa seguinte do projeto (2-A) consistiu na infusão de doses crescentes, com aumento a cada 3 minutos, até a dose de 17,5 micg/Kg/min , incluindo agora a importante observação do resultado do estresse farmacológico sobre as imagens cintilográficas de perfusão. É importante ressaltar aqui a importância da monitoração dos efeitos do estresse farmacológico sobre as imagens de perfusão nos animais controles normais, da forma como foi desenhado nosso projeto. Fica claro que

espera-se que, em animais controles sadios, o estresse farmacológico não induza defeitos reversíveis ou dilatação cavitária ventricular esquerda transitória (marcador de disfunção isquêmica).

De fato, nesse cenário, a padronização de uma dose adequada de agente adrenérgico, como a dobutamina, para obtenção de imagens de perfusão, não requer apenas documentarmos uma elevação significativa da FC, ou mais propriamente do duplo produto, mas também nos certificarmos que a dose infundida não cause danos miocárdico agudo, semelhante ao que se observa na miocardiopatia induzida por catecolaminas, que possa tornar-se fator confundidor na interpretação futura dos resultados (Akashi, *et al.*, 2008).

Um exemplo clássico de que o estímulo exagerado de catecolaminas possa induzir disfunção miocárdica que está associada a alterações da microcirculação coronária foi colhida pelo nosso grupo de pesquisa em estudo clínico em crianças vítimas de acidente escorpiônico grave com disfunção cardíaca, cujo mecanismo envolve intensa liberação de catecolaminas endógenas induzida pelo veneno do escorpião amarelo (*Titius serrulatus*), como uma verdadeira “tempestade adrenérgica” (Figueiredo *et al.* 2010). Nesse estudo encontramos significativa correlação topográfica entre os distúrbios da perfusão miocárdica regional em repouso detectados por SPECT e a disfunção contrátil do ventrículo esquerdo nas fases iniciais do escorpionismo grave. A indução de isquemia miocárdica pelo estímulo excessivo de catecolaminas neste cenário pode ocorrer tanto do intenso aumento do consumo miocárdico de oxigênio como pelo espasmo coronário e/ou vasoconstrição da microcirculação. Os achados deste estudo reforçam que as catecolaminas agem localmente, produzindo constrição microvascular, isquemia e “stunning miocárdico”, sendo considerado um modelo de miocardiopatia de estresse ou catecolaminogênica (Figueiredo, *et al.*, 2010).

Na etapa 2-A da validação do protocolo de estresse, com doses de dobutamina incrementais de 2,5 a 17,5 µg/kg/min, obtivemos sucesso em elevarmos a FC para valores pico semelhantes ao que obtivemos na curva inicial de dose-resposta da fase 1. Contudo, ao realizarmos a análise visual das imagens cintilográficas, detectamos a presença de significativa proporção de defeitos perfusionais reversíveis. Dos 7 hamsters efetivamente investigados nesta etapa, 5 animais apresentaram defeitos de perfusão reversíveis e extensos e associados à presença de dilatação cavitária ventricular esquerda transitória durante estresse. Esses

achados, foram indicativos de que a dose da infusão da dobutamina para o teste de estresse foi excessiva, induzindo disfunção microvascular e disfunção miocárdica nos animais controle sadios.

A interpretação de que as doses infundidas na etapa 2-A foram excessivas, também se baseia nos desfechos observados após o teste de estresse. Observamos que 4 animais morreram após o fim da infusão e 4 hamsters foram observados durante o período de 1 semana. Desses animais, 3 apresentaram sinais sugestivos de desenvolvimento de insuficiência cardíaca (edema de patas, ascite, respiração ofegante, inatividade). Infelizmente, não foi possível programar um estudo necroscópico dos animais devido à rápida evolução do quadro.

Para contornarmos essa dificuldade, optamos por modificar a forma de infusão da dobutamina, fazendo uma única dose infundida em prazo mais curto, de forma a reduzir os efeitos do hiperestímulo de catecolaminas e evitar a lesão miocárdica.

Dessa forma, na etapa 2-B, utilizamos uma dose única de infusão de dobutamina de 12,5 µg/kg/min ao longo de 1 minuto. Com esse protocolo, os animais controles apresentaram aumento da FC comparável ao que se observou na dose máxima de dobutamina infundida nas etapas anteriores. Por outro lado, a resposta da PAS foi mais consistente com aumento significativo, levando a significativo aumento do duplo produto. Essa dose mostrou esses efeitos de aumento do duplo produto, sem induzir defeitos de perfusão nas imagens de cintilografia. Portanto, o objetivo de estabelecermos uma dose adequada e segura de dobutamina para hamsters controles foi atingida nesta fase de padronização do protocolo de estresse farmacológico.

A seguir, na etapa 3, foi empregada a dose de dobutamina de 12,5 µg/kg/min durante 1 minuto de infusão em hamsters sírios cronicamente infectados com *T. cruzi*, para documentarmos a eventual ocorrência de defeitos perfusionais isquêmicos.

A resposta observada da FC nos animais chagásicos mostra que o estresse farmacológico foi efetivo, com aumento bastante significativo da FC, comparável ao que se observou nos animais controles não chagásicos. Vale chamar atenção aqui que a curva de resposta da FC nos animais chagásicos se diferencia da curva obtida nos controles na fase de recuperação após o término da infusão da dobutamina. Nesta fase, a FC dos animais chagásicos leva mais tempo para retornar aos valores basais. É plausível supor que esse comportamento seja reflexo da desnervação

parassimpática predominante na CCC que pode levar a um menor tônus vagal e menor bradicardia após cessado o efeito simpático da infusão da dobutamina (Guzzetti, *et al.*, 1991).

Vale ressaltar que não registramos complicações agudas e mortalidade imediatamente em seguida do emprego desse protocolo de estresse com dobutamina nos animais chagásicos, atestando a sua segurança.

Do total de 23 animais chagásicos com 8 meses de idade, 9 (39%) animais apresentaram defeitos de perfusão reversíveis predominando em frequência em segmentos apicais e da parede ântero-lateral e inferior. Esses resultados espelham de forma bastante aproximada a frequência esperada de defeitos reversíveis nesta fase de evolução da CCC, já que estudos clínicos mostram que 30 a 50% dos pacientes investigados apresentam defeitos de perfusão isquêmicos. (Marin-Neto *et al.*, 1992; Simões, *et al.*, 2000; Hiss, *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a distribuição topográfica dos defeitos reversíveis nos segmentos da parede do ventrículo esquerdo retratam de forma muito próxima o que se observa na CCC de humanos. De fato, vários estudos clínicos utilizando a cintilografia de perfusão em pacientes com CCC mostram o predomínio dos defeitos de perfusão reversíveis nos segmentos da região apical, da parede inferior e pósterio-lateral (Marin-Neto *et al.* 1992, Simoes *et al.* 2000, Hiss *et al.* 2009).

Conclusão

6.0. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que hamsters sírios são particularmente sensíveis aos efeitos deletérios de doses altas de catecolamina, desenvolvendo defeitos perfusionais isquêmicos e disfunção miocárdica transitória em regimes de infusão de dobutamina utilizados rotineiramente como teste de estresse para obtenção de imagens cardiovasculares em outras espécies de roedores em que não se observam evidências de lesão miocárdica.

O protocolo especialmente padronizado no nosso projeto se mostrou efetivo em produzir aumento significativo da FC e da PA em animais controles normais, sem produzir defeitos perfusionais isquêmicos ou sinais de disfunção miocárdica transitória durante o estresse.

O emprego desse protocolo de estresse com dobutamina foi capaz de induzir defeitos perfusionais reversíveis em significativa proporção de animais cronicamente infectados pelo T cruzi, em taxas e topografia de acometimento dentro do que se tem descrito nos estudos cintilográficos conduzidos no cenário clínico.

Referências Bibliográficas

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akashi Y, *et al.* Takotsubo cardiomyopathy: a new form of acute, reversible heart failure. *Circulation*. 2008;118(25):2754-62. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106400>

Braunwald E. Myocardial oxygen consumption: the quest for its determinants and some clinical fallout. *J Am Coll Cardiol* 35: 45B-48B, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757368>

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/pubmed/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/pubmed/14554253>.

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: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23113506>.

Burger A, Notarianni M, Aronson D. Safety and efficacy of an accelerated dobutamine stress echocardiography protocol in the evaluation of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000;86:825-29. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11024395>

Candell-Riera J, Romero-Farina G, Milá M, et al. Low-dose dobutamine gated-SPECT analysis of left ventricular segmental wall thickening in ischemic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol*. 2008; 61:1061-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18817682>

CHAUHAN A, Mullins PA, Petch MC, Schofield PM. Is coronary flow reserve in response to papaverine really normal in syndrome X? *Circulation* 1994; 89: 1.998-2.004. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.89.5.1998>

CONNORS AFJ, Speroff T, Dawson NV, et al. The effectiveness of right heart catheterization in the initial care of critically ill patients. *JAMA* 1996; 276:889-97. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782638>

DE 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/pubmed/12050602>.

DIAS J. C. P et al. II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2015. *Epidemiol Serv Saúde* [internet]. 2016 jun; 25(núm. esp.): 7-86. v25nspe/2237-9622-ress-25-esp-00007.pdf. doi: 0.5123/ S1679-49742016000500002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ress/>.

DOLAN MS, *et al.* Effect of intravenous contrast for left ventricular opacification and border definition on sensitivity and specificity of dobutamine stress echocardiography compared with coronary angiography in technically difficult patients. *Am Heart J*. 2001; 142: 908-15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685180>

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/pubmed/3985268>.

FIGUEIREDO, Alexandre Baldini de; CUPO, Palmira; PINTYA, Antonio O.; *et al.* Avaliação da perfusão e função miocárdicas em vítimas de escorpionismo utilizando o Gated-SPECT. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, São Paulo, v. 94, n. 4, p. 444-451, 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/abc/v94n4/v94n4a03.pdf>.
782x2010000400003.

DOI: 10.1590/s0066-

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/pubmed/19825107>.

GUZZETTI, S. *et al.*, Impaired heart rate variability in patients with chronic Chagas' disease. *Am Heart J*. 1991 Jun;121(6 Pt 1):1727-34. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1903581>

HACKAM GD, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003;290:932-40. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928471>

HAZARI, M.S. *et al.* Dobutamine "Stress" Test and Latent Cardiac Susceptibility to Inhaled Diesel Exhaust in Normal and Hypertensive Rats. *Environ Health Perspect* 120:1088–1093 (2012). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22543081>

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/pubmed/1870649>.

HIGUCHI, M. L. Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. *São Paulo Medical Journal*, v. 113, n. 2, p. 821-825, 1995.

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/pubmed/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: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356551>.

KELM, N.Q., Beare, J.E., LeBlanc, A.J. Evaluation of Coronary Flow Reserve After Myocardial Ischemia Reperfusion in Rats. J. Vis. Exp. (148), e59406, doi: 10.3791/59406 (2019). Disponível em: <https://www.jove.com/video/59406>

KLOCKE F.J., *et al.* ACC/AHA/ASNC guidelines for the clinical use of cardiac radionuclide imaging—executive summary: a report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASNC Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Clinical Use of Cardiac Radionuclide Imaging). Circulation 2003;108:1404–18. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522503>

LA CANNA G, *et al.* Echocardiography during infusion of dobutamine for identification of reversible dysfunction in patients with chronic coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 1994; 23: 617-26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113543>

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/pubmed/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/pubmed/1546653>.

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, n. 5, p. 536-41, Sep-Oct 2013. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23904079>.

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 414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085887>

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753454>.

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: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770163>.

OLIVEIRA, L. F. 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/pubmed/23917507>.

OLIVEIRA, L. F. L. et al. Histopathological Correlates of Global and Segmental Left Ventricular Systolic Dysfunction in Experimental Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Journal American Heart Association*, 2016.

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

PARKER, K.M. *et al.* Comparison of Quantitative Wall-Motion Analysis and Strain for Detection of Coronary Stenosis with Three-Dimensional Dobutamine Stress Echocardiography. AHA Predoctoral Fellowship (KMP) and NIH R01 HL-085160

(JWH). August 2, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4415736/>

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/pubmed/16612471>.

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/pubmed/11871482>.

PEREZ-MOLINA, J. A. et al. Guidelines on the treatment of chronic coinfection by *Trypanosoma cruzi* and HIV outside endemic areas. *HIV Clin Trials*, v. 12, n. 6, p. 287-98, Nov-Dec 2011. ISSN 1528-4336 (Print) 1528-4336.

PICANO E, *et al.* The comparable diagnostic accuracies of dobutamine-stress and dipyridamole-stress echocardiographies: a meta-analysis. *Coron Artery Dis*. 2000; 11 (2): 151-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758817>

REANT, P. *et al.* Quantitative Analysis of Function and Perfusion during Dobutamine Stress in the Detection of Coronary Stenoses: Two-Dimensional Strain and Contrast Echocardiography Investigations. *Am Soc Echocardiogr* 2010;23:95-103. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962857>

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: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612022>.

RIBEIRO, A. L. et al. Electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositive and seronegative former blood donors. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 2, p. e2078, 2013. ISS 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469305>.

RODRIGUEZ-GUARDADO, A. et al. Screening for Chagas' disease in HIV-positive immigrants from endemic areas. *Epidemiol Infect*, v. 139, n. 4, p. 539-43, Apr 2011. ISSN 0950-2688.

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/pubmed/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/pubmed/6230012>.

RUFFOLO RR Jr, Spradlin TA, Pollock GD, Waddell JE, Murphy PJ. Alpha and beta adrenergic effects of the stereoisomers of dobutamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;219(2):447-52. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6270308>

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/pubmed/11053710>.

SCHMIDT, A. et al. Is Left ventricular diastolic thickening documented during dobutamine and pacing stress echocardiography related to myocardial ischemia? An animal model study. *Echocardiography: A Jnl. of CV Ultrasound & Allied Tech*, Vol. 19, No. 1, 2002. Doi:10.1046/j.1540-8175.2002.t01-1-00007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884250>.

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: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29392628>.

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>.

Thackeray *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. (Eletronic) 1619-7070 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25112398?dopt=Citation>

Topol EJ, Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation* 2000; 101:570-80. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662756>

TORRES, C. M. Arteriosclerosis of the fine arterial branches of the myocardium (Chagas' coronaritis) & focal myocytolysis in chronic Chagas' heart disease. *Hospital (Rio J)*, v. 54, n. 5, p. 597-610, Nov 1958. ISSN 0018-5469 (Print) 0018-5469 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13610337>.

_____. 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: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13777558>.

Vasan RS *et al.*, Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 1948-55. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2004000500014

WHO. Handbook for Guideline development. (2014). Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/145714>.

Anexo

8.0. Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Padronização de protocolo de estresse cardíaco com dobutamina em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters*”, registrado com o número **218/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 24 de abril de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 hamsters Sírio-Golden fêmeas pesando 140g oriundos da ANILAB. Vigência da autorização: 24/04/2017 a 20/03/2019.

We certify that the Protocol *nº 218/2016*, entitled “*Standardization of cardiac stress protocol with dobutamine in a model of chronic chagasic cardiomyopathy in hamsters*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 04/24/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 female Sírio-Golden hamsters weighing 140g from ANILAB. This certificate is valid until 03/20/2018.

Ribeirão Preto, 24 de abril de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP