UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Luciano Fonseca Lemos de Oliveira

Estudo da perfusão miocárdica e da função sistólica
ventricular esquerda no modelo de cardiomiopatia chagásica
crônica no hamster, utilizando-se imagens *in vivo* de alta
resolução

Ribeirão Preto

2014

Luciano Fonseca Lemos de Oliveira

Estudo da perfusão miocárdica e da função sistólica ventricular esquerda no modelo de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster, utilizando-se imagens *in vivo* de alta resolução

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

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões

Ribeirão Preto

2014

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

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Oliveira, Luciano Fonseca Lemos de

Estudo da perfusão miocárdica e da função sistólica ventricular esquerda no modelo de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster, utilizando-se imagens *in vivo* de alta resolução. Ribeirão Preto, 2014.

92 p.: 12 il.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões

1. Miocardiopatia chagásica 2. Cintilografia miocárdica 3. Modelo experimental

Nome: OLIVEIRA, Luciano Fonseca Lemos de

Título: Estudo da perfusão miocárdica e da função sistólica ventricular esquerda no modelo de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster, utilizando-se imagens *in vivo* de alta resolução

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Prof. Dr:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

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

Agradeço,

À minha família,

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinícius,

Aos meus colaboradores de pesquisa, Prof^a. Dr^a. Minna Moreira Dias Romano, Dr. Jorge Mejia, Prof^a. Dr^a Maria de Lourdes Higuchi, Prf. Dr. João Santana da Silva, Ms. Eduardo Carvalho, Fernando Fonseca, Silvia Ruiz,

Aos funcionários do biotério do departamento de Clínica Médica,

Aos funcionários da Divisão de Cardiologia e da Medicina Nuclear em especial à Joseane Souza,

Aos funcionários da oficina de precisão da USP,

Aos amigos que moraram comigo na república Casa de Família durante essa trajetória Bernardo, Olavo, Luiz, Eduardo, Fernando, Rodrigo, Maurício e José Paulo

Aos meus colegas e amigos.

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

Emmanuel

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Animal sedado, submetido à tricotomia e posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização de exame ecocardiográfico 35
- Figura 2 - A- Avaliação da FEVE pelo método Teichholz na janela paraesternal do eixo longo cardíaco; B- Segmentação do VE em 13 segmentos. Apical (AP), anterior basal (AB), anterior médio (AM), ântero-lateral médio (ALM), inferior basal (IB), inferior médio (IM), pósterolateral médio (PLM), septo anterior médio (SAM), septo posterior médio (SPM)..... 36
- Figura 3 - Sistema “mini-Spect” posicionado em uma das duas cabeças da gamma câmara clínica Sopha/DST. (1) –Detector da gama-câmara, (2) – Carro suporte do colimador pinhole, (3) – Suporte rotacional para conter o pequeno animal durante a aquisição acoplado a motor de passo, (4) – Computador pessoal utilizado para processamento e análise das imagens, (5) – Mecanismo eletrônico que controla o motor 37
- Figura 4 – Procedimento cirúrgico para dissecação da veia jugular interna para injeção do radiofármaco 38
- Figura 5 – Mapa polar de perfusão miocárdica de um animal normal ilustrando a segmentação do ventrículo esquerdo. Septo anterior basal (SAB), anterior basal (AB), ântero-lateral basal (ALB) pósterolateral basal (PLB), inferior basal (IB), septo inferior basal (SIB), Septo anterior médio (SAM), anterior médio (AM), ântero-lateral médio (ALM) pósterolateral médio (PLM), inferior médio (IM), septo inferior médio (SIM), apical (AP). 40
- Figura 6 – Análise histopatológica mantendo correlação topográfica com os exames de imagem *in vivo*. Lâmina corada com HE à esquerda e Picrosírius vermelho a direita. 42
- Figura 7 – Ilustração do método Ecocardiográfico de avaliação da FE do VE pelo método Teichholz na janela paraesternal do eixo longo do miocárdio; A- Animal com 6 meses pós infecção demonstrando FE normal (75%); B- Animal com 10 meses pós infecção demonstrando FE reduzida (39%); 49

Figura 8 – Organograma da distribuição dos animais segundo o grau de acometimento da função sistólica regional e global pela análise ecocardiográfica.	51
Figura 9 – A- Imagem de SPECT de perfusão miocárdica de alta resolução evidenciando defeito perfusional grave (<50% de captação) envolvendo 15% da área de superfície do VE nos segmentos apicais e parede pósterolateral. B- Correlação topográfica entre perfusão miocárdica e a histologia mostrando ausência de fibrose transmural nos segmentos topograficamente correspondentes aos defeitos perfusionais	55
Figura 10 - Análise qualitativa visual em um animal controle (A), animal infectado sem DP ou AMP (B), animal infectado com DP (C), animal infectado apresentando disfunção de ventricular esquerda (D).	59
Figura 11 - Cortes histopatológicos: A – miocardite focal subepicárdica; B – miocardite focal perivascular; C – miocardite difusa e perivascular; D - miocardite difusa..	60
Figura 12 - Esquema dos principais mecanismos patogênicos na cardiomiopatia chagásica crônica utilizado por Marin-Neto et al. (2007).	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gráficos de barras representando os valores obtidos na análise histopatológica entre os diferentes grupos. *p< 0,05 vs baixo inóculo	48
Gráfico 2: Gráficos de barras representando os valores médios obtidos na análise histopatológica entre os animais com 6 meses e 8 meses de infecção . *p< 0,05 vs 6 meses de infecção.....	50
Gráfico 3: Gráficos de barras representando os valores médios obtidos na análise histopatológica entre os diferentes grupos . *p< 0,01 vs grupos 1, 2 e 3; # p<0,05 vs grupo 1 ..	52
Gráfico 4: Gráfico de dispersão ilustrando a análise de correlação entre a FE e o escore de mobilidade parietal, intensidade da inflamação e extensão de fibrose.....	53
Gráfico 5: Gráficos de barras representando a comparação, entre os segmentos normais contra os segmentos com alteração de mobilidade parietal segmentar, de fibrose, inflamação e microcirculação	54
Gráfico 6: Gráficos de barras representando a comparação, entre os segmentos com DP e os segmentos normais, da inflamação, escore regional de mobilidade parietal, fibrose e microcirculação	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sumário dos resultados apresentados no ecocardiograma do grupo controle	47
Tabela 2 – Sumário dos resultados das alterações da função ventricular entre o grupo controle e as diferentes quantidades de inóculo. O valor de p refere-se ao teste ANOVA de comparação de múltiplas médias	48
Tabela 3 – Sumário dos resultados da comparação entre médias da função ventricular entre o grupo de animais.....	50
Tabela 4 – Resumo dos resultados do ecocardiograma entre os grupos de animais classificados conforme a forma de acometimento estrutural/funcional. O valor de p refere-se ao teste ANOVA de comparação de múltiplas médias.....	52
Tabela 5 – Resumo dos resultados das alterações da função ventricular e das alterações histológicas conforme a presença de defeitos perfusionais nos animais investigados. O valor de p refere-se ao teste ANOVA de comparação de múltiplas médias.....	56
Tabela 6 - Tabela 2x2 com associação topográfica entre os segmentos com DP e os com AMP, $p < 0,0001$	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Doença de Chagas	22
1.2. Distúrbios da microcirculação	24
1.3. Modelos experimentais de cardiopatia chagásica crônica	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Animais experimentais	32
3.2. Delineamento geral do estudo	32
3.3. Contagens de parasitas e análise de sobrevivência	33
3.4. Métodos de imagem	33
3.4.1. <i>Ecocardiograma</i>	34
3.4.2. <i>Cintilografia (SPECT) de perfusão miocárdica de alta resolução</i>	36
3.4.2.1. <i>Sistema de aquisição de imagens tomográficas</i>	36
3.4.2.2. <i>Aquisição de imagens de perfusão miocárdica</i>	38
3.4.2.3. <i>Processamento e análise das imagens</i>	38
3.5. Histopatologia	40
3.6. Imunohistoquímica.....	41
3.7. Digitalização e análise quantitativa.....	41
3.8. Aspectos éticos de investigação animal	43
3.9. Análise estatística	43
4. RESULTADOS	46
4.1. Detecção de parasitemia e confirmação da infecção experimental.....	46
4.2. Mortalidade	46
4.3. Função sistólica e remodelamento ventricular esquerdo.....	47
4.3.1. <i>Análise conforme a quantidade de inóculo</i>	47

4.3.2. <i>Análise conforme o tempo de evolução</i>	49
4.3.3. <i>Análise conforme a presença de disfunção sistólica ventricular esquerda global e segmentar</i>	50
4.3.4. <i>Correlação entre alterações da função sistólica VE e alterações histológicas</i>	52
4.3.5. <i>Análise baseada em segmentos</i>	54
4.4. Avaliação da perfusão miocárdica	54
4.4.1. <i>Análise baseada em animais individuais</i>	54
4.4.2. <i>Análise baseada em segmentos</i>	56
4.5. Avaliação qualitativa e descritiva visual	58
5. DISCUSSÃO	62
5.1. Principais achados	62
5.2. Modelo experimental de CCC no hamster	62
5.3. Disfunção ventricular esquerda	65
5.3.1. <i>Disfunção sistólica regional do ventrículo esquerdo</i>	67
5.4. Perfusão miocárdica	69
5.5. Implicações do estudo	78
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ANEXO A: Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo	92
--	----

RESUMO

OLIVEIRA, L. F. L. **Estudo da perfusão miocárdica e da função sistólica ventricular esquerda no modelo de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster, utilizando-se imagens in vivo de alta resolução.** 2014. 92f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Vários aspectos fisiopatogênicos da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) ainda carecem de elucidação, principalmente os mecanismos que determinam o aparecimento da lesão miocárdica crônica apenas em fase bastante tardia, 2 a 3 décadas após a fase aguda da doença. Evidências experimentais e clínicas apontam para uma participação da isquemia microvascular neste processo lento de progressão da cardiomiopatia. Defeitos de perfusão miocárdica (DP) são frequentes na CCC, mas as alterações teciduais associadas e seu significado fisiopatológico ainda não são claros. Neste cenário, o emprego do modelo experimental em hamster que reproduz a fase crônica da CCC após 6 meses da infecção, poderia fornecer observações valiosas sobre esses mecanismos fisiopatogênicos. Dessa forma, o presente estudo objetivou empregar imagens *in vivo* para investigar a correlação entre as alterações de perfusão com a gravidade da disfunção miocárdica na CCC assim como as alterações histopatológicas subjacentes em modelo experimental em hamsters. Para tanto, hamsters sírios fêmeas (n=60) foram infectados com $3,5 \times 10^4$ ou 10^5 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) enquanto um grupo de animais (n=8) recebeu inóculo de salina. Os animais foram investigados após 6 ou 10 meses de infecção, empregando-se imagens *in vivo* da perfusão miocárdica com SPECT-Sestamibi-Tc99m de alta resolução e da função sistólica segmentar e global do ventrículo esquerdo (VE) com Ecocardiograma 2D. Procedeu-se à análise histológica para quantificação regional de intensidade de inflamação, extensão de fibrose e densidade microvascular. Utilizou-se segmentação do VE em 13 segmentos para todos os métodos de análise. Dos 34 animais infectados que sobreviveram ao final do estudo, 10 (29%) apresentaram fração de ejeção (FE) reduzida ($48,5 \pm 11,4\%$) em relação aos controles ($82,4 \pm 5,5\%$), $p < 0,0001$. Entre os 24 animais com FE preservada ($82,9 \pm 5,5\%$, $p > 0,05$ em comparação ao controle), 8 (33%) apresentavam alterações de mobilidade parietal segmentar (MPS) que predominaram nos segmentos apicais, inferiores e póstero-laterais. Os animais com FE rebaixada apresentaram maior intensidade de inflamação quando comparados a todos os outros animais, maior extensão de fibrose somente quando comparados aos animais controles, mas semelhante densidade microvascular. O escore de MPS correlacionou-se com a FE ($r = -0,60$; $p = 0,0002$), com a inflamação ($r = 0,53$ - $p = 0,0014$), mas não exibiu correlação com a fibrose ($r = 0,25$ - $p = 0,16$) e densidade microvascular ($r = 0,24$; $p = 0,17$). Defeitos perfusionais (DP) estavam presentes em 17 (50%) dos animais infectados e não apresentaram correlação topográfica com fibrose transmural. Os animais com perfusão alterada, quando comparados aos animais sem DP, exibiram menor FE (65 ± 21 e $81 \pm 9\%$, $p < 0,01$), maior inflamação ($172,8 \pm 89$ e $111,5 \pm 54$ n/mm²; $p = 0,04$), maior escore de MPS ($1,44 \pm 0,5$ e $1,04 \pm 0,05$; $p = 0,003$), mas semelhante extensão de fibrose ($8,4 \pm 3,9$; $6,6 \pm 3,2\%$ /mm²; $p = 0,06$) e densidade dos vasos da microcirculação ($0,69 \pm 0,5$ e $0,57 \pm 0,2\%$ /mm²; $p = 0,6$). Observou-se associação topográfica significativa entre presença de DP e alteração de MPS ($p < 0,01$). De todos os segmentos analisados (n=438), aqueles exibindo alteração de MPS em comparação aos com MPS normal, apresentaram maior fibrose ($9,34 \pm 5,7$ e $7 \pm 6,3\%$ /mm², $p < 0,0001$); maior inflamação ($218 \pm 111,6$ e $124,5 \pm 84,8$ n/mm², $p < 0,0001$), mas semelhante densidade de microvasos ($0,72 \pm 0,66$ e $0,62 \pm 0,38\%$ /mm²,

p=0,89). Os segmentos com DP quando comparados aos segmentos sem defeitos mostraram maior inflamação ($175,8 \pm 145$; $111,6 \pm 69,2$ n/mm²; p=0,001), maior escore de MPS ($1,65 \pm 0,6$; $1,1 \pm 0,4$; p<0,0001), entretanto com semelhante extensão de fibrose ($10,5 \pm 18,6$; $7,4 \pm 6,2$ %/mm²; p=0,37) e de densidade microvascular ($0,72 \pm 0,64$; $0,63 \pm 0,5$ %/mm²; p=0,38). Os resultados mostram que as alterações da MPS são frequentes, ocorrendo em animais com desempenho global ainda preservado. Os DP em CCC são topograficamente correlacionados a alterações inflamatórias que são intensas o suficiente para promover disfunção sistólica regional e global do VE. O fato destes distúrbios não serem devidos à fibrose transmural abre a possibilidade de que as intervenções terapêuticas destinadas a reduzir o grau de inflamação do miocárdio e/ou da hipoperfusão possam se acompanhar de recuperação da função sistólica cardíaca e impactar favoravelmente na história natural da CCC.

Palavras-chave: Miocardiopatia chagásica. Cintilografia miocárdica. Modelo experimental

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. F. L. **Study of myocardial perfusion and left ventricular systolic function in the model of chronic Chagas cardiomyopathy in hamsters, using in vivo high resolution images.** 2014. 92f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Several pathophysiological aspects of chronic Chagas cardiomyopathy still need elucidation, specially the mechanisms that determine the development of chronic myocardial injury, 2-3 decades after the acute phase of the disease. Experimental and clinical evidence suggest the participation of microvascular ischemia in this slow progression of cardiomyopathy. Myocardial perfusion defects (PD) are frequent in CCC, but its underlying tissue changes and pathophysiologic mechanisms are unclear. In this scenario, the use of experimental hamster model that reproduces the chronic phase of the CCC after 6 months of infection, would provide valuable insights into the pathophysiological mechanisms. Therefore, the present study aimed to employ in vivo images to investigate the presence of perfusion changes and its correlation with left ventricular systolic dysfunction and underlying histopathological changes in an experimental model in hamsters. For this purpose, female Syrian hamsters (n=60) were infected with $3,5 \times 10^4$ or 10^5 trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Y-strain) while a group of animals (n=8) has received saline inoculum. The animals were investigated after 6 or 10 months infection, employing in vivo high-resolution Sestamibi-Tc-99m-SPECT imaging of myocardial perfusion and segmental and global systolic function of the left ventricle (LV) with 2D echocardiography. Histological analysis was performed to quantify regional intensity inflammation, extension of fibrosis and microvascular density. Were used 13 segments for LV segmentation for all imaging methods. Among the 34 infected animals who survived at the end of the study, 10 (29%) showed reduced ejection fraction (EF) ($48,5 \pm 11,4\%$) compared to controls ($82,4 \pm 5,5\%$), $p < 0,0001$. Among the 24 animals with preserved EF ($82,9 \pm 5,5\%$, $p > 0,05$ compared to controls), 8 (33%) showed abnormal segmental wall motion (SWM) that predominated in the apical, inferior and posterolateral. Animals with reduced EF showed more intensive inflammation compared to other animals, greater extension of fibrosis only when compared to controls, but similar microvascular density. The score of SWM correlated with the EF ($r = -0,60$; $p = 0,0002$), with inflammation ($r = 0,53$ - $p = 0,0014$), but showed no correlation with fibrosis ($r = 0,25$ - $p = 0,16$) and microvascular density ($r = 0,24$; $p = 0,17$). PD were present in 17 (50%) infected animals and showed no topographic correlation with transmural scar. Animals with altered perfusion, compared to animals without PD, exhibited lower EF (65 ± 21 and $81 \pm 9\%$, $p < 0,01$), more intense inflammation ($172,8 \pm 89$ and $111,5 \pm 54$ n/mm²; $p = 0,04$), higher score of SWM ($1,44 \pm 0,5$ and $1,04 \pm 0,05$; $p = 0,003$), but similar extension of fibrosis ($8,4 \pm 3,9$; $6,6 \pm 3,2\%$ /mm²; $p = 0,06$) and microvascular density ($0,69 \pm 0,5$ and $0,57 \pm 0,2\%$ /mm²; $p = 0,6$). There was significant topographic association between the presence of PD and abnormal SWM ($p < 0,01$). Of all segments analyzed (n=438), those showing change in SWM compared with the normal SWM, showed more fibrosis ($9,34 \pm 5,7$ and $7 \pm 6,3\%$ /mm², $p < 0,0001$); more intense inflammation ($218 \pm 111,6$ and $124,5 \pm 84,8$ n/mm², $p < 0,0001$), but similar microvascular density ($0,72 \pm 0,66$ and $0,62 \pm 0,38\%$ /mm², $p = 0,89$). The segments with PD compared to segments without defects showed more intense inflammation ($175,8 \pm 145$; $111,6 \pm 69,2$ n/mm²; $p = 0,001$), higher score of SWM ($1,65 \pm 0,6$; $1,1 \pm 0,4$; $p < 0,0001$), however with similar extension of fibrosis ($10,5 \pm 18,6$; $7,4 \pm 6,2\%$ /mm²; $p = 0,37$) and microvascular

density ($0,72 \pm 0,64$; $0,63 \pm 0,5\%$ /mm²; $p=0,38$). The results show that changes in SWM are frequent, occurring in animals with global performance still preserved. The PD in experimental CCC are topographically correlated with inflammatory changes that are intense enough to cause wall motion impairment. The fact that these derangements are not due to fibrosis opens the possibility that therapeutic interventions aimed at reducing the degree of myocardial inflammation and/or hypoperfusion may favorably impact on the natural history of this model of experimental CCC.

Keywords: Chagas cardiomyopathy. myocardial scintigraphy. experimental model

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é um parasito eucariota unicelular que possui um ciclo de vida complexo envolvendo múltiplos estágios tanto no hospedeiro (mamífero) como no inseto transmissor (Triatomíneo). A infecção natural do hospedeiro definitivo se dá quando as formas infectantes, encontradas nas dejeções dos triatomíneos (vetores), penetram nas células da derme e mucosas, replicando-se em células nucleadas causando a doença de Chagas.

Embora se tenha estabelecido o controle da transmissão natural usando estratégias para eliminar os vetores do ambiente peridomiciliar (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006), a doença de Chagas constitui ainda uma importante preocupação para as autoridades sanitárias nas Américas, principalmente em países pobres, onde as condições sócio-econômicas mantêm a interação entre o homem e o inseto transmissor. A doença também pode ser transmitida através de doação de órgãos, transfusões sanguíneas e de mãe para o filho durante o parto levando ao aumento da incidência da doença também em países não endêmicos (BERN; MONTGOMERY, 2009; JACKSON et al., 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010). Casos de transmissão em acidentes laboratoriais também já foram relatados (HERWALDT, 2001) assim como vários surtos de infecções através da ingestão de comidas ou bebidas contaminadas (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007) estima em 300.000 o número de novos casos por ano na América Latina e que existam 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo.

A doença de Chagas, cujas manifestações clínicas foram descritas pela primeira vez em 1909, pelo médico Carlos Chagas, apresenta duas fases: aguda e crônica. A fase aguda de duração curta, que dura de 1 a 3 meses, destaca-se por uma reação inflamatória localizada no ponto da inoculação, assim como manifestações cardiovasculares derivadas de uma intensa reação inflamatória no coração secundária ao parasitismo das fibras cardíacas por ninhos da forma amastigota do *T. cruzi*. Na fase crônica, de longa duração, a doença pode ser assintomática (forma indeterminada da doença) (MONCAYOE; ORTIZ YANINE, 2006) ou sintomática com o desenvolvimento de complicações cardíacas e/ou digestivas. Enquanto a forma digestiva acomete cerca de 10% dos pacientes as complicações cardíacas alcançam

cerca de 30% dos casos de indivíduos chagásicos (MARIN-NETO et al., 2007). A lesão no coração é caracterizada por um infiltrado de células mononucleares, destruição de miofibras e fibrose intersticial, com parasitismo de fibras cardíacas de muito baixa intensidade ou virtualmente ausente. Em estágios mais avançados da doença ocorrem alterações da função cardíaca com importante dilatação das cavidades do coração assumindo o fenótipo clínico de uma miocardiopatia dilatada (KOBERLE, 1968; ROSSI, 1990).

Embora intensamente estudada, a fisiopatogenia da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) ainda não é completamente compreendida (PRATA, 2001). O aspecto mais intrigante da história natural desta forma de cardiomiopatia dilatada é o longo tempo, cerca de 2-3 décadas, de aparente quiescência clínica que se interpõe entre a infecção inicial (fase aguda) e sua fase crônica, caracterizada por uma miocardiopatia dilatada com manifestação de insuficiência cardíaca (IC), arritmias cardíacas, eventos tromboembólicos e morte súbita (NUNES et al., 2013). Particularmente desafiadora é a caracterização dos mecanismos lesivos envolvidos nesta lenta progressão da disfunção miocárdica, ou a rápida eclosão da agressão miocárdica, na fase crônica da doença.

A disfunção sistólica ventricular global é precedida por alterações segmentares da mobilidade parietal segmentar do ventrículo esquerdo. Esse acometimento apresenta-se predominantemente nos segmentos inferiores (MATSUMOTO et al., 1979) e póstero-laterais em níveis médio e apical e estão correlacionados com pior prognóstico da doença (ALMEIDA-FILHO et al., 2002; PAZIN-FILHO et al., 2006). Outra característica no Ecocardiograma predominante da CCC é o aneurisma apical que está fortemente relacionado com a gravidade da doença (ACQUATELLA, 2007).

As evidências obtidas por meio de estudos em modelos animais e em humanos, indicam a existência de 2 principais mecanismos patogénéticos para explicar o desenvolvimento da doença cardíaca chagásica crônica: a destruição tissular direta causada pelo *T. cruzi* e a lesão inflamatória mediada por agressão autoimune.

Entretanto, baixos níveis de parasitemia e os achados de extrema raridade de células parasitadas são argumentos contra a hipótese de que a lesão miocárdica esteja diretamente relacionada com a presença do parasita (MARIN-NETO et al., 2007).

Além desses mecanismos centrais, são ainda reconhecidos 2 outros mecanismos auxiliares de lesão ou ampliação do dano tissular: os distúrbios da microcirculação coronária, com consequente lesão isquêmica miocárdica; e a desnervação autonômica. Várias evidências clínicas e experimentais têm sugerido a participação desses mecanismos auxiliares na patogênese do dano miocárdico na fase crônica da cardiopatia chagásica. Estes aspectos

foram recentemente revisados em publicação do nosso grupo de investigação (MARIN-NETO et al., 2007).

1.2. Distúrbios da microcirculação

As evidências iniciais da participação de distúrbios da microcirculação nos mecanismos de lesão miocárdica na cardiopatia chagásica crônica foram levantadas nos primeiros estudos necroscópicos caracterizando séries de casos de pacientes falecidos pela doença (TORRES, 1958; TORRES, 1960). Nestes estudos, Carlos Margarino Torres descreveu de forma original a presença de intensas lesões vasculares com hiperproliferação intimal, espessamento da parede e obstrução de finos ramos arteriulares coronários intramurais em corações chagásicos. Adicionalmente, observou-se que as fibras miocárdicas topograficamente associadas a essas lesões vasculares exibiam necrose miocitolítica, lesão miocelular caracteristicamente associada à isquemia miocárdica. No conjunto, esses achados sugeriam fortemente a participação da isquemia microvascular na gênese dos focos inflamatórios, de miocitólise e posterior fibrose reparativa na fase crônica da cardiopatia chagásica. Esses achados foram reforçados e ampliados por mais estudos recentes com técnicas mais avançadas de microscopia (ROSSI, 1990; Higuchi et al., 1998)

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

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

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

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

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

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

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

Hiss et al. (2009), demonstraram por meio de estudo longitudinal retrospectivo utilizando cintilografia miocárdica de perfusão, que a isquemia microvascular correlaciona-se

topograficamente com aparecimento de fibrose regional miocárdica durante a evolução da cardiopatia chagásica. Dos 54 segmentos apresentando defeitos isquêmicos no estudo inicial 36 (68%) evoluíram para defeitos perfusionais em repouso, ou seja, fibrose e dos 487 segmentos não apresentando isquemia no estudo inicial somente 49 tiveram a mesma evolução (10%). Esses resultados reforçam a hipótese de que a isquemia miocárdica microvascular esteja diretamente envolvida no mecanismo de formação da fibrose regional que participa da progressão da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo na cardiomiopatia chagásica crônica.

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

O uso de modelos experimentais de cardiopatia chagásica crônica em pequenos animais, lançando-se mão de recentes métodos de aquisição de imagens cintilográficas de alta resolução para obtenção de estudos *in vivo*, poderia constituir estratégia de investigação útil capaz de gerar resultados originais que lancem luz sobre esse tema.

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

1.3. Modelos experimentais de cardiopatia chagásica crônica

Desde os estudos iniciais de Carlos Chagas, há referências à inoculação de vários modelos animais como macacos (CARVALHO et al., 2003), coelhos (FIGUEIREDO et al., 1985), cães (LANA et al., 1992), ratos (GUARITA-SOUZA et al., 2006) e camundongos (CHANDRA et al., 2002; JELICKS et al., 2002) com o *Trypanosoma cruzi*, como meio de estudar a evolução da infecção em diferentes vertebrados e para estudar diferentes aspectos da interação parasita e hospedeiro, com resultados variáveis e características peculiares (ANDRADE, 2000).

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

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

Uma particularidade deste modelo, que o torna especialmente útil para um estudo de correlação de achados morfológicos e funcionais, é o fato de na fase crônica existir uma variedade considerável de comprometimento da função cardíaca e de dano histológico, encontrando-se desde animais com função sistólica normal ou com mínimo comprometimento até animais com grave disfunção sistólica e importante dilatação ventricular esquerda. Esse

aspecto também simula de forma muito próxima o que se observa no campo clínico nos acometidos pela doença de Chagas.

Até o momento, no melhor do nosso conhecimento, ainda não há relatos da aplicação de imagens cintilográficas *in vivo* para caracterização das anormalidades de perfusão miocárdica em modelos de pequenos animais de cardiomiopatia chagásica crônica, sendo este o objetivo do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo investigar, mediante emprego de métodos de imagem “in vivo”, a associação dos distúrbios de perfusão miocárdica com a disfunção ventricular esquerda global e segmentar, assim como a correlação desses achados com alterações histopatológicas subjacentes em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters sírios.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar a disfunção sistólica ventricular esquerda neste modelo experimental;
- Investigar a presença e extensão de distúrbios da perfusão miocárdica;
- Correlacionar topograficamente as anormalidades da perfusão e da função sistólica ventricular esquerda segmentar e global;
- Analisar a correlação entre os achados *in vivo* dos parâmetros estudados da perfusão e da função sistólica ventricular esquerda com as alterações histopatológicas *ex vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

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

Inicialmente os animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

- 1- Animais controles (n=8) = receberam inóculo de salina em igual volume e via de administração usada nos animais dos grupos infectados com *T. cruzi*;
- 2- Animais chagásicos de baixo inóculo (n=30) = infectados intraperitonealmente com $3,5 \times 10^4$ formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y;
- 3- Animais chagásicos de alto inóculo (n=30) = infectados intraperitonealmente com 10^5 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y.

Em todos os procedimentos, máximo esforço foi feito para evitar sofrimento desnecessário nos animais.

3.2. Delineamento geral do estudo

Após a infecção pelo *T. cruzi*, os animais foram observados quanto à confirmação da infecção (contagem direta de parasitas circulantes) e sobrevivência. A maior parte dos animais foi acompanhado durante 6 meses, e um pequeno grupo de 6 animais foi mantido até 10 meses de infecção. Esses animais com 10 meses de infecção não realizaram avaliações antes de 10 meses de infecção.

Os animais foram submetidos à avaliação da função sistólica e remodelamento ventricular esquerdo pelo ecocardiograma e a análise da perfusão miocárdica em repouso foi avaliada pela Cintilografia de perfusão miocárdica com Sestamibi-Tc99m (mini-SPECT).

Ao final do período de observação os animais foram submetidos à eutanásia e remoção dos corações para estudo histopatológico.

Para melhor entendimento da cardiopatia, os animais foram analisados quanto à quantidade de inóculo (controles vs baixo inóculo vs alto inóculo), tempo após a infecção (animais com 6 meses vs 10 meses de infecção, ambos com baixo inóculo). Além disso, também foram analisados quanto ao grau de acometimento da função ventricular: 1- Grupo controle; 2- Grupo de animais infectados sem acometimento ventricular segmentar ou global; 3- Grupo de animais com alteração da mobilidade parietal (AMP) e FE ainda normal; 4- Grupo de animais com disfunção VE global (FE reduzida). Também foram analisados quanto à presença ou não de defeito perfusional miocárdico (DP): animais infectados sem DP vs animais infectados com DP. Ainda realizou-se análise segmentar quanto à função sistólica parietal (segmentos com AMP vs segmentos normais) e quanto à perfusão (segmentos com DP vs segmentos normais).

3.3. Contagens de parasitas e análise de sobrevivência

Para a confirmação da infecção pelo *T. cruzi*, a detecção de parasitas no sangue circulante foi realizada no 9º dia após a infecção. Sangue dos animais infectados, obtido mediante punção do plexo retro-orbital com o animal anestesiado, (5µL) foi colocado sobre lâmina, coberto com lamínula 22x22 mm. Os parasitos foram contados com auxílio de microscópio óptico (400x) em um total de 100 campos, determinando-se a quantidade de parasitos por mL de sangue. A mortalidade dos animais foi aferida diariamente, e determinada a curva de sobrevivência.

3.4. Métodos de imagem

Os estudos de imagem foram realizados com os animais anestesiados com injeção intraperitoneal de Pentobarbital sódico (50mg/kg).

3.4.1. Ecocardiograma

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

As imagens obtidas foram gravadas para análise “off-line” dos dados ao final do estudo. A coleta das imagens assim como a análise das mesmas foi realizada por uma ecocardiografista com experiência na obtenção e análise de ecocardiografias de pequenos animais, e cega a que grupo de estudo o animal pertencia. As dimensões obtidas no modo M (imagens de eixo curto) do VE em diástole e sístole foram utilizadas para determinação da fração de ejeção, conforme a fórmula:

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

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

Figura 1 - Animal sedado, submetido à tricotomia e posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização de exame ecocardiográfico.

A mobilidade parietal segmentar (MPS) sistólica do VE foi analisada pelo modelo de 13 segmentos (MORGAN et al, 2004). Uma projeção paraesternal do eixo longo e 3 níveis de corte do eixo curto (basal, medioventricular e apical) do VE foram utilizadas para segmentação (figura 2-B). A mobilidade regional foi graduada em cada segmento em 1 normal, 2 hipocinético e 3 acinético. O escore de mobilidade de segmentar foi determinado pela somatória dos índices de cada segmento dividido pelo número total de segmentos. Os exames de cada animal demoraram em média 10 minutos.

Figura 2 - A- Avaliação da FE do VE pelo método Teichholz na janela paraesternal do eixo longo do miocárdio; B- Segmentação do VE em 13 segmentos. Apical (AP), anterior basal (AB), anterior médio (AM), anterolateral médio (ALM), inferior basal (IB), inferior médio (IM), posterolateral médio (PLM), septo anterior médio (SAM), septo posterior médio (SPM).

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

3.4.2.1. Sistema de aquisição de imagens tomográficas

Uma gama câmara clínica (DST/Sopha Medical Vision, Twinsburg, Ohio, USA) foi adaptada pela construção de um sistema de blindagem que permite o encaixe de um colimador de orifício simples, com diâmetro de 1,5 mm e ângulo de abertura total de 150°. Esta blindagem é constituída por uma placa de alumínio recoberta com uma manta de chumbo de 6mm de espessura, adequada para fótons com energia na faixa de 150 keV. Adicionalmente,

foi desenvolvido um suporte cilíndrico para o posicionamento do animal. Esse suporte é acoplado a um sistema motorizado que permite rotacionar o alvo para as diferentes posições angulares de acordo com o número de projeções a serem registradas ao longo dos 360° da aquisição tomográfica. Sincronizada com o protocolo de aquisição dinâmico da gama câmara, a sequência de projeções é registrada e armazenada em formato DICOM. Na Figura 3 ilustramos o conjunto do hardware construído.

Figura 3 - Sistema “mini-Spect” posicionado em uma das duas cabeças da gamma câmara clínica Sopha/DST. (1) – Detector da gama-câmara, (2) – Carro suporte do colimador pinhole, (3) – Suporte rotacional para conter o pequeno animal durante a aquisição acoplado a motor de passo, (4) – Computador pessoal utilizado para processamento e análise das imagens, (5) – Mecanismo eletrônico que controla o motor de passos.

3.4.2.2. Aquisição de imagens de perfusão miocárdica

Para a aquisição das imagens, os animais foram anestesiados e após um pequeno procedimento cirúrgico, uma atividade de 555 MBq de ^{99m}Tc -Sestamibi foi injetada na veia jugular interna (figura 4). Uma hora e meia após a injeção, os animais foram novamente anestesiados e posicionados no sistema para a aquisição de imagens.

Quarenta projeções, igualmente espaçadas em 360 graus, foram adquiridas em todos os protocolos de imagens. As projeções foram registradas em uma matriz de 128 x 128 elementos, cada elemento com uma área de 3,4 mm x 3,4 mm. Um fator de magnificação de 6,3 X foi adotado para todos os experimentos, o que corresponde a uma dimensão lateral de elemento do volume do objeto (ou voxel) de 0,54 mm. O tempo de aquisição por projeção foi de 30 segundos, totalizando aproximadamente 22 minutos por animal.

Figura 4 – Procedimento cirúrgico para dissecção da veia jugular interna para injeção do radiofármaco.

3.4.2.3. Processamento e análise das imagens

Após a aquisição das projeções, as imagens gravadas 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,

desenvolvemos um software de reconstruções iterativas de imagens baseado no algoritmo de Máxima Verossimilhança (SHEPP; VARDI, 1982). A ferramenta foi implementada em Linguagem C, usando um compilador freeware Dev-C++ (Bloodshed Software). Para visualização final das reconstruções, foi utilizado o freeware AMIDE Medical Image Data Examiner (LOENING; GAMBHIR 2003).

A fim de testarmos a acurácia desse sistema na detecção de fibrose miocárdica regional, realizamos um estudo em modelo de cardiopatia isquêmica que foi recentemente publicado em revista de veiculação nacional (OLIVEIRA et al., 2013) e que se encontra no Anexo B.

A avaliação tomográfica da perfusão miocárdica foi otimizada com a elaboração de outro software próprio que gera um mapa polar para avaliação quantitativa (planimetria) das áreas de defeitos graves (contagens abaixo de 50% do pixel de maior contagem).

O software gera um perfil circunferencial de contagens por toda a parede miocárdica do ventrículo esquerdo em cortes do eixo curto do coração. Após a seleção da quantidade de cortes a serem analisados e qual o limite de contagens, o software realiza uma interpolação dos dados e gera uma imagem onde as áreas abaixo do limiar de contagem são excluídas. A seguir é quantificada a porcentagem da área da superfície do VE com defeito perfusional. O software permite ainda a edição adequada do perfil circunferencial de forma que seja feita uma completa varredura de miocárdio do VE. Em seguida, foi realizada a segmentação miocárdica do VE em 13 segmentos (6 basais, 6 médio-ventriculares e 1 apical).

Na figura 5 ilustramos um exemplo de um mapa polar de um animal sem alterações de perfusão do VE e a sua respectiva segmentação miocárdica.

Figura 5 – Mapa polar de perfusão miocárdica de um animal normal ilustrando a segmentação do ventrículo esquerdo. Septo anterior basal (SAB), anterior basal (AB), anterolateral basal (ALB) posterolateral basal (PLB), inferior basal (IB), septo inferior basal (SIB), Septo anterior médio (SAM), anterior médio (AM), anterolateral médio (ALM) posterolateral médio (PLM), inferior médio (IM), septo inferior médio (SIM), apical (AP).

3.5. Histopatologia

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

3.6. Imunohistoquímica

Para marcação de alfa-actina da musculatura lisa dos vasos, as amostras foram imersas em xilol, hidratadas em álcool de diferentes concentrações (100%, 95%, 70%) e água. Quando necessária, a recuperação antigênica foi realizada com enzima (5 minutos a 37°C) ou com tampões (TRIS-EDTA 10mM pH 9.0 ou Citrato 10mM pH6.0) em panela de pressão (DakoCytomation- California/ Code N° S2800).

Após a lavagem do material em água foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com Peróxido de Hidrogênio 6%, com 2 banhos de 8 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com Protein Block (DakoCytomation- California/ Ref X0909), 10 minutos a temperatura ambiente. De acordo com a padronização e orientação do fabricante, o anticorpo primário foi diluído em Antibody Diluent (Invitrogen cód. 3218) e cada corte foi incubado durante 40 minutos a temperatura ambiente.

A seguir, após lavagem em PBS pH 7.4, foi realizada a detecção do antígeno/anticorpo utilizando o Kit Picture Max HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum (Invitrogen-cod 878983). Na revelação das reações foi utilizado o substrato cromógeno DAB, (DakoCytomation- California/ Code N° K3468) e a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (Easy Path- cod K3468). As lâminas com as reações foram desidratadas em álcool de diferentes concentrações (70%, 95% e 100%), diafanizadas com xilol e montadas com lamínulas e resina sintética Entellan® (Merk, Alemanha).

3.7. Digitalização e análise quantitativa

As lâminas foram escaneadas por um sistema de análise digital de imagens constituído por um escâner digital (Scanscope CS System; Aperio Technologies, Inc., CA, USA), com uma objetiva Olympus UPlanSApo 20x com especificações 20x/0.75 acoplada ao escâner, gerando arquivos de imagem svf. As imagens digitalizadas foram analisadas através do programa Aperio ImageScope View Software (Aperio Technologies, Inc., CA, USA), uma nova tecnologia que dispensa o uso do microscópio óptico.

As amostras foram analisadas pela ferramenta de análise, selecionando o algoritmo de macro para marcação nuclear e de membrana documentadas através do Software Image Scope.

Para todas as análises, foram utilizadas amostragens que variaram de 1,5 a 2 mm² mantendo correlação topográfica com os exames de imagem *in vivo* (figura 5). Entretanto, um cuidado em especial merece ser destacado na imunohistoquímica para avaliação da densidade de microcirculação. Quando havia a presença de grandes vasos em territórios subjacentes às outras análises, o mesmo era desconsiderado por um mecanismo de marcação semiautomática do software para que não fosse contabilizado na densidade e dessa forma não superestimar o resultado.

Figura 6 – Análise histopatológica mantendo correlação topográfica com os exames de imagem *in vivo*. Lâmina corada com HE à esquerda e Picrosírius vermelho à direita.

Pela coloração de Hematoxilina e Eosina, foram realizadas análises quantitativa e qualitativa por uma patologista experiente e cega a qual grupo pertencia os animais. A macro do software para análise quantitativa foi definida pela mesma patologista onde o software identifica células mononucleadas com tamanho e forma específicas e contabiliza o números de células, inferindo dessa forma a extensão de infiltrados de células mononucleadas.

Pela coloração de Picrosírius vermelho, foi quantificada a extensão de fibrose onde a macro identifica áreas coradas em vermelho e contabiliza a extensão por milímetro quadrado em relação a área total analisada.

Pela Imunohistoquímica, a densidade de microcirculação foi quantificada pela macro que identifica áreas coradas em marrom escuro e contabiliza a extensão por milímetro quadrado em relação a área total analisada.

Todas as análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Inflamação no Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

3.8. Aspectos éticos de investigação animal

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

3.9. Análise estatística

Os resultados de variáveis contínuas são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média e as variáveis nominais expressas como frequência absoluta (n) e relativa (%).

Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição das variáveis. Para testar a diferença entre médias de dois grupos foi empregado o Teste t de Student, para variáveis com distribuição normal, e o Teste de Mann-Whitney, para as variáveis com distribuição não-normal. Para análise comparativa entre 3 ou mais grupos simultaneamente, foi utilizado o Teste ANOVA para variáveis com distribuição normal, e o Teste Kruskal-Wallis, para variáveis com distribuição não-normal. Utilizou-se o Teste Exato de Fisher para testar a heterogeneidade de distribuição das frequências. Para as análises de correlações, foi utilizado o teste de Pearson quando as variáveis apresentavam uma distribuição normal, e o teste de Spearman quando as variáveis não seguiam uma curva de distribuição normal.

As análises foram realizadas com o auxílio do programa de estatística GraphPad InStat, versão 3.05. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Detecção de parasitemia e confirmação da infecção experimental

O controle da parasitemia colhido na fase aguda em parte dos animais confirmou o desenvolvimento de infecção. O grupo de maior inóculo apresentou maior índice de parasitismo.

Entretanto, pela avaliação histopatológica, não foi visualizada a presença de parasitas nas formas tripomastigotas (extracelular) ou amastigotas (intracelular) na fase crônica da doença.

4.2. Mortalidade

No grupo de baixo inóculo, a mortalidade foi de 16,66% (5 animais) na fase aguda da doença. Dos 25 animais que sobreviveram à fase aguda, 5 animais morreram durante a avaliação por algum dos métodos de imagem totalizando ao final do protocolo 20 animais que realizaram os 2 exames de imagem *in vivo* (Ecocardiograma, cintilografia de perfusão miocárdica), resultando numa mortalidade geral de 33%.

No grupo de alto inóculo, a mortalidade foi de 50% (15 animais) na fase aguda da doença. Dos 15 animais que sobreviveram à fase aguda, somente 1 animal morreu durante os estudos com imagem totalizando ao final do protocolo 14 animais, resultando na mortalidade geral de 53%.

No grupo de animais controles, 1 animal morreu em consequência de anestesia durante um dos exames de imagem. Com isso, o grupo de animais controles ao término do protocolo, somou 7 animais.

4.3. Função sistólica e remodelamento ventricular esquerdo

A avaliação funcional do ventrículo esquerdo mediante emprego da Ecocardiografia nos animais controles permitiu estabelecer limites de normalidade que estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 – Sumário dos resultados apresentados no ecocardiograma do grupo controle.

Animal	FE(%)	DDVE(cm)	DSVE(cm)	SIV(cm)	PPVE(cm)	ESCORE
61	84.9	0.43	0.22	0.07	0.12	1
62	79.9	0.44	0.25	0.09	0.1	1
63	90.8	0.39	0.17	0.08	0.1	1
64	77.3	0.41	0.24	0.08	0.12	1
65	78.9	0.47	0.27	0.08	0.11	1
66	79,9	0,5	0,3	0,12	0,12	1
67	82	0,42	0,23	0,13	0,13	1
Média	81.9	0.44	0.24	0.09	0.11	1
DP	4,6	0.04	0.04	0.02	0.01	0
LN	73	0.51	0.32	-	-	1

DP: Desvio Padrão, LN: Limite de normalidade, FE: Fração de ejeção do VE, DDVE: Diâmetro diastólico do VE, DSVE: Diâmetro sistólico do VE, SIV: Septo interventricular, PPVE: Parede posterior do VE, ESCORE: Escore de mobilidade segmentar do VE.

4.3.1. Análise conforme a quantidade de inóculo

Ao considerarmos somente os animais sacrificados com 6 meses após a infecção, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os animais controles (n= 7), animais com baixo inóculo (n= 14) e animais com alto inóculo (n= 14) quanto à fração de ejeção ($81,93 \pm 4,6$; $80,92 \pm 7,03$ e $75,79 \pm 17,89\%$, respectivamente, $p=0,44$), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ($0,44 \pm 0,04$; $0,5 \pm 0,07$ e $0,48 \pm 0,07$ cm, respectivamente, $p=0,16$), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ($0,24 \pm 0,04$; $0,28 \pm 0,07$ e $0,27 \pm 0,09$ cm, respectivamente, $p=0,5$), septo interventricular ($0,09 \pm 0,02$; $0,1 \pm 0,01$ e $0,09 \pm 0,02$ cm, respectivamente, $p=0,6$) e parede posterior do ventrículo esquerdo ($0,11 \pm 0,01$; $0,11 \pm 0,01$ e $0,12 \pm 0,03$ cm, respectivamente, $p=0,4$). Entretanto, foi identificado um maior acometimento

regional, dado pelo escore de mobilidade parietal segmentar, do grupo de alto inóculo em relação ao grupo controle (tabela 2).

Tabela 2 – Sumário dos resultados das alterações da função ventricular entre o grupo controle e as diferentes quantidades de inóculo. O valor de p refere-se ao teste ANOVA de comparação de múltiplas médias.

Grupos	FE(%)	DDVE(cm)	DSVE(cm)	SIV(cm)	PPVE(cm)	ESCORE
Controle	81,93±4,6	0,44±0,04	0,24±0,04	0,09±0,02	0,11±0,01	1±0
Baixo inóculo	80,92±7,03	0,5±0,07	0,28±0,07	0,1±0,01	0,11±0,01	1,04±0,07
Alto inóculo	75,79±17,89	0,48±0,07	0,27±0,09	0,09±0,02	0,12±0,03	1,23±0,38*
<i>p</i>	0,44	0,16	0,5	0,6	0,4	0,03

Valores como média ± desvio padrão.

FE: Fração de ejeção do VE, DDVE: Diâmetro diastólico do VE, DSVE: Diâmetro sistólico do VE, SIV: Septo interventricular, PPVE: Parede posterior do VE, ESCORE: Escore de mobilidade parietal segmentar do VE.

*p< 0,05 vs. Controle

Como pode ser observado no gráfico 1, não foi evidenciada diferença estatística entre os grupos quando comparada a extensão de fibrose (controle: 4,5±1,82; baixo inóculo: 7,5±3,2 e alto inóculo: 5,34±2,04%/mm², p> 0,05). Entretanto, observou-se diferença estatisticamente significativa na intensidade de inflamação (controle: 113,2±38,8; baixo inóculo: 89,39±41,2 e alto inóculo: 141,8±44,6 n/mm², p= 0,01).

Gráfico 1: Gráficos de barras representando os valores obtidos na análise histopatológica entre os diferentes grupos. *p< 0,05 vs baixo inóculo.

4.3.2. Análise conforme o tempo de evolução

Seis animais infectados com baixa quantidade de inóculo foram seguidos até 10 meses a fim de verificar se o tempo poderia influenciar na gravidade do acometimento ventricular. Quando comparados aos animais também infectados com baixo inóculo, mas com 6 meses de infecção (n=14), esses animais apresentaram significativa redução da fração de ejeção ($46,9 \pm 8,5$ vs $80,9 \pm 7\%$, $p < 0,0001$) como exemplificado um caso na figura 7.

Figura 7 - Ilustração do método Ecocardiográfico de avaliação da FE do VE pelo método Teichholz na janela paraesternal do eixo longo do miocárdio; A- Animal com 6 meses pós infecção demonstrando FE normal (75%); B- Animal com 10 meses pós infecção demonstrando FE reduzida (39%).

Também houve aumento significativo dos diâmetros diastólico ($0,7 \pm 0,13$ vs $0,5 \pm 0,07$ cm, $p = 0,0004$) e sistólico do ventrículo esquerdo ($0,56 \pm 0,12$ vs $0,28 \pm 0,07$ cm, $p < 0,0001$), assim como aumento do escore de MPS ($1,74 \pm 0,49$ vs $1,04 \pm 0,07$ cm, $p = 0,0029$). Como pode ser visto na tabela 3, não houve diferença do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Sumário dos resultados da comparação entre médias da função ventricular entre o grupo de animais.

Grupos	FE(%)	DDVE(cm)	DSVE(cm)	SIV(cm)	PPVE(cm)	ESCORE
6 meses	80,9±7	0,5±0,07	0,28±0,07	0,1±0,01	0,11±0,01	1,04±0,07
10 meses	46,9±8,5	0,7±0,13	0,56±0,12	0,1±0,02	0,11±0,03	1,74±0,49
<i>p</i>	<0,0001	0,0004	<0,0001	0,7	0,6	0,0029

Valores como média ± desvio padrão.

FE: Fração de ejeção do VE, DDVE: Diâmetro diastólico do VE, DSVE: Diâmetro sistólico do VE, SIV: Septo interventricular, PPVE: Parede posterior do VE, ESCORE: Escore de mobilidade parietal segmentar do VE

Na análise histopatológica foi evidenciado um maior acometimento dos animais com 10 meses de infecção contra os animais com 6 meses de infecção com significativa maior extensão de fibrose ($12,56 \pm 2,37$ vs $7,53 \pm 3,23$ %/mm², $p = 0,003$) e maior intensidade de inflamação ($266,2 \pm 72,9$ vs $89,4 \pm 41,2$ n/mm², $p < 0,0001$) (gráfico 2).

Gráfico 2: Gráficos de barras representando os valores médios obtidos na análise histopatológica entre os animais com 6 meses e 8 meses de infecção . * $p < 0,05$ vs 6 meses de infecção.

4.3.3. Análise conforme a presença de disfunção sistólica ventricular esquerda global e segmentar

Dentre todos os 34 animais infectados (baixo e alto inóculo; com 6 e 10 meses), 10 (29%) apresentaram FE reduzida ($48,5 \pm 11,4\%$) em relação aos controles ($81,9 \pm 4,6\%$), $p < 0,0001$. Entre os 24 animais com FE preservada ($82,9 \pm 5,5\%$, $p > 0,05$ em comparação ao controle), 8 (33%) apresentavam alterações de mobilidade parietal segmentar (Figura 8) que

predominaram nos segmentos apicais, inferiores e póstero-laterais. Entretanto, nenhum aneurisma apical ventricular esquerdo foi identificado. O limiar inferior para considerarmos um animal com FEVE rebaixada foi estabelecido como valores inferiores a 2 vezes o desvio padrão do controle, equivalendo ao valor de corte de 73%.

Figura 8 – Organograma da distribuição dos animais segundo o grau de acometimento da função sistólica regional e global pela análise ecocardiográfica.

Na tabela 4 são apresentados os resultados da análise das alterações funcionais e estruturais do VE pelo ecocardiograma sendo os animais divididos em grupos conforme a forma de acometimento ventricular. Pela análise de variância ANOVA, observa-se que além da diferença entre a fração de ejeção, foi encontrada diferença estatística entre os grupos no diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e escore de mobilidade parietal segmentar. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas médias de septo interventricular e parede posterior do ventrículo esquerdo.

Tabela 4 – Resumo dos resultados do ecocardiograma entre os grupos de animais classificados conforme a forma de acometimento estrutural/funcional. O valor de p refere-se ao teste ANOVA de comparação de múltiplas médias.

Grupos	FE(%)	DDVE(cm)	DSVE(cm)	SIV(cm)	PPVE(cm)	ESCORE
1	81,9±4,6	0,44±0,04	0,24±0,04	0,09±0,02	0,11±0,01	1±0
2	82,6±5,3	0,5±0,1	0,3±0,1	0,1±0,01	0,12±0,02	1±0
3	83,6±6,2	0,5±0,1	0,3±0,1	0,1±0,02	0,12±0,02	1,12±0,06 [§]
4	48,5±11,4*	0,6±0,1 [#]	0,5±0,1*	0,09±0,02	0,11±0,02	1,72±0,45 [£]
<i>p</i>	< 0.0001	0.0016	< 0.0001	0.7	0.6	< 0.0001

Valores como média ± desvio padrão.

FE: Fração de ejeção do VE, DDVE: Diâmetro diastólico do VE, DSVE: Diâmetro sistólico do VE, SIV: Septo interventricular, PPVE: Parede posterior do VE, ESCORE: Escore de mobilidade parietal segmentar do VE

* p< 0,001 vs grupos 1, 2 e 3; # p< 0,05 vs grupos 1, 2 e 3; § p < 0,05 vs grupos 1 e 2; £ p< 0,001 vs grupos 1 e 2

4.3.4. Correlação entre alterações da função sistólica VE e alterações histológicas

Nos resultados da avaliação histopatológica desses grupos (Gráfico 3), pela análise de variância ANOVA, encontrou-se diferença significativa no número de células inflamatórias entre o Grupo 4 ($224,8 \pm 86$ n/mm²) e os demais grupos (G1=113,2±38,8; G2=105,7±45,4; G3= 18,8±40,6 n/mm²; p< 0,0001) não sendo encontrada diferença entre eles. Na avaliação de extensão de fibrose, foi encontrada diferença significativa somente entre o Grupo 1 e o Grupo 4 ($4,5 \pm 1,8$; $9,5 \pm 4,3$ %/mm², p=0,04).

Gráfico 3: Gráficos de barras representando os valores médios obtidos na análise histopatológica entre os diferentes grupos . *p< 0,01 vs grupos 1, 2 e 3; # p<0,05 vs grupo 1.

Considerando os animais infectados, foi evidenciada moderada correlação negativa da FEVE com o escore mobilidade parietal segmentar ($r = -0,60$; $p = 0,0002$), com a intensidade de inflamação ($r = -0,63$; $p < 0,0001$) e fraca correlação negativa com a extensão de fibrose ($r = -0,36$; $p = 0,036$), como pode ser visto no gráfico 4.

Gráfico 4: Gráfico de dispersão ilustrando a análise de correlação entre a FE e o escore de mobilidade parietal, intensidade da inflamação e extensão de fibrose.

4.3.5. Análise baseada em segmentos

Considerando todos os segmentos miocárdicos analisados dos animais infectados, aqueles sem evidência de disfunção regional de mobilidade parietal ($n=337$), foram comparados com os segmentos que apresentaram alteração de mobilidade parietal ($n=101$).

Como pode ser observado no gráfico 5, os segmentos com mobilidade parietal segmentar normal apresentaram menor extensão de fibrose ($7\pm6,3$ e $9,34\pm5,7$ $\%/mm^2$, $p<0,0001$), menor intensidade de inflamação ($124,5\pm84,8$ e $218\pm111,6$ n/mm^2 , $p<0,0001$) porém com semelhante densidade de microvasos ($0,72\pm0,66$ e $0,62\pm0,38$ $\%/mm^2$, $p=0,89$).

Gráfico 5: Gráficos de barras representando a comparação, entre os segmentos normais contra os segmentos com alteração de mobilidade parietal segmentar, de fibrose, inflamação e microcirculação.

4.4. Avaliação da perfusão miocárdica

4.4.1. Análise baseada em animais individuais

Entre os animais infectados, defeitos perfusionais graves em repouso (<50% da captação miocárdica em relação ao máximo) estavam presentes em 17 (50%) dos animais infectados. Os defeitos perfusionais corresponderam em média a $7,4\pm5,9\%$ da área da superfície do VE. Um exemplo de animal com defeito perfusional (DP) envolvendo a parede póstero-lateral e região apical é mostrado na figura 8. Dos 17 animais apresentando DP, 8

(47%) eram animais com alto inóculo e 6 meses de infecção. 4 animais (23,5%) eram animais infectados com baixo inóculo e sacrificados com 6 meses de infecção enquanto que os outros 5 animais (29,5) eram animais também com baixo inóculo estudados com 10 meses de infecção.

Figura 9: A- Imagem de SPECT de perfusão miocárdica de alta resolução evidenciando defeito perfusional grave (<50% de captação) envolvendo 15% da área de superfície do VE nos segmentos apicais e pósterio-lateral. B- Correlação topográfica entre perfusão miocárdica e a histologia mostrando ausência de fibrose transmural nos segmentos topograficamente correspondentes aos defeitos perfusionais.

O resultado mais relevante na análise comparativa topográfica com a histologia foi de que essas regiões de grave defeito perfusional não corresponderam a regiões com fibrose transmural (Figura 9).

A partir desses resultados separamos os animais em 3 grupos distintos: A- grupos de animais controles, B- grupo de animais infectados sem DP e C- grupo de animais infectados com DP. Os resultados da análise das alterações da função ventricular esquerda e das alterações histológicas estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5 – Resumo dos resultados das alterações da função ventricular e das alterações histológicas conforme a presença de defeitos perfusionais nos animais investigados. O valor de p refere-se ao teste ANOVA de comparação de múltiplas médias.

GRUPOS	FE (%)	ESCORE	INFLAMAÇÃO (n/mm ²)	FIBROSE (%/mm ²)	MICROCIRCULAÇÃO (%/mm ²)
A	81,9±4,6	1±0	113,2±38,8	4,5±1,8	0,73±0,5
B	80,8±8,6	1,04±0,1	111,5±54,5	6,6±3,2	0,57±0,2
C	64,8±20,8*	1,44±0,5*	172,8±88,9 [#]	8,43±3,9	0,69±0,5
<i>p</i>	0,005	0,001	0,04	0,06	0,6

Valores como média ± desvio padrão.

FE: Fração de ejeção do VE.

* p< 0,05 vs grupos A e B; # p< 0,05 vs grupo B.

Observa-se que os animais com perfusão alterada, quando comparados aos animais sem defeito de perfusão, exibiram menor FE (64,8±20,8 e 80,8±8,6%, p=0,007), maior escore de mobilidade segmentar (1,44±0,5 e 1,04±0,05%; p= 0,003), maior intensidade de inflamação (172,8±89 e 111,5±54 n/mm²; p=0,04), mas semelhante extensão de fibrose (8,4±3,9; 6,6±3,2 %/mm²; p= 0,06) e de densidade de microcirculação (0,69±0,5 e 0,57±0,2 %/mm²; p= 0,6).

Foi encontrada ainda, associação significativa entre os animais que apresentavam DP e os que apresentavam alterações da mobilidade parietal segmentar (Tabela 6). Entre os 17 animais com defeitos perfusionais, 12 (71%) apresentaram também alteração da mobilidade parietal, enquanto apenas 6 (27%) dos 22 animais com perfusão normal apresentaram alterações concomitantes da mobilidade parietal (p=0,0105, Teste Exato de Fischer).

4.4.2. *Análise baseada em segmentos*

Da mesma forma que os segmentos foram comparados quanto a mobilidade segmentar, também foi realizada a comparação entre os segmentos com perfusão miocárdica normal (n= 487) e os segmentos com defeitos perfusionais (n=57). Esses últimos, mostraram maior intensidade de inflamação (175,8±145; 111,6±69,2 n/mm²; p=0,001), maior escore de mobilidade segmentar (1,65±0,6; 1,1±0,4; p<0,0001), entretanto, com semelhante extensão de

fibrose ($10,5 \pm 18,6$; $7,4 \pm 6,2\%$; $p=0,37$) e de densidade microvascular ($0,72 \pm 0,64$; $0,63 \pm 0,5$) quando comparados aos segmentos sem defeitos perfusionais (gráfico 6).

Gráfico 6: Gráficos de barras representando a comparação, entre os segmentos com DP e os segmentos normais, da inflamação, escore regional de mobilidade parietal, fibrose e microcirculação.

Além disso, houve associação topográfica entre os segmentos com defeitos perfusionais e os segmentos com alteração de mobilidade segmentar mediante a aplicação do Teste Exato de Fisher (Tabela 6).

Tabela 6 - Tabela 2x2 com associação topográfica entre os segmentos com DP e os com AMP, $p < 0,0001$.

	AMP	NORMAL	Total
DP	24	25	49
Perfusão NORMAL	77	316	393
Total	101	341	442

DP: defeito de perfusão; AMP: alteração de mobilidade parietal

4.5. Avaliação qualitativa e descritiva visual

Alguns animais foram selecionados aleatoriamente para a descrição e comparação de achados histopatológicos entre animais controle, animais infectados sem defeito de perfusão e animais infectados com defeito perfusional. Nos animais controles, foram encontradas fibras preservadas, com leve edema intracelular (Figura 10-A). Nos animais infectados sem DP ou AMP, foi identificada congestão, leve edema intracelular e bandas de contração (Figura 10-B).

Considerando os animais que apresentam DP com função ventricular preservada, os segmentos acometidos evidenciaram congestão e bandas de contração, enquanto que os segmentos que não possuem DP apresentavam fibras mais preservadas, congestão discreta e presença de algumas fibras eosinofílicas em base ventricular (Figura 10-C).

Nos animais com DP e disfunção ventricular, foi encontrado congestão e hemorragia, bandas de contração, arteríolas dilatadas, edema intracelular e fibras onduladas e adelgadas em base ventricular esquerda (Figura 10-D).

Portanto, pela análise visual qualitativa nas regiões com DP em animais com disfunção ventricular foram encontradas alterações mais graves como congestão, hemorragia e edema intracelular que não foram vistos em outros animais controles e naqueles infectados sem defeitos perfusionais. Esses achados reforçam o resultado de que os defeitos de perfusão correspondem a regiões com maior grau de lesão miocárdica de natureza inflamatória, mas não à fibrose coalescente.

Figura 10: Análise qualitativa visual em um animal controle (A), animal infectado sem DP ou AMP (B), animal infectado com DP (C), animal infectado apresentando disfunção de ventricular esquerda (D)

Em uma análise descritiva visual, a maioria dos animais sacrificados com 10 meses de infecção, foi evidenciada importante dilatação de câmaras com diminuição do espessamento de paredes do ventrículo esquerdo. Entretanto, nenhuma cicatriz transmural foi evidenciada entre os grupos. Raros animais apresentaram miocardite grave. Intenso infiltrado inflamatório focal com células monoclueadas geralmente apresentaram-se em regiões subepicárdica ou perivascular (Figura 11). A maioria dos animais apresentou miocardite mais branda multifocal ou difusa.

Figura 11: Cortes histopatológicos: A – miocardite focal subepicárdica; B – miocardite focal perivascular; C – miocardite difusa e perivascular; D - miocardite difusa.

5. DISCUSSÃO

5.1. Principais achados

Mediante emprego de métodos de imagens *in vivo* e subsequente análise histopatológica topograficamente correlacionada com as alterações encontradas nos exames de imagem *in vivo*, descrevemos algumas características relevantes do envolvimento miocárdico da cardiomiopatia chagásica crônica no hamster. Demonstramos que a disfunção regional sistólica do VE ocorre com frequência elevada em animais ainda sem demonstração de disfunção sistólica global nesse modelo experimental de CCC. Além disso, tais alterações identificam regiões com maior extensão de fibrose e intensidade de inflamação.

Não obstante, documentamos defeitos perfusionais graves em frequência e topografia comparável ao que se tem observado em humanos chagásicos. Esses defeitos apresentaram correlação topográfica significativa com as alterações da mobilidade segmentar parietal do VE, reforçando a noção de que os defeitos perfusionais correspondem a alterações fisiopatologicamente importantes. É possível que o resultado mais impactante do estudo resida na observação original da correlação topográfica dos defeitos perfusionais com alterações histológicas inflamatórias e não com a presença de fibrose.

5.2. O modelo experimental de CCC no hamster

A fim de se estudar os mecanismos envolvidos na fisiopatogênese da CCC, vários modelos animais têm sido pospostos: macacos (CARVALHO et al., 2003), coelhos (FIGUEIREDO et al., 1985) cães (LANA et al., 1992), ratos (GUARITA-SOUZA et al., 2006) e camundongos (CHANDRA et al., 2002; JELICKS et al., 2002). Os modelos em pequenos roedores têm sido preferidos pela redução de espaços e recursos financeiros. Entretanto, alguns estudos mostraram que o camundongo pode não reproduzir de forma fidedigna as fases evolutivas da CCC, pois exhibe alterações inflamatórias muito intensas na fase aguda evoluindo indistintamente para fases sub-aguda e crônica sem exhibir uma fase de

latência entre elas (MELLO et al., 1979). Por sua vez, o rato exibe intensas alterações miocárdicas na fase aguda, mas, frequentemente falha em desenvolver a fase crônica da cardiopatia (ZELEDON et al., 1988). Dessa forma, o modelo de CCC no hamster parece reunir vantagens como: miocardite detectável na fase aguda seguida de uma fase de quiescência (equivalente à fase indeterminada da doença) e consistente progressão da disfunção ventricular esquerda na fase crônica culminando em IC (RAMIREZ et al., 1994; BILATE et al., 2003).

O modelo de CCC em hamster estudado neste trabalho mostrou consistente reprodução dos resultados encontrados na literatura. Na presente investigação observamos na fase aguda da doença, uma mortalidade de 16% no grupo de animais infectados com baixa carga de inóculo enquanto que a mortalidade no grupo de alto inóculo foi de 50%. Essa alta mortalidade na fase aguda da doença, pode ser explicada pela maior virulência da cepa Y de *T. cruzi* quando comparadas com outras cepas (Vicentina e Benedito) no modelo da doença de Chagas em hamster (RAMIREZ et al., 1994). O mesmo comportamento pode ser observado em experimentos com outros modelos animais utilizando-se a cepa Y (CHAPADEIRO et al., 1988).

Dessa forma, consideramos que 35.000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (considerado como baixo inóculo) seja uma melhor opção para este modelo experimental, em comparação com maiores inóculos, pois produziu alterações miocárdicas semelhantes com menor taxa de mortalidade na fase aguda, portanto com melhor rendimento.

Quando estudados na janela temporal de 6 meses de infecção, embora ambos os grupos apresentassem semelhante fração de ejeção do ventrículo esquerdo, os animais com alta carga parasitária apresentavam maior escore de mobilidade segmentar, correlacionado com maior intensidade de inflamação. Esse resultado sugere que a carga parasitária imposta na fase aguda da doença esteja relacionada com a intensidade de inflamação tardiamente e que esta esteja relacionada à gravidade da doença no modelo do hamster.

Esses dados, corroboram os resultados encontrados por Bilate et al (2003), que embora tenham encontrado mortalidade semelhante entre as mesmas cargas parasitárias, evidenciou mortalidade e disfunção ventricular mais precoces em animais com maior quantidade de inóculo.

Concordando com esse resultado, Marinho et al (1999), avaliaram se diferentes cargas de inóculo (baixa e alta) poderia influenciar a evolução da fase crônica da doença em camundongos infectados com *T. cruzi*. Um ano após a infecção, os animais infectados com alto inóculo demonstraram maiores níveis de parasitemia, intensidade de inflamação cardíaca

e da musculatura estriada esquelética e principalmente, maior ativação do sistema imune do que os animais com baixo inóculo. Esses resultados sugeriram que a carga parasitária na fase aguda influencia a ativação do sistema imune e o desenvolvimento da patologia da CCC no camundongo (MARINHO et al., 1999). No nosso estudo em hamsters, contudo, não incluímos detecção do grau de parasitismo no tecido cardíaco para que possamos documentar esse mecanismo objetivamente. Contudo, os resultados mostrando maior intensidade de inflamação em animais com maior inóculo apoiam indiretamente a hipótese de que a carga parasitária na fase aguda influencia a gravidade da cardiopatia crônica.

Corroborando com os dados supracitados, um estudo com duração de 8 anos, realizado no interior de Minas Gerais com 279 pacientes, avaliou a evolução da CCC e sua relação com a parasitemia através do eletrocardiograma e do xenodiagnóstico. Não foi evidenciada relação entre a parasitemia e a evolução da doença. Além disso, independente da parasitemia, houve progressão da cardiopatia (35% dos pacientes) e esta estava associada à idade e ao sexo masculino (PEREIRA et al., 1992). Entretanto, cabe ressaltar que a relação entre o grau de parasitismo na fase aguda e a evolução da doença na sua fase crônica no âmbito clínico ainda é aspecto controverso na fisiopatogenia da CCC. Estudos em humanos não confirmaram até o momento o conceito de que o grau de parasitismo na fase aguda determina a evolução tardia da doença.

No nosso estudo, animais com mesma carga parasitária (baixo inóculo), entretanto com maior tempo de evolução da doença (10 meses vs 6 meses de infecção), demonstraram maior dilatação ventricular, mais acentuada disfunção sistólica ventricular esquerda global e regional (figura 7). Esses achados também se correlacionam com maior intensidade de inflamação e com maior extensão de fibrose. Isso aponta para um caráter progressivo da doença no hamster com o aparecimento de fibrose reparativa e consequente insuficiência cardíaca nas fases mais tardias, bem semelhante ao acometimento observado em humanos (Mady; Nacrueth, 1995). Hiss et al. (2009), demonstraram progressão de fibrose regional ao reavaliar pacientes chagásicos após 5 anos da avaliação basal através da cintilografia de perfusão miocárdica *in vivo*. Além disso, a progressão da fibrose associou-se com a progressão da disfunção ventricular esquerda.

Vale ainda ressaltar que no nosso estudo não foi identificada a presença de parasitas no tecido miocárdico na fase crônica da doença, mediante emprego de análise histológica convencional com coloração de hematoxilina e eosina. Esses dados corroboram os resultados de estudos anteriores no hospedeiro cronicamente infectado com *T. cruzi* que geralmente

evidenciam infiltrados de células inflamatórias, que podem vir acompanhadas de fibrose, mas pouco ou nenhum parasita nos sítios de intensa inflamação (Tarleton; Zhang, 1999).

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

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

5.3. Disfunção ventricular esquerda

A ecocardiografia nas últimas décadas tornou-se importante ferramenta no estudo da estrutura e função cardíaca nas diversas fases da doença de Chagas (ACQUATELLA, 2007). Embora o acometimento cardíaco na fase aguda da doença seja infrequente, a miocardite ou pericardite pode apresentar-se principalmente com derrame pericárdico, discinesia da parede anterior e/ou apical e dilatação ventricular esquerda embora a fração de ejeção esteja preservada (PARADA et al., 1997; PINTO et al., 2008). Essas alterações são decorrentes tanto da destruição da trama tecidual pela proliferação do próprio parasita quanto da intensa atividade inflamatória próxima às células infectadas (ROSSI, 1990) e podem surgir durante a reagudização da doença no caso de imunossupressão por transplantes de órgãos (SIMOES et al., 1995) ou na síndrome da imunodeficiência adquirida (VAIDIAN et al., 2004).

Na fase crônica da doença, após décadas da infecção, os pacientes com CCC podem apresentar ao ecocardiograma refluxo mitral, dilatação do átrio esquerdo, disfunção diastólica, redução da fração de ejeção associada à dilatação ventricular esquerda (ACQUATELLA et al., 1980) e hipocontratilidade global ou regional que tem valor prognóstico (RASSI et al., 2006). Esse remodelamento cardíaco tem como característica microscópica a miocardite

multifocal ou difusa (PEREIRA BARRETTO et al., 1986) e fibrose intersticial extensa (MADY et al., 1999).

Concordante com esses achados de estudos clínicos, no nosso trabalho, uma parcela relevante (29%; n=10) dos animais cronicamente infectados apresentaram significativa redução da FEVE (figura 7), aumento do DSVE e DDVE assim como maior escore de mobilidade parietal segmentar quando comparados aos controles da mesma idade. Desses animais, seis estavam na janela temporal de 10 meses de infecção.

Esses resultados corroboram os achados de Bilate et al (2003), que mediante estudo ecocardiográfico longitudinal e histopatológico em hamster cronicamente infectados com *T. cruzi*, observaram pequena porcentagem de animais com disfunção ventricular com 4 meses após infecção (28%). Esta porcentagem evoluiu aos 8 e 12 meses pós-infecção (50 e 90% respectivamente).

Os animais com disfunção ventricular do nosso estudo apresentavam significativo aumento do número de células mononucleadas, correspondendo a um infiltrado inflamatório mais intenso no tecido miocárdio, quando comparados aos animais não infectados e aos animais infectados sem disfunção ventricular. Além disso, esses animais apresentaram maior área de fibrose quando comparados aos animais não infectados. A FEVE correlacionou-se negativamente com a extensão de fibrose, porém correlacionou-se negativamente de forma mais importante com a intensidade de inflamação. No conjunto esses resultados sugerem que os animais foram estudados em uma fase intermediária de evolução da doença em que o componente de agressão inflamatória mostra-se mais saliente do que a fibrose reparativa que deve tornar-se mais intensa nas fases mais tardias da cardiopatia.

Nossos achados assemelham-se aos obtidos no estudo de Ramires e colaboradores (RAMIREZ et al., 1994) em hamsters onde foi evidenciado o desenvolvimento de cardiopatia crônica com miocardite multifocal e fibrose, levando à dilatação ventricular esquerda em grande parte dos animais estudados. Bilate et al. (2003), demonstrou que esse modelo desenvolve miocardite multifocal e que esta, pode ser a responsável pelo dano progressivo do tecido cardíaco desencadeando um processo de remodelamento que culmina em extensa fibrose reparativa.

Colmanetti et al. (2005), em um estudo ultraestrutural e morfométrico de cardiomiócitos de hamsters também infectados com *T. Cruzi* encontrou abaulamento subsarcolema e ruptura em nível do disco Z. Nessas regiões, o transporte de substâncias do interstício para dentro de parte das células pode ser alterado prejudicando o desempenho cardíaco. Ainda foram observadas alterações na zona de aderência com condensação de

elétrons de proteínas de adesão e aumento do espaço intersticial. Apesar dos desmossomos e das junções GAP não apresentarem alterações, havia um desarranjo dos miofilamentos. Como consequência, as alterações morfológicas encontradas nas junções dos cardiomiócitos de hamster com CCC, podem perturbar a superfícies de contato entre essas células. Isso prejudica a condução normal dos estímulos elétricos e consequentemente a função cardíaca. Na análise morfométrica de sarcômeros, foi encontrado diferença significativa tanto no comprimento quanto na espessura de miofibrilas quando comparados a animais não infectados.

Estes dados demonstram a ocorrência de uma cardiomiopatia dilatada semelhante ao descrito em pacientes chagásicos (PALACIOS-PRU et al., 1989). Estudos clínicos mostram os mesmos achados vistos aqui, de que a presença de inflamação correlaciona-se com a gravidade de disfunção ventricular esquerda. Através de um estudo com biópsia endomiocárdica com pacientes chagásicos em estágios diferentes da evolução da doença, Higuchi et al (1987), demonstraram que a intensidade de inflamação estava diretamente associada à gravidade da doença e que pacientes com IC apresentavam alta incidência de miocardite ativa.

5.3.1. Disfunção sistólica regional do ventrículo esquerdo

Estudo em animais utilizando a ecocardiografia tem auxiliado o entendimento de fisiopatogênese da doença de Chagas em vários modelos experimentais (JELICKS et al., 2002; GUARITA-SOUZA et al., 2006) especialmente em hamsters (BILATE et al., 2007; PIMENTEL et al., 2012). Entretanto, tais estudos têm avaliado somente índices de função sistólica global do VE como a fração encurtamento e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Nos pacientes chagásicos na fase indeterminada da doença, estudos ecocardiográficos têm demonstrado algum grau de acometimento da mobilidade parietal em grande parte desses indivíduos, embora esses pacientes não apresentem sintomas, alterações eletrocardiográficas ou radiológicas, (BARRETTO; IANNI, 1995). Estudos pregressos já demonstraram que presença de alterações de mobilidade segmentar da parede ventricular esquerda na fase indeterminada está associada ao desenvolvimento tardio de maior dano cardíaco (ALMEIDA-

FILHO et al., 2002) e piora mais acentuada da função sistólica global (PAZIN-FILHO et al., 2006). Esses aspectos reforçam a noção de que o acometimento regional da função sistólica do VE mesmo naqueles indivíduos com FE normal tem importância clínica e fisiopatológica na CCC.

No nosso trabalho, dos 24 animais infectados e ainda com FEVE preservada, 33% apresentaram alteração de mobilidade parietal segmentar. Tais alterações segmentares estavam presentes no ápice, segmentos inferiores e póstero-laterais. Essas alterações assemelham-se aos achados frequentemente relatados na avaliação ecocardiográfica em pacientes na fase indeterminada ou intermediária do desenvolvimento da disfunção miocárdica da doença (ACQUATELLA, 2007).

Ao compararmos os segmentos exibindo alteração de mobilidade parietal com os segmentos com MPS normal, observamos maior intensidade de inflamação e da extensão de fibrose nos primeiros. Adicionalmente, valores individuais do escore de mobilidade parietal segmentar correlacionaram-se positivamente com a intensidade de inflamação. Isso demonstra que as alterações segmentares detectadas não foram devidas a artefatos ou falhas na avaliação segmentar da mobilidade parietal pelo método ecocardiográfico.

Portanto, a detecção de alterações de mobilidade regional em animais com função global ainda preservada, que é um achado original desta pesquisa, identifica animais com doença miocárdica incipiente, basicamente de natureza inflamatória, sendo uma variável relevante na caracterização e monitoramento da função cardíaca no modelo de CCC no hamster. É plausível supor que apenas em fases mais tardias da evolução da CCC as regiões dissinérgicas venham a corresponder a áreas de fibrose miocárdica regional, como sugerem estudos anatomopatológicos em humanos.

Um achado intrigante em nosso estudo é que, embora não tenhamos encontrado aneurismas apicais, houve um acometimento da função sistólica regional preferencial das mesmas paredes acometidas no ventrículo esquerdo de humanos (ápice e paredes póstero-laterais). Estudos da década de 80 já demonstravam o acometimento regional da doença, especialmente da parede posterior do ventrículo esquerdo (FRIEDMAN et al., 1981; ORTIZ et al., 1987). Um estudo anatomopatológico de 118 pacientes que morreram de CCC evidenciou afilamento e fibrose segmentar especialmente em ápice, parede posterior e lateral do ventrículo esquerdo com relativo estado preservado do septo interventricular. (ACQUATELLA et al., 1980). Os mecanismos fisiopatogênicos que levam a esse padrão específico de acometimento regional do VE tanto nos humanos como neste modelo experimental ainda são desconhecidos.

5.4. Perfusão miocárdica

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

Simões et al. (2000), estudando 37 pacientes chagásicos com diferentes níveis de disfunção miocárdica, identificaram defeitos de perfusão regional cardíaco (fixos, reversíveis e paradoxais) em uma frequência importante (78% dos pacientes). Defeitos perfusionais reversíveis estiveram presentes em 46% dos pacientes, na vigência de coronárias angiograficamente normais, portanto, associadas à disfunção microvascular coronária.

Assim como o trabalho supracitado, em um trabalho bem recente, onde foram estudados 40 pacientes na fase indeterminada da doença, defeitos de perfusão miocárdica identificados pelo *gated*-SPECT com ^{99m}Tc-Sestamibi, correlacionaram-se topograficamente com alterações segmentares de mobilidade parietal identificadas pelo Doppler tecidual (PEIX, et al. 2013).

Esses trabalhos associaram essas alterações a possíveis mecanismos regulatórios do fluxo coronariano em nível da microcirculação. Além disso, regulação do fluxo anormal compatível com disfunção endotelial e respostas anormais ao estímulo de hiperventilação tem sido descritas em pacientes com doença de Chagas (TORRES et al., 1995; SIMOES et al., 1998).

Mais recentemente, Rabelo et al. (2014), estudaram pacientes chagásicos na fase indeterminada da doença em comparação com indivíduos controles saudáveis, mediante a avaliação da Reserva de Fluxo Coronariano (RFC) utilizando-se Eco-Doppler de estresse.

Demonstrou-se que a sorologia positiva para a doença de Chagas foi fator associado de forma independente à redução da RFC. Esses resultados confirmam os achados dos estudos anteriores indicando a presença de distúrbios de perfusão miocárdica por disfunção da microcirculação coronária, caracterizada por capacidade reduzida da microcirculação em responder com aumento adequado do fluxo coronariano frente a estímulo de vasodilação.

Além da participação na gênese dos sintomas anginosos, outros estudos em humanos sugerem também que a isquemia microvascular coronária possa participar do mecanismo que determina o aparecimento da disfunção miocárdica na fase crônica da doença.

Hiss et al (2009), estudaram recentemente 36 pacientes chagásicos longitudinalmente por um período médio de 5,6 anos. Na avaliação basal, defeitos perfusionais em repouso estavam presentes em 27 pacientes (75%). A proporção de segmentos acometidos aumentou de 16% para 25,8% dos segmentos analisados na reavaliação desses indivíduos. A distribuição destes defeitos também foi predominantemente em seguimentos postero-laterais, inferiores e apicais e houve associação topográfica entre defeitos perfusionais e alterações regionais de mobilidade parietal, assim como houve correlação do defeito de perfusão em repouso com a fração de ejeção. Além disso, na reavaliação foi visto uma alta frequência de defeitos perfusionais de repouso que possuíam caráter reversível na avaliação inicial, ou seja, dos 47 segmentos apresentando defeitos reversíveis, 32 progrediram para defeitos fixos em repouso e dos 469 segmentos normais no início, somente 41 tiveram o mesmo destino. Dessa forma, os autores mostraram que a progressão da disfunção ventricular esquerda tanto segmentar quanto global correlacionava-se com o agravamento da extensão dos defeitos de perfusão em repouso. Isso estaria indicando possivelmente o aumento das áreas de fibrose miocárdica. Essa correlação topográfica entre defeitos de perfusão em repouso e fibrose miocárdica tem sido descrita em pacientes com cardiomiopatia dilatada através de estudos com biópsias ou investigações de autópsia (LI, et al. 1996).

Portanto, é bastante plausível a hipótese de que a disfunção microvascular coronariana possa ocupar um lugar importante na fisiopatologia da CCC. Neste sentido, estudos experimentais usando imagens *in vivo* poderiam contribuir significativamente para o entendimento deste assunto.

No nosso trabalho, 17 dos 34 (50%) animais infectados com *T. cruzi* apresentaram redução grave de captação miocárdica do radiotraçador de perfusão (^{99m}Tc-Sestamibi), após injeção na condição de repouso.

De um ponto de vista teórico e amplo, considerando a cinética e os mecanismos de distribuição e captação do radiotraçador de perfusão e os princípios físicos de obtenção de

imagens *in vivo* de perfusão miocárdica pelo método cintilográficos, esses defeitos perfusionais poderiam corresponder a:

- 1- **Artefatos de atenuação:** Um problema comum dos sistemas de imagens cintilográficas baseados em detecção de fótons singulares, como SPECT, é a ocorrência de artefatos em consequência da atenuação da emissão de fótons que são absorvidos por partes moles (diafragma, mama, musculatura) podendo gerar falsos defeitos perfusionais em repouso (FRICKE, et al. 2004). Entretanto, vários argumentos podem ser levantados para indicar que artefatos de atenuação não foram os responsáveis pelos defeitos perfusionais em repouso encontrados no nosso modelo. Inicialmente, as imagens obtidas em nosso estudo apresentaram boa relação órgão alvo/fundo com perfeita visualização dos limites das paredes e da cavidade do ventrículo esquerdo. Além disso, demonstramos em estudo prévio utilizando o mesmo sistema de imagens (mini-SPECT) que defeitos de atenuação não foram capazes de promover defeitos com captação miocárdica abaixo de 50% (defeito grave) em relação ao pixel de máximo acúmulo de captação no miocárdio de ratos (OLIVEIRA et al., 2013). Adicionalmente, as imagens dos animais controles não exibiram defeitos perfusionais, apresentando distribuição uniforme do radiotraçador entre os diferentes seguimentos miocárdicos.

Outro fator que vai contra a interpretação de que os defeitos encontrados se devam a artefatos de atenuação é que demonstramos significativa redução da fração de ejeção, aumento do escore de mobilidade parietal e aumento na intensidade de inflamação nos animais com defeitos de perfusão. Além disso, de forma bem semelhante à doença humana, os defeitos de perfusão apresentaram-se preferencialmente em segmentos apicais, inferiores e póstero-laterais e houve associação topográfica com o acometimento simultâneo da mobilidade parietal. Dessa forma, consideramos que os defeitos de perfusão não eram artefactuais, mas correspondiam à alterações tissulares reais e significativas.

- 2- **Fibrose transmural:** O Sestamibi-Tc99m é um agente marcador de perfusão miocárdica que se distribui proporcionalmente ao fluxo sanguíneo coronário regional (GIBBONS et al., 1989), dependendo também da extração celular, refletindo portanto a viabilidade miocárdica (BEANLANDS et al., 1990). Concordante com esses conceitos, estudos experimentais e clínicos têm utilizado SPECT com Sestamibi-Tc99m como ferramenta altamente precisa para detecção e quantificação da extensão

de infarto agudo do miocárdio (CHRISTIAN et al., 1990; SANTORO et al., 1990; SINUSAS et al., 1990; FREEMAN et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2013). Um estudo avaliando a perfusão miocárdica em pacientes isquêmicos que foram submetidos a transplante cardíaco demonstrou que para a presença de defeitos graves de captação (<60% de captação em relação ao máximo), seria necessária uma extensão menor ou igual a 30% de miocárdio viável, portanto 70% de extensão de fibrose transmural, em dado segmento da parede ventricular esquerda (MEDRANO et al., 1996). Concordante com esses conceitos, vários autores que identificaram defeitos perfusionais em repouso em pacientes com CCC, interpretaram tais alterações como decorrentes de extensa necrose ou fibrose regional (MARIN-NETO et al., 1992; HISS et al., 2009).

Entretanto, no melhor do nosso conhecimento nenhum estudo pregresso, clínico ou experimental, realizou correlação topográfica dos achados histopatológicos associados aos defeitos perfusionais *in vivo* na CCC. Os achados histopatológicos encontrados em nosso trabalho foram conclusivos em mostrar correlação topográfica de maior grau de inflamação nas áreas com defeitos perfusionais, mas não apresentavam diferenças quanto à extensão de fibrose. Vale ressaltar que a extensão da fibrose nas regiões com defeitos perfusionais atingiu valores médios de 10,5 %/mm² sendo, portanto insuficientes para causarem magnitude significativa de redução de captação do radiotraçador por métodos *in vivo* utilizando-se imagens de SPECT (MEDRANO et al., 1996).

- 3- ***Redução da perfusão miocárdica presente em repouso, em regiões de miocárdio viável:*** No nosso trabalho, regiões com defeitos perfusionais demonstraram claramente ausência de necrose ou fibrose regional significativa suficientes para produzir uma redução detectável de captação do radiotraçador. Portanto, é plausível considerar que os defeitos perfusionais detectados em repouso nas áreas miocárdicas plenamente viáveis, como demonstradas pela histopatologia, correspondam a regiões com hipoperfusão miocárdica. Dessa forma, esta situação é semelhante àquela vista em pacientes com síndrome coronariana aguda que recebem a injeção do radiotraçador na vigência da dor precordial e demonstram defeitos perfusionais em repouso em regiões supridas por artérias coronárias transitoriamente obstruídas, ainda passíveis de recuperação funcional após tratamento de reperfusão/revascularização (SANTORO et al., 1990; JAVADI et al. 2011).

Portanto, nossos achados indicam a presença de distúrbios da perfusão miocárdica em repouso em regiões miocárdicas viáveis em grande parcela (50%) dos animais com CCC.

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

Vários mecanismos envolvendo alterações estruturais ou funcionais da microcirculação coronária podem ser aventados para explicar a presença desses distúrbios da perfusão miocárdica na CCC.

Uma das alterações estruturais propostas estaria relacionada a processos de rarefação da microcirculação coronária. Esse processo descrito como “*descapilarização mesênquimo-reactiva*” ocorreria por hipótese por compressão extraluminal associada ao processo inflamatório no interstício cardíaco e foi demonstrada em estudos histotopográficos da microcirculação coronária de pacientes chagásicos. Um achado relevante desses estudos reside na correlação topográfica positiva entre regiões de rarefação vascular com a presença de miocitólise focal, forma de lesão do cardiomiócito intimamente associada à isquemia miocárdica (JORG, 1974). A diminuição da densidade de finos ramos arteriais coronários intramurais também foi caracterizada por estudos de corações chagásicos usando técnicas de angiografia *post mortem* (FERREIRA et al., 1980).

Nossos resultados não reforçam a atuação deste tipo de mecanismo no modelo de CCC no hamster. A análise quantitativa a partir da imunohistoquímica para alfa actina, que marca componentes das paredes dos microvasos coronários, não mostrou diferença entre os segmentos com ou sem defeitos perfusionais. Esses dados indicam que não houve importante redução, ou rarefação, do número de microvasos coronários nas regiões com hipoperfusão. Esses resultados sugerem, portanto, que as alterações de perfusão miocárdica ocorram por outro mecanismo que não a destruição ou rarefação da microcirculação coronariana.

Por outro lado, os resultados da presente investigação mostram relevante associação topográfica positiva do distúrbio de perfusão miocárdica com alterações inflamatórias. Esses achados sugerem fortemente que o distúrbio perfusional ocorra por alterações funcionais do controle do fluxo sanguíneo a nível microvascular secundárias ao próprio processo inflamatório.

De fato, várias evidências derivadas de estudos clínicos (TORRES, 1960) e experimentais (ROSSI et al., 1984; FACTOR et al., 1985) suportam a hipótese de que

anormalidades estruturais e funcionais da microcirculação associadas à inflamação ocorram na cardiomiopatia chagásica e que estas possam contribuir para progressão da disfunção miocárdica. Essas alterações podem estar diretamente relacionadas à infecção pelo *T. cruzi* lesando células endoteliais e indiretamente relacionada à própria agressão inflamatória. Esse corpo de evidências foi revisto recentemente (MARIN-NETO et al., 2013) e a seguir os principais mecanismos são brevemente relatados.

Torres (1960) descreveu em um estudo de necropsia, intenso colapso de arteríolas intramiocárdicas com proliferação da camada íntima em pacientes com cardiomiopatia chagásica. Essas alterações seriam as responsáveis por diminuição da permeabilidade dos vasos sanguíneos ocasionando distúrbios circulatórios de pouca intensidade e curta duração. Um estudo através de biópsia miocárdica corroborou com esses achados. Ferrans et al. (1988), demonstraram um espessamento das membranas basais de células vasculares lisas e dos miócitos cardíacos. Tais perturbações promoveriam alterações do metabolismo das células musculares cardíacas com consequente miocitólise difusa.

Estudos em camundongos que apresentaram características semelhantes da doença humana demonstraram um intenso comprometimento da microcirculação incluindo ocorrência de trombos plaquetários oclusivos em pequenas artérias coronárias epicárdicas e intramurais (ROSSI et al., 1984). Os autores demonstraram em outro estudo que esses distúrbios levam à hipóxia tecidual miocárdica podendo ser em parte responsável pela miocitólise focal (ROSSI; CAROBREZ, 1985). Utilizando o mesmo modelo, Factor et al. (1985), detectaram áreas focais de constrição vascular e proliferação endotelial microvascular.

Outro estudo ultraestrutural no mesmo modelo experimental por nós estudado demonstrou que o edema de células endoteliais e redução do lúmen de vasos capilares poderiam ser os responsáveis em parte pelas alterações nos cardiomiócitos através de isquemia focal (COLMANETTI et al., 2005).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a infecção pelo *T. Cruzi* não se restringe aos cardiomiócitos, mas pode se estender para células endoteliais levando à lesão e DMC diretamente (ROSSI, 1997).

Em estágios bem precoces da fase aguda da infecção experimental em ratos, pode ser detectada a presença de parasitas em células endoteliais da microcirculação coronariana. Edema dessas células e alguns pontos de descontinuidade citoplasmática já surgem em forma de buracos expondo o colágeno subendotelial e geralmente associado à agregação plaquetária. Dessa forma, o endotélio coronário poderia ser um alvo inicial do parasita e as alterações

decorrentes dessa agressão direta, afetaria também a geração de substâncias vasoativas (ROSSI, 1997).

Além disso, Tripomastigotas de *T. cruzi* podem produzir neuraminidase que pode estar envolvida na remoção de ácido siálico em superfície de células endoteliais do miocárdio de mamíferos. Agregação de plaquetas e formação de trombos dentro da microcirculação coronariana pode ter origem a partir da perda desta molécula protetora da superfície endotelial (LIBBY et al., 1986).

Huang et al. (1999), demonstraram que a infecção endotelial está associada com a ativação de NF- κ B e expressão de moléculas de adesão celular como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1. Essa ativação do NF- κ B desempenha um papel crucial na iniciação de uma resposta inflamatória é um possível mecanismo para o recrutamento de leucócitos circulantes. Entretanto, essa resposta inflamatória, que é importante para o controle inicial da infecção aguda, pode ser prejudicial se persistir por períodos prolongados e contribuir com a lesão vascular e consequente dano miocárdico.

As células endoteliais são a principal fonte de endotelina 1 (ET-1), que é um peptídeo de 21 aminoácidos reconhecido como potente vasoconstritor endógeno. A ET-1, que também pode ser produzido por cardiomiócitos, interage com o receptor de endotelina da musculatura lisa (ETA) e promove um aumento do cálcio intracelular e consequente vasoconstrição. A infecção com *T. cruzi* em camundongos promove altos níveis plasmáticos de ET-1 e superexpressão do RNA mensageiro de ET-1, da pré-proendotelina (preproET-1, molécula precursora de ET-1), e da enzima conversora de endotelina (ECE) na vasculatura de células miocárdicas (PETKOVA et al., 2001). Pacientes com CCC têm apresentado altos níveis plasmáticos de ET-1 (SALOMONE et al., 2001). Além disso, ET-1 prejudica o metabolismo da adenosina monofosfato cíclica (AMPc), que tem função protetora contra lesão direta e indireta das células endoteliais através da adesão e agregação plaquetária na parede do vaso (MORRIS et al., 1992).

Em um estudo histopatológico e ultraestrutural em cães, Andrade et al. (1994), demonstraram que a necrose miocitolítica e a lesão do endotélio capilar estavam associadas a intenso infiltrado mononuclear, mesmo na ausência de células parasitadas. Os autores aventaram a hipótese que essa lesão vascular indireta era em consequência da interação entre linfócitos e células epiteliais. É provável que um estímulo antigênico durante a fase aguda da infecção leve a um aumento da expressão de várias moléculas de adesão de células endoteliais e aumento da adesão de leucócitos a células endoteliais e essa interação, promoveria a liberação de mediadores causadores de lesão microvascular. Esse dano é manifestado pelo

edema e degeneração de células endoteliais e pela formação de agregados de plaquetas e microtrombos de fibrina.

A ativação plaquetária pode ser decorrente também da interação entre plaquetas e o endotélio lesado, e têm como consequência produção de tromboxano A₂ (TXA₂) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF), que são agentes indutores de agregação plaquetária e vasoespasmo (TANOWITZ et al., 1990). Além disso, foi demonstrado em outro estudo que TXA₂ pode ser sintetizado pelo próprio T. Cruzi, independente da forma do parasita (ASHTON et al., 2007).

Essas anormalidades são potencialmente reversíveis com o uso de verapamil, uma droga bloqueadora dos canais de cálcio, com efeito vasodilatador e antiagregante plaquetário, o que permitiria a manutenção da perfusão microvascular (MORRIS et al., 1989). A administração dessa droga reduziu a mortalidade (TANOWITZ et al., 1996), diminui a inflamação e extensão de fibrose, melhora a estrutura miocárdica em camundongos tratados na fase aguda da doença (CHANDRA et al., 2002; SOUZA et al., 2004). Esses resultados podem ser em consequência da melhora das áreas segmentares de vasoespasmos, da velocidade de fluxo e agregação plaquetária que geralmente estão comprometidos nessa infecção (TANOWITZ et al., 1996).

Por outro lado, a infecção chagásica resulta no aumento da expressão de citocinas (TANOWITZ et al., 1992; HUANG et al., 1999), moléculas de adesão celular e quimiocinas (TEIXEIRA et al., 2002) que são importantes componentes da resposta inflamatória (Rossi, Tanowitz et al. 2010), mas que podem agir diretamente sobre a resposta vascular induzindo alterações do controle da regulação do fluxo sanguíneo miocárdico.

Portanto, os nossos achados reforçam fortemente a hipótese levantada em outras ocasiões de que a disfunção microvascular possa ser um marcador indireto da presença de inflamação na CCC (MARIN-NETO et al., 2007). A figura 12, adaptada a partir de revisão publicada sobre o assunto, ressalta o conjunto do modelo fisiopatológico da CCC com ênfase ao papel da disfunção e isquemia microvascular como consequência da inflamação na doença.

Figura 12- Esquema dos principais mecanismos patogênicos na cardiomiopatia chagásica crônica utilizado por Marin-Neto et al. (2007).

Vale ressaltar ainda, para uma melhor compreensão da tradução dos resultados desta investigação experimental para o contexto clínico que, diferente do que acontece nos humanos em que a DMC é documentada *in vivo* pela presença de defeito perfusional reversível durante estresse na vigência de artérias coronárias normais (CREA; CAMICI; MERZ, 2013), a presença de DMC é indicada no modelo do hamster pelo achado de defeito perfusional em repouso em regiões de miocárdio viável, confirmado pela histopatologia. Resta esclarecer que o fato de termos realizado aquisição de imagens apenas na condição de repouso possa ter mascarado os defeitos perfusionais reversíveis, subestimando-se dessa forma a magnitude dos distúrbios de perfusão presentes na CCC do hamster.

5.5. Implicações dos resultados do presente estudo

Os resultados reportados aqui vêm a contribuir para o entendimento do significado da isquemia miocárdica microvascular para o complexo fisiopatogênico da cardiomiopatia chagásica crônica. Demonstramos que alterações da perfusão miocárdica estão topograficamente associadas à inflamação. Além disso, o achado da correlação topográfica dos defeitos de perfusão com as alterações da mobilidade parietal segmentar em regiões de miocárdio viável aponta para a possibilidade de que as alterações funcionais contráteis possam ser recuperáveis, com potencial impacto na evolução da cardiopatia, mediante emprego de formas de intervenção terapêutica voltadas para redução da isquemia miocárdica.

6. CONCLUSÃO

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

1. A disfunção sistólica segmentar do VE ocorre com frequência elevada em animais com desempenho sistólico global do VE ainda preservado identificando regiões com maior extensão de fibrose e maior intensidade de inflamação.
2. Defeitos perfusionais graves correspondendo a distúrbios da perfusão miocárdica foram detectados em elevado percentual de animais e apresentaram correlação topográfica com alterações da mobilidade segmentar parietal e com maior grau de disfunção sistólica global do VE.
3. Os distúrbios perfusionais miocárdicos apresentaram associação topográfica com alterações histológicas inflamatórias em regiões com plenitude de viabilidade miocárdica e não com presença de fibrose, indicando que esses defeitos perfusionais representem distúrbios da perfusão miocárdica decorrentes da disfunção microvascular coronária secundária à inflamação.

Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124-1131, 2007.

ACQUATELLA, H. et al. M-mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chagas' heart disease. A clinical and pathologic study. **Circulation**, v. 62, n. 4, p. 787-799, 1980.

ALMEIDA-FILHO, O. C. et al. Minor segmental dyssynergy reflects extensive myocardial damage and global left ventricle dysfunction in chronic Chagas disease. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 15, n. 6, p. 610-616, 2002.

ANDRADE, S. Patologia experimental da doença de Chagas. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. Guanabara Koogan: 177-200, 2000.

ANDRADE, Z. A. et al. Myocardial changes in acute Trypanosoma cruzi infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **American Journal of Pathology**, v. 144, n.6, p. 1403-1411, 1994.

ASHTON, A. W. et al. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 929-940, 2007.

BARRETTO, A. C.; IANNI, B. M. The undetermined form of Chagas' heart disease: concept and forensic implications. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 2, p. 797-801, 1995.

BEANLANDS, R. S., et al. Are the kinetics of technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile affected by cell metabolism and viability? **Circulation**, v. 82, n. 5, p. 1802-1814, 1990.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 5, p. 52-54, 2009.

BILATE, A. M. et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy, **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1104-1113, 2007.

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 and Infection**, v. 5, n. 12, p. 1116-1124, 2003.

CARVALHO, C. M. E. et al. Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (Macaca mulatta): Evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography, and radiology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 6, p. 683-691, 2003.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

- CHAGAS, C. Processos patojenicos da tripanozomiasse americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 5-36, 1916.
- CHANDRA, M. et al. Cardioprotective effects of verapamil on myocardial structure and function in a murine model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection (Brazil Strain): an echocardiographic study. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 207-215, 2002.
- CHAPADEIRO, E. et al. Cardiac lesions in Wistar rats inoculated with various strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 3, p. 95-103, 1988.
- CHRISTIAN, T. F. et al. Mismatch of left ventricular function and infarct size demonstrated by technetium-99m isonitrile imaging after reperfusion therapy for acute myocardial infarction: identification of myocardial stunning and hyperkinesia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 16, n. 7, p. 1632-1638, 1990.
- COLMANETTI, F. H. et al. Myocardiocyte ultrastructure and morphometrical analysis in hamsters experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Ultrastructural Pathology**, v. 29, n. 2, p. 139-147, 2005.
- CREA, F.; CAMICI, P. G.; MERZ, C. N. B. Coronary microvascular dysfunction: an update. **European Heart Journal**, 2013. [Epub ahead of print]
- FACTOR, S. M. et al. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 2, p. 246-253, 1985.
- FEIT, A.; EL-SHERIF, N.; KOROSTOFF, S. Chagas' disease masquerading as coronary artery disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 143, n. 1, p. 144-145, 1983.
- FERRANS, V. J. et al. Basement membrane thickening in cardiac myocytes and capillaries in chronic Chagas' disease. **American Journal of Cardiology**, v. 61, n. 13, p. 1137-1140, 1988.
- FERREIRA, C. S. et al. Post-mortem coronary angiography in chronic Chagas carditis, Anatomico-radiologic correlation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 34, p. 2, p. 81-86, 1980.
- FIGUEIREDO, F.; ROSSI, M. A.; SANTOS, R. R. Evolução da cardiopatia experimentalmente induzida em coelhos infectados com *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 133-141, 1985.
- FREEMAN, I., et al. Effect of coronary occlusion and myocardial viability on myocardial activity of technetium-99m-sestamibi. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 32, n. 2, p. 292-298, 1991.
- FRICKE, H. et al. A method to remove artifacts in attenuation-corrected myocardial perfusion SPECT Introduced by misalignment between emission scan and CT-derived attenuation maps. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 10, p. 1619-1625, 2004.

FRIEDMAN, A. A. et al. Ventricular performance in Chagas disease. Echocardiographic relations in myocardiopathy with dromotropic disorder and in the preclinical phase. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 36, n. 1, p. 23-27, 1981.

GIBBONS, R. J. et al. Feasibility of tomographic ^{99m}Tc-hexakis-2-methoxy-2-methylpropyl-isonitrile imaging for the assessment of myocardial area at risk and the effect of treatment in acute myocardial infarction. **Circulation**, n. 80, v. 5, p. 1277-1286, 1989.

GUARITA-SOUZA, L. C. et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. **Circulation**, v. 114(1 Suppl), p. 120-124, 2006.

GUTIERREZ, F. R. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 673-685, 2009.

HAGAR, J. M.; RAHIMTOOLA, S. H. Chagas' heart disease in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 11, p. 763-768, 1991.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659-688, table of contents, 2001.

HIGUCHI, M. D. et al. Correlation between Trypanosoma-Cruzi Parasitism and Myocardial Inflammatory Infiltrate in Human Chronic Chagasic Myocarditis - Light-Microscopy and Immunohistochemical Findings. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101-106, 1993.

HIGUCHI, M. L. et al. Severe arteriolar dilatation and ischemic lesions in chronic Chagas' cardiopathy: a 3D confocal laser microscopic study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, p. 382, 1998.

HIGUCHI, M. L. et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clinical Cardiology**, v. 10, n. 11, p. 665-670, 1987.

HISS, F. C. et al. Changes in myocardial perfusion correlate with deterioration of left ventricular systolic function in chronic Chagas' cardiomyopathy. **JACC Cardiovascular Imaging**, v. 2, n. 2, p. 164-172, 2009.

HUANG, H. et al. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in Trypanosoma cruzi-infected mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 75-88, 1999.

JACKSON, Y. et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. 592, 2010.

JAVADI, H. et al. Scintigraphic parameters with emphasis on perfusion appraisal in rest ^{99m}Tc-sestamibi SPECT in the recovery of myocardial function after thrombolytic therapy in patients with ST elevation myocardial infarction (STEMI). **Perfusion**, v. 26, n. 5, p. 394-399, 2011.

JELICKS, L. A. et al. Cardioprotective effects of phosphoramidon on myocardial structure and function in murine Chagas' disease. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1497-1506, 2002.

JORG, M. E. Trypanosomiasis Cruzi (Chagas Disease) - Angiotopographic Anarchy Due to Mesenchymoreactive Decapillarisation - Pathogenic Cofactor of Chronic Myocardiopathy. **Prensa Medica Argentina**, v. 61, n. 3, p. 94-106. 1974.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 63-116, 1968.

LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 59-71. 1992.

LI, L. X. et al. Comparative study of 201Tl-scintigraphic image and myocardial pathologic findings in patients with dilated cardiomyopathy. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 10, n. 3, p. 307-314, 1996.

LIBBY, P.; ALROY, J.; PEREIRA, M. E. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, n. 1, p. 127-135, 1986.

LOENING, A. M.; GAMBHIR, S. S. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. **Molecular Imaging**, v. 2, n. 3, p. 131-137, 2003.

MADY, C. et al. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. **American Journal of Cardiology**, v. 84, n. 3, p. 354-356, A359, 1999.

MADY, C.; NACRUTH, R. Natural history of chronic Chagas' heart disease: prognosis factors. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 2, p. 791-796, 1995.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A. et al. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. **American Journal of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 780-784, 1992.

MARIN-NETO, J. A. et al. Studies of the coronary circulation in Chagas' heart disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 2, p. 826-834, 1995.

MARIN-NETO, J. A.; SIMOES M. V.; RASSI JUNIOR, A. Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 536-541, 2013.

MARINHO, C. R. et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 308-318, 1999.

- MATSUMOTO, A. Y. et al. Echocardiography: III--Myocardopathies. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 33, n. 4, p. 293-297, 1979.
- MEDRANO, R. et al. Assessment of myocardial viability with ^{99m}Tc sestamibi in patients undergoing cardiac transplantation. A scintigraphic/pathological study. **Circulation**, v. 94, n. 5, p. 1010-1017, 1996.
- MEJIA, J. et al. Methodological approaches to planar and volumetric scintigraphic imaging of small volume targets with high spatial resolution and sensitivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 8, p. 692-699, 2009.
- MEJIA, J. et al. A clinical gamma camera-based pinhole collimated system for high resolution small animal SPECT imaging. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 43, v. 12, p. 1160-1166, 2010.
- MELLO, D. A.; VALIN, E.; TEIXEIRA, M. L. Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys callosus* (Rodentia). **Revista de Saúde Pública**, v. 13, p. 314-325, 1979.
- MENGEL, J. O.; ROSSI, M. A. Chronic chagasic myocarditis pathogenesis: dependence on autoimmune and microvascular factors. **American Heart Journal**, v. 124, n. 4, p. 1052-1057, 1992.
- MONCAYO, A; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. 8, p. 663-677, 2006.
- MORGAN, E. E. et al. Validation of echocardiographic methods for assessing left ventricular dysfunction in rats with myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 5, p. H2049-2053, 2004.
- MORRIS, S. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: alteration of cAMP metabolism following infection of human endothelial cells. **Experimental Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 69-76, 1992.
- MORRIS, S. A. et al. Verapamil ameliorates clinical, pathologic and biochemical manifestations of experimental chagasic cardiomyopathy in mice. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 14, n. 3, p. 782-789, 1989.
- NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.
- OLIVEIRA, L. F. et al. Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 1, p. 59-67, 2013.
- ORTIZ, J. et al. Segmental contractility changes in the indeterminate form of Chagas' disease. Echocardiographic study. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 49, n. 4, p. 217-220, 1987.

PALACIOS-PRU, E. et al. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 1, p. 29-40, 1989.

PARADA, H. et al. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. **International Journal of Cardiology**, v. 60, n. 1, p. 49-54, 1997.

PAZIN-FILHO, A. et al. Minor segmental wall motion abnormalities detected in patients with Chagas' disease have adverse prognostic implications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 483-487, 2006.

PEIX, A. et al. Myocardial perfusion imaging and cardiac involvement in the indeterminate phase of Chagas disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 2, p. 114-117, 2013.

PEREIRA BARRETTO, A. C. et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. **American Heart Journal**, v. 111, n. 2, p. 307-312, 1986.

PEREIRA, J. B.; WILCOX, H. P.; COURA, J. R. The evolution of chronic chagasic cardiopathy. I. The influence of parasitemia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 2, p. 101-108, 1992.

PETKOVA, S. B. et al. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 499-511, 2001.

PIMENTEL Wde, S. et al. The effect of beta-blockade on myocardial remodelling in Chagas' cardiomyopathy. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 9, p. 1063-1069, 2012.

PINTO, A. Y. et al. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Para, Amapa and Maranhao observed between 1988 and 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 115, n. 3, p. 279-283, 2007.

RABELO, D. R. et al. Impaired Coronary Flow Reserve in Patients with Indeterminate Form of Chagas' Disease. **Echocardiography**, v. 31, n. 1, p. 67-73, 2014.

RAMIREZ, L. E. et al. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as experimental model in Chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 3, p. 163-169, 1994.

RASSI, A. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 799-808, 2006.

ROSSI, M. A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. **American Heart Journal**, v. 120, n. 1, p. 233-236, 1990.

ROSSI, M. A. Aortic endothelial cell changes in the acute septicemic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats: scanning and transmission electron microscopic study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 3, p. 321-327, 1997.

ROSSI, M. A.; CAROBREZ, S. G. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. **British journal of experimental pathology**, v. 66, n. 2, p. 155-160, 1985.

ROSSI, M.; GONÇALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **American Journal of Pathology**, v. 114, n. 2, p. 209-216, 1984.

ROSSI, M. A. et al. Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e684, 2010.

SALOMONE, O. A. et al. High plasma immunoreactive endothelin levels in patients with Chagas' cardiomyopathy. **American Journal of Cardiology**, v. 87, n. 10, p. 1217-1220; A1217, 2001.

SANTORO, G. M. et al. Single photon emission computed tomography with technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile in acute myocardial infarction before and after thrombolytic treatment: assessment of salvaged myocardium and prediction of late functional recovery. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 15, n. 2, p. 301-314, 1990.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21.

SHEPP, L. A.; VARDI, Y. Maximum likelihood reconstruction for emission tomography. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 1, n. 2, p. 113-122, 1982.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845-852. 2012.

SIMOES, M. V. et al. Detection of myocardial ischemia in chronic Chagas disease patients with atypic precordial pain by exercise and Holter tests. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 60, n. 5, p. 315-319, 1993.

SIMOES, M. V. et al. Esophageal origin of precordial pain in chagasic patients with normal subepicardial coronary arteries. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 64, n. 2, p. 103-108, 1995.

SIMOES, M.V. et al. Exacerbated Coronary Artery Constrictor Responses And Autonomic Dysfunction In Vasotonic Angina: A Comparative Study With Chagas'Heart Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, p. 340C, 1998.

SIMOES, M. V. et al. Relation of regional sympathetic denervation and myocardial perfusion disturbance to wall motion impairment in Chagas' cardiomyopathy. **American Journal of Cardiology**, v. 86, n. 9, p. 975-981, 2000.

SIMOES, M. V.; SOARES, F. A.; MARIN-NETO, J. A. Severe myocarditis and esophagitis during reversible long standing Chagas' disease recrudescence in immunocompromised host. **International Journal of Cardiology**, v. 49, n. 3, p. 271-273, 1995.

SINUSAS, A. J. et al. Quantification of area at risk during coronary occlusion and degree of myocardial salvage after reperfusion with technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile. **Circulation**, v. 82, n. 4, p. 1424-1437, 1990.

SOUZA, A. P. et al. Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. **Parasitology Research**, v. 92, n. 6, p. 496-501, 2004.

TANOWITZ, H. B. et al. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 3, p. 274-281, 1990.

TANOWITZ, H. B. et al. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 3, p. 598-603, 1992.

TANOWITZ, H. B. et al. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 124-130, 1996.

TANOWITZ, H. B. et al. Effect of verapamil on the development of chronic experimental Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 643-649, 1989.

TANOWITZ, H. B. et al. Effects of verapamil on acute murine Chagas' disease. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 814-819, 1996.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitology Today**, v. 15, n. 3, p. 94-99, 1999.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002.

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, 1958.

TORRES, C. M. Myocytolysis and fibrosis of the myocardium in Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 58, p. 161-182, 1960.

TORRES, F. W. et al. Coronary vascular reactivity is abnormal in patients with Chagas' heart disease. **American Heart Journal**, v. 129, n. 5, p. 995-1001, 1995.

VAIDIAN, A. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Chagas' disease and AIDS. **Kinetoplastid Biology and Disease**, n. 3, v. 1, p. 2, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases., et al. (2007). **Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas**: 17-20 de abril de 2005, actualizado en julio de 2007, Buenos Aires, Argentina. Geneva, World Health Organization.

ZELEDON, R. et al. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 1, p. 15-20, 1988.

Anexo A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 034/2011, sobre o projeto intitulado “*Estudo das alterações da inervação simpática cardíaca e da perfusão miocárdica e sua correlação com a progressão da disfunção ventricular esquerda em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marcos Vinícius Simões** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de junho de 2011.

(We certify that the protocol nº 034/2011, about “*Study of the myocardial sympathetic innervations disturbance and myocardial perfusion changes and their correlation with the progression of the left ventricular dysfunction in an experimental model of chronic changes cardiomyopathy*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 06/27/2011.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2011.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício