

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA GODOY FABRICIO

Correlações histopatológicas dos defeitos de perfusão miocárdica em modelo experimental de cardiomiopatia crônica da Doença de Chagas em hamsters

Ribeirão Preto

2022

CAMILA GODOY FABRICIO

CORRELAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS DEFEITOS DE PERFUSÃO
MIOCÁRDICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CARDIOMIOPATIA
CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS EM HAMSTERS

Versão corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de
Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões

Ribeirão Preto

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA À FONTE.

Catálogo da Publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Fabricio, Camila Godoy.

Correlações histopatológicas dos defeitos de perfusão miocárdica em modelo experimental de cardiomiopatia crônica da Doença de Chagas em hamsters/ Camila Godoy Fabricio; orientador Marcus Vinícius Simões – Ribeirão Preto, 2022.

103f: 13il

Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

1. Cardiomiopatia crônica da doença de Chagas, 2. Microcirculação, 3. Inflamação, 4. Fibrose, 5. Disfunção ventricular, 6. Perfusão miocárdica.

Nome: FABRICIO, Camila Godoy.

Título: Correlações histopatológicas dos defeitos de perfusão miocárdica em modelo experimental de cardiomiopatia crônica da Doença de Chagas em hamsters.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRA

Ao meu esposo, Otávio, aos meus
amados pais, Silma e Luis e ao
meu irmão, Matheus

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pelo dom da vida e por guiar meus caminhos com saúde;

Agradeço ao meu marido, Otávio, por todo amor e paciência no dia-a-dia e por ser meu grande incentivador e me desafiar a ser melhor a cada dia;

Agradeço imensamente ao amor e confiança da minha família, meus pais, Luis e Silma e, meus irmãos, Danilo e Matheus, e às minhas companheirinhas caninas Amora e Luna;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinicius Simões, por todo conhecimento transmitido, pela paciência em ensinar e pelo carinho com que atua nesta encantadora função da docência e pesquisa;

À minha grande amiga, Denise Mayumi Tanaka, companheira de jornada na pós-graduação e na vida, agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada e nunca ter largado minha mão;

Aos meus amigos, Anderson Dias, Sheila Carrara, Eduardo Carvalho, Luciano Oliveira, Jaqueline Gentil, Marianne Delarisse e Alessandra Resende, por terem me ajudado a dar um passo de cada vez em busca do meu sonho;

Aos meus amigos, alunos e colegas manauaras, por terem sido tão carinhosos comigo neste último ano;

À nutricionista Cristiana Amato por ter me apresentado ao centro de cardiologia e ter feito com que eu me apaixonasse pela área;

Aos colaboradores desta pesquisa, Prof.^a Dr.^a Minna Moreira Dias Romano, Me. Fernando Fonseca França Ribeiro, Dr. Jorge Mejia, Prof. Dr. José Antônio Marin-Neto, Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro, M.^a Sabrina Setembre Batah, Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Higuchi.

Aos funcionários e docentes da Divisão de Cardiologia, da Medicina Nuclear, do biotério da Clínica Médica pela amizade e por colocar à disposição os locais para conduzir esta pesquisa;

À Coordenação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Um cientista que também é um ser humano não deve descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento repousa em uma estante”.

(Albert Sabin)

Fabricio, CG. **Correlações histopatológicas dos defeitos de perfusão miocárdica em modelo experimental de cardiomiopatia crônica da Doença de Chagas em hamsters.** 2022. 103f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

RESUMO

Introdução: A cardiomiopatia crônica da doença de Chagas (CCC) representa uma das principais causas de insuficiência cardíaca e morte súbita na América Latina. Apesar disso, muitos aspectos da sua fisiopatogênese permanecem obscuros. Fenômenos de isquemia microvascular coronariana são comuns, mas ainda não é clara a correlação da presença de defeito perfusional miocárdico (DPM) em repouso e reversível e a presença e localização das alterações histopatológicas que acompanham a progressão da disfunção ventricular esquerda. **Objetivos:** Analisar as alterações histopatológicas nas diferentes camadas da parede do ventrículo esquerdo (VE) e correlacioná-las com o grau de disfunção sistólica, remodelamento do VE e com os DPM em repouso e reversível. **Método:** Foram estudados hamsters sírios fêmeas (n=23) infectados com $3,5 \times 10^4$ formas de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) e seus respectivos controles (n=6). Oito meses após a infecção, foram submetidos a exames *in vivo*: cintilografia de perfusão miocárdica com Sestamibi-Tc99m em repouso e estresse farmacológico e ecocardiografia transtorácica. Ao final, o tecido miocárdico foi processado para análise histopatológica quantitativa e de localização (subendocárdio, mesocárdio e subepicárdio) de índice de infiltrado mononuclear (IIM) e de fibrose global e tipos de fibras espessa e fina de colágeno. **Resultados:** Os animais foram divididos em controle (CTR: FEVE=51,3±6,2%), Chagas sem disfunção sistólica (CHs: FEVE=53,3±3,9%) e Chagas com disfunção sistólica (CHc: FEVE=36,4±8,3%, $p < 0,01$). Animais infectados, independente de apresentar disfunção sistólica (CHs: $1,00 \pm 0,49$ cél/CGH e CHc: $1,04 \pm 0,54$ cél/CGH), mostraram IIM total maior quando comparado ao CTR ($0,41 \pm 0,32$ cél/CGH; $p = 0,03$), especialmente no subendocárdio, onde apenas o CHc ($1,02 \pm 0,62$ cél/CGH) apresentou aumento em comparação ao CTR ($0,38 \pm 0,22$ cél/CGH; $p = 0,04$). A fibrose global total não evidenciou diferença entre os grupos, porém na camada subendocárdica os grupos CH (CHs: $0,63 \pm 0,15\%$ área, CHc: $0,74 \pm 0,18\%$ área) apresentaram aumento comparado ao CTR ($0,45 \pm 0,15\%$ área, $p = 0,01$). A camada subendocárdica se destacou na correlação da fibra fina de colágeno com a FEVE ($r = -0,54$; $p < 0,01$), com o diâmetro sistólico final do VE ($r = 0,52$; $p = 0,01$) e com o escore de mobilidade parietal segmentar ($r = 0,60$; $p < 0,01$). Para os DPM, o CHc ($11,2 \pm 8,9\%$) mostra aumento do DPM em repouso comparado ao CTR ($4,9 \pm 2,2\%$; $p = 0,03$), diferença não encontrada nos demais tipos de DPM. Aqueles animais que apresentaram exclusivamente DPM em repouso (60,1%) tiveram aumento de IIM em comparação ao CTR ($1,09 \pm 0,55\%$ vs $0,41 \pm 0,32\%$, respectivamente; $p = 0,03$) e a camada subendocárdica se realça pela correlação com a inflamação ($r = 0,55$; $p = 0,01$). Apenas no subendocárdio há aumento da fibrose global naqueles animais CH com DPM em repouso em comparação ao CTR ($0,67 \pm 0,18\%$ vs $0,45 \pm 0,15\%$, respectivamente; $p = 0,03$). **Conclusão:** A disfunção sistólica do VE correlaciona-se com a intensidade da inflamação e com a extensão da fibrose na camada subendocárdica do VE, mas não com as alterações identificadas quando todas as camadas são tomadas em conjunto, indicando que o subendocárdio seja uma região mais sensível aos mecanismos lesivos atuantes na CCC. Os DPM em repouso têm correlação com a intensidade da inflamação na camada subendocárdica, indicando que possa atuar como fator amplificador e localizador da inflamação, sugerindo um papel relevante da hipoperfusão miocárdica nos mecanismos de lesão miocárdica na CCC.

PALAVRAS CHAVES: Cardiomiopatia crônica da doença de Chagas, Microcirculação, Inflamação, Fibrose, Disfunção ventricular, Perfusão miocárdica.

ABSTRACT

Fabricio, CG. **Histopathological correlations of myocardial perfusion defects in experimental model of chronic Chagas' cardiomyopathy in hamsters.** 2022. 103f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

ABSTRACT

Background: Chronic Chagas' cardiomyopathy (CCC) represents one of the major causes of heart failure and sudden death in Latin America. Phenomena of coronary microvascular ischemia are common, but the presence of resting and reversible myocardial perfusion defect (MPD) and their correlation with the presence and location of histopathological changes are still unclear in the progression of left ventricular dysfunction. **Purpose:** Analyze the histopathological changes in different layers from the left ventricle (LV) wall and correlate them with systolic dysfunction LV remodeling degrees, and with MPD of resting and reversible. **Methods:** Female Syrian hamsters (n=23) infected with 3.5×10^4 blood trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain) and their respective controls (n=6) were studied. At 8 months after infection, the animals underwent *in vivo* tests: myocardial perfusion scintigraphy with Sestamibi-Tc99m at rest and under pharmacological stress and transthoracic echocardiography. At the end, the myocardial tissue was processed for quantitative histopathological analysis and location (subendocardium, mesocardium and subepicardium) of mononuclear infiltrate index (MII) and global fibrosis and collagen fibers thick and thin. **Results:** At 8 months after infection, animals were divided into control (CTR: LVEF=51.3±6.2%), Chagas' without systolic dysfunction (CHs: LVEF=53.3±3.9%) and Chagas' with systolic dysfunction (CHc: LVEF=36.4±8.3%, p<0.01). Infected animals, regardless of having systolic dysfunction (CHs: 1.00±0.49 cells/CGH and CHc: 1.04±0.54 cells/CGH), showed higher total MII when compared to CTR (0.41±0.32 cells /CGH; p=0.03), especially in the subendocardium, where only CHc (1.02±0.62 cells/CGH) shows a significant increase compared to CTR (0.38±0.22 cells/CGH; p=0.04). In the total fibrosis, there was no difference between the groups, but in the subendocardial layer the CH groups (CHs: 0.63±0.15% area, CHc: 0.74±0.18% area) showed a significant increase compared to CTR (0.45±0.15% area, p=0.01). The subendocardial layer also highlights in the correlation of thin collagen fiber with LVEF (r=-0.54; p<0.01), with the left ventricular end-systolic diameter (r=0.52; p=0.01) and with the segmental parietal mobility score (r=0.60; p<0.01). Regarding myocardial perfusion, resting MPD in the CHc group (11.2±8.9%) was significantly increased at CTR (4.9±2.2%; p=0.03), a difference not found in the other types of DPM studied. Those animals that exclusively presented MPD at rest (60.1%) had a significant increase in MII compared to CTR (1.09±0.55% vs 0.41±0.32%, respectively; p=0.03) and the subendocardial layer is highlighted by the correlation with inflammation (r=0.55; p=0.01). Only the subendocardial layer showed a significant increase in fibrosis in those CH animals with MPD at rest compared to CTR (0.67±0.18% vs 0.45±0.15%, respectively; p=0.03). **Conclusions:** LV systolic dysfunction correlates with the intensity of inflammation and the extent of fibrosis in the subendocardial layer of the left ventricular wall, but not with the changes identified when all layers are taken together, indicating that the subendocardium is a myocardial region more sensitive to the harmful mechanisms acting in the CCC. Myocardial perfusion defects at rest have a significant correlation with the intensity of inflammation in the subendocardial layer, indicating that it may act as an amplifying and localizing factor for inflammation, suggesting a relevant role for myocardial hypoperfusion in the mechanisms of myocardial injury in CCC.

KEY WORDS: Chronic Chagas' cardiomyopathy, Microcirculation, Inflammation, Fibrosis, Ventricular dysfunction, Myocardial perfusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento do estudo.....	42
Figura 2 – Equipamentos utilizados na aquisição de imagens ecocardiográficas	43
Figura 3 – Imagem ilustrativa adquirida durante o exame de ecocardiograma.....	44
Figura 4 – Imagem ilustrativa da medida de fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo método bidimensional.	45
Figura 5 – Segmentação do ventrículo esquerdo.....	45
Figura 6 – Sistema SPECT de alta-resolução e posicionamento do animal.....	47
Figura 7 – Mapa polar	49
Figura 8 – Imagem ilustrativa de corte histológico e segmentação do ventrículo esquerdo.	50
Figura 9 – Imagem ilustrativa da contagem de células inflamatórias mononucleares através do retículo de Weibel.....	51
Figura 10 – Imagem ilustrativa de cortes histológicos capturada com luz polarizada.	52
Figura 11 – Cortes histológicos representativos corados com hematoxilina-eosina e picosírius-vermelho.	60
Figura 12 – Imagem ilustrativa do estudo de perfusão miocárdica sob estresse farmacológico e em repouso.....	69
Figura 13 – Mapas polares, inflamação e fibrose global em animais Chagas com e sem disfunção ventricular esquerda.....	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2 – Distribuição dos grupos em CTR e CH baseado na FEVE (n = 29).	56
Gráfico 3 – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (n = 29).	57
Gráfico 4 – Diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (n = 29).	58
Gráfico 5 – Escore de mobilidade parietal segmentar (n = 29).	58
Gráfico 6 – Correlação entre o índice de inflamação e a função sistólica do ventrículo esquerdo (n = 23).	64
Gráfico 7 – Correlação entre fibrose e a função sistólica do ventrículo esquerdo (n = 23).	65
Gráfico 8 – Correlação entre as fibras fina e espessa de colágeno no subendocárdio e a função sistólica do ventrículo esquerdo (n = 23).	66
Gráfico 9 – Correlação entre as fibras fina e espessa de colágeno no subendocárdio e o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (n = 23).	67
Gráfico 10 – Correlação entre as fibras fina e espessa de colágeno no subendocárdio e o escore de mobilidade parietal segmentar (n = 23).	68
Gráfico 11 – Área de defeito de perfusão em repouso (n = 29).	70
Gráfico 12 – Área de defeito de perfusão reversível (n = 29).	71
Gráfico 13 – Área de defeito de perfusão paradoxal (n = 29).	71
Gráfico 14 – Correlação entre a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e as áreas de defeito de perfusão miocárdica (n = 23).	72
Gráfico 15 – Correlações entre os diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico em repouso (n = 23).	73
Gráfico 16 – Correlações entre os diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico reversível (n = 23).	74
Gráfico 17 – Correlações entre os diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico paradoxal (n = 23).	75
Gráfico 18 – Correlação entre o escore de mobilidade parietal segmentar e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico (n = 23).	76
Gráfico 19 – Correlação entre os índices de infiltrado mononuclear e a porcentagem de área de defeito de perfusão em repouso (n = 23).	81
Gráfico 20 – Correlação entre os índices de fibrose global e a porcentagem de área de defeito de perfusão em repouso (n = 23).	82
Gráfico 21 – Correlação entre as fibras de colágeno no subendocárdio e a porcentagem de área de defeito de perfusão em repouso (n = 23).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados basais, finais do ecocardiograma na divisão dos animais baseada em grupos por FEVE, nos animais nos grupos controle, Chagas sem disfunção e Chagas com disfunção ventricular esquerda (n = 29).....	59
Tabela 2 – Dados de infiltrado mononuclear e fibrose transmural na divisão dos animais baseada em grupos por FEVE, nos grupos controle e Chagas sem e com disfunção sistólica (n = 29).	60
Tabela 3 – Dados de infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose transmural na divisão dos animais baseada em grupos por FEVE, nos grupos controle e Chagas sem e com disfunção sistólica (n = 29).	62
Tabela 4 – Resultados basais e finais da cintilografia miocárdica nos animais nos grupos controle, Chagas sem disfunção e Chagas com disfunção ventricular esquerda (n = 29).....	70
Tabela 5 – Resultados de inflamação e fibrose transmural nos grupos controle e Chagas sem e com defeito de perfusão em repouso (n = 29).	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Segmento anterior basal
ALB	Segmento anterior lateral basal
ALM	Segmento anterior lateral médio
ANOVA	Análise de variância
AM	Segmento anterior médio
AP	Segmento apical
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil
CCC	Cardiomiopatia crônica da doença de Chagas
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CH	Animais com doença de Chagas
CHc	Animais com doença de Chagas e com disfunção sistólica
CHs	Animais com doença de Chagas e sem disfunção sistólica
CTR	Animais controle
CGH	Campo grande de aumento
DC	Doença de Chagas
DdVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DP	Defeito de perfusão
DPM	Defeito perfusional miocárdico
DsVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
EMPS	Escore de mobilidade parietal segmentar
FAEPA	Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das

Clínicas

FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
F-FDG	¹⁸ F-Fluorodeoxiglicose
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
IB	Segmento inferior basal
IM	Segmento inferior médio
IMVE	Índice de massa do ventrículo esquerdo
IIM	Índice de infiltrado mononuclear
MBq	Megabecquerel
MPS	Mobilidade parietal segmentar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PET	Exame de tomografia por emissão de pósitrons

PBS	Solução tampão fosfato-salino
SAB	Segmento septo anterior basal
SAM	Segmento septo anterior médio
SARS-CoV-2	Coronavírus (COVID-19)
SIB	Segmento septo inferior basal
SIM	Segmento septo inferior médio
SEPCT	Cintilografia de perfusão miocárdica de alta-resolução
TAPSE	Excursão sistólica do anel tricúspide
<i>T CRUZI</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i>
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
1.1.	Conceito e fases evolutivas da doença de Chagas.....	25
1.2.	Epidemiologia e impacto sócio-econômico.....	27
1.3.	Lesões histopatológicas na CCC	28
1.4.	Mecanismos fisiopatogênicos da CCC	30
1.5.	Isquemia microvascular na CCC	31
1.6.	Hipótese	37
2.	OBJETIVOS	39
2.1.	Objetivo Principal.....	39
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1.	Animais e protocolo experimental.....	41
3.2.	Infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	41
3.3.	Delineamento geral do estudo	41
3.4.	Métodos de imagem	42
3.4.1.	Ecocardiografia de alta resolução.....	42
3.4.2.	Cintilografia (SPECT) de perfusão miocárdica de alta-resolução.....	46
3.4.2.1.	Aquisição das imagens em SPECT	46
3.4.2.2.	Protocolo de imagens em repouso e sob estresse farmacológico	47
3.4.2.3.	Processamento e análise das imagens.....	48
3.5.	Histopatologia.....	49
3.5.1.	Digitalização e análise quantitativa de inflamação.....	50
3.5.2.	Análise quantitativa e qualitativa da fibrose.....	51
3.6.	Aspectos éticos de investigação animal.....	52
3.7.	Análise estatística	52
4.	RESULTADOS	55
4.1.	Confirmação da infecção experimental	55
4.2.	Mortalidade e exclusão	55
4.3.	Avaliação basal.....	55
4.4.	Evolução das alterações estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo	56
4.5.	Análise da inflamação e fibrose no miocárdio	59
4.5.1.	Inflamação e fibrose nas camadas da parede miocárdica	61

4.5.2.	Correlações entre alterações histopatológicas e parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo	62
4.6.	Tipos de defeito de perfusão miocárdica	68
4.6.1.	Correlação entre os tipos de defeito de perfusão e as alterações estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo	71
4.7.	Alterações histopatológicas relacionadas à presença de defeito de perfusão miocárdica em repouso	77
4.7.1.	Correlações entre o tamanho do defeito de perfusão em repouso e a topografia da inflamação e fibrose	80
5.	DISCUSSÃO	85
6.	CONCLUSÕES.....	96
7.	BIBLIOGRAFIA	98
8.	ANEXOS.....	105
8.1.	Anexo A.....	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITO E FASES EVOLUTIVAS DA DOENÇA DE CHAGAS

Carlos Chagas, em 1909, descobriu a doença que leva seu nome (CHAGAS, 1909). Identificou o agente etiológico e seu mecanismo essencial de transmissão, considerado um feito histórico para a medicina (MARIN NETO; SIMOES; SARABANDA, 1999). A doença de Chagas (DC) humana é causada por um protozoário flagelado denominado *Trypanossoma cruzi* (*T. cruzi*).

O modo de transmissão mais comum aos humanos, correspondendo a 80% das infecções registradas, ocorre por meio da inoculação de fezes contaminadas pelo vetor triatomíneo, popularmente conhecido como “barbeiro” (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Outras formas de contaminação têm ganhado espaço, principalmente em regiões não endêmicas da doença, como a contaminação iatrogênica por transfusões sanguíneas de doadores infectados com *T. cruzi*, correspondendo a aproximadamente 20%. Há também a transmissão congênita por meio da placenta, cerca 2% a 6% dos recém-nascidos de mães infectadas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). A infecção por via oral através da ingestão de alimentos com as excretas do barbeiro ou com a presença do próprio inseto contaminado com *T. cruzi* tem ganhado importância epidemiológica, sugerindo um novo ciclo de contágio da doença, de dimensão ainda a ser definida. Estudos recentes têm mostrado surtos de contaminação em regiões amazônicas, limitado a pequenas comunidades ou núcleos familiares, em que o veículo de transmissão foi o consumo de açaí contaminado (BRITO; SOUSA; SILVA JUNIOR; RUIZ *et al.*, 2022; SOUZA-LIMA RDE; BARBOSA; COURA; ARCANJO *et al.*, 2013). Nestes casos a falta de legislação que exija a pasteurização da polpa de açaí e a falta de higiene na manipulação do fruto são as principais causas destes recorrentes surtos. Acidentes laboratoriais também podem ser uma forma de contaminação, porém esses eventos são raros.

A DC é uma doença complexa com duas fases evolutivas clinicamente distintas: aguda e crônica. O período de incubação da doença varia entre 1 a 3 semanas. A fase aguda tem duração de, aproximadamente, 30 a 90 dias, sendo na maioria dos casos assintomática ou pode apresentar manifestações cardiovasculares provocadas por uma intensa reação inflamatória no miocárdio, secundária ao vigoroso parasitismo das fibras cardíacas pelo *T. cruzi*, que aparentemente apresenta tropismo específico para fibras cardíacas estriadas (BONNEY; ENGMAN, 2008). Nesta fase o coração é globular e flácido, com intenso infiltrado inflamatório

mononuclear e necrose miocitolítica (ROSSI, 1990). A miocardite grave ou a meningoencefalite ocorrem em menos de 1% dos casos e pode ser fatal em 3 a 5% dos acometidos. Outras manifestações clínicas incluem febre, efusão pericárdica e a presença de “chagoma” de inoculação, conhecido como sinal de Romana (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; PRATA, 2001).

Uma vez que a fase aguda cede, os pacientes entram na fase crônica da doença, podendo ser assintomática e constituindo a forma indeterminada, de aparente quiescência da doença, com excelente prognóstico (MARIN-NETO; SIMOES; RASSI JUNIOR, 2013). A forma indeterminada da doença se caracteriza pela redução do número de tripomastigotas circulantes no sangue periférico, a ponto de não ser possível encontrá-los em exame de sangue fresco (DIAS; LARANJA; MIRANDA; NOBREGA, 1956). A transição da forma assintomática para a forma sintomática da doença com o aparecimento de doença cardíaca é, muitas vezes, difícil de definir claramente (DIAS; LARANJA; MIRANDA; NOBREGA, 1956).

As formas crônicas sintomáticas com o desenvolvimento de complicações cardíacas atingem cerca de 30% dos indivíduos cronicamente infectados e de maneira intrigante surgem cerca de 2-3 décadas após a fase aguda da doença (DIAS; LARANJA; MIRANDA; NOBREGA, 1956; MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007). A cardiopatia é a manifestação mais importante e grave da doença crônica. As lesões histopatológicas cardíacas nesta fase compreendem uma miocardite de baixa intensidade, focal e difusa, com infiltrado predominante de células mononucleares, destruição de cardiomiócitos e fibrose intersticial, e parasitismo de fibras cardíacas de muito baixa intensidade ou indetectável (MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007). Na fase crônica manifestações clínicas gastrointestinais também podem ser encontradas, como megaesôfago ou megacólon, cuja patogênese não é completamente entendida mas pode envolver danos dos corpos neuronais da parede intestinal (BONNEY; ENGMAN, 2008).

As alterações da função cardíaca reconhecidas como cardiomiopatia da doença de Chagas crônica (CCC) decorrem de dano progressivo do miocárdio com importante dilatação das cavidades do coração, podendo apresentar aneurisma apical, ocorrendo nos estágios mais avançados da doença (ROSSI, 1990).

Nos primeiros estágios da CCC os pacientes podem não apresentar sintomas característicos mesmo com a presença de anormalidades eletrocardiográficas (DIAS; LARANJA; MIRANDA; NOBREGA, 1956). As manifestações clínicas vão depender da gravidade da lesão miocárdica, da presença ou não de insuficiência cardíaca e do tipo de

arritmia. As principais manifestações clínicas observadas na CCC são arritmias complexas, dilatação das cavidades cardíacas com padrão de miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca, associada a manifestações de congestão, morte súbita, aneurisma ventricular e tromboembolismo (DIAS; LARANJA; MIRANDA; NOBREGA, 1956; MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007). A CCC é uma doença intensamente estudada, porém sua etiopatogenia ainda não é completamente compreendida (PRATA, 2001).

1.2. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO SÓCIO-ECONÔMICO

Apesar dos esforços das entidades de saúde em realizar estratégias para eliminação dos vetores do entorno dos domicílios e, passados mais de 110 anos de sua descoberta, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-americana de Saúde estimam que hoje existam 6-7 milhões de pessoas infectadas no mundo, localizadas principalmente em regiões endêmicas da América do Sul, América Central e México, e mais de 65 milhões de pessoas em risco de desenvolver a doença (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019; WHO, 2017). No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 1.156.000 infectados (WHO, 2010).

O número de novos casos anuais por transmissão vetorial ainda atinge a marca de 29 mil novos casos na América Latina (WHO, 2010). A tripanossomíase Americana se expandiu da zona rural para a zona urbana e das regiões endêmicas para regiões não-endêmicas (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020). Graças à globalização e às correntes migratórias é, atualmente, também uma doença emergente em países não endêmicos como Estados Unidos e Canadá, países da Europa, principalmente, Espanha, Itália, Alemanha e Portugal, além de países da Ásia, como Japão e Austrália (SCHMUNIS; YADON, 2010).

Melhores condições socioeconômicas incluindo casas de alvenaria, ações continuadas de prevenção e controle de transmissão vetorial, e de transmissão por transfusão sanguínea, além de promoção de saúde e higiene resultaram em consistente declínio nas taxas de infecção e mortalidade nas regiões endêmicas nas últimas décadas (MARTINS-MELO; CASTRO; WERNECK, 2021). Apesar de todas essas ações, a DC se mantém uma importante e negligenciada causa de morte nas regiões endêmicas e com grandes implicações sociais e de saúde.

É uma doença com elevado impacto econômico devido à alta morbidade e mortalidade, e das altas despesas com tratamentos controversos de pacientes cronicamente infectados

(BONNEY; ENGMAN, 2008). Representa uma das maiores causas de insuficiência cardíaca e morte súbita em vários países da América Latina, incluindo o Brasil (WHO, 2010). Estima-se que ao longo de 40 anos, mais de 200 mil pessoas tenham morrido por DC no país (SIMOES; BORGES; PARREIRA DE ASSIS; SILVA *et al.*, 2018) e a média anual de mortalidade, ajustada pela idade, é de 3,22/100.000 habitantes (MARTINS-MELO; CASTRO; WERNECK, 2021).

O gasto devido ao afastamento de trabalhadores afetados pela doença representou uma perda de ao menos 5.600 mil dólares/ano (OPAS, 2006) e a taxa de mortalidade pela doença é maior em indivíduos entre 50 e 64 anos, faixa etária considerada produtiva (SIMOES; BORGES; PARREIRA DE ASSIS; SILVA *et al.*, 2018). A mortalidade masculina é 1,6 vezes maior que a feminina, provavelmente devido ao fato das mulheres acessarem com mais frequência o sistema de saúde primário e secundário (SIMOES; BORGES; PARREIRA DE ASSIS; SILVA *et al.*, 2018).

Os custos para o tratamento da DC são altos e um estudo realizado na Colômbia estimou um gasto anual de US\$ 1.028 por paciente, e ao longo de toda vida de US\$ 11.619, em valores médios, já que os custos podem sofrer grandes variações dependendo da gravidade da doença e do nível de cuidado necessário (CASTILLO-RIQUELME; GUHL; TURRIAGO; PINTO *et al.*, 2008). Um modelo de simulação estimou o impacto da DC na saúde de economias globais e foi demonstrado que os custos globais com a DC anualmente são de, aproximadamente, 7 bilhões de dólares, considerando os gastos com o sistema de saúde e a perda de produtividade de indivíduos economicamente ativos (LEE; BACON; BOTTAZZI; HOTEZ, 2013).

1.3. LESÕES HISTOPATOLÓGICAS NA CCC

Na fase aguda, microscopicamente, são observados no miocárdio focos de necrose miocitolítica e degeneração de fibras, com intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Enquanto que, macroscopicamente, o coração se apresenta flácido e globular (ROSSI; TANOWITZ; MALVESTIO; CELES *et al.*, 2010).

Já na fase crônica da doença, o miocárdio pode ou não apresentar tamanho e forma anormais. Quando as anormalidades se desenvolvem, as câmaras direitas costumam estar mais dilatadas do que hipertrofiadas e o ventrículo esquerdo, frequentemente, apresenta aneurisma apical, caracterizado por afinamento e abaulamento do ápice (ROSSI; TANOWITZ; MALVESTIO; CELES *et al.*, 2010). Este afinamento costuma ocorrer também nas paredes

laterais dos ventrículos direito e esquerdo e levar a formação de trombos (ROSSI; TANOWITZ; MALVESTIO; CELES *et al.*, 2010).

Em corações autopsiados de portadores de CCC, a microscopia revela fibrose intersticial difusa e em graus variados. O aumento da fibrose na CCC, comparada a corações de pacientes controles, está relacionado ao aumento das fibras de colágeno espessas, do tipo I, que envolvem as fibras musculares e os vasos coronários intramiocárdicos (ROSSI, 1991). Em outro estudo com autópsia de miocárdio há co-localização entre infiltrados inflamatórios, compostos principalmente por linfócitos T e macrófagos, e os focos de fibrose (ROSSI, 1998), revelando um padrão de miocardite crônica focal e difusa e subsequente fibrose reparativa. Portanto, na fase crônica da cardiomiopatia da DC, há uma predominância de células linfocitárias mononucleares e fibrose intersticial (ROSSI, 1998).

As clássicas lesões histopatológicas da CCC com miocardite focal e difusa e fibrose reparativa podem estar associadas as extensas lesões vasculares, como demonstrada por estudos necroscópicos originais de Magarino Torres (TORRES, 1958; 1960), em que se observou proliferação celular e o espessamento da parede das arteríolas levando à obstrução de finos ramos arteriais coronários, com alterações miocitolíticas nos agrupamentos de fibras miocárdicas vizinhas aos processos obstrutivos, sugerindo fortemente a ocorrência de lesão celular causada por isquemia microvascular (MARIN-NETO; SIMOES; RASSI JUNIOR, 2013).

Pouco se estudou em relação ao tipo de fibrose que se desenvolve ao longo da progressão da DC no miocárdio. Um estudo em cães, demonstrou que diferentes cepas do *T. cruzi* proporcionaram diferentes evoluções no aparecimento de fibras de colágeno ao longo das fases evolutivas da doença (CALDAS; MENEZES; DINIZ; NASCIMENTO *et al.*, 2019). Animais infectados com a cepa VL-10 apresentaram aumento das fibras espessas de colágeno (tipo I e II) na fase crônica da doença em relação a sua condição na fase aguda. Já animais infectados com a cepa AAS, o processo fibrótico evoluiu rapidamente com intenso depósito de fibras finas de colágeno (tipo III), reduzindo seu depósito na fase crônica.

Este remodelamento da matriz do colágeno assume papel relevante na fisiopatologia da disfunção miocárdica na CCC, uma vez que participa da progressão da disfunção sistólica ventricular devido à perda de elementos contráteis, combinada à disfunção diastólica secundária ao aumento da rigidez miocárdica intrinsecamente associada ao aumento da fibrose intersticial (ROSSI; TANOWITZ; MALVESTIO; CELES *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que não encontramos estudos anteriores que tenham analisado a distribuição topográfica dos diferentes tipos de colágeno nas diferentes camadas das paredes do ventrículo esquerdo e as eventuais implicações desses achados.

1.4. MECANISMOS FISIOPATOGÊNICOS DA CCC

Conforme dito anteriormente, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da disfunção cardíaca na DC crônica ainda não são completamente compreendidos. Quatro mecanismos fisiopatogênicos têm sido propostos: 1. agressão miocárdica dependente do parasitismo pelo *T. cruzi* persistente e de baixa intensidade; 2. lesão miocárdica inflamatória exacerbada por mecanismos autoimunes; 3. disfunção do sistema nervoso autônomo cardíaco; 4. isquemia miocárdica causada por distúrbios microvasculares coronários (MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007).

Durante a fase aguda, a cardiopatia chagásica está relacionada com a intensa parasitemia e o parasitismo das fibras cardíacas por ninhos de formas amastigotas do *T. cruzi*. O alto grau de parasitismo nesta fase evolutiva da doença provoca forte resposta imune celular e humoral contra o *T. cruzi* (ROSSI, 1990), segundo estudos prévios, esta reação imune levaria a um controle biológico, porém sem a eliminação completa do parasita, que persiste em baixo grau e de forma incessante na fase crônica (HIGUCHI; DEBRITO; REIS; BARBOSA *et al.*, 1993; MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007).

Na fase crônica, os ninhos de parasitas são raros ou não detectáveis quando se utiliza métodos de microscopia convencional (KOBBERLE, 1968; ROSSI, 1990). Alguns estudos clínicos e experimentais utilizando imunohistoquímica e técnicas de biologia molecular demonstraram que antígenos e material genômico do *T. cruzi* estavam presentes e claramente associados topograficamente aos focos de inflamação e dano tissular (HIGUCHI; DEBRITO; REIS; BARBOSA *et al.*, 1993), sugerindo fortemente a participação do parasitismo nos mecanismos de lesão miocárdica também na fase crônica da doença. Contudo, este parasitismo é de baixa intensidade, insuficiente para justificar a magnitude da lesão miocárdica usualmente detectada na fase crônica da doença, sendo muito mais provável que o seu papel na fisiopatogênese da fase crônica seja alimentar perpetuamente a resposta imune, amplificando a inflamação, que leva à agressão de fibras cardíacas não parasitadas (HIGUCHI, 1995).

Vários estudos independentes apontam que a miocardite difusa com miocitólise e fibrose reparativa, que são os atributos marcantes da CCC, exiba características de uma reação

de hipersensibilidade tardia, com infiltrados inflamatórios focais compostos por células mononucleares (HIGUCHI; DEBRITO; REIS; BARBOSA *et al.*, 1993). Soma-se a isso, a deposição de imunoglobulinas e complemento no tecido miocárdico de pacientes com CCC, constituindo um conjunto que indica o envolvimento de fatores imunológicos na patogênese e nos diferentes graus de dano miocárdico na CCC (CUNHA-NETO; BILATE; HYLAND; FONSECA *et al.*, 2006; GOMES; BAHIA-OLIVEIRA; ROCHA; MARTINS-FILHO *et al.*, 2003).

Muitos investigadores acreditam que anormalidades no sistema nervoso autônomo também possam ter papel fisiopatológico na gênese das arritmias ventriculares, morte súbita e distúrbios do controle da microcirculação coronária na CCC. As alterações no sistema nervoso autônomo podem aparecer antes mesmo das anormalidades de mobilidade do ventrículo esquerdo, como demonstrado em estudo prévio, em que uma marcante associação topográfica entre perfusão, inervação e anormalidades da mobilidade de parede foram encontradas (SIMOES; PINTYA; BROMBERG-MARIN; SARABANDA *et al.*, 2000). Em estudo mais recente, o grupo de pesquisa da FMRP-USP identificou correlação positiva entre os defeitos de inervação simpática regional e global e o desenvolvimento a longo prazo (em média após 5,5 anos) de piora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e com associação topográfica entre denervação simpática regional e novas anormalidades de mobilidade das paredes do ventrículo esquerdo (GADIOLI; MIRANDA; MARIN-NETO; VOLPE *et al.*, 2022). Ainda que esses resultados em conjunto sugiram um potencial papel da denervação simpática para a gênese da lesão miocárdica na CCC, é igualmente possível que as alterações da inervação ocorram como consequência da agressão inflamatória da doença, sendo, portanto, um marcador da presença desta última e não um mecanismo lesivo *per se*. Estudos mais profundos são necessários para definirmos o real papel da denervação autonômica dentro do complexo mecanismo fisiopatogênico da CCC.

1.5. ISQUEMIA MICROVASCULAR NA CCC

Adicionalmente aos mecanismos anteriormente citados, há consistentes evidências clínicas e experimentais que sugerem a participação de anormalidades na microcirculação coronária no processo fisiopatogênico da CCC, com consequente isquemia e lesão miocárdicas (MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007; MARIN-NETO; SIMOES;

RASSI JUNIOR, 2013; PETKOVA; TANOWITZ; MAGAZINE; FACTOR *et al.*, 2000; ROSSI, 1990).

O miocárdio é um músculo estriado cardíaco aeróbio, ou seja, não pode trabalhar em déficit de oferta de oxigênio (EVANS; MATSUOKA, 1915), exceto por curtos períodos de tempo. Isquemia é a deficiência ou ausência de suprimento sanguíneo para determinado órgão ou tecido, e, conseqüentemente, redução do débito de oxigênio que leva à disfunção ou lesão do órgão ou tecido.

A isquemia miocárdica, portanto, ocorre devido a um desequilíbrio entre o suprimento e a demanda de oxigênio para o músculo cardíaco. Como consequência desse desbalanço pode ocorrer disfunção miocárdica, arritmias, infarto miocárdico e morte súbita (SHIMOKAWA; YASUDA, 2008). Em condições fisiológicas alterações adaptativas da circulação coronariana permitem adequar o fluxo sanguíneo às necessidades metabólicas do miocárdio, como por exemplo em situações de aumento do trabalho cardíaco, o maior consumo de oxigênio induz aumento do fluxo sanguíneo por meio, fundamentalmente, da vasodilatação da microcirculação pela liberação de adenosina (GUYTON; HALL, 2011).

Estudos necroscópicos apontaram as primeiras evidências da participação de distúrbios da microcirculação nos mecanismos de lesão miocárdica na CCC (TORRES, 1960). Magarino Torres descreveu a presença de intensas lesões vasculares com hiperproliferação intimal, espessamento da parede e obstrução de finos ramos arteriolares coronários intramurais em corações de pacientes com CCC. Adicionalmente, observou-se que as fibras miocárdicas topograficamente vizinhas às lesões vasculares exibiam necrose miocitolítica, uma forma de lesão miocelular caracteristicamente associada à isquemia miocárdica. Em estudo experimental, Marcos Rossi evidenciou a presença de agregados plaquetários em vasos epicárdicos e intramiocárdicos formando trombos oclusivos passageiros, seguido de reperfusão, associados à necrose miocárdica focal e degeneração, com infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose intersticial (ROSSI, 1990). No conjunto, esses achados sugeriram fortemente a participação da isquemia microvascular na gênese dos focos inflamatórios, da miocitólise e da posterior fibrose reparativa que figuram como as alterações mais características da histopatologia da fase crônica da cardiomiopatia da doença de Chagas (MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007).

Em estudos clínicos, investigações empregando cintilografia miocárdica de perfusão evidenciaram elevada frequência (30 a 50%) de defeitos perfusionais isquêmicos em pacientes portadores de CCC com coronárias subepicárdicas normais, sugerindo fortemente que

disfunção microvascular coronariana seja o mecanismo responsável por tais fenômenos isquêmicos nessa cardiopatia (HISS; LASCALA; MACIEL; MARIN-NETO *et al.*, 2009; MARIN-NETO; MARZULLO; MARCASSA; GALLO JUNIOR *et al.*, 1992; SIMOES; PINTYA; BROMBERG-MARIN; SARABANDA *et al.*, 2000). Além da elevada frequência de defeitos perfusionais, resultados colhidos pelo grupo de pesquisa da FMRP-USP mostram que os distúrbios de perfusão isquêmicos se correlacionam topograficamente com áreas de dissinergia contrátil regional das paredes do ventrículo esquerdo e que as alterações de perfusão ocorrem precocemente ao longo da evolução da CCC (SIMOES; PINTYA; BROMBERG-MARIN; SARABANDA *et al.*, 2000), sugerindo que a isquemia microvascular seja um distúrbio precoce na evolução da doença, podendo preceder o aparecimento da disfunção contrátil ventricular esquerda e estar associado a fenômenos de hibernação ou atordoamento (stunning) miocárdico.

O mesmo grupo de pesquisa também reportou resultados de estudo que empresta suporte adicional à relevância da isquemia microvascular na CCC. Os resultados de um estudo longitudinal retrospectivo utilizando cintilografia miocárdica de perfusão mostraram que a isquemia microvascular se correlaciona topograficamente com aparecimento de fibrose regional miocárdica durante a evolução da cardiopatia da doença de Chagas. Soma-se a isso o achado que a progressão da disfunção sistólica ventricular esquerda se correlacione com o agravamento da extensão e gravidade dos defeitos de perfusão em repouso, sinalizando o aumento das áreas de miocárdio hibernante. Esses resultados reforçam a hipótese de que a isquemia miocárdica microvascular possa estar diretamente envolvida no mecanismo de formação da fibrose regional que participa da progressão da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo na CCC (HISS; LASCALA; MACIEL; MARIN-NETO *et al.*, 2009).

Outro aspecto relevante diz respeito à investigação dos mecanismos contribuintes para a gênese da isquemia microvascular na CCC. Estudos anteriores têm apontado para vários mecanismos possivelmente envolvidos (MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007): 1. alterações funcionais da árvore arterial coronária com aumento da vaso-reatividade e espasmo dos finos ramos arteriais coronários, mecanismo potencialmente vinculado à denervação autonômica cardíaca precocemente identificada nestes pacientes; 2. lesão endotelial causada diretamente pela agressão do parasita e consequente disfunção endotelial; e, 3. alterações funcionais e estruturais vasculares induzidas pelas substâncias liberadas pelo infiltrado inflamatório no tecido miocárdico vizinho aos microvasos coronários, principalmente citocinas. Esse último mecanismo tem recebido grande corpo de evidências mostrando que

alterações inflamatórias miocárdicas se associam ao desenvolvimento de "plugs" plaquetários, lesões proliferativas intimaes obstrutivas, espasmo e obstrução arteriolas (PETKOVA; HUANG; FACTOR; PESTELL *et al.*, 2001; ROSSI; TANOWITZ; MALVESTIO; CELES *et al.*, 2010).

No campo dos estudos clínicos, um estudo recente avaliou amostra de 101 pacientes que relatavam sintomas anginosos graves e evidenciaram coronárias subepicárdicas normais, portanto, diagnosticados com disfunção microvascular coronariana, tendo mostrado que 15% destes eram indivíduos cronicamente infectados por *T. cruzi*. Comparados com as demais etiologias, os pacientes com DC tinham menor FEVE e pior escore de mobilidade parietal, destacando, mais uma vez, a importância de se investigar a disfunção microvascular coronariana na CCC (CAMPOS; MAGALHAES; MOREIRA; PAVAO *et al.*, 2020; NUNES, 2020)

Dois importantes estudos clínicos utilizando agentes vasodilatadores de microcirculação coronariana e de vasos coronários subepicárdicos, dipiridamol (KUSCHNIR; SGAMMINI; CASTRO; EVEQUOZ *et al.*, 1983) e dinitrato de isossorbida (MARIN-NETO; SOUSA; MACIEL; GALLO JUNIOR *et al.*, 1988), respectivamente, demonstraram a melhora na função sistólica global do ventrículo esquerdo em pacientes com CCC e distúrbios de perfusão. Sugerindo que a isquemia microvascular miocárdica possa estar direta ou indiretamente envolvida na progressão da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo na CCC.

No campo dos estudos experimentais, o grupo de pesquisadores da FMRP-USP desenvolveu recentemente um estudo em modelo de hamsters sírios cronicamente infectados pelo *T. cruzi* endereçando a correlação topográfica dos resultados das imagens ecocardiográficas *in vivo* e de perfusão miocárdica com Sestamibi-Tc99m adquiridas com cintilografia miocárdica de perfusão pelo método tomográfico de emissão de alta resolução em pequenos animais (SPECT adaptado) e as lesões histopatológicas de inflamação e fibrose. Neste modelo experimental, em torno de 50% dos animais infectados na janela temporal de 6 meses exibem extensos defeitos perfusionais miocárdicos em repouso. De forma ainda mais impactante e original, demonstrou-se a associação topográfica dos defeitos perfusionais miocárdicos com alterações histológicas inflamatórias e não com a presença de fibrose parietal regional transmural (LE MOS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018). Além disso, demonstrou-se ainda que a disfunção sistólica segmentar do ventrículo esquerdo ocorre com frequência elevada nesse modelo experimental de CCC e

que tais alterações identificam regiões com maior intensidade de inflamação (OLIVEIRA; ROMANO; CARVALHO; MEJIA *et al.*, 2016).

Portanto, é razoável supor que a hipoperfusão microvascular coronariana ocorrendo de forma persistente ou em episódios repetidos ao longo da evolução da doença possa contribuir para o mecanismo patogênico, induzindo inflamação focal e subsequente fibrose reparativa, e consequente desenvolvimento de disfunção sistólica regional e global do ventrículo esquerdo vistos na CCC.

Contudo, outras evidências lançam dúvidas sobre o real significado fisiopatogênico da isquemia microvascular na CCC. Um recente estudo experimental do grupo de pesquisa da FMRP-USP, utilizando hamsters sírios cronicamente infectados por *T. cruzi* e tratados com dipiridamol, observou significativa reversão dos defeitos de perfusão em repouso, apontando indiretamente para a presença de miocárdio viável nos segmentos hipoperfundidos. No entanto, a reversão dos defeitos perfusionais nos animais infectados tratados com dipiridamol não se associou à atenuação da progressão da disfunção ventricular esquerda ou redução das lesões histológicas inflamatórias miocárdicas (TANAKA; DE OLIVEIRA; MARIN-NETO; ROMANO *et al.*, 2018), sugerindo que a isquemia microvascular não desempenhe papel relevante na gênese do dano miocárdico na CCC, neste modelo experimental.

Outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa utilizando um imunomodulador de TNF- α e vasodilatador de microcirculação, a pentoxifilina, em modelo experimental de CCC em hamsters, mostrou redução dos defeitos de perfusão miocárdica em repouso, porém a pentoxifilina não impediu a progressão da disfunção sistólica ventricular esquerda, ainda que tenha atenuado parcialmente a intensidade das lesões inflamatórias. Esse conjunto de resultados pode indicar que as alterações de perfusão miocárdica sejam um marcador da presença de inflamação, mas não representem um mecanismo lesivo independente durante a progressão da CCC. Tais resultados sugerem ainda que há necessidade de estudos mais profundos investigando o papel da disfunção microvascular nos mecanismos de lesão miocárdica nessa doença (TANAKA, 2019).

Vale ressaltar que os estudos experimentais utilizando imagens *in vivo* de perfusão miocárdica relatados aqui se restringiram a pesquisar defeitos de perfusão em repouso, sem incluir a investigação de defeitos perfusionais sob estresse, ou reversíveis, esses mais classicamente investigados nos estudos de perfusão miocárdica em humanos.

Dessa forma, estudos mais detalhados correlacionando isquemia microvascular coronária e as características das lesões histopatológicas miocárdicas poderiam contribuir para o entendimento desse problema, já que o padrão de fibrose miocárdica na CCC pode refletir os mecanismos patogênicos envolvidos.

Estudos em cardiopatia isquêmica aterosclerótica indicam que o subendocárdio é a primeira camada afetada pela lesão isquêmica. Esse aspecto retrata o fato de que o subendocárdio é a camada da parede ventricular esquerda com menor pressão de perfusão sanguínea e, desta forma, o fluxo sanguíneo subendocárdico é o mais gravemente reduzido quando há obstrução de uma artéria coronária. Essa característica deriva-se do fato de que as artérias coronárias são vasos “perfurantes” que emergem a partir das artérias coronárias subepicárdicas e vão se ramificando para vasos arteriais de fino calibre e intramurais à medida que se aprofundam nas camadas do miocárdio em direção ao endocárdio (GUYTON; HALL, 2011). Nos casos mais prolongados e graves de redução de fluxo sanguíneo, a lesão isquêmica se inicia no subendocárdio e se estende para outras camadas da parede ventricular esquerda progredindo para o epicárdio e tornando-se transmural (REIMER; JENNINGS, 1979). Dessa forma, é aspecto clássico da histopatologia da cardiopatia isquêmica aterosclerótica a distribuição de fibrose predominando na região subendocárdica, aspecto muito bem demonstrado nos estudos *in vivo* usando ressonância magnética cardíaca com imagens de realce tardio de contraste paramagnético (TREIBEL; LOPEZ; GONZALEZ; MENACHO *et al.*, 2018).

Por outro lado, em lesões miocárdicas isquêmicas por doença aterosclerótica, o colágeno tipo I é predominante nas fases mais precoces de instalação da fibrose, cerca de 70%. Nas fases mais tardias de lesão fibrose, os colágenos tipo I e II aumentam de maneira proporcional, sem predominância específica (STARY; CHANDLER; DINSMORE; FUSTER *et al.*, 1995). Vale ressaltar que muito pouco se estudou até o momento sobre os tipos de fibras colágenas e a suas distribuições topográficas na fibrose miocárdica decorrente da CCC. Sabe-se que a degeneração das miofibrilas é focal e associada com as áreas de inflamação (BONNEY; LUTHRINGER; KIM; GARG *et al.*, 2019), e que se caracteriza pelo aumento difuso nas fibras tipo I de colágeno no endomísio e perimísio, predominando as fibras do tipo I em relação as fibras do tipo III (ROSSI, 1991; 1998). Contudo, não pudemos encontrar, após busca extensa na literatura médica especializada, estudos endereçando a investigação da correlação entre as alterações histopatológicas com a presença de defeitos de perfusão, e particularmente sobre os diferentes tipos de fibras de colágeno envolvidas. Esse tipo de estudo poderia contribuir para determinar-

se o significado dos distúrbios de perfusão miocárdica na gênese da lesão miocárdica na CCC. Por premissa, a eventual participação significativa da isquemia miocárdica nos mecanismos de lesão miocárdica na CCC implicaria em uma correlação topográfica e quantitativa com maior dano e mais intensa lesão histológica na camada subendocárdica, onde a isquemia é mais pronunciada durante a redução de fluxo arterial coronário.

1.6. HIPÓTESE

Diante do exposto, é plausível considerar que fenômenos de isquemia microvascular coronariana sejam comuns na CCC e que possam estar envolvidos nos processos fisiopatogênicos que levam à disfunção sistólica ventricular esquerda, com consequente desenvolvimento tardio de fibrose miocárdica regional.

Contudo, ainda há controvérsia se a isquemia microvascular possa representar um mecanismo lesivo independente ou ser um mero marcador da presença de inflamação miocárdica na CCC.

Por outro lado, pouco se sabe sobre o desenvolvimento de inflamação e fibrose através das diversas camadas das paredes do ventrículo esquerdo ao longo da progressão da CCC e sua relação com a isquemia microvascular, além da escassez de estudos evidenciando diferenças entre os tipos de fibras de colágeno que se formam durante esse processo.

Desta forma, estudos em modelo experimental de CCC investigando as correlações topográficas e quantitativas entre defeitos de perfusão miocárdica e as lesões histopatológicas, incluindo tipos de colágeno e a sua distribuição transmural nas paredes do ventrículo esquerdo, poderiam contribuir para melhor compreensão do papel fisiopatogênico dos distúrbios de perfusão miocárdica na CCC.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo do presente estudo foi analisar, em modelo experimental de CCC em hamsters sírios, as alterações histopatológicas de fibrose e inflamação nas diferentes camadas da parede ventricular esquerda e correlacioná-las com o grau de disfunção sistólica e remodelamento ventricular esquerdo e com as alterações de perfusão miocárdica em repouso e sob estresse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para o protocolo de estudo foram utilizados hamsters sírios fêmeas (*Mesocricetus auratus*) de 12 semanas de idade (Amilab – Animais de laboratório Criação e Comércio Ltda., Paulínia/SP, Brasil). Os animais foram mantidos em alojamento climatizado no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com livre acesso a água e ração padrão, submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Chagas (CH) com 26 animais cronicamente infectados por *T. cruzi* e grupo controle (CTR) com 12 animais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas (FAEPA).

3.2. INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *T. CRUZI*

Os animais do grupo Chagas foram infectados intraperitonealmente com $3,5 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, enquanto que os animais do grupo controle foram inoculados intraperitonealmente com o mesmo volume de solução salina.

3.3. DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO

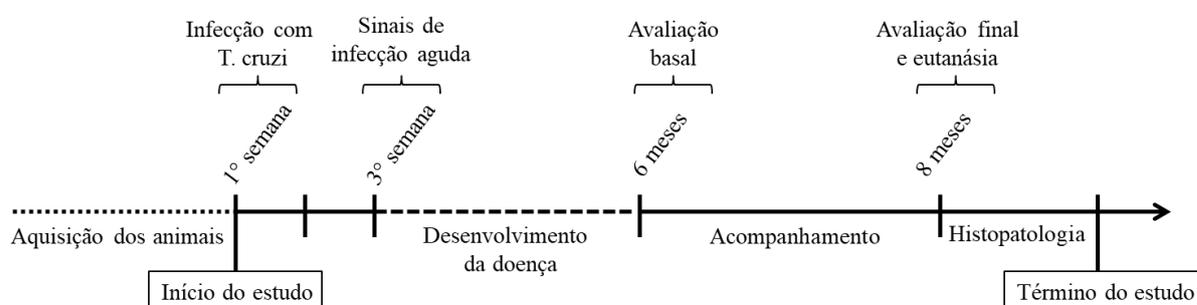
Após a infecção com *T. cruzi* ou solução salina, os animais foram acompanhados e observados quanto aos sinais de infecção aguda, como perda de peso, diarreia, vômito e mortalidade.

Na janela temporal de 6 meses após infecção, aqui denominada de avaliação basal, os animais dos dois grupos foram submetidos aos seguintes exames de imagem: ecocardiograma de alta resolução e cintilografia de perfusão miocárdica com Sestamibi-Tc99m de alta resolução, em repouso e sob estresse farmacológico induzido por cloridrato de dobutamina. Em seguida, todos os animais foram acompanhados durante 8 semanas. Após esse período os métodos de avaliação por imagem *in vivo* foram repetidos, em uma avaliação final. Em seguida, os animais sofreram eutanásia para retirada do coração para estudo histopatológico.

A partir dos dados de ecocardiograma obtidos na avaliação final (8 meses após a infecção) os animais foram divididos nos seguintes grupos para realização da análise estatística: 1. grupo controle (CTR); 2. grupo doença de Chagas sem disfunção ventricular esquerda (CHs); e, 3. grupo doença de Chagas com disfunção ventricular esquerda (CHc). Em seguida, houve uma segunda divisão de grupos para análise estatística baseada na presença de DPM em repouso $\geq 5\%$: 1. grupo controle (CTR); 2. grupo doença de Chagas sem defeito de perfusão miocárdico em repouso; e, 3. grupo doença de Chagas com defeito de perfusão miocárdico em repouso.

A figura 1 apresenta o delineamento do estudo segundo a linha do tempo.

Figura 1 – Delineamento do estudo



Fonte: Fabricio, C.G. (2022).

3.4. MÉTODOS DE IMAGEM

3.4.1. Ecocardiografia de alta resolução

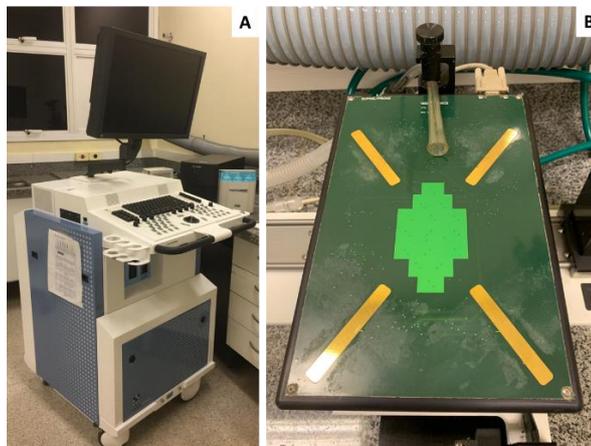
O ecocardiograma foi realizado utilizando-se um transdutor linear de 30 MHz de frequência fundamental, com interface para um sistema de imagem de alta resolução Vevo 2100 (VisualSonics, Toronto, ON, Canadá), sistema de ultrassom dedicado ao estudo de pequenos animais, figura 2A.

Para realização das imagens, os animais foram previamente submetidos à anestesia, com uma combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente), seguida por depilação da região anterior do tórax através de aplicação de creme depilatório comercial humano.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em uma plataforma inclinável (VisualSonics, Toronto, ON, Canadá) com controle de temperatura e monitorização com

eletrocardiograma de superfície, figura 2B. Os animais permaneceram em ventilação espontânea durante todo o exame.

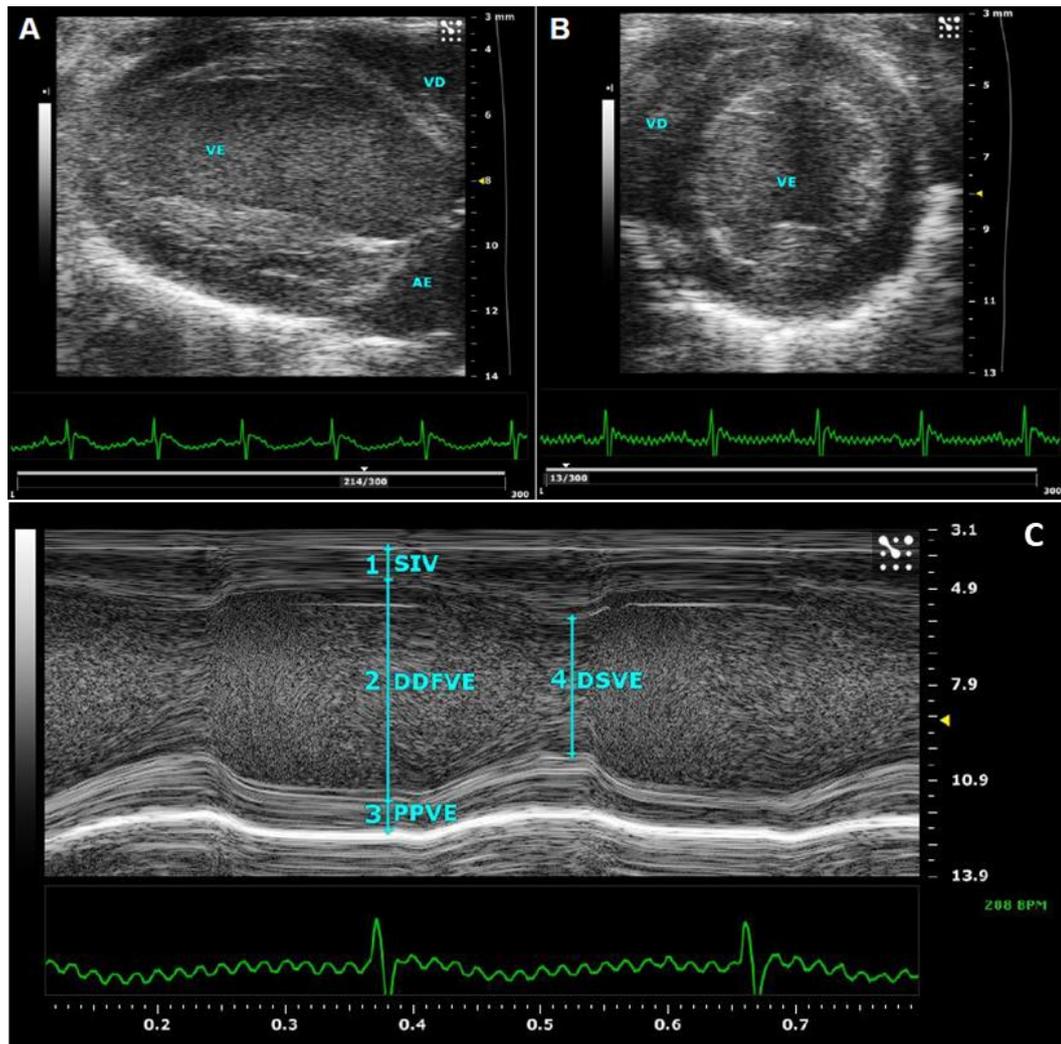
Figura 2 – Equipamentos utilizados na aquisição de imagens ecocardiográficas



A: Imagens ilustrativas de equipamento Vevo utilizado para aquisição de imagens ecocardiográficas; B: Plataforma inclinável para o posicionamento do animal.
Fonte: (TANAKA, 2019).

Para aquisição das imagens ecocardiográficas, pelo menos 3 ciclos cardíacos foram registrados. O transdutor, embebido em gel aquecido, foi posicionado levemente à esquerda do esterno entre a quarta e sexta costela, de forma a não induzir bradicardia. Foram gravadas imagens paraesternal no eixo longo (figura 3A) e no eixo curto (figura 3B), ao nível dos músculos papilares. As medidas em modo M foram realizadas para aferir a espessura do septo intraventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo, assim como suas dimensões sistólicas e diastólicas. O diâmetro sistólico foi adquirido durante a máxima movimentação anterior da parede posterior e o diâmetro diastólico obtido na dimensão diastólica ventricular máxima, figura 3C, foram seguidas as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia e da Sociedade Europeia de Imagem Cardiovascular (LANG; BADANO; MOR-AVI; AFILALO et al., 2015) para quantificação cavitária.

Figura 3 – Imagem ilustrativa adquirida durante o exame de ecocardiograma.



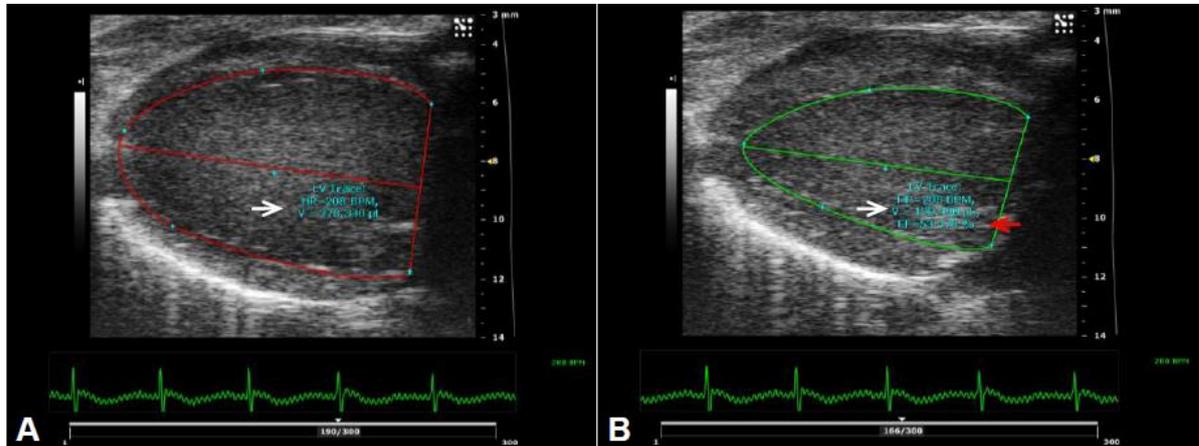
A: Imagem adquirida na janela paraesternal eixo longo; B: Imagem paraesternal eixo curto em nível papilar; C: Imagem em Modo M, ilustrando as medidas do septo interventricular (SIV), diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE) e diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE).

Fonte: (TANAKA, 2019).

Para análise de função ventricular esquerda foi utilizada a técnica bidimensional de variação de área para o cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). O vídeo com melhor definição da projeção paraesternal longitudinal foi escolhido para análise. A marcação das bordas do subendocárdio em diástole ocorreu no quadro com maior volume diastólico e, no mesmo ciclo cardíaco, o quadro com menor volume sistólico para determinação da sístole, figura 4. A função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) foi considerada normal para aqueles animais do grupo CH que apresentavam fração de ejeção $> 44\%$, conforme observado no valor mínimo do intervalo de referência utilizando o valor médio menos dois desvios padrões ($53,8 \pm 4,7$) por Barros e cols. em seu estudo em hamsters sírios visando determinar a

viabilidade, intervalos de referência e reprodutibilidade da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (BARROS FILHO; MOREIRA; DIAS; RIBEIRO et al., 2021).

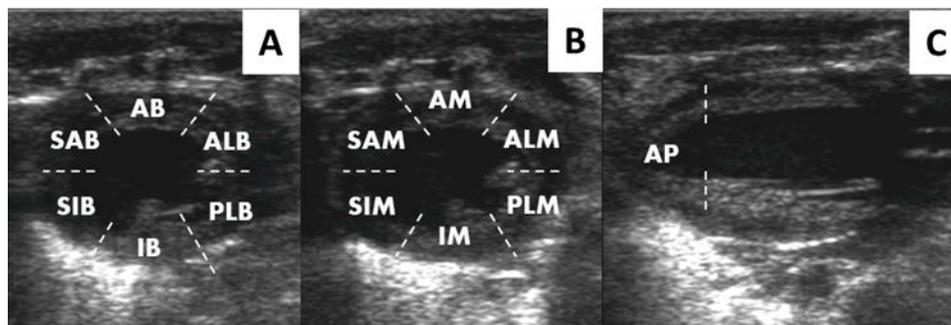
Figura 4 – Imagem ilustrativa da medida de fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo método bidimensional.



A: Marcação das bordas do subendocárdio em diástole; B: marcação das bordas do subendocárdio em sístole.
Fonte: (TANAKA, 2019).

A mobilidade parietal segmentar (MPS) sistólica do ventrículo esquerdo foi analisada seguindo-se modelo de segmentação do VE em 13 segmentos: 6 segmentos basais, 6 segmentos médio-ventriculares e o ápice (MORGAN; FAULX; MCELFRISH; KUNG et al., 2004), figura 5. Um observador experiente e velado quanto ao grupo ao qual o animal estava alocado e janela temporal do estudo graduou a MPS como: normal = 1, hipocinético = 2 e acinético/discinético = 3. O escore de mobilidade parietal segmentar (EMPS) foi determinado pela somatória dos índices de cada segmento dividido pelo número total de segmentos.

Figura 5 – Segmentação do ventrículo esquerdo.



Segmentação do VE. A: Paraesternal eixo curto em nível basal; B: Paraesternal eixo curto em nível médio-ventricular; C: Paraesternal eixo longo.

Fonte: (TANAKA, 2019).

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

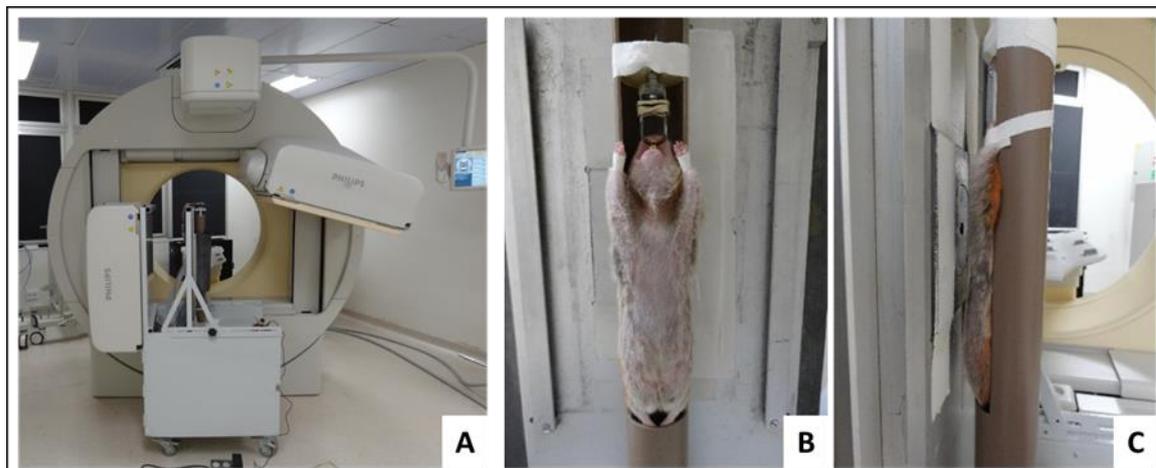
3.4.2.1. Aquisição das imagens em SPECT

A aquisição das imagens de cintilografia foi realizada utilizando-se uma gama-câmara clínica (BrightView XCT; Philips Medical Systems Inc., Cleveland, OH), adaptada para aquisição de imagens de alta-resolução para pequenos animais. Esse sistema de aquisição foi desenvolvido localmente e validado para obtenção de imagens de perfusão miocárdica em pequenos animais, figura 6A (MEJIA; GALVIS-ALONSO; BRAGA; CORREA et al., 2009; MEJIA; GALVIS-ALONSO; CASTRO; BRAGA et al., 2010; OLIVEIRA; MEJIA; DE CARVALHO; LATARO et al., 2013).

O sistema de blindagem adaptado ao detector da gama-câmara permite o encaixe de um colimador de orifício simples ("pinhole"), com diâmetro de 1,5 mm e ângulo de abertura total de 150°, permitindo a magnificação da imagem e atingindo resolução espacial entre 1 a 2 mm objeto alvo. A blindagem é formada por placa de alumínio revestida por uma manta de chumbo de 6 mm de espessura, adequada para fótons com energia na faixa de 150 KeV. O animal é posicionado em um tubo cilíndrico (figura 6B) que se acopla a um sistema motorizado, dentro do sistema de blindagem, permitindo a rotação do alvo em 360° para aquisição das imagens tomográficas em diferentes ângulos (figura 6C).

A captura das imagens segue um protocolo de aquisição dinâmico da gama-câmara e foram armazenadas em formato DICOM. Para aquisição das imagens, foram realizadas 40 projeções, igualmente espaçadas em um ângulo de 360°. As projeções foram registradas em uma matriz de 128 x 128 elementos, cada elemento com uma área de 3,4 x 3,4 mm. Um fator de magnificação de 6,3 vezes foi adotado para todos os experimentos, correspondendo a uma dimensão espacial de 2,4 mm. E a janela de energia simétrica de 20% foi centrada no fotóptico de energia do Tc99^m (140 keV). O tempo de aquisição total foi de, aproximadamente, 23 minutos por animal, sendo cada uma das 40 projeções de 30 segundos.

Figura 6 – Sistema SPECT de alta-resolução e posicionamento do animal.



A: Sistema posicionado em uma das duas cabeças da gama câmara clínica BrightView XT; B e C: animal posicionado em suporte rotacional.

Fonte: (TANAKA, 2019).

3.4.2.2. Protocolo de imagens em repouso e sob estresse farmacológico

Para o protocolo de imagens em repouso, os animais foram rapidamente anestesiados com isoflurano a 5% por 1 minuto e 555 MBq de Sestamibi-Tc99m foi injetada na veia sublingual e permitido que o animal despertasse em seguida. Uma hora e meia após a injeção, os animais foram novamente anestesiados em uma combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente) e posicionados no sistema para a aquisição de imagens.

Para o protocolo de imagens sob estresse, os animais foram anestesiados com combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente). O cloridrato dobutamina foi infundido em cateter posicionado previamente em veia safena. A dobutamina é uma catecolamina sintética com atividade predominante de agonista de receptores adrenérgicos beta-1, aumentando o inotropismo (contração) e cronotropismo (ritmo) cardíacos (BURGER; NOTARIANNI; ARONSON, 2000). A administração da dobutamina foi realizada em infusão contínua de 12,5 µg/Kg/mim, por 1 minutos, conforme estudo prévio de padronização realizado pelo grupo de pesquisa da FMRP-USP (DELARISSE, 2020). Ao final da infusão de dobutamina, foi injetado 555 MBq de Sestamibi-Tc99m, por via sublingual e seguiu-se o protocolo estabelecido para as imagens em repouso.

O estudo de Delarisse e cols. testou diferentes dosagens de dobutamina e mostrou-se efetivo em produzir aumento significativo do duplo produto (frequência cardíaca x pressão arterial) em uma dosagem de 12,5 µg/Kg/min por 1 minuto, sem induzir defeitos perfusionais isquêmicos em animais controles ou sinais de disfunção miocárdica transitória durante o

estresse (DELARISSE, 2020). Este mesmo estudo realizou, em seguida, SPECT adaptado para pequenos animais em modelo experimental de CCC em hamsters com 6 meses após a infecção por *T. cruzi* e verificou que o protocolo com dobutamina foi capaz de induzir defeitos perfusionais reversíveis (DELARISSE, 2020). Em outros estudos em pequenos roedores, a dobutamina também foi utilizada com sucesso para provocação de isquemia miocárdica (HAZARI; CALLAWAY; WINSETT; LAMB *et al.*, 2012; KELM; BEARE; LEBLANC, 2019).

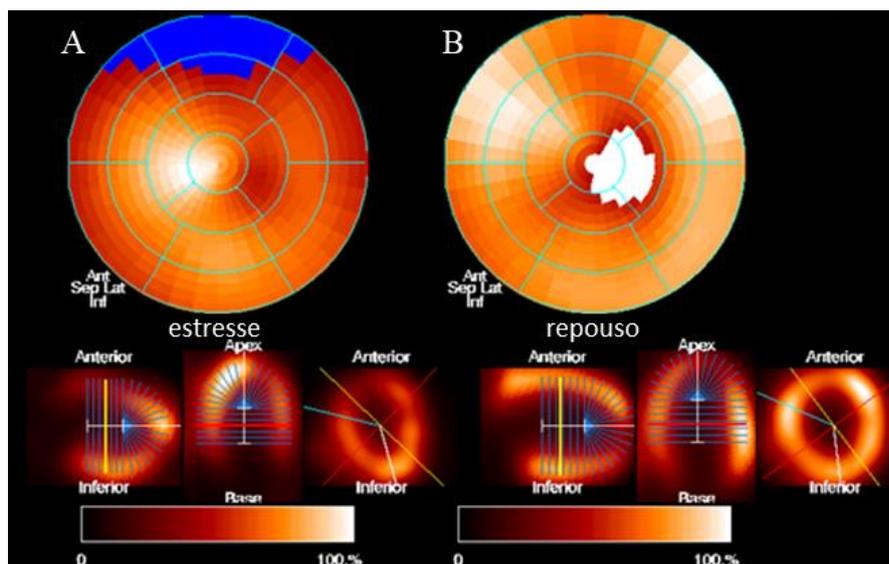
3.4.2.3. Processamento e análise das imagens

Após a aquisição das projeções, as imagens foram exportadas em formato DICOM para um computador pessoal, onde foram processadas para obtenção do modelo tridimensional da distribuição do radiofármaco no órgão alvo (MEJIA; GALVIS-ALONSO; CASTRO; BRAGA *et al.*, 2010). Para isso, foi desenvolvido um software de reconstruções interativa de imagens baseado no algoritmo de *ordered-subsets expectation maximization* (OSEM). Para visualização final das reconstruções, foi utilizado o freeware AMIDE Medical Image Data Examiner, sendo gerados cortes tomográficos nos 3 eixos ortogonais: eixos longos horizontal e vertical, eixo curto.

A análise da perfusão miocárdica foi baseada na construção de mapa polar para avaliação quantitativa (planimetria) das áreas de defeitos graves (pixels exibindo contagens abaixo de 50% do pixel de maior contagem), figura 7. A construção do mapa polar foi realizada em parceria com a Faculdade de Medicina de Hannover pelo software MunichHeart®, no Departamento de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina de Hannover. Após o cálculo dos mapas polares, as informações quantitativas de captação foram analisadas aplicando-se a segmentação da superfície miocárdica do VE em 16 segmentos (6 basais, 6 médio-ventriculares e 4 apicais), para permitir análise topográfica dos defeitos e correlação com as análises da histopatologia que se baseou no mesmo esquema de segmentação miocárdica.

Mediante comparação dos mapas polares obtidos nas imagens de estresse e repouso, foram identificadas as regiões miocárdicas exibindo defeitos perfusionais (DP): 1. em repouso em que a captação do radiotraçador foi inferior a 50% do máximo nas imagens em repouso; 2. reversíveis, caracterizados pela subtração da área de DP sob estresse pela área de DP em repouso (estresse – repouso); 3. paradoxal, caracterizado pela subtração da área de DP em repouso pela área de DP sob estresse (repouso – estresse).

Figura 7 – Mapa polar



Mapas polares gerados com divisão em 16 segmentos e a ponta do ápice (descartada da análise): 6 basais, 6 médio-ventriculares e 4 apicais. A: imagem ilustrativa de um mapa polar de exame em estresse, em azul área de captação do radiofármaco inferior a 50% em relação ao máximo; B: imagem ilustrativa de um mapa polar de exame em repouso, em branca área de captação do radiofármaco inferior a 50% em relação ao máximo.

Fonte: Fabricio, C.G. (2022)

3.5. HISTOPATOLOGIA

Após anestesia em níveis mais profundos utilizando-se Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente), os animais foram eutanasiados mediante abertura do tórax, sendo o coração rapidamente excisado e lavado em solução PBS. Em seguida os vasos da base assim como os átrios e ventrículo direito foram descartados de forma cuidadosa para não produzir lesão na parede ou cavidade ventricular esquerda. Para análise histopatológica foram obtidos cortes em três níveis do coração (basal, médio-ventricular e apical) com o cuidado de se manter a mesma orientação para a correlação topográfica com as imagens *in vivo*.

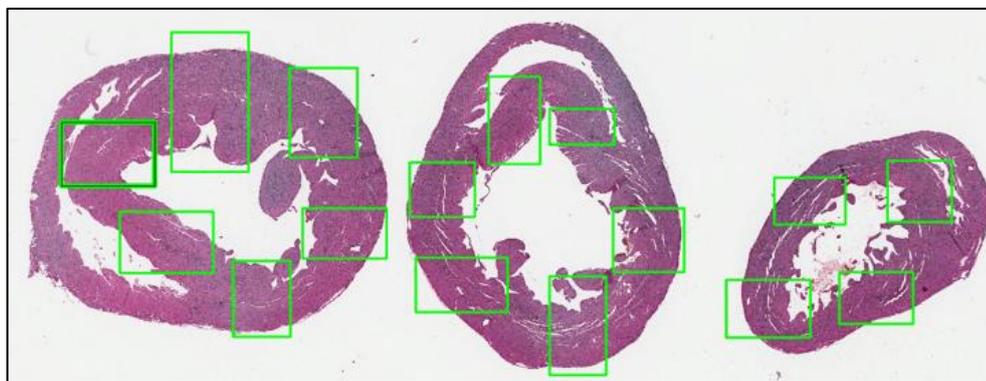
As amostras do tecido cardíaco foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 24 horas, e depois transferidas para álcool 70%. As amostras foram, então, progressivamente desidratadas, embebidas em parafina, cortadas em micrótomo com 5 μm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina e picrossírius-vermelho para quantificação da presença de inflamação e fibrose, respectivamente.

3.5.1. Digitalização e análise quantitativa de inflamação

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina 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 svx.

Similarmente ao realizado com as imagens de cintilografia, foi realizada a segmentação miocárdica do VE em 16 segmentos. Para cada lâmina escaneada foram realizadas 9 fotos por segmento utilizando aumento de 40 vezes, ou seja, as lâminas foram amostradas utilizando-se a técnica de amostragem aleatória uniforme isotrópica recomendada pelas normas Sociedade Americana de Tórax e pela Sociedade Europeia Respiratória para avaliação quantitativa das estruturas, permitindo maior acurácia e precisão (HSIA; HYDE; OCHS; WEIBEL *et al.*, 2010), figura 8. Para que a varredura do miocárdio fosse completa, em cada um dos 16 segmentos do VE, foram fotografadas 3 imagens aleatórias de cada camada das paredes do ventrículo esquerdo: subendocárdio, mesocárdio e subepicárdio. Dessa forma, foram produzidas 144 imagens para cada animal analisado, que foram analisadas para intensidade de inflamação mediante contagem de células mononucleares.

Figura 8 – Imagem ilustrativa de corte histológico e segmentação do ventrículo esquerdo.



Cortes histológicos do ventrículo esquerdo mantendo correlação topográfica com as imagens *in vivo*. Coloração de hematoxilina-eosina para quantificação de inflamação. As marcações em verde representam as áreas dos segmentos utilizados para fotografia de subendocárdio, mesocárdio e subepicárdio.

Fonte: Fabricio, C.G. (2022)

A contagem da densidade inflamatória foi realizada manualmente através do retículo de Weibel, em que as células inflamatórias mononucleares foram contadas quando havia interseção com as barras do retículo, figura 9 (HSIA; HYDE; OCHS; WEIBEL *et al.*, 2010).

Figura 9 – Imagem ilustrativa da contagem de células inflamatórias mononucleares através do retículo de Weibel.

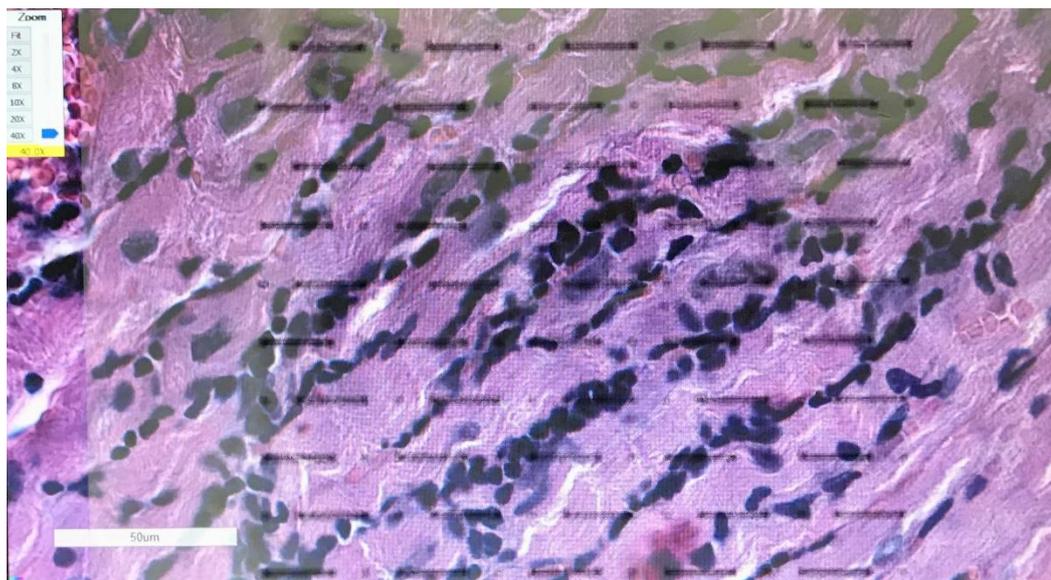


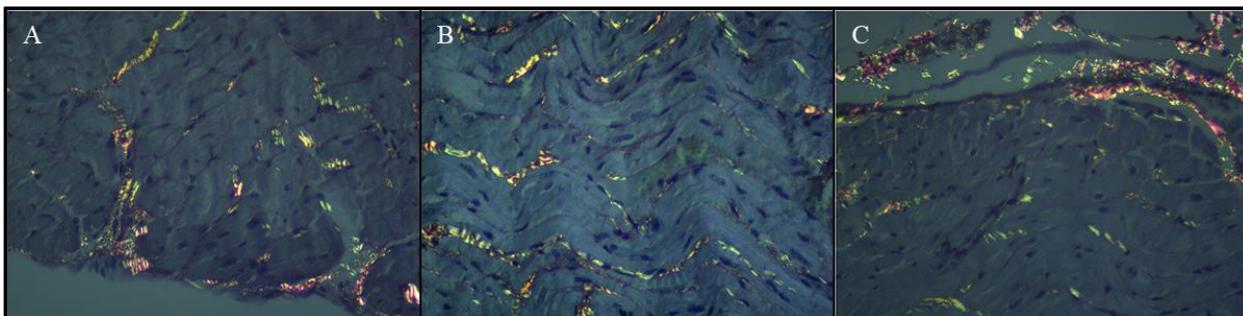
Foto de um corte histológico do mesocárdio de um animal com CCC utilizando o retículo de Weibel. As contagens das células inflamatórias foram consideradas quando havia intersecção entre as barras pretas e as células mononucleares.

Fonte: Fabricio, C.G. (2022)

3.5.2. Análise quantitativa e qualitativa da fibrose

As lâminas coradas com picrossírius-vermelho foram examinadas em microscópio óptico Novel sob luz polarizada, dos quais foram capturadas imagens com câmera Life HD, no aumento de 40 vezes, seguindo a mesma sistemática de amostragem por segmento do VE e camada miocárdica, como descrito para a análise da inflamação, perfazendo um total de 144 fotos por lâmina (figura 10). A quantificação das fibras de colágeno foi medida e expressa como uma razão entre a quantidade de fibras e a área total estudada. O resultado final expressa a área percentual ocupada pelas fibras colágenas em relação ao total, conforme descrito detalhadamente por Silva e cols. (SILVA; PARRA; ZOCOLARO; NARDE *et al.*, 2012). Foram analisados colágenos tipo I e III. As fibras de colágeno tipo I aparecem na imagem em luz polarizada nas cores amarelo ou amarelo-vermelho, sendo também conhecidas como fibras espessas. As fibras de colágeno tipo III são observadas na cor verde, em luz polarizada, também conhecidas como fibras finas de colágeno. Ao final, a quantificação das fibras do tipo I e III foram somadas e nomeadas “fibrose global” para dar a dimensão total da quantidade de colágeno existente nos tecidos analisados. Em relação à análise baseada nas camadas murais do miocárdio ventricular esquerdo, usamos o termo “fibrose total” para nos referirmos à soma das fibroses nas 3 camadas miocárdicas do VE.

Figura 10 – Imagem ilustrativa de cortes histológicos capturada com luz polarizada.



Imagens de corte histológicos corados com picrosírius vermelho e capturadas por microscópio ótico com incidência de luz polariza. A: imagem de subendocárdio; B: imagem de mesocárdio; C: imagem de subepicárdio. Fonte: Fabricio, C.G. (2022)

3.6. ASPECTOS ÉTICOS DE INVESTIGAÇÃO ANIMAL

Os animais foram submetidos aos procedimentos sob anestesia, de forma a não induzir estresse ou dor. Não foram utilizados métodos cruentos ou que submetessem os animais a sofrimento ou dor. O projeto foi executado após a devida aprovação do projeto no comitê de ética em pesquisa animal da nossa instituição (Protocolo nº 128/2016), anexo A.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de variáveis contínuas são apresentados como média \pm desvio padrão da média, para variáveis paramétricas, ou representadas em mediana (25% - 75%), para as variáveis não paramétricas. As variáveis nominais são expressas como frequência absoluta (n) e relativa (%).

O teste Kolmogorov-Smirnov foi empregado para avaliar a distribuição amostral gaussiana das variáveis. Para a avaliação das diferenças entre os grupos ao longo de tempo foi realizada a análise de variância (ANOVA) para modelos mistos de medidas repetidas em um dos fatores (ANOVA de múltiplos fatores). Análises *post hoc* de efeitos simples foram realizadas para se examinar diferenças intragrupos, em caso de interação significativa.

Para comparação simultânea das médias das variáveis obtidas apenas na avaliação final (análises histopatológicas) nos 3 grupos experimentais, foi aplicado o Teste de ANOVA de medidas simples, com pós teste de Dunn.

Para as análises de correlações apenas os animais infectados foram utilizados. Para tanto, foi utilizada a análise de Regressão Linear e Correlação de Pearson quando as variáveis

apresentavam distribuição normal, e o teste de Correlação de Spearman quando as variáveis não seguiam uma curva de distribuição normal. Estabeleceu-se como nível de significância um valor de $p < 0,05$, bicaudal.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Estudos prévios do grupo de pesquisa da FMRP-USP, utilizando a mesma técnica e protocolo de infecção, confirmaram a infecção experimental através de *Western-Blot*. Naquela ocasião, todos os animais infectados apresentaram anticorpos anti-*T. cruzi* no soro (TANAKA, 2019; TANAKA; DE OLIVEIRA; MARIN-NETO; ROMANO *et al.*, 2018). Desta forma, podemos supor que no presente estudo a infecção atuou de maneira semelhante.

4.2. MORTALIDADE E EXCLUSÃO

Durante o protocolo, 4 animais morreram, sendo 1 animal do grupo CTR e 3 do grupo CH. Adicionalmente, outros 5 animais do grupo CTR foram excluídos devido à qualidade subótima das imagens ou pela presença de arritmia durante o ecocardiograma. Ao final foram analisados dados de 6 animais no grupo CTR e 23 animais no grupo CH.

4.3. AVALIAÇÃO BASAL

A média de peso dos animais controles foi de $215,7 \pm 14,8$ gramas e dos animais infectados foi de $179,6 \pm 22,7$ gramas, $p < 0,01$ (teste t não pareado).

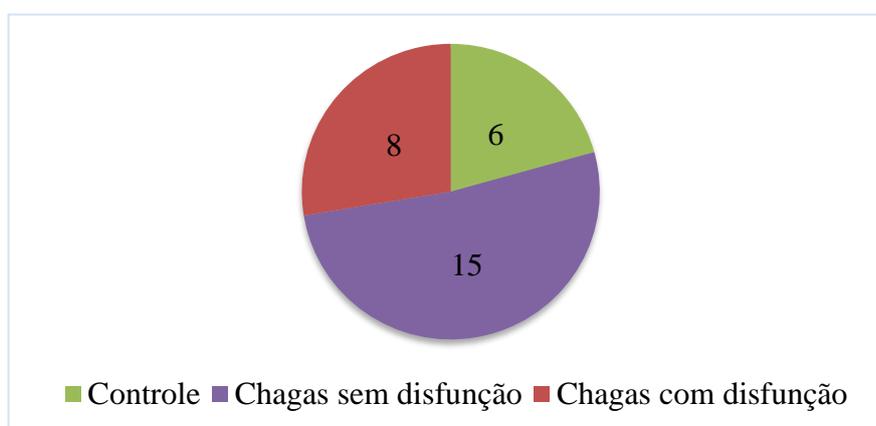
Na janela temporal de 6 meses após a infecção, a FEVE foi menor no grupo CTR que nos animais infectados por *T. cruzi*: $52,5 \pm 5,05\%$ e $57,6 \pm 4,2\%$, respectivamente, $p = 0,02$. Os diâmetros diastólico (DdVE) e sistólico (DsVE) não apresentaram diferença significativa entre os grupos, os animais CTR e CH apresentaram valores de DdVE igual a $7,35 \pm 0,30$ mm e $7,10 \pm 0,10$ mm ($p = 0,30$), DsVE igual a $4,75 \pm 0,18$ mm e $4,55 \pm 0,48$ mm ($p = 0,34$), respectivamente. Em relação ao índice de massa (IMVE) e as espessuras da parede do VE, os animais CTR apresentaram aumento em comparação aos CH, com IMVE igual a $518,17 \pm 31,23$ g/kg e $441,83 \pm 77,36$ g/kg ($p < 0,01$), espessura lateral do VE igual a $1,38 \pm 0,10$ mm e $1,22 \pm 0,12$ mm ($p < 0,01$), espessura do septo do VE igual a $1,35 \pm 0,11$ mm e $1,26 \pm 0,08$ mm ($p = 0,02$), respectivamente. Os valores da excursão sistólica do anel tricúspide – TAPSE (CTR: $1,67 \pm 0,16$ mm e CH: $1,61 \pm 0,14$ mm; $p = 0,42$) e o EMPS (CTR: $1,0 \pm 0,0$ e CH: $1,0 \pm 0,02$) não foram diferentes entre os grupos estudados.

Nesta avaliação, 13 animais (56,5%) infectados apresentaram alguma área de DP em repouso, 9 com DP reversível (39,1%) e 7 com DP paradoxal (30,4%), em média $2,08 \pm 2,73\%$, $0,94 \pm 1,55\%$ e $0,45 \pm 0,91\%$, respectivamente. Entre os animais controles, 5 apresentaram DP em repouso (83,3%), 1 DP reversível (16,7%) e 4 DP paradoxal (66,7%), em média $2,77 \pm 2,14\%$ ($p = 0,56$), $0,45 \pm 1,10\%$ ($p = 0,46$) e $1,14 \pm 1,31\%$ ($p = 0,20$), respectivamente.

4.4. EVOLUÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Considerando que valores de FEVE $\leq 44\%$ podem identificar animais com disfunção sistólica global ventricular esquerda significativa (BARROS FILHO; MOREIRA; DIAS; RIBEIRO et al., 2021), em consequência da cardiomiopatia crônica da DC. Dessa forma, os resultados do presente estudo mostraram, na avaliação final, 8 animais no grupo CH com disfunção sistólica (CHc: 35%) e 15 animais sem disfunção sistólica (CHs: 65%), gráfico 2.

Gráfico 1 – Distribuição dos grupos em CTR e CH baseado na FEVE (n = 29).



Na análise pareada comparando os resultados da avaliação basal e final, os animais dos grupos CHc ($57,8 \pm 4,0\%$ vs $36,4 \pm 8,3\%$, $p < 0,01$) e CHs ($57,5 \pm 4\%$ vs $53,3 \pm 3,9\%$, $p < 0,01$) apresentaram queda da FEVE ao longo do tempo, diferença não encontrada no grupo CTR ($52,5 \pm 5,0\%$ vs $51,3 \pm 6,2\%$, $p > 0,05$), gráfico 3. Na avaliação final, a análise intergrupos, mostrou que apenas o grupo CHc ($36,4 \pm 8,3\%$) apresentou diferença na FEVE quando comparado com os demais grupos (CHs: $53,3 \pm 3,9\%$; CTR: $51,3 \pm 6,2\%$; $p < 0,01$), enquanto o grupo CHs não se diferenciou do CTR, tabela 1, gráfico 3. Os dados da avaliação basal e final referentes aos parâmetros analisados através do ecocardiograma estão apresentados na tabela 1.

Os diâmetros diastólico e sistólico aumentaram significativamente ao longo do tempo em todos os grupos (gráfico 4), entretanto, na avaliação final, os animais do grupo CHc apresentaram valores significativamente maiores de DdVE ($8,5 \pm 0,9$ mm), quando comparados ao grupo CHs ($7,7 \pm 0,4$ mm; $p < 0,01$) e valores maiores de DsVE quando comparados aos demais grupos (CTR: $5,5 \pm 0,5$ mm; CHs: $5,3 \pm 0,5$; CHc: $6,6 \pm 0,8$; $p < 0,01$).

O EMPS também apresentou aumento no grupo CHc em relação ao basal (variação de 0,2 (0,2 – 0,9); $p < 0,01$) e aos demais grupos na avaliação final (CTR: 1,0 (1,0 – 1,1); CHs: 1,0 (1,0 – 1,1); CHc: 1,3 (1,2 – 1,9); $p < 0,01$), conforme ilustrado no gráfico 5.

Os resultados da avaliação utilizando ANOVA de medidas repetidas do IMVE ($p = 0,1$), espessura da parede lateral ($p = 0,6$) e da parede do septo ($p = 0,5$), e os valores de TAPSE ($p = 0,6$) não evidenciaram alteração significativa na avaliação ao longo do tempo ou na diferença entre os grupos nas avaliações basal e final.

Gráfico 2 – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (n = 29).

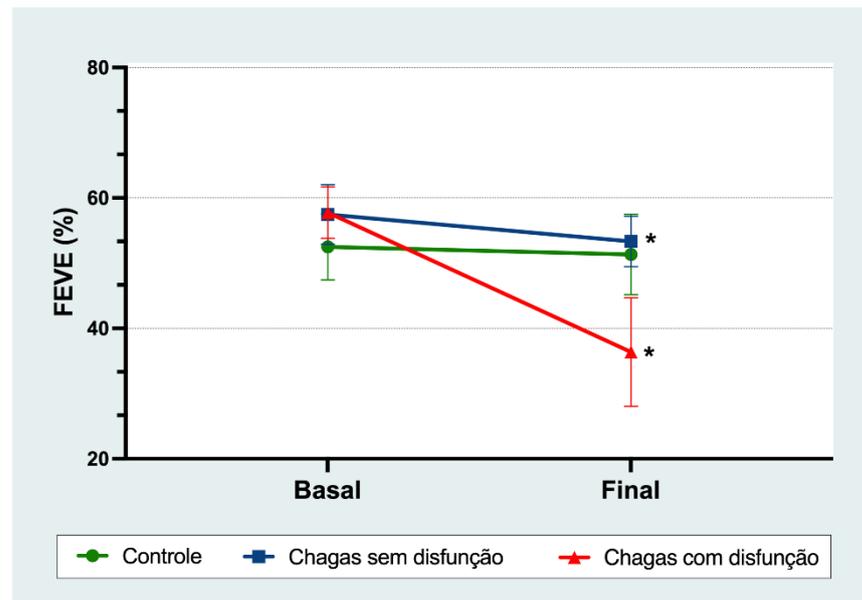
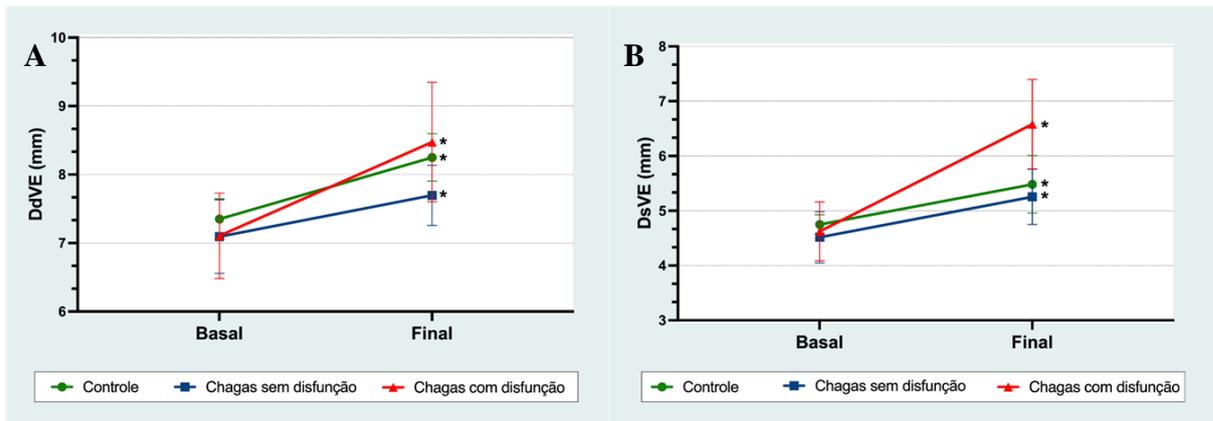


Gráfico de linhas representando os valores obtidos de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) de cada grupo nas condições basal e final. * $p < 0,01$ em relação ao basal. O valor de p refere-se à ANOVA para modelos mistos.

Gráfico 3 – Diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (n = 29).



Gráficos de linhas A) representando os valores obtidos de diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DdVE) de cada grupo nas condições basal e final, e B) representando os valores obtidos de diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DsVE) de cada grupo nas condições basal e final. * $p < 0,01$ em relação ao basal. O valor de p refere-se à ANOVA para modelos mistos.

Gráfico 4 – Escore de mobilidade parietal segmentar (n = 29).

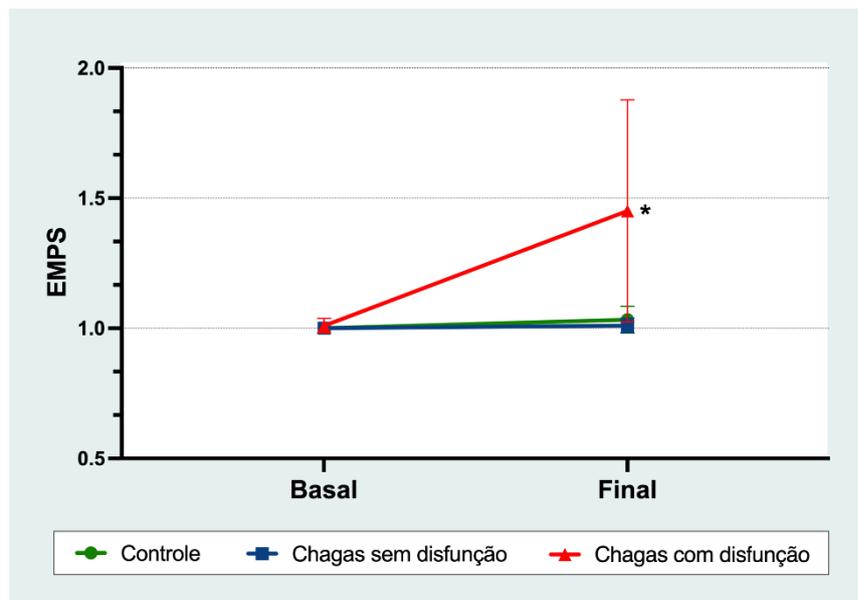


Gráfico de linhas representando os valores obtidos do escore de mobilidade parietal segmentar (EMPS) de cada grupo nas condições basal e final. * $p < 0,01$ em relação ao basal. O valor de p refere-se à ANOVA para modelos mistos.

Tabela 1 – Dados basais, finais do ecocardiograma na divisão dos animais baseada em grupos por FEVE, nos animais nos grupos controle, Chagas sem disfunção e Chagas com disfunção ventricular esquerda (n = 29).

	CTR (n = 6)		CHs (n = 15)		CHc (n = 8)		p ANOVA
	basal	final	basal	final	basal	final	
FEVE (%)	52,5 ± 5,0	51,3 ± 6,2	57,5 ± 4,6	53,3 ± 3,9#	57,8 ± 4,0	36,4 ± 8,3##*†	< 0,01
DdVE (mm)	7,3 ± 0,3	8,3 ± 0,4#	7,1 ± 0,5	7,7 ± 0,4#	7,1 ± 0,6	8,5 ± 0,9#†	0,01
DsVE (mm)	4,8 ± 0,2	5,5 ± 0,5#	4,5 ± 0,5	5,3 ± 0,5#	4,6 ± 0,5	6,6 ± 0,8##*†	< 0,01
IMVE (g/Kg)	518,2 ± 31,2	641,7 ± 116,1	438,5 ± 71,6	525,4 ± 69,4	448,0 ± 92,1	656,3 ± 186,5	0,10
Esp. Lateral (mm)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,60
Esp. Septo (mm)	0,0 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,50
TAPSE (mm)	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,60
EMPS	1,0 (1,0 - 1,0)	1,0 (1,0 - 1,1)	1,0 (1,0 - 1,0)	1,0 (1,0 - 1,0)	1,0 (1,0 - 1,0)	1,3 (1,2 - 1,9)##*†	< 0,01

Dados paramétricos apresentados em média ± desvio padrão e dados não paramétricos apresentados em mediana (25% - 75%). Resultado de avaliação pós-teste de ANOVA de medidas repetidas: # diferença significativa vs dados da avaliação basal no mesmo grupo; * diferença significativa vs grupo CTR na avaliação final; † diferença significativa vs CHs na avaliação final. Legenda: CTR: controle; CHs: Chagas sem disfunção sistólica; CHc: Chagas com disfunção sistólica; FEVE (fração de ejeção do ventrículo esquerdo); DdVE (diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo); DsVE (diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo); IMVE (índice de massa do ventrículo esquerdo); Esp. Lateral (espessura da parede lateral); Esp. Septo (espessura da parede septal); TAPSE (excursão sistólica do anel tricúspide); EMPS (escore de mobilidade parietal segmentar).

4.5. ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO E FIBROSE NO MIOCÁRDIO

Na avaliação histopatológica não foram visualizados parasitas nas formas tripomastigotas (extracelular) ou amastigotas (intracelular) na fase crônica da doença de Chagas, 8 meses após a infecção parasitária.

A análise histopatológica realizada na avaliação final mostrou que os animais infectados com *T. cruzi*, independente de apresentar disfunção sistólica, apresentaram maiores índices de infiltrado mononuclear quando comparados com o grupo CTR (p = 0,03 - ANOVA de medidas simples), tabela 2. Ressalte-se que apenas o grupo CHs exibiu diferença significativa em relação ao grupo CTR na análise pós-teste, ainda que o valor observado no CHc seja bastante comparável ao observado no CHs (tabela 2). Na figura 11-A a formação do infiltrado inflamatório mononuclear se apresenta de forma focal, porém difusa em todo tecido miocárdico.

As fibras de colágeno foram observadas especialmente circundando as fibras musculares peremisiais e ao redor dos vasos coronários. Em relação à avaliação da fibrose tecidual global levando em conta toda a extensão da parede do ventrículo esquerdo, não foi identificada diferença significativa entre os grupos estudados utilizando a análise ANOVA de medidas simples, p > 0,05 (tabela 2). O resultado se mantém após analisarmos os diferentes tipos de fibras de colágeno presentes no miocárdio (fibras espessas e fibras finas), novamente sem levarmos em conta as camadas da parede ventricular esquerda (tabela 2). A figura 11-B apresenta cortes histopatológicos representativos da análise da fibrose nos grupos investigados.

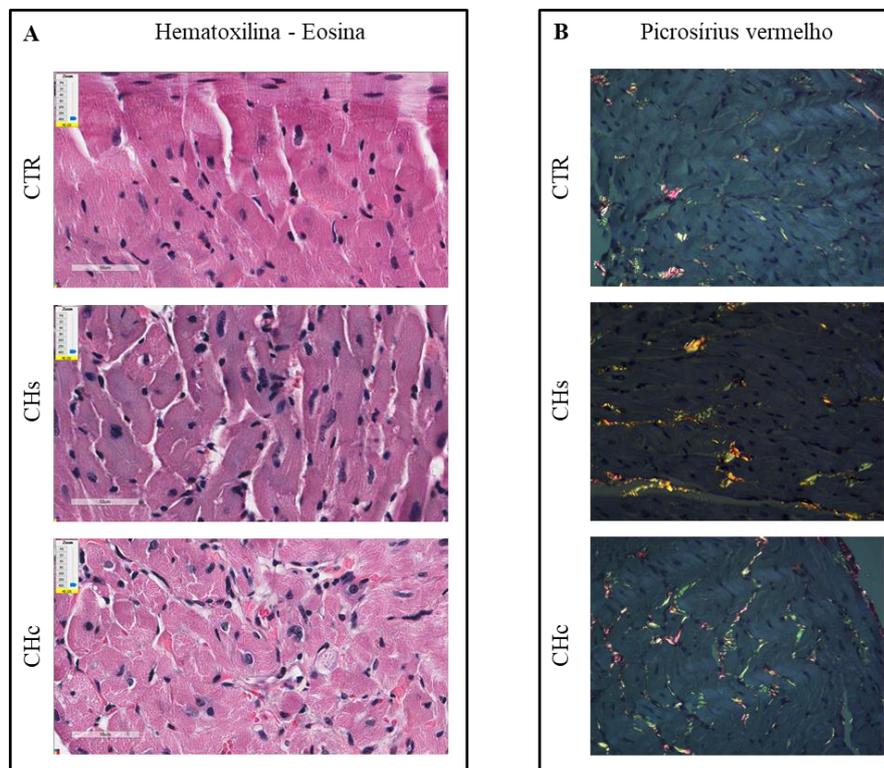
Tabela 2 – Dados de infiltrado mononuclear e fibrose transmurais na divisão dos animais baseada em grupos por FEVE, nos grupos controle e Chagas sem e com disfunção sistólica (n = 29).

	<i>CTR</i> (n = 6)	<i>CHs</i> (n = 15)	<i>CHc</i> (n = 8)	<i>p</i> - ANOVA
IIM	0,41 ± 0,32	1,00 ± 0,49*	1,04 ± 0,54	0,03
Fibrose global (%)	0,78 ± 0,23	0,83 ± 0,16	0,94 ± 0,20	0,24
<i>fibras espessas</i> (%)	0,42 ± 0,12	0,47 ± 0,08	0,52 ± 0,16	0,25
<i>fibras finas</i> (%)	0,37 ± 0,12	0,36 ± 0,08	0,42 ± 0,08	0,31

* $p < 0,05$ vs Controle utilizando o teste ANOVA de medidas simples

Legenda: IIM: índice de infiltrado mononuclear; CTR: controle; CHs: Chagas sem disfunção sistólica; CHc: Chagas com disfunção sistólica.

Figura 11 – Cortes histológicos representativos corados com hematoxilina-eosina e picrossírius-vermelho.



Legenda: CTR (controle), CHs (Chagas sem disfunção sistólica ventricular esquerda), CHc (Chagas com disfunção sistólica ventricular esquerda).

A: Cortes histológicos representativos corados com Hematoxilina – Eosina (painéis à esquerda), e B: corados com picrossírius vermelho (painéis à direita). Observa-se nos animais infectados por *T. cruzi* apresentam pontos focais de infiltrado inflamatório mononuclear difuso e sem aumento significativo na extensão de fibrose intersticial global.

Fonte: Fabricio, C.G. (2021).

4.5.1. Inflamação e fibrose nas camadas da parede miocárdica

Em análise histopatológica mais detalhada, foram avaliadas as camadas do subendocárdio, mesocárdio e subepicárdio de cada corte histológico (tabela 3). Os resultados dessa análise para intensidade da inflamação mostraram que a camada subendocárdica se destaca nos animais CHc por estar aumentada em relação aos animais controle ($p = 0,04$). No mesocárdio, ambos os grupos infectados apresentaram maior intensidade de inflamação quando comparados ao controle ($p = 0,01$), independente de apresentar disfunção sistólica. Já a camada subepicárdica chama a atenção por não se diferenciar entre os grupos estudados ($p = 0,14$), conforme observado na tabela 3.

O índice de fibrose foi analisado por camadas miocárdicas e pela presença de fibras de colágeno espessas e finas (tipo I e II e tipo III, respectivamente). Os resultados da avaliação de ambas as fibras, espessas e finas, revela que apenas na camada subendocárdica do grupo CHc apresenta aumento significativo em relação ao grupo CTR, $p = 0,03$ e $0,049$, respectivamente (tabela 3). Na análise de fibrose global evidenciou-se diferença significativa entre os grupos unicamente na camada subendocárdica, porém sem diferença entre os grupos no pós-teste.

Em uma análise endereçando especificamente as diferenças entre os grupos por tipo de fibra de colágeno, o grupo Chagas sem disfunção sistólica mostrou diferença significativa entre os valores totais (todas as camadas somadas) das fibras espessas e fibras finas ($p = 0,0017$). Os grupos controle ($p = 0,55$) e grupo Chagas com disfunção ($p = 0,13$) não mostraram essa diferença. Na camada subendocárdica, o grupo controle não apresentou diferença significativa entre os tipos de fibras ($p = 0,13$), enquanto os grupos Chagas sem e com disfunção apresentaram aumento significativo da fibra espessa em relação à fibra fina ($p < 0,001$ e $p = 0,01$, respectivamente), tabela 3.

Tabela 3 – Dados de infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose transmural na divisão dos animais baseada em grupos por FEVE, nos grupos controle e Chagas sem e com disfunção sistólica (n = 29).

	<i>IIM</i>	<i>Fibrose</i>		
		<i>fibras espessas</i>	<i>fibras finas</i>	<i>global</i>
<i>Controle (n = 6)</i>				
<i>Subendocárdio</i>	0,38 ± 0,22	0,27 ± 0,10	0,19 ± 0,07	0,45 ± 0,15
<i>Mesocárdio</i>	0,11 ± 0,08	0,35 ± 0,10	0,34 ± 0,13	0,69 ± 0,21
<i>Subepicárdio</i>	0,73 ± 0,89	0,62 ± 0,20	0,57 ± 0,18	1,18 ± 0,37
<i>Total</i>	0,41 ± 0,32	0,42 ± 0,12	0,37 ± 0,12	0,78 ± 0,23
<i>Chagas sem disfunção (n = 15)</i>				
<i>Subendocárdio</i>	0,87 ± 0,41	0,40 ± 0,12	0,22 ± 0,06	0,63 ± 0,16
<i>Mesocárdio</i>	0,55 ± 0,37*	0,39 ± 0,12	0,33 ± 0,11	0,72 ± 0,22
<i>Subepicárdio</i>	1,60 ± 0,80	0,61 ± 0,12	0,54 ± 0,13	1,15 ± 0,24
<i>Total</i>	1,00 ± 0,49*	0,47 ± 0,08	0,36 ± 0,08	0,83 ± 0,16
<i>Chagas com disfunção (n = 8)</i>				
<i>Subendocárdio</i>	1,02 ± 0,62*	0,46 ± 0,16*	0,28 ± 0,09*	0,74 ± 0,18
<i>Mesocárdio</i>	0,70 ± 0,44*	0,41 ± 0,10	0,36 ± 0,12	0,77 ± 0,16
<i>Subepicárdio</i>	1,40 ± 0,97	0,70 ± 0,25	0,64 ± 0,09	1,34 ± 0,32
<i>Total</i>	1,04 ± 0,54	0,52 ± 0,16	0,42 ± 0,08	0,94 ± 0,20
<i>p - ANOVA medidas simples</i>				
<i>Subendocárdio</i>	0,04	0,03	0,049	0,01
<i>Mesocárdio</i>	0,01	0,62	0,81	0,78
<i>Subepicárdio</i>	0,14	0,50	0,28	0,34
<i>Total</i>	0,03	0,25	0,31	0,24

* pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer = $p < 0,05$ vs. Controle.

4.5.2. Correlações entre alterações histopatológicas e parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo

A análise de correlação foi realizada contemplando apenas os animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, excluindo os animais controle dessa análise. O objetivo dessas correlações é destacar as alterações de função e dimensões cardíacas em consequência da piora da inflamação e fibrose causada pela infecção crônica da doença de Chagas.

Os resultados de correlação entre o índice de inflamação e a função sistólica do VE não mostram correlação significativa no total de inflamação ($p = 0,16$) e nem quando a inflamação foi analisada por camadas transmuralis (subendocárdio: $p = 0,17$; mesocárdio: $p = 0,18$; subepicárdio: $p = 0,41$), conforme são apresentados no gráfico 6.

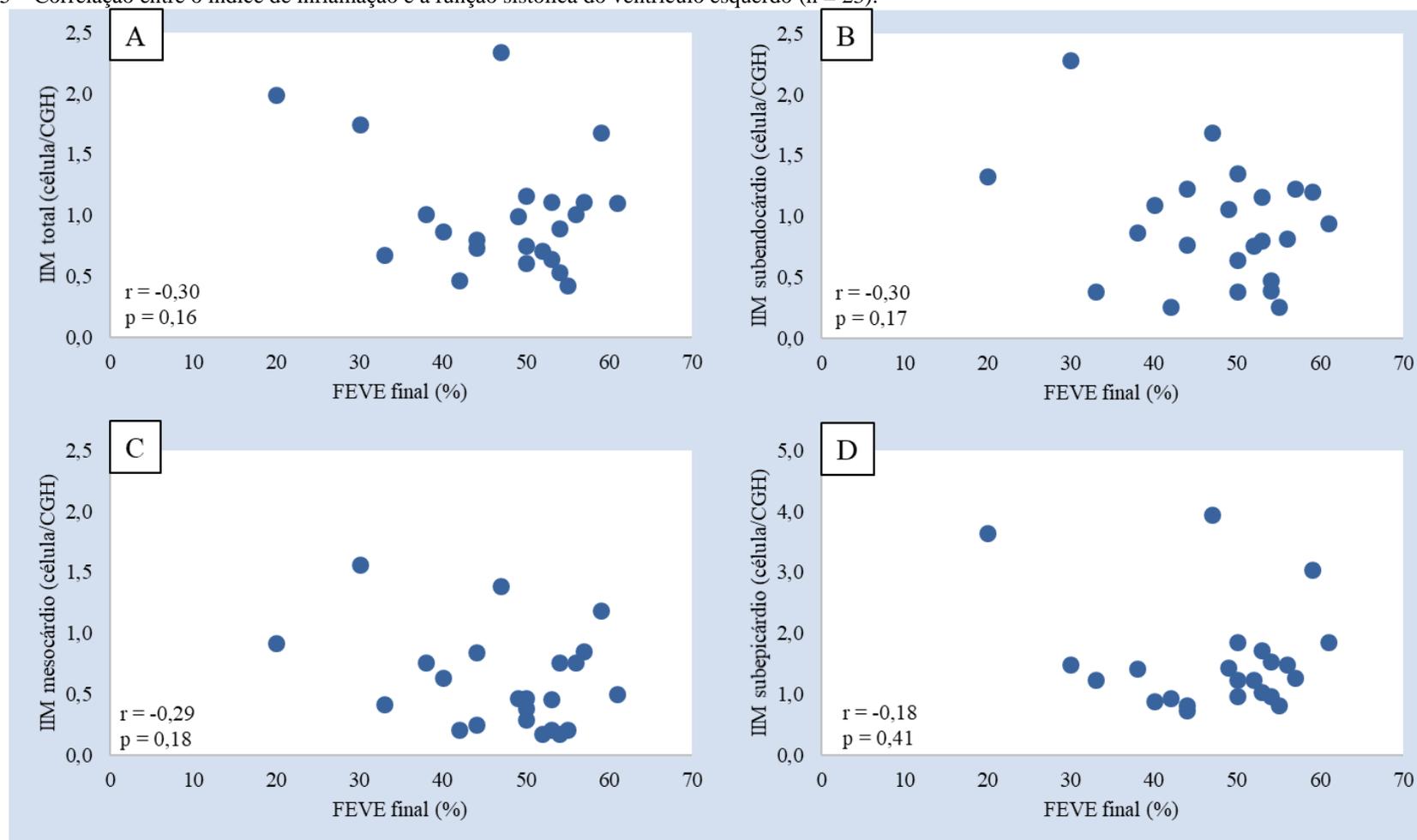
A análise de correlação entre o índice de fibrose total ($p = 0,16$) e por camadas transmuralis (subendocárdio: $p = 0,16$; mesocárdio: $p = 0,77$; epicárdio: $p = 0,08$) e a função sistólica do VE também não mostraram correlação significativa, conforme são apresentados no gráfico 7.

Analisando mais detalhadamente o subendocárdio, já que este se apresentou mais sensível às alterações nas fibras de colágeno (dados mostrados na tabela 3), o tipo de fibra de colágeno e sua correlação com a função sistólica, é possível observar correlação negativa, moderada e significativa entre as fibras finas de colágeno no subendocárdio e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, $p = 0,009$ e $r = -0,54$ (gráfico 8-A). Ou seja, quanto maior a porcentagem de área afetada pelas fibras finas de colágeno, menor é a FEVE do animal. Essa correlação não se mantém significativa na análise com as fibras espessas no subendocárdio, $p = 0,67$ (gráfico 8-B).

As fibras finas de colágeno na camada subendocárdica também se mostraram mais sensíveis em se correlacionar com o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, $p = 0,01$ e $r = 0,52$ (gráfico 9-A), enquanto que as fibras espessas não se correlacionam com o diâmetro sistólico final do VE, $p = 0,15$ (gráfico 9-B).

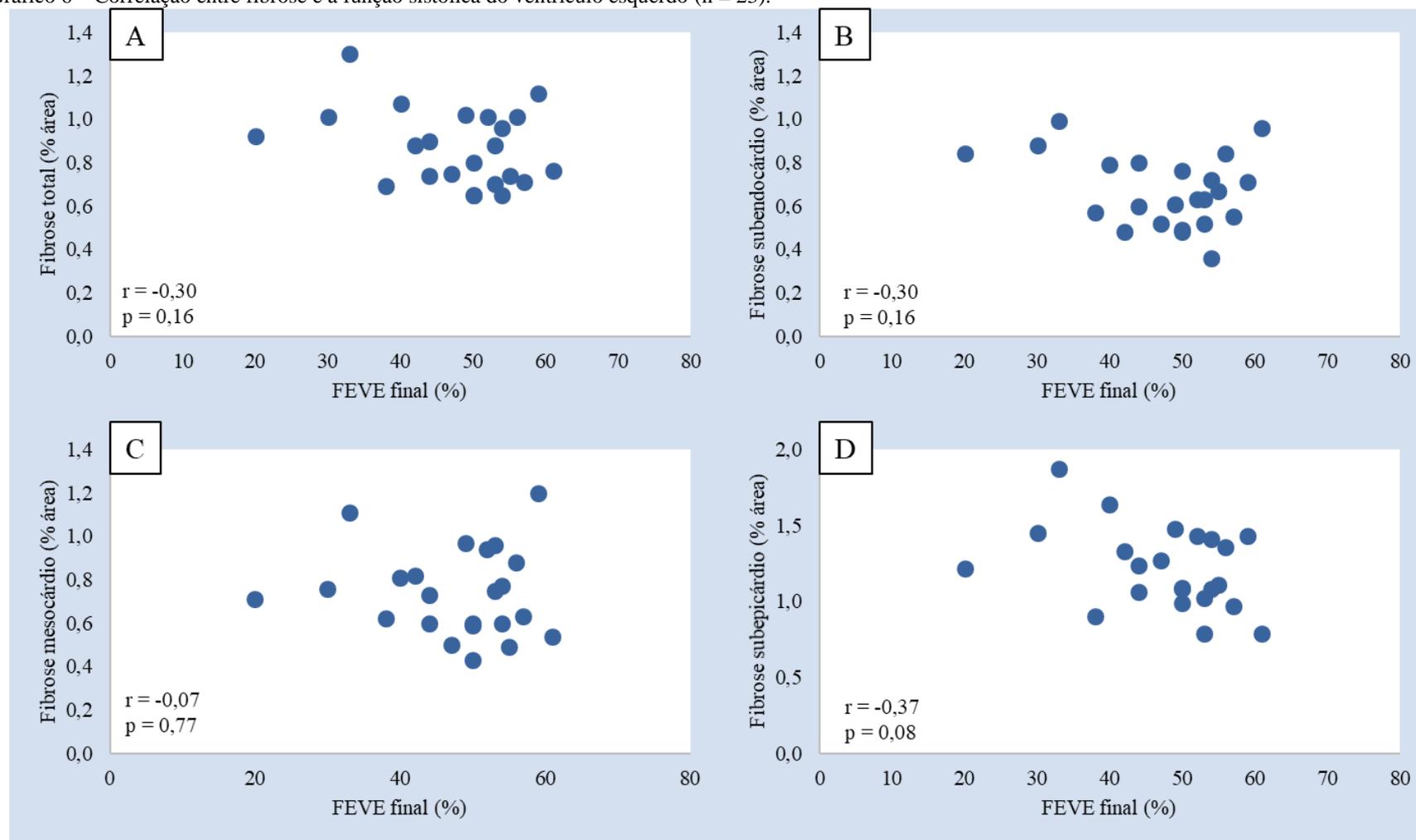
O escore de mobilidade parietal segmentar também se correlacionou significativa e positivamente, com coeficiente moderado, com as fibras finas de colágeno no subendocárdio, $p = 0,003$ e $r = 0,6$ (gráfico 10-A). Em se tratando das fibras espessas de colágeno no subendocárdio essa correlação não aparece quando com EMPS, $p = 0,16$ e $r = 0,3$ (gráfico 10-B).

Gráfico 5 – Correlação entre o índice de inflamação e a função sistólica do ventrículo esquerdo (n = 23).



Os gráficos de dispersão estão ilustrando a correlação, não significativa, entre os valores individuais do índice de inflamação nos animais infectados e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. A: inflamação total e FEVE. B: inflamação na camada subendocárdica e FEVE. C: inflamação na camada mesocárdica e FEVE. D: inflamação na camada subepicárdica e FEVE. Legenda: IIM: índice de infiltrado mononuclear; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Gráfico 6 – Correlação entre fibrose e a função sistólica do ventrículo esquerdo (n = 23).



Os gráficos de dispersão estão ilustrando a correlação, não significativa, entre os valores individuais fibrose nos animais infectados e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. A: fibrose total e FEVE. B: fibrose na camada subendocárdica e FEVE. C: fibrose na camada mesocárdica e FEVE. D: fibrose na camada subepicárdica e FEVE. Legenda: FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Gráfico 7 – Correlação entre as fibras fina e espessa de colágeno no subendocárdio e a função sistólica do ventrículo esquerdo (n = 23).

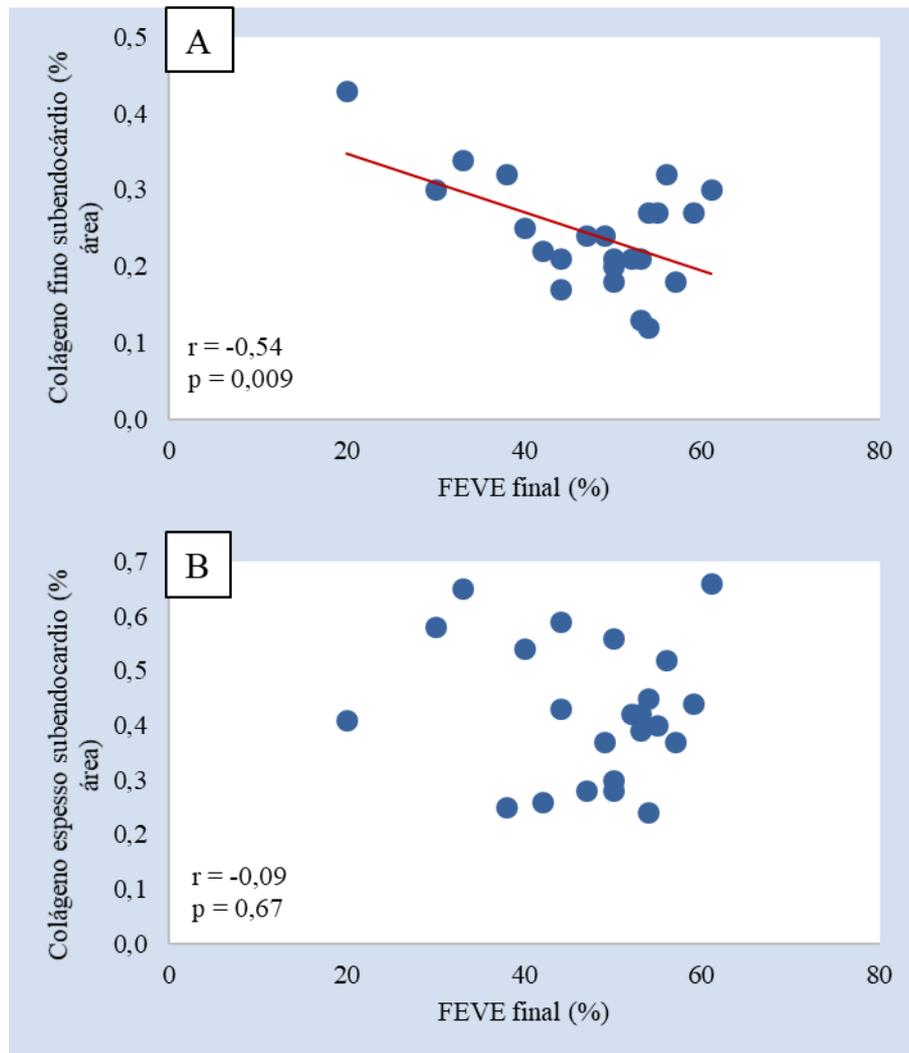


Gráfico de dispersão ilustrando a A) correlação significativa e negativa entre as porcentagens de área afetadas pelas fibras finas de colágeno no subendocárdio e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo; e B) correlação, não significativa, entre as porcentagens de área afetadas pelas fibras espessas de colágeno no subendocárdio e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. Legenda: FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Gráfico 8 – Correlação entre as fibras fina e espessa de colágeno no subendocárdio e o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (n = 23).

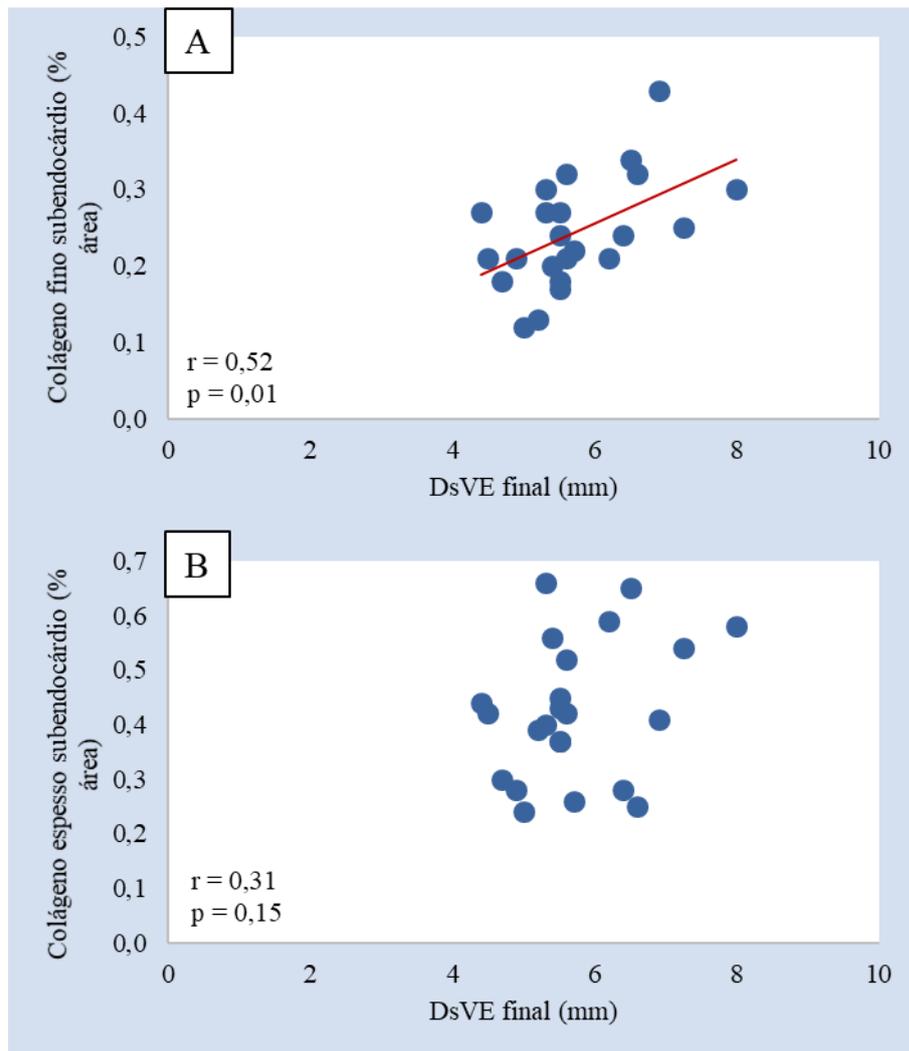


Gráfico de dispersão ilustrando a A) correlação significativa, positiva e moderada entre as porcentagens de área afetadas pelas fibras finas de colágeno no subendocárdio e o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; e B) correlação, não significativa, entre as porcentagens de área afetadas pelas fibras espessas de colágeno no subendocárdio e o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. Legenda: DsVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

Gráfico 9 – Correlação entre as fibras fina e espessa de colágeno no subendocárdio e o escore de mobilidade parietal segmentar (n = 23).

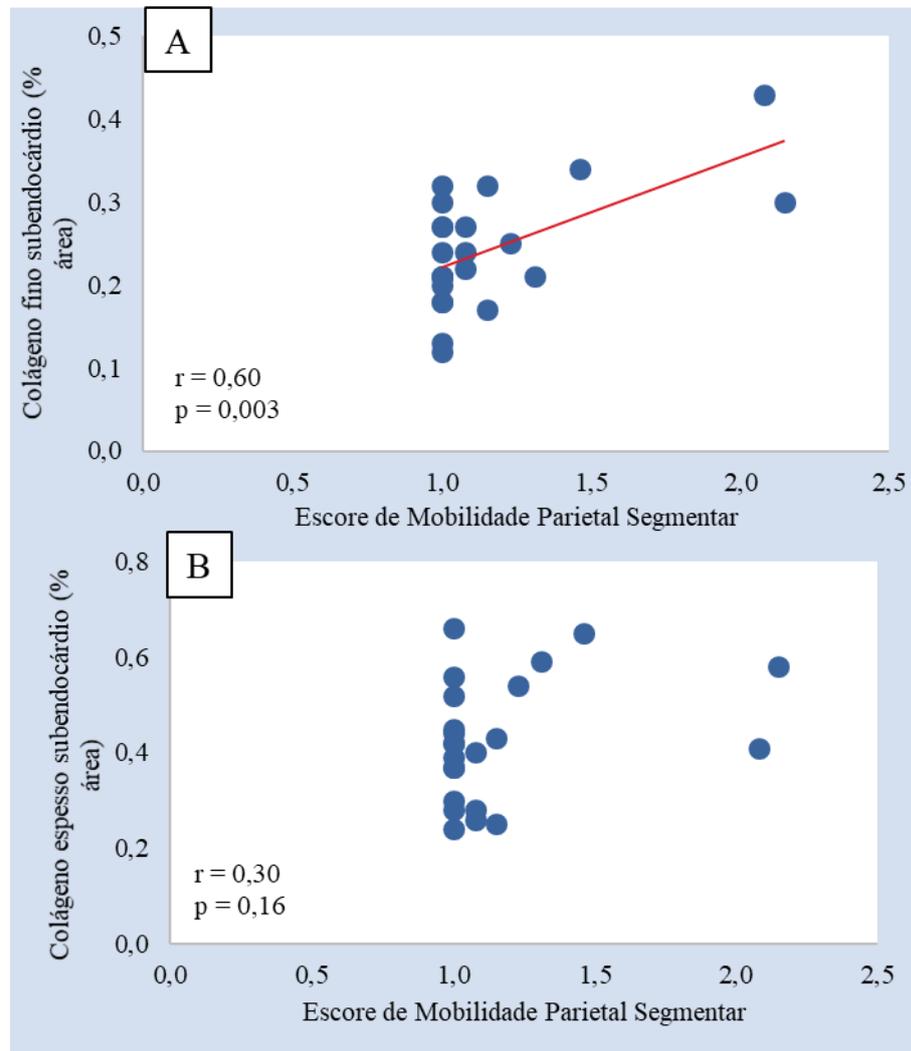


Gráfico de dispersão ilustrando a A) correlação significativa, positiva e moderada entre as porcentagens de área afetadas pelas fibras finas de colágeno no subendocárdio e o escore de mobilidade parietal segmentar; e B) correlação, não significativa, entre as porcentagens de área afetadas pelas fibras espessas de colágeno no subendocárdio e o escore de mobilidade parietal segmentar. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação.

4.6. TIPOS DE DEFEITO DE PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Por meio do SPECT de alta-resolução com Sestamibi-Tc99m, foi avaliada a presença de defeitos perfusionais miocárdicos nos animais em repouso e sob estresse farmacológico com dobutamina. A partir desta avaliação as áreas de defeitos de perfusão foram classificadas em DP em repouso, DP reversível e DP paradoxal. A figura 12 apresenta um exemplo ilustrativo das imagens de SPECT de alta-resolução de imagens de perfusão, com os cortes tomográficos e os mapas polares resultantes dos exames em repouso e sob estresse.

Figura 12 – Imagem ilustrativa do estudo de perfusão miocárdica sob estresse farmacológico e em repouso.

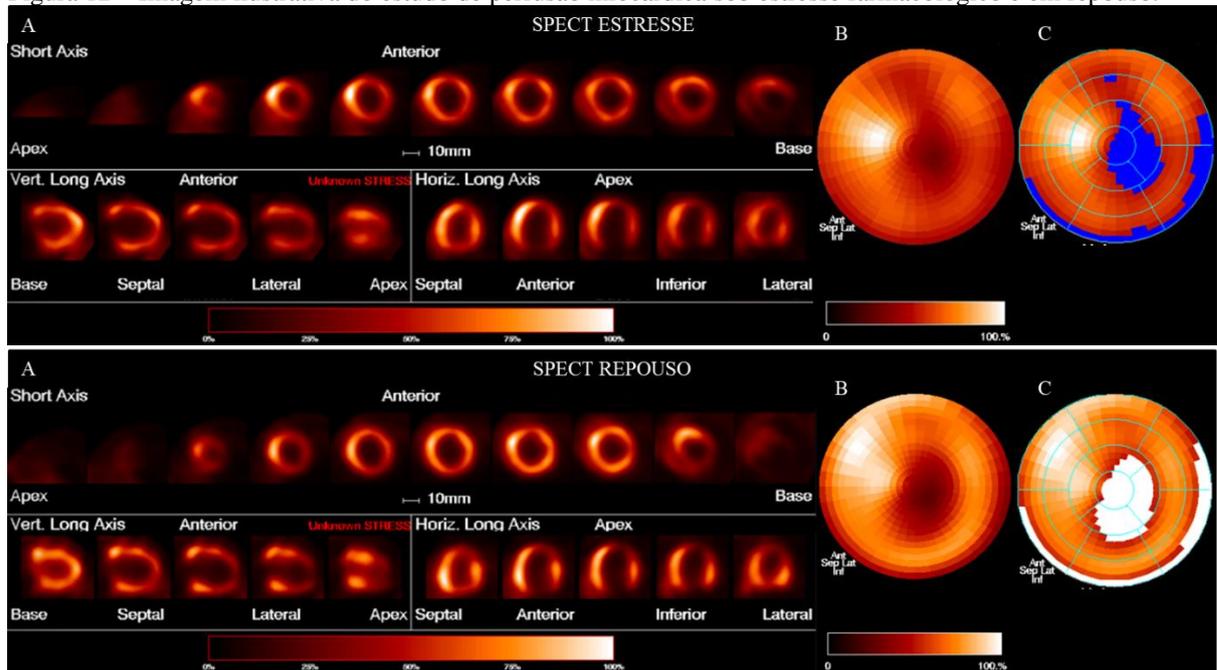


Figura ilustrando o estudo de perfusão miocárdica (SPECT de alta-resolução com ^{99m}Tc -Sestamibi) em um animal cronicamente infectado por *T. cruzi*. O conjunto superior mostra imagens do exame realizado sob estresse farmacológico com dobutamina e o conjunto inferior mostra as imagens do exame realizado em repouso. Em cada conjunto são mostrados os cortes tomográficos (A), sendo que a fileira superior mostra cortes tomográficos de eixo curto e as fileiras inferiores mostram cortes tomográficos eixo longo vertical (à esquerda) e eixo longo horizontal (à direita). Mapas polares resultantes são mostrados nos campos (B), com delineamento das áreas de hipocaptção significativa (< 50% em relação ao pixel de máxima captação), são mostrados em azul (imagens de estresse) ou branco (imagens em repouso).

Fonte: Fabricio, C.G. (2022).

Na avaliação final todos os 23 animais infectados por *T. cruzi* apresentaram algum grau de DP em repouso, com área média de DP de $7,5 \pm 6,5\%$, os DP sob estresse apresentaram área média de $8,2 \pm 7,6\%$, porém 4 animais não manifestam redução da captação do radiotraçador neste tipo de exame. Dentre os animais que revelaram DP sob estresse farmacológico, 12 apresentaram DP reversível, com área média de DP de $2,2 \pm 3,1\%$, e 11 animais algum grau de DP paradoxal, área de média de DP de $1,5 \pm 2,8\%$. A tabela 4 apresenta os resultados dos exames basais e finais da área percentual de superfície do miocárdio afetada por defeito de perfusão considerando um ponto de corte de 50% abaixo do limiar máximo, nos diferentes grupos analisados (controle, Chagas sem e com disfunção sistólica).

A ANOVA para modelos mistos mostrou interação significativa tempo vs grupo entre os grupos quando se trata de defeito de perfusão em repouso ($p = 0,03$), mas não para os demais tipos de defeito analisados. As análises *post hoc* mostraram que a área de defeito de perfusão miocárdica em repouso no grupo controle não apresentou diferença significativa ao longo do

tempo ($p > 0,05$), enquanto que ambos os grupos infectados cronicamente por *T. cruzi* mostraram aumento significativo das áreas de defeitos perfusionais em repouso entre as avaliações basal e final (ambos com $p < 0,01$). Contudo, o grupo Chagas com disfunção mostrou aumento da área de DP em repouso na avaliação final em relação aos demais grupos ($p = 0,03$ vs controle e $p = 0,01$ vs Chagas sem disfunção), como apresentado no gráfico 11. Os gráficos 12 e 13 apresentam a evolução temporal dos defeitos de perfusão reversível e paradoxal, respectivamente.

Tabela 4 – Resultados basais e finais da cintilografia miocárdica nos animais nos grupos controle, Chagas sem disfunção e Chagas com disfunção ventricular esquerda ($n = 29$).

	CTR ($n = 6$)		CHs ($n = 15$)		CHc ($n = 8$)		<i>p</i> ANOVA
	basal	final	basal	final	basal	final	
DP repouso (%)	2,8 ± 2,1	4,9 ± 2,2	1,2 ± 1,9	5,6 ± 4,4#	2,2 ± 2,0	11,2 ± 8,9#*†	0,03
DP reversível (%)	0,5 ± 1,1	2,8 ± 2,3	1,0 ± 1,9	2,3 ± 3,5	1,4 ± 2,1	2,1 ± 2,7	0,70
DP paradoxal (%)	1,1 ± 1,3	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,5	1,6 ± 3,4	0,7 ± 1,5	1,4 ± 2,0	0,20

vs dados no basal; * vs grupo CTR na avaliação final; † vs grupo CHs na avaliação final utilizando o teste ANOVA de medidas repetidas. Legenda: DP: defeito de perfusão; CTR: controle; CHs: Chagas sem disfunção sistólica; CHc: Chagas com disfunção sistólica.

Gráfico 10 – Área de defeito de perfusão em repouso ($n = 29$).

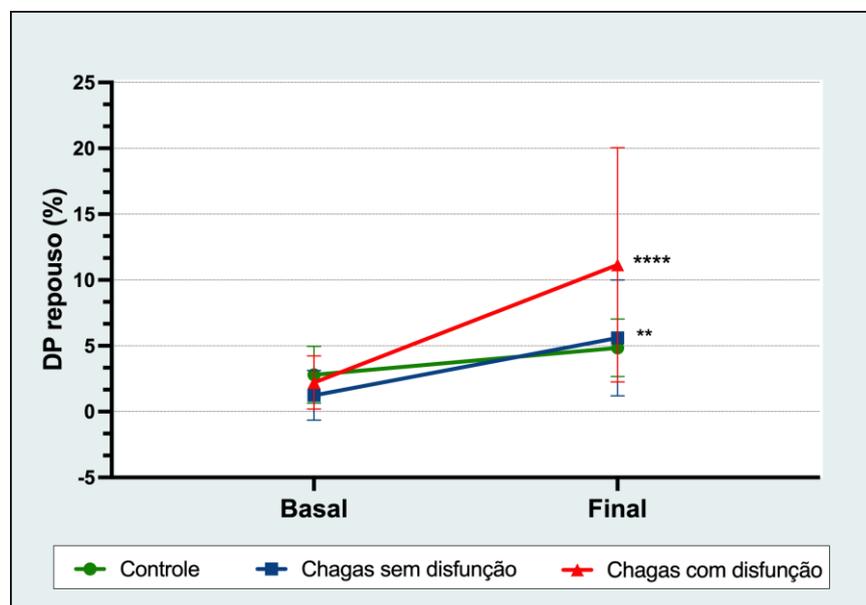


Gráfico de linhas representando os valores obtidos da área de defeito de perfusão em repouso de cada grupo nas condições basal e final. ** $p < 0,01$ em relação ao basal e **** $p < 0,05$ em relação ao basal e aos demais grupos na avaliação final. O valor de *p* refere-se à ANOVA para modelos mistos.

Gráfico 11 – Área de defeito de perfusão reversível (n = 29).

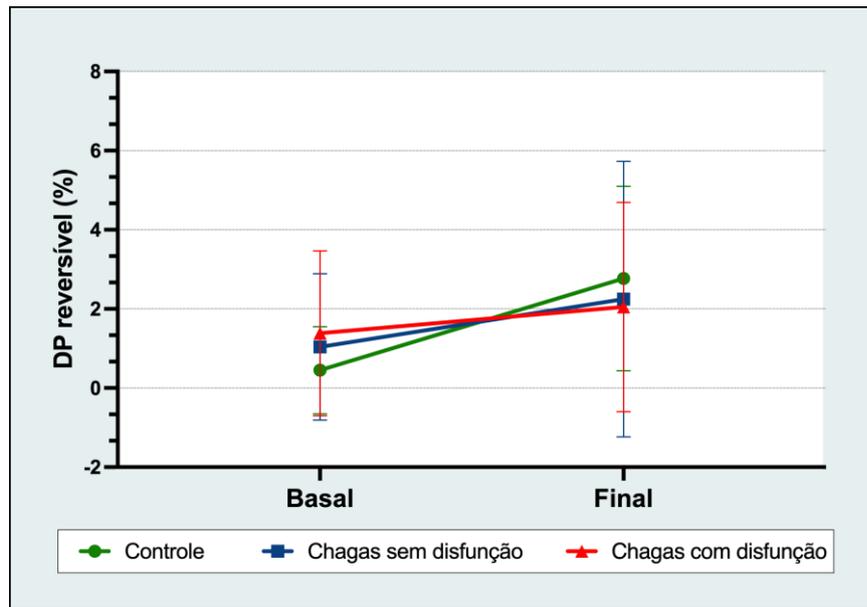


Gráfico de linhas representando os valores obtidos da área de defeito de perfusão reversível de cada grupo nas condições basal e final.

Gráfico 12 – Área de defeito de perfusão paradoxal (n = 29).

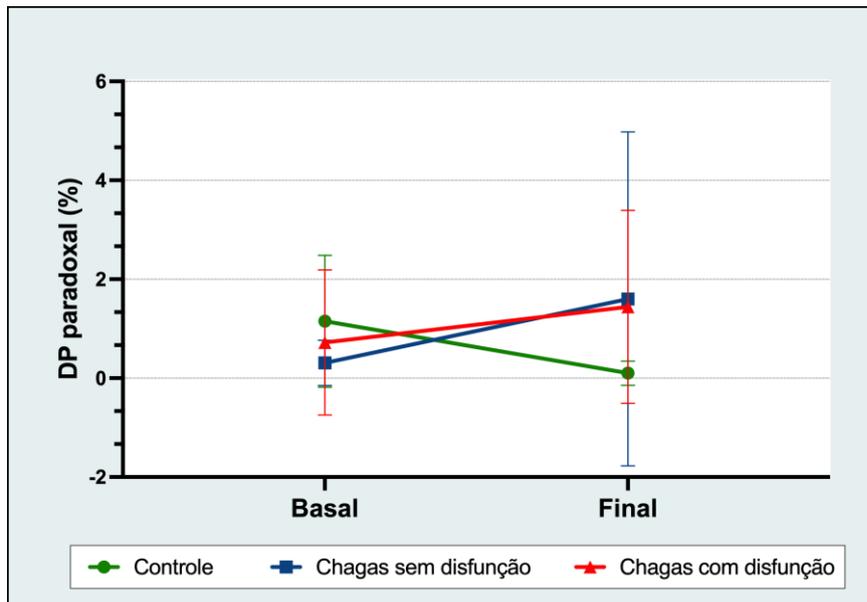


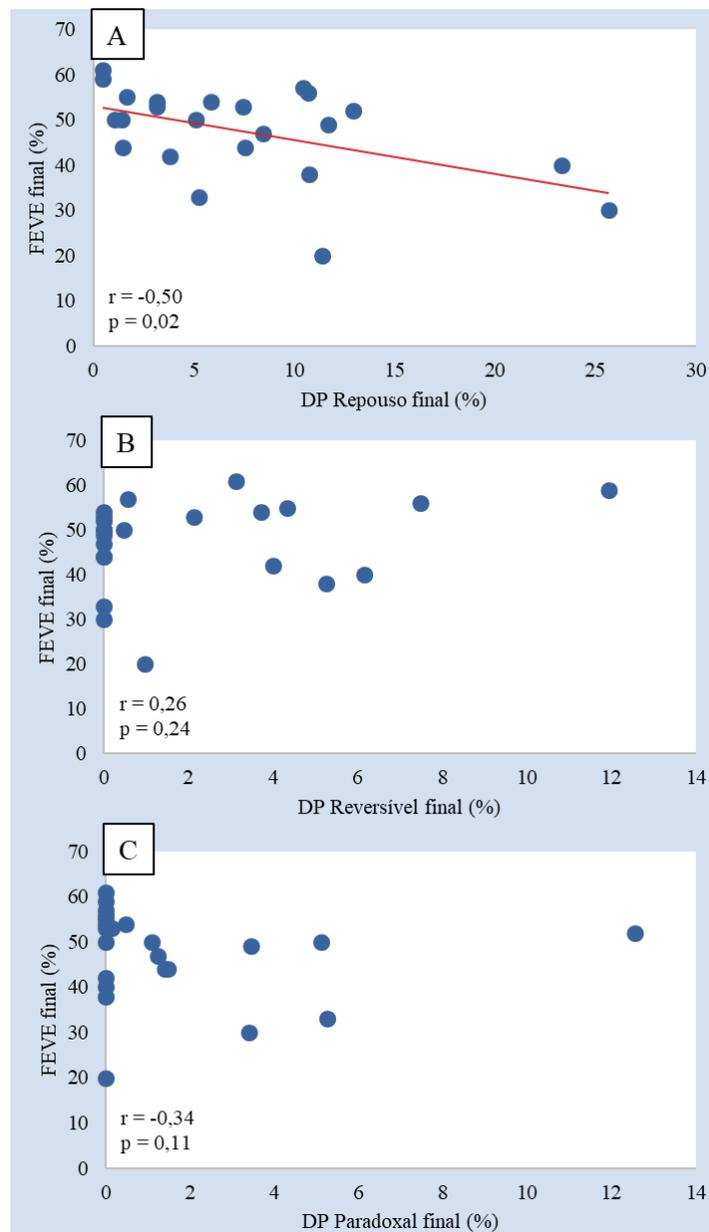
Gráfico de linhas representando os valores obtidos da área de defeito de perfusão paradoxal de cada grupo nas condições basal e final.

4.6.1. Correlação entre os tipos de defeito de perfusão e as alterações estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo

Dentre os tipos de defeito de perfusão miocárdicos avaliados na cintilografia, apenas o DP em repouso apresentou correlação significativa com a fração de ejeção dos animais com

doença de Chagas. É mostrado no gráfico 14-A que essa correlação se apresenta negativa e moderada, desta forma, quanto maior a área percentual de defeito de perfusão em repouso, menor é a função sistólica global desses animais ($r = -0,5$ e $p = 0,02$). As porcentagens de área de defeito reversível e paradoxal não se correlacionam significativamente com a FEVE, $p = 0,24$ e $0,11$, respectivamente (gráficos 14-B e 14-C).

Gráfico 13 – Correlação entre a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e as áreas de defeito de perfusão miocárdica ($n = 23$).



Gráficos de dispersão ilustrando a A) correlação significativa, negativa e moderada entre a porcentagem de área afetada pelo DP em repouso e a FEVE. B) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP em reversível e a FEVE. C) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP em paradoxal e a FEVE. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. Legenda: FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DP: defeito de perfusão.

Em relação aos parâmetros de remodelamento estrutural cardíaco, diâmetro diastólico e sistólico final do VE, apenas a área de defeito de perfusão em repouso apresenta correlação significativa positiva e forte. Ou seja, quanto maior a área afetada por defeito perfusional em repouso, maior é o diâmetro do VE em sístole ($r = 0,79$ e $p < 0,01$) e em diástole ($r = 0,83$ e $p < 0,01$), a representação gráfica 15 apresenta esses dados.

Gráfico 14 – Correlações entre os diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico em repouso ($n = 23$).

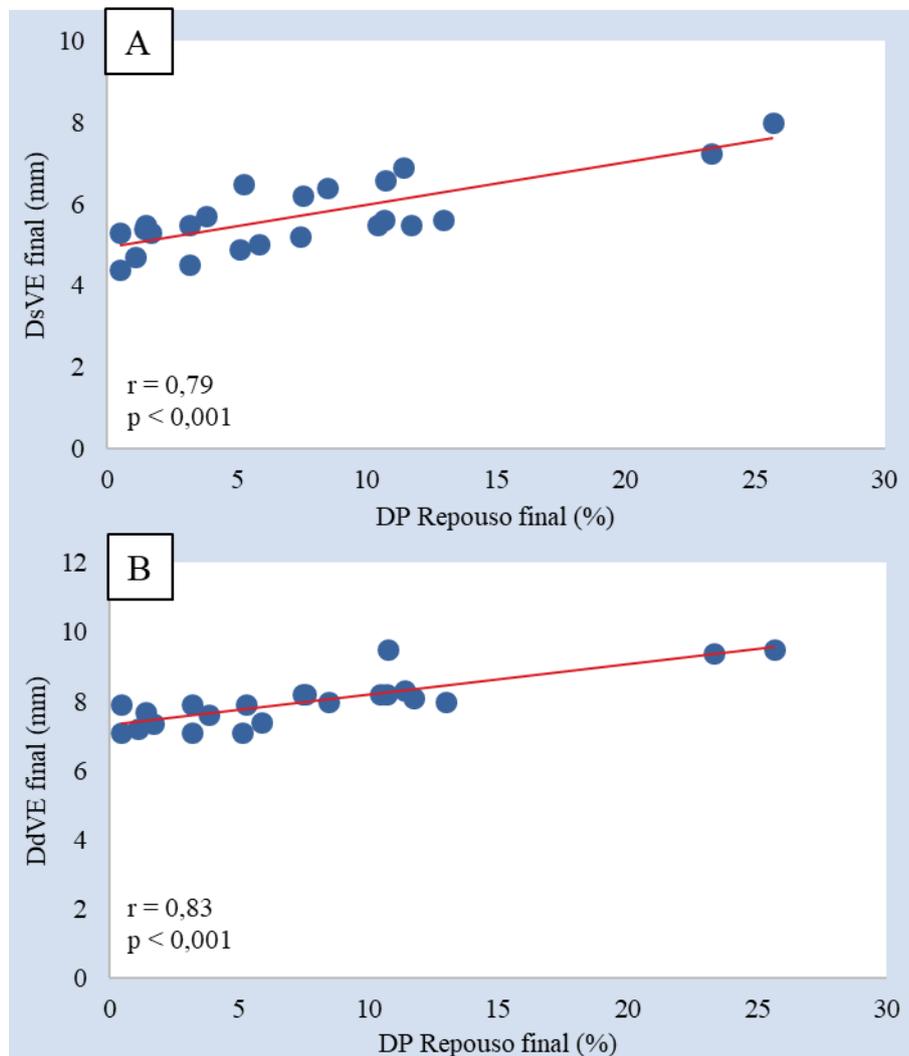


Gráfico de dispersão ilustrando a A) correlação significativa, positiva e forte entre a porcentagem de área afetada pelo DP em repouso e o DsVE; e B) correlação significativa, positiva e forte entre a porcentagem de área afetada pelo DP em repouso e o DdVE. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. Legenda: DsVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; DdVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DP: defeito de perfusão.

Os demais DP não apresentam correção significativa com os parâmetros de remodelamento estrutural cardíaco, como apresentado no gráfico 16 para os DP reversíveis ($p = 0,54$ e $p = 0,8$, respectivamente para DsVE e DdVE) e no gráfico 17 para os DP paradoxais ($p = 0,55$ e $p = 0,62$, respectivamente para DsVE e DdVE).

Gráfico 15 – Correlações entre os diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico reversível ($n = 23$).

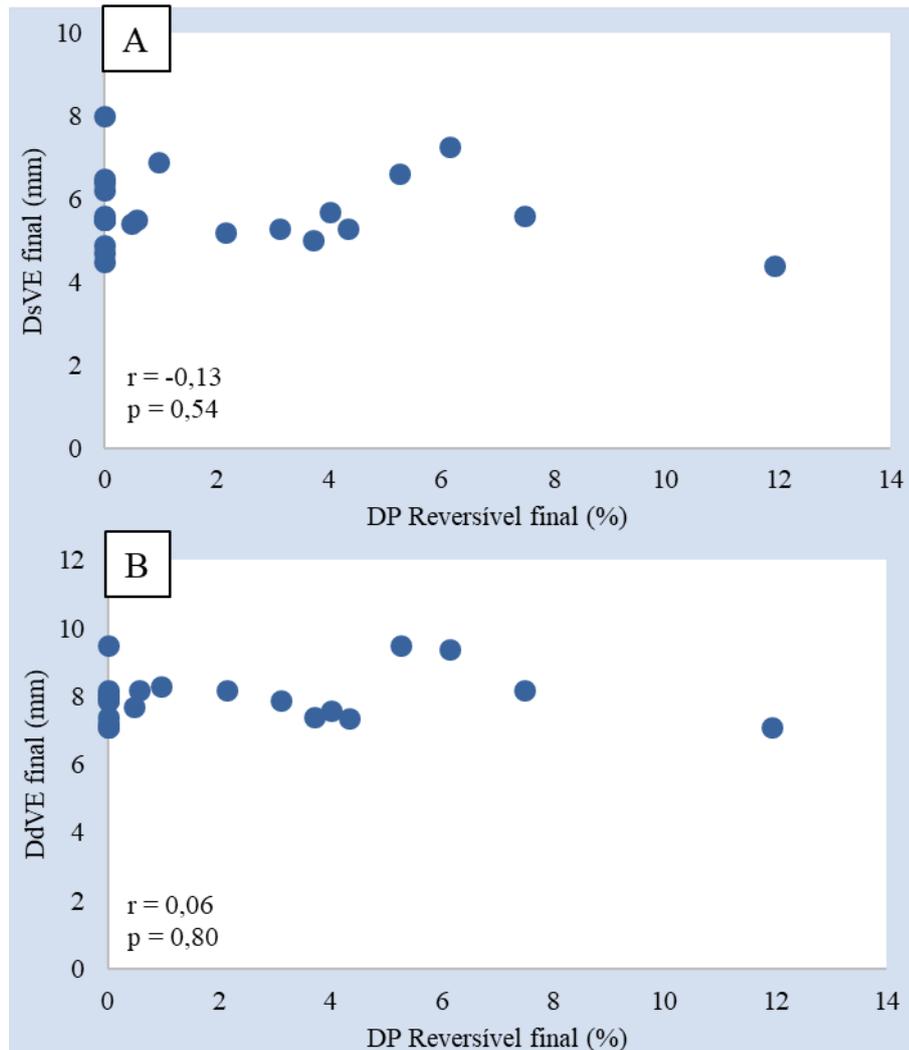


Gráfico de dispersão ilustrando a A) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP reversível e o DsVE; e B) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP reversível e o DdVE. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. Legenda: DsVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; DdVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DP: defeito de perfusão.

Gráfico 16 – Correlações entre os diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico paradoxal (n = 23).

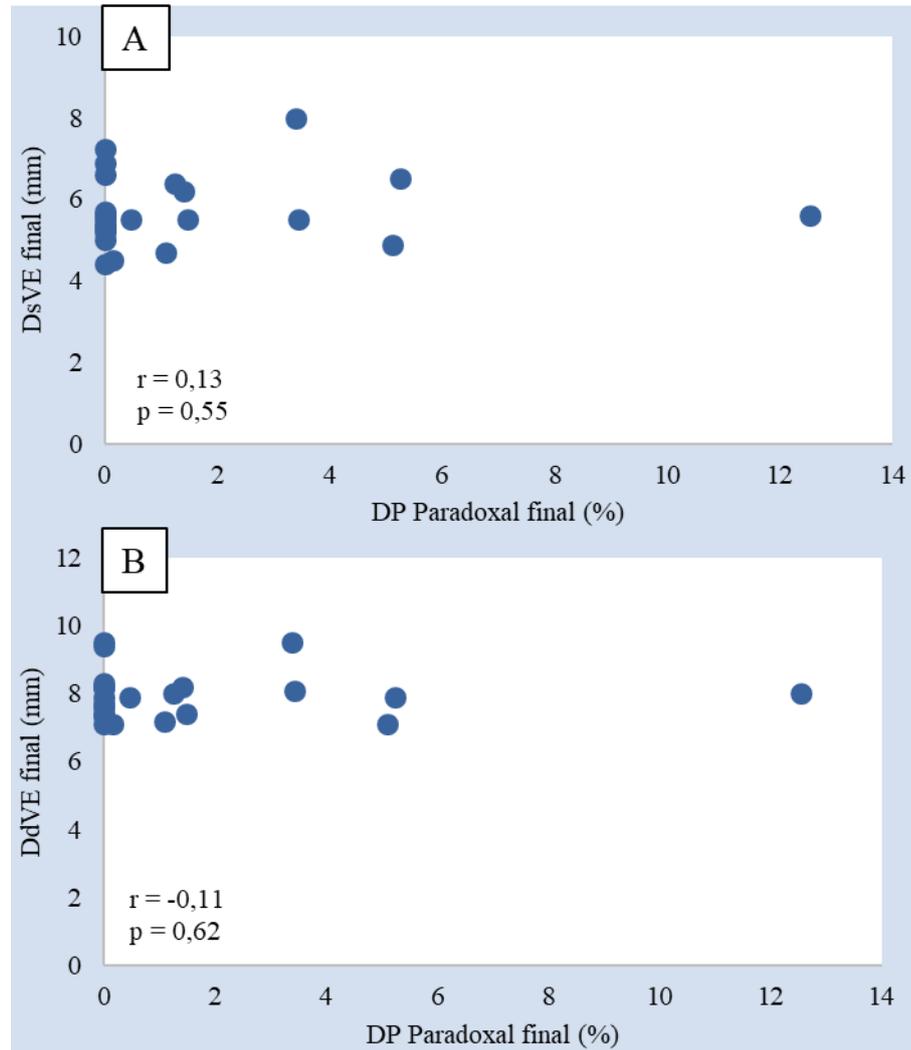


Gráfico de dispersão ilustrando a A) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP paradoxal e o DsVE; e B) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP paradoxal e o DdVE. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. Legenda: DsVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; DdVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DP: defeito de perfusão.

Com relação ao escore de mobilidade parietal segmentar, não houve correlação significativa com o tamanho da área de defeito de perfusão na cintilografia, independentemente do tipo de defeito avaliado ($p = 0,08$, $0,79$ e $0,51$, respectivamente em repouso, reversível e paradoxal), gráfico 18.

Gráfico 17 – Correlação entre o escore de mobilidade parietal segmentar e a porcentagem de área afetada por defeito de perfusão miocárdico (n = 23).

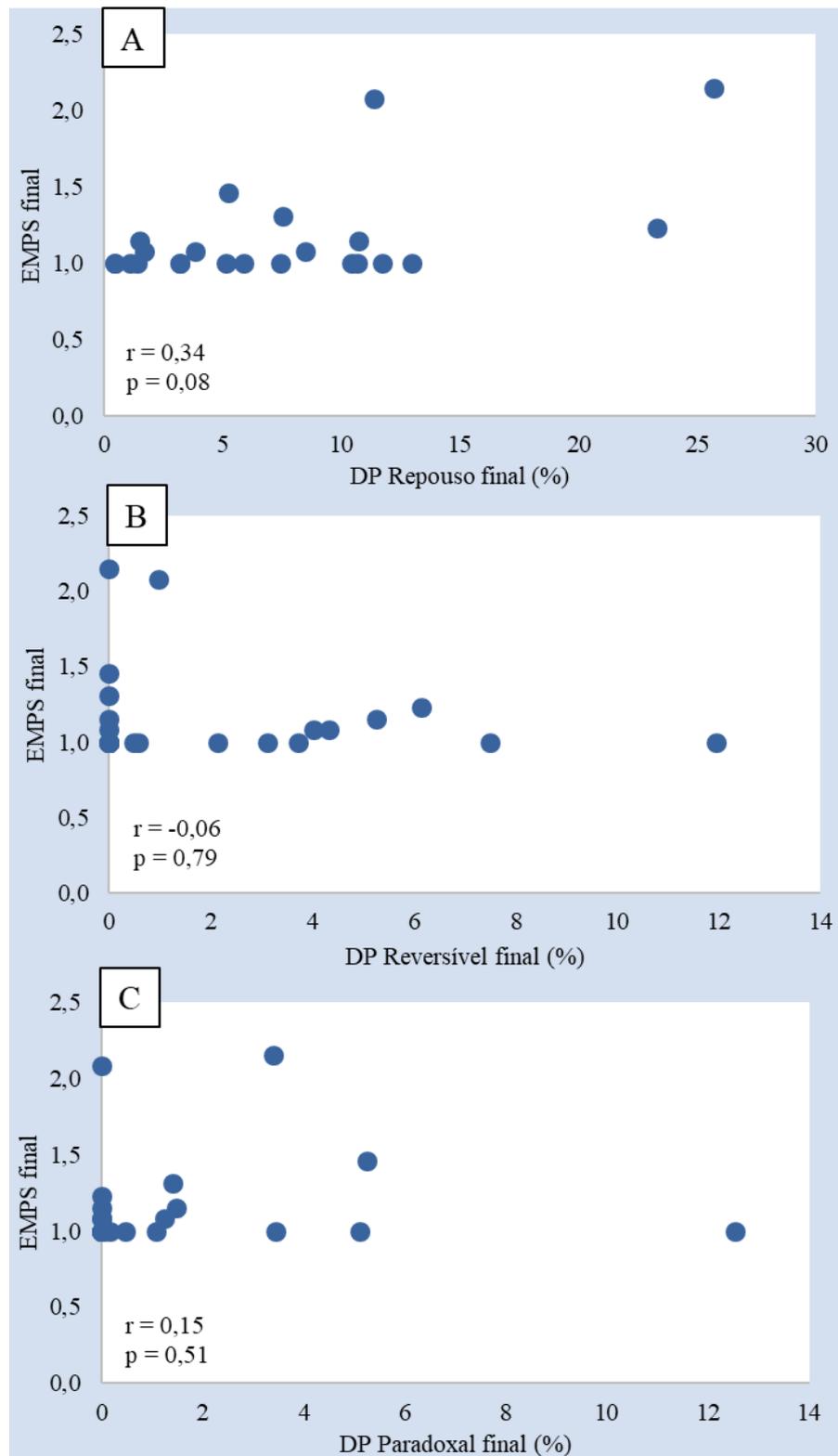


Gráfico de dispersão ilustrando a A) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP em repouso e o EMPS; B) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP reversível e o EMPS; e C) correlação, não significativa, entre a porcentagem de área afetada pelo DP paradoxal e o EMPS. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. Legenda: EMPS: escore de mobilidade parietal segmentar; DP: defeito de perfusão.

4.7. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS RELACIONADAS À PRESENÇA DE DEFEITO DE PERFUSÃO MIOCÁRDICA EM REPOUSO

Dentre os animais cronicamente infectados com doença de Chagas, na avaliação final, 14 animais (61%) apresentaram áreas de DP em repouso $\geq 5\%$. Áreas de DP em repouso abaixo de 5% foram consideradas insignificantes e passíveis de viés e não foram consideradas. Partindo desta análise, os animais com defeito em repouso apresentaram aumento significativo do índice de infiltrado mononuclear em todas as camadas transmuralis (subendocárdio, mesocárdio e subepicárdio) quando comparados aos controles, conforme apresentado na tabela 5.

A tabela 5 também apresenta os resultados da análise de fibrose transmural, tanto para fibras espessas e finas de colágeno e fibrose global. Na avaliação total, não houve diferença entre os grupos em nenhum tipo de fibra de colágeno (fibras espessas: $p = 0,38$, fibras finas: $p = 0,71$), assim como na global ($p = 0,47$). Contudo, quando analisadas por camadas, o subendocárdio se destaca na avaliação de fibrose global no grupo CH com DP em repouso, sendo maior que o apresentado pelos controles na análise pós-teste ($p = 0,03$), aspecto que não se reproduz para as demais camadas. Analisando o tipo de fibra de colágeno, as fibras espessas também apresentaram aumento no subendocárdio dos grupos CH, com e sem DP em repouso, em comparação com o CTR ($p = 0,03$) e, mais uma vez, não se verifica esse aumento nas demais camadas da parede do VE.

Analisando a diferença existente entre os tipos de fibras de colágeno, o resultado total das camadas mostra diferença apenas no grupo Chagas sem defeito de perfusão ($p < 0,001$), revelando maior predominância da fibra espessa, enquanto que nos demais grupos não há diferença entre os tipos de fibras (CTR: $p = 0,12$; CH com DP: $0,57$). Observando a diferença entre as fibras na camada subendocárdica, a fibra espessa se destaca com aumento significativo em todos os grupos analisados (CTR: $p = 0,004$; CH sem DP: $p < 0,001$; CH com DP: $p = 0,001$), tabela 5.

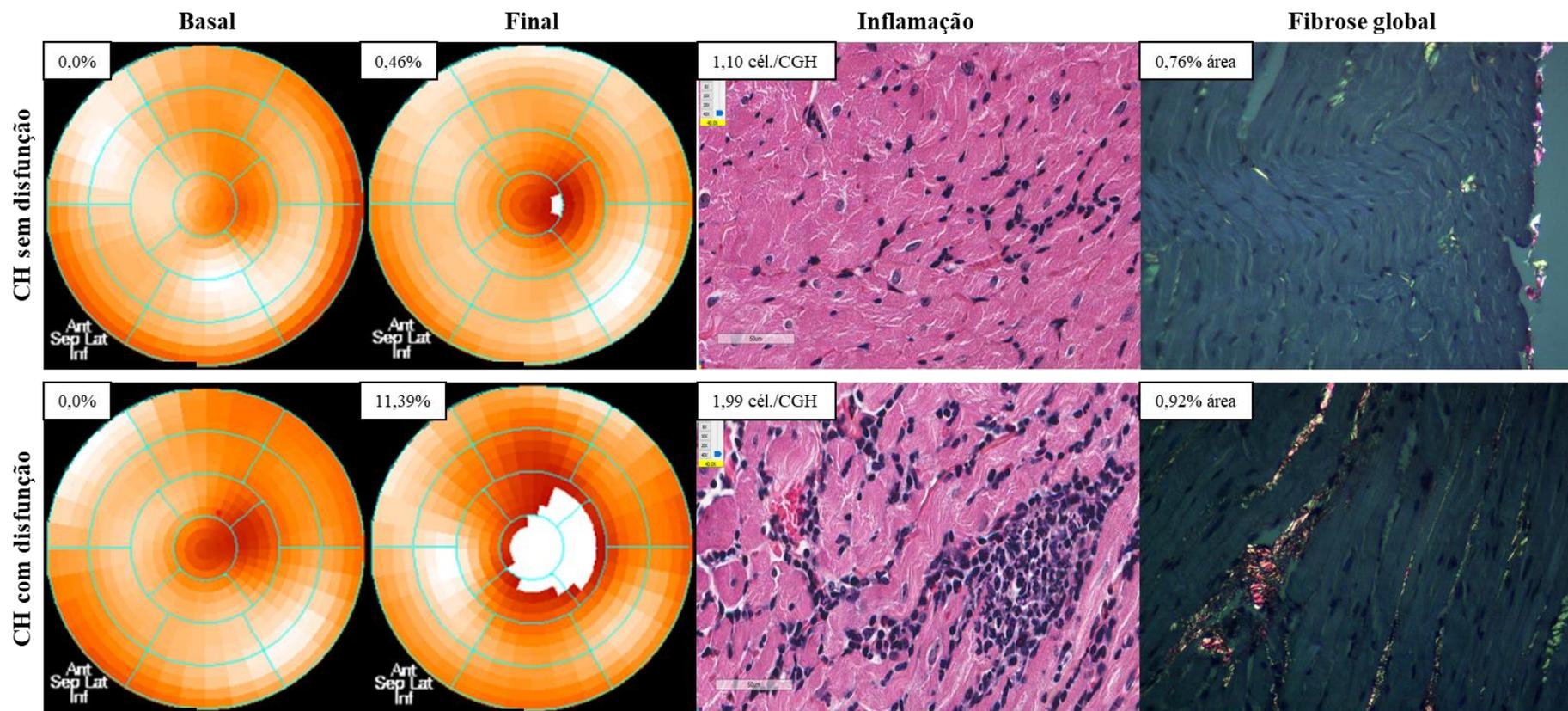
A figura 13 apresenta exemplos de associação entre a presença de defeito de perfusão em repouso e a queda da FEVE na avaliação final, com as alterações histopatológicas do miocárdio ventricular esquerdo.

Tabela 5 – Resultados de inflamação e fibrose transmural nos grupos controle e Chagas sem e com defeito de perfusão em repouso (n = 29).

	<i>IIM</i>	<i>Fibrose</i>		
		<i>fibras espessas</i>	<i>fibras finas</i>	<i>global</i>
Controle (n = 6)				
<i>Subendocárdio</i>	0,38 ± 0,22	0,27 ± 0,10	0,19 ± 0,07	0,45 ± 0,15
<i>Mesocárdio</i>	0,11 ± 0,08	0,35 ± 0,10	0,34 ± 0,13	0,69 ± 0,21
<i>Subepicárdio</i>	0,73 ± 0,89	0,62 ± 0,20	0,57 ± 0,18	1,18 ± 0,37
<i>Total</i>	0,41 ± 0,32	0,42 ± 0,12	0,37 ± 0,12	0,78 ± 0,23
Chagas sem defeito de perfusão em repouso (n = 9)				
<i>Subendocárdio</i>	0,75 ± 0,44	0,44 ± 0,12*	0,23 ± 0,05	0,67 ± 0,15
<i>Mesocárdio</i>	0,55 ± 0,33	0,40 ± 0,13	0,33 ± 0,12	0,73 ± 0,23
<i>Subepicárdio</i>	1,50 ± 0,73	0,60 ± 0,11	0,54 ± 0,13	1,14 ± 0,21
<i>Total</i>	0,93 ± 0,43	0,48 ± 0,08	0,37 ± 0,08	0,85 ± 0,13
Chagas com defeito de perfusão em repouso (n = 14)				
<i>Subendocárdio</i>	1,05 ± 0,50*	0,42 ± 0,14*	0,25 ± 0,08	0,67 ± 0,18*
<i>Mesocárdio</i>	0,64 ± 0,44*	0,40 ± 0,10	0,34 ± 0,11	0,75 ± 0,19
<i>Subepicárdio</i>	1,57 ± 0,97*	0,68 ± 0,20	0,60 ± 0,12	1,27 ± 0,30
<i>Total</i>	1,09 ± 0,55*	0,50 ± 0,13	0,40 ± 0,08	0,90 ± 0,20
p - ANOVA de medidas simples				
<i>Subendocárdio</i>	0,02	0,03	0,19	0,03
<i>Mesocárdio</i>	0,02	0,63	0,97	0,86
<i>Subepicárdio</i>	0,03	0,58	0,61	0,54
<i>Total</i>	0,03	0,38	0,71	0,47

* diferença significativa vs grupo Controle. Legenda: IIM: índice de infiltrado mononuclear.

Figura 13 – Mapas polares, inflamação e fibrose global em animais Chagas com e sem disfunção ventricular esquerda



Imagens ilustrativas de animais do grupo Chagas, apresentando nos quadros à esquerda os mapas polares basal e final (indicado em branco as áreas de defeito perfusional em repouso). Nos quadros centrais ilustram-se cortes histológicos representativos do infiltrado inflamatório mononuclear (hematoxilina-eosina), com valores da análise quantitativa da intensidade da inflamação mostrado no campo superior esquerdo de cada imagem. Nos quadros mais à direita mostram-se cortes histológicos corados com picrosirius-vermelho observados com luz polarizada e mostrando os diferentes componentes de fibrose. No painel superior está representado um animal do grupo Chagas sem disfunção que não exibiu defeito perfusional na avaliação final, a FEVE final = 61% e o DdVE final = 7,9 mm. No painel inferior está ilustrado um animal do grupo Chagas que evoluiu com disfunção e aumento significativo da área de defeito perfusional em repouso na avaliação final (área = 11,4%), a FEVE na avaliação final = 20% e DdVE = 8,3 mm. Observa-se maior intensidade da inflamação e da fibrose no animal com CCC exibindo aumento do defeito de perfusão e queda da FEVE.

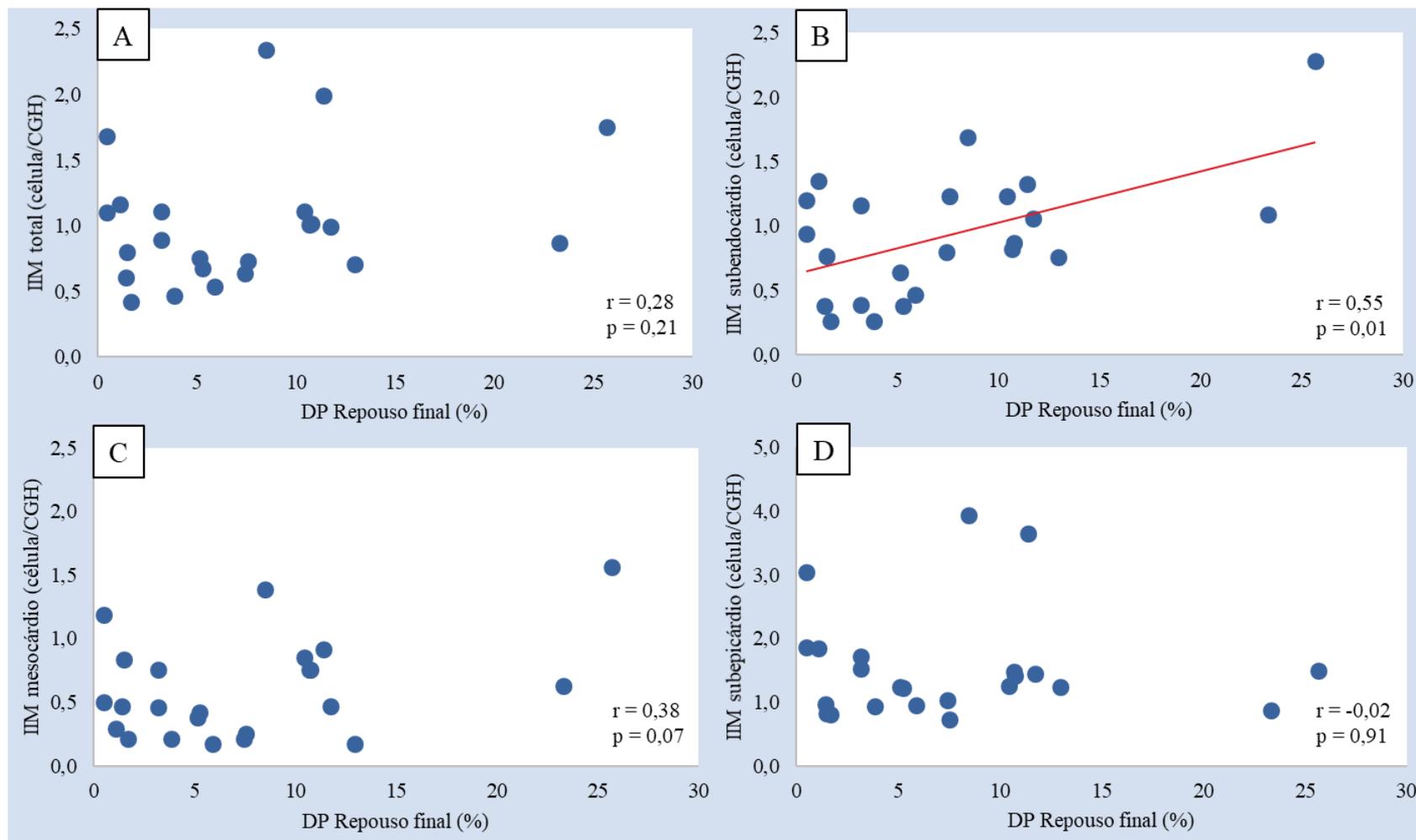
4.7.1. Correlações entre o tamanho do defeito de perfusão em repouso e a topografia da inflamação e fibrose

A extensão do infiltrado inflamatório mononuclear se correlacionou positivamente e moderadamente com a extensão do DP em repouso apenas na camada subendocárdica, $p = 0,01$ e $r = 0,55$ (gráfico 19). As demais análises de correlação entre o processo inflamatório e a presença de DP repouso não se correlacionaram (IIM total: $p = 0,21$; IIM no mesocárdio: $p = 0,07$; IIM no epicárdio: $p = 0,91$), dispersão apresentada no gráfico 19.

Ao analisar a correlação entre a presença de fibrose global e o defeito de perfusão em repouso, nenhuma camada transmural apresentou correlação significativa (fibrose no subendocárdio: $p = 0,33$; fibrose no mesocárdio: $p = 0,54$; fibrose no subepicárdio: $p = 0,06$), assim como o total ($p = 0,13$), dados apresentados no gráfico 20.

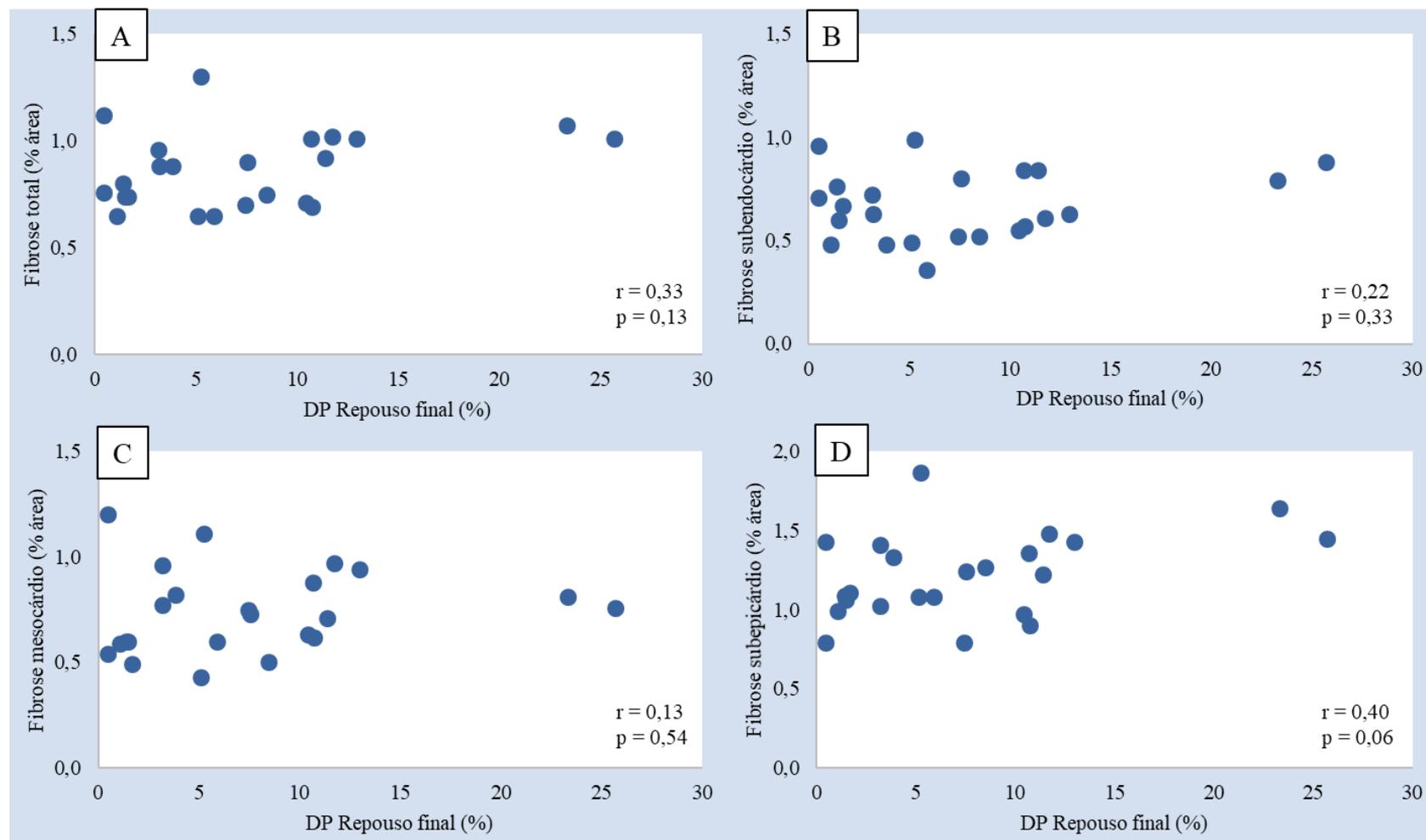
Com relação ao tipo de fibra de colágeno que afeta a camada subendocárdica, não houve correlação significativa entre a extensão do defeito de perfusão em repouso e a área das fibras finas de colágeno ($p = 0,27$) ou das fibras espessas de colágeno ($p = 0,5$), conforme apresentado no gráfico 21.

Gráfico 18 – Correlação entre os índices de infiltrado mononuclear e a porcentagem de área de defeito de perfusão em repouso (n = 23).



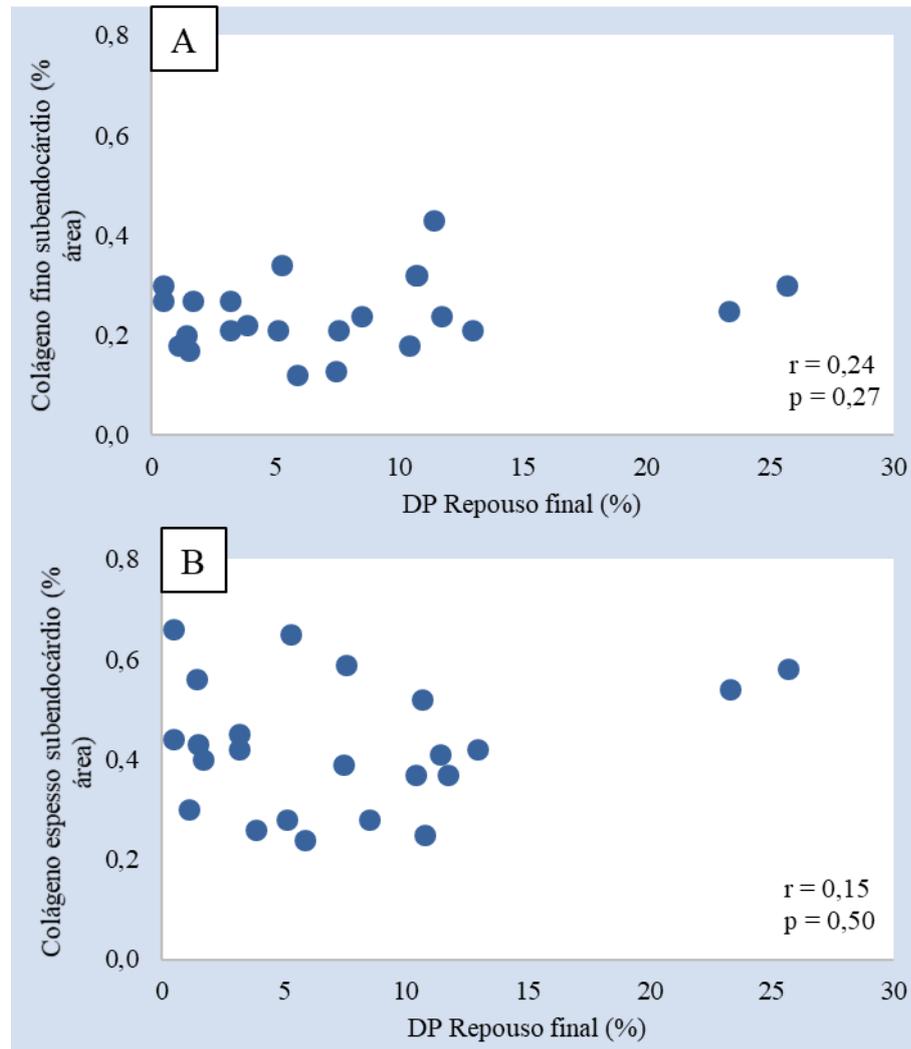
Os gráficos de dispersão estão ilustrando a correlação entre os valores individuais de inflamação nos animais infectados e o defeito de perfusão em repouso. Foi utilizado o teste de correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. A: inflamação total e DP em repouso. B: inflamação na camada subendocárdica e DP em repouso. C: inflamação na camada mesocárdica e DP em repouso. D: inflamação na camada subepicárdica e DP em repouso. Legenda: IIM: índice de infiltrado mononuclear; DP: defeito de perfusão.

Gráfico 19 – Correlação entre os índices de fibrose global e a porcentagem de área de defeito de perfusão em repouso (n = 23).



Os gráficos de dispersão estão ilustrando a correlação entre os valores individuais de fibrose nos animais infectados e o defeito de perfusão em repouso. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. A: fibrose total e DP em repouso. B: fibrose na camada subendocárdica e DP em repouso. C: fibrose na camada mesocárdica e DP em repouso. D: fibrose na camada subepicárdica e DP em repouso. Legenda: DP: defeito de perfusão.

Gráfico 20 – Correlação entre as fibras de colágeno no subendocárdio e a porcentagem de área de defeito de perfusão em repouso (n = 23).



Os gráficos de dispersão estão ilustrando a correlação entre os valores individuais de fibras de colágeno no subendocárdio nos animais infectados e o defeito de perfusão em repouso. Foi utilizado o teste correlação de Pearson, em que r é o coeficiente de correlação. A: fibra de colágeno fino na camada subendocárdica e DP em repouso. B: fibra de colágeno grosso na camada subendocárdica e DP em repouso. Legenda: DP: defeito de perfusão.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos a evolução temporal das alterações de estrutura e função ventricular esquerda e dos defeitos perfusionais miocárdicos na cardiomiopatia crônica da doença de Chagas por meio de métodos de imagem de alta-resolução *in vivo*, após 6 e 8 meses da infecção intraperitoneal com 35.000 formas tripomastigotas de cepa Y do *T. cruzi* em hamsters sírios. Pioneiramente, estudamos a presença e progressão de defeitos perfusionais miocárdicos reversíveis e paradoxais neste modelo experimental. Em seguida, os achados *in vivo* foram correlacionados topograficamente com as alterações de inflamação e fibrose observadas na totalidade e por camadas transmuralis do tecido miocárdico. Por fim, os tipos de fibra de colágeno I e III também foram correlacionados com os resultados dos exames de imagem *in vivo*.

Sobre o modelo experimental e fases de evolução da CCC

Como já citado anteriormente, a doença de Chagas apresenta uma fase aguda com duração de, aproximadamente, 30 a 90 dias em humanos, podendo ser assintomática ou apresentar manifestações cardiovasculares. Estudos anteriores mostram que o modelo experimental de CCC no hamster utilizado no presente estudo também reproduz uma fase aguda com queda significativa da função sistólica ventricular esquerda cerca de 15 dias após a infecção por *T. cruzi* (VARGAS; DIAS; MOREIRA; SIMÕES *et al.*, 2020). Logo após a fase aguda, os animais neste modelo, entram em uma fase de aparente quiescência da doença, comparável, a grosso modo, à forma indeterminada da CCC vista nos humanos. Dessa forma, aos 6 meses após a infecção, a função sistólica do VE dos animais infectados não difere significativamente dos animais controle (TANAKA, 2019; TANAKA; DE OLIVEIRA; MARIN-NETO; ROMANO *et al.*, 2018). Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam essa evolução temporal da disfunção miocárdica desse modelo de CCC no hamster.

Já na fase crônica mais tardia da doença, 8 meses após a infecção, é possível observar redução da fração de ejeção e alteração nos parâmetros de remodelamento cardíaco (BILATE; SALEMI; RAMIRES; DE BRITO *et al.*, 2003; OLIVEIRA; ROMANO; CARVALHO; MEJIA *et al.*, 2016; TANAKA; DE OLIVEIRA; MARIN-NETO; ROMANO *et al.*, 2018). Nossos dados novamente corroboram os resultados encontrados por esses estudos anteriores. Por outro lado, observamos também significativa heterogeneidade no desenvolvimento da disfunção miocárdica, que ocorreu em aproximadamente 35% dos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*,

taxa que se assemelha ao encontrado em humanos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010), em que cerca de 30% os pacientes com CCC progridem com disfunção sistólica global, dilatação das câmaras ventriculares e diminuição da espessura das paredes (BILATE; SALEMI; RAMIRES; DE BRITO *et al.*, 2003).

Considerando a evidente heterogeneidade do acometimento miocárdico da CCC tanto em humanos, quanto no modelo experimental, optamos por individualizar um grupo de animais que exibiram queda significativa da função sistólica global ventricular esquerda aos 8 meses de evolução. Dessa forma, objetivamos selecionar um subgrupo de animais que desenvolveram cardiomiopatia mais grave e evidenciável por métodos de imagem *in vivo*. Para essa divisão entre os animais foi utilizado um valor de corte da fração de ejeção do ventrículo esquerdo baseado no estudo realizado por Barros Filho e cols. que relatou uma média e desvio-padrão da FEVE de $53,8 \pm 4,7\%$ e intervalo de referência de $44,3 - 63,1\%$, usando imagens ecocardiográficas de alta resolução, e cálculo da FEVE usando método biplanar em hamsters controles (BARROS FILHO; MOREIRA; DIAS; RIBEIRO *et al.*, 2021). A partir dessa avaliação definiu-se que todos os animais que com FEVE menor ou igual a 44% seriam considerados como apresentando disfunção sistólica.

Nesse cenário experimental, estudos anteriores mostram que este modelo desenvolve miocardite focal e/ou difusa e aumento da fibrose intersticial na escassez, ou aparente ausência, de parasitismo tecidual miocárdico (BILATE; SALEMI; RAMIRES; DE BRITO *et al.*, 2003). Estudos recentes conduzidos pelo grupo de pesquisa da FMRP-USP vêm demonstrando que a utilização do modelo de hamsters sírios cronicamente infectados com *T. cruzi* se assemelha clinicamente aos achados ecocardiográficos, cintilográficos e histopatológicos em humanos (LE MOS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018; OLIVEIRA; ROMANO; CARVALHO; MEJIA *et al.*, 2016; TANAKA; DE OLIVEIRA; MARIN-NETO; ROMANO *et al.*, 2018).

Dessa forma, julgamos que o modelo experimental utilizado no presente estudo reproduziu adequadamente as fases evolutivas da doença, aproximando-se da história natural da CCC em humanos, conforme observado em estudos anteriores (LE MOS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018; TANAKA; DE OLIVEIRA; MARIN-NETO; ROMANO *et al.*, 2018).

Alterações histopatológicas e a disfunção sistólica

Dentre as alterações histopatológicas, os nossos resultados mostraram que o infiltrado inflamatório mononuclear total (considerando toda a transmuralidade da parede do ventrículo esquerdo) se faz aumentado nos animais cronicamente infectados por *T. cruzi*, independentemente de apresentarem ou não disfunção sistólica ventricular esquerda. Estes dados corroboram estudos anteriores em que a intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear se apresenta aumentada naqueles animais infectados nesta mesma fase evolutiva da doença, em comparação com os animais controles (OLIVEIRA; ROMANO; CARVALHO; MEJIA *et al.*, 2016; TANAKA, 2019; TANAKA; DE OLIVEIRA; MARIN-NETO; ROMANO *et al.*, 2018).

Nossos resultados sugerem uma ausência clara de associação entre a presença de inflamação miocárdica e o grau de disfunção sistólica cardíaca nessas fases consideradas como intermediárias de evolução da CCC experimental. Essa observação não contradiz o conceito fundamental de que a inflamação evolui de forma lenta e incessante, tendo papel fundamental no aparecimento da disfunção miocárdica da CCC mais evidente em fases mais tardias da evolução da doença. Pereira-Barreto e cols., em estudo utilizando biopsias endomiocárdicas, mostrou que a inflamação se fez presente em pacientes com doença de Chagas crônica, independentemente do estágio de progressão da doença, aproximadamente, em 65% dos pacientes com alterações eletrocardiográficas (com ou sem insuficiência cardíaca) e em 37% dos pacientes com a forma indeterminada da doença (PEREIRA BARRETTO; MADY; ARTEAGA-FERNANDEZ; STOLF *et al.*, 1986).

No nosso estudo, não observamos correlação significativa entre a intensidade de inflamação e os valores da fração de ejeção do ventrículo esquerdo nessa janela temporal de 8 meses após a infecção. Nossos resultados divergem dos observados no estudo de Oliveira e cols. que encontrou correlação entre a intensidade da inflamação e a redução da fração de ejeção. Provavelmente essa discordância se deva à diferença das janelas temporais de observação utilizadas em cada estudo. Oliveira e cols. realizaram análises histopatológicas aos 10 meses após a infecção, enquanto os resultados do presente estudo se referem a análises no oitavo mês (OLIVEIRA; ROMANO; CARVALHO; MEJIA *et al.*, 2016). Essas observações sugerem, portanto, que uma avaliação mais tardia possa mostrar infiltrados inflamatórios mais extensos na CCC e, conseqüentemente, correlação com a piora da fração de ejeção.

Pelo exposto, fica também aparente que a fase evolutiva na qual os animais foram investigados no presente estudo pode ser considerada uma fase crônica mais precoce ou intermediária em que as lesões histológicas ainda não atingiram seu ápice de desenvolvimento.

De maneira original, nossos resultados mostram que alterações do subendocárdio se destacaram naqueles animais com fração de ejeção reduzida, mostrando aumento significativo da inflamação nesta camada miocárdica específica e se diferenciando dos demais animais infectados com função sistólica normal. Um achado ainda não previamente descrito e que pode indicar que as lesões inflamatórias na CCC possam acometer mais precoce e intensamente a camada subendocárdica. Contudo, uma comprovação mais definitiva desse processo dependeria de observações seriadas de grupos de animais em diferentes intervalos temporais após infecção, o que não foi realizado no presente estudo.

Quando analisamos as características das lesões inflamatórias em outros modelos de miocardite, como nas doenças virais, estudos anteriores mostraram lesões difusas envolvendo todas as camadas da parede do VE ou concentradas tanto no subendocárdio como no subepicárdio. Um estudo realizado em autópsia de 19 corações com miocardite inespecíficas e 19 corações com cardiomegalia pós-miocardite revelou que em um terço dos casos as lesões patológicas se localizam nas camadas subepicárdicas, sendo encontrado infiltrado celular difuso naqueles casos de miocardite aguda (2 a 5 dias) e focal em miocardite crônica (8 meses a 8 anos) (OKADA; WAKAFUJI, 1985). Esse estudo também mostrou que necrose e degeneração de miócitos foram, geralmente, associadas à inflamação intersticial. Em outro estudo mais recente com 9 corações autopsiados após uma infecção viral por SARS-CoV-2 mostrou a presença miocardite difusa, afetando subendocárdio, mesocárdio e gordura subepicárdica (SCHURINK; ROOS; RADONIC; BARBE *et al.*, 2020).

Outros estudos utilizando imagens *in vivo* de realce tardio de contraste paramagnético na ressonância magnética cardíaca mostram um acometimento preferencial da camada subepicárdica ou mesomiocárdica nos pacientes com miocardite aguda (MAHRHOLDT; WAGNER; DELUIGI; KISPERS *et al.*, 2006; YILMAZ; FERREIRA; KLINGEL; KANDOLF *et al.*, 2013). Esse mesmo padrão sequelar de áreas de realce tardio localizadas nas regiões subepicárdicas ou mesomiocárdicas são classicamente associadas à etiologia pós-viral nos pacientes com fenótipo clínico de miocardiopatia dilatada.

Dessa forma, o acometimento preferencial do subendocárdio na miocardite crônica da doença de Chagas é um aspecto particular dessa cardiopatia e sugere a presença de um fator localizador ou potencializador do processo inflamatório nessa camada do miocárdio. Como discutiremos mais adiante, é plausível supor que a isquemia microvascular possa ser esse fator.

Quando se trata da avaliação de fibrose é importante destacar a diferença entre os tipos de fibras encontrados em nossa análise. As fibras de colágeno espessas, também conhecidas

como fibras do tipo I, são fibras mais maduras, ou seja, colágeno que se formou há mais tempo e já está bem estabelecido no tecido miocárdico. Já a fibra fina, também chamada de fibra tipo III, representa lesão fibrótica mais recente que posteriormente será substituída pelas fibras espessas (PICK; JANICKI; WEBER, 1989).

Em relação à fibrose miocárdica total, sem levar em consideração o tipo de fibra, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos estudados, corroborando o que já foi reportado por estudos anteriores do grupo de pesquisa da FMRP-USP, utilizando o mesmo modelo experimental de CCC nesta mesma fase evolutiva da doença (TANAKA, 2019) (OLIVEIRA; ROMANO; CARVALHO; MEJIA *et al.*, 2016; TANAKA; CARVALHO; OLIVEIRA; ROMANO *et al.*, 2016). Esses resultados indicam que, na fase evolutiva em que esses animais se encontram, as lesões histopatológicas são majoritariamente inflamatórias e com discreta extensão de fibrose intersticial reparativa que se acentua apenas nas fases mais avançadas da cardiopatia.

Ainda nas análises totais de fibrose, não obtivemos aqui uma correlação significativa entre a fibrose global, ou por tipo de fibra, com a redução da FEVE. Contudo, estudo realizado por Oliveira e cols. mostrou que aos 10 meses após a infecção por *T. cruzi*, os animais com fração de ejeção reduzida apresentaram aumento significativo de fibrose em relação aos controles e correlação negativa com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (OLIVEIRA; ROMANO; CARVALHO; MEJIA *et al.*, 2016). Novamente, podemos supor que, da mesma forma como observamos em relação à inflamação, a avaliação histopatológica realizada no 8º mês pós infecção possa representar uma etapa mais precoce de evolução da doença, com fibrose mais discreta e sem correlação nítida com a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, aspecto que pode ser bem demonstrado nos estudos realizados aos 10 meses após infecção.

Em humanos, estudo em pacientes com CCC utilizando imagens de realce tardio por gadolínio por ressonância magnética cardíaca para detectar anormalidades teciduais, constatou que 71,4% dos pacientes apresentavam fibrose miocárdica, e estes pacientes apresentaram menor fração de ejeção do VE e maior volume diastólico final e massa do VE do que pacientes sem fibrose miocárdica (VOLPE; MOREIRA; TRAD; WU *et al.*, 2018). Esse mesmo estudo encontrou que a presença de fibrose está fortemente associada com prognósticos adversos, como morte cardiovascular, taquicardia e hospitalização, portanto, a presença de fibrose se associa com a gravidade da doença.

Quando partimos para a análise por camadas, a camada subendocárdica na análise de fibrose global mostra diferença significativa entre os grupos, ainda que não tenham

apresentando diferença significativa na avaliação estatística do pós-teste. Ao observar o tipo de fibra, ambas as fibras de colágeno tipo I e III se destacam no grupo Chagas com disfunção sistólica no subendocárdio por estarem significativamente aumentadas em comparação ao grupo controle. Esse resultado reforça a ideia de que o subendocárdio é a camada mais precocemente lesada na CCC, assim como acontece com as lesões inflamatórias, sugerindo algum fator que localiza e potencializa a lesão no subendocárdio. Esses resultados corroboram resultados encontrados por outro estudo utilizando ressonância magnética cardíaca com realce tardio de gadolínio em pacientes com estenose aórtica grave que demonstrou um padrão específico de fibrose miocárdica, especialmente localizada na camada subendocárdica (TREIBEL; LOPEZ; GONZALEZ; MENACHO *et al.*, 2018). Vale ressaltar que pacientes com estenose aórtica grave, com grave hipertrofia ventricular esquerda, também cursam comumente com isquemia miocárdica microvascular que pode ser mais intensa e localizada no subendocárdio.

Com relação ao tipo de fibra de colágeno, as fibras finas no subendocárdio se correlacionaram negativamente com a FEVE e positivamente com o DdVE e com o EMPS, reforçando a noção do envolvimento da camada subendocárdica ser mais precoce e se correlacionar com a gravidade da disfunção em fase ainda intermediária de evolução da cardiopatia em que a fibrose total ainda não se encontra aumentada.

As fibras finas representam a fibrose mais recente que evoluem para fibras espessas com o passar do tempo e aumento da lesão, desta forma pode-se sugerir que a CCC após 8 meses da infecção seja ainda uma fase inicial da evolução da fase crônica da doença.

No presente estudo ambas as fibras de colágeno, espessas e finas, se mostraram aumentadas nos animais infectados em relação aos animais controle. Na análise de predominância do tipo de fibra de colágeno é possível observar que as fibras espessas estão aumentadas em relação às fibras finas, especialmente na camada subendocárdica dos grupos Chagas em que a diferença é significativa. Nossos dados corroboram os resultados de estudos anteriores sobre o padrão de fibras de colágeno na CCC em humanos com cardiopatia avançada (ROSSI, 1991; 1998) que mostraram predomínio das fibras espessas em relação às fibras finas.

Pode-se dizer, com base nos resultados apresentados, que a camada subendocárdica seja a camada mais precocemente afetada tanto pela lesão inflamatória como pelas lesões fibróticas. Soma-se a isso o fato de que aos 8 meses pós-infecção o predomínio histopatológico seja de infiltrados mononucleares em relação ao infiltrado de fibras de colágeno, e que o padrão mais abundante de colágeno nesta fase evolutiva da doença seja de fibras espessas.

Defeitos de perfusão detectados in vivo em modelos experimentais de CCC

Um relevante aspecto em relação à execução de estudos longitudinais visando à demonstração da participação de distúrbios da microcirculação coronária no desenvolvimento do dano miocárdico crônico dessa doença é o tempo de observação extremamente longo, 2 a 3 décadas, necessário para observar a progressão da doença a partir da sua fase indeterminada. Esse longo tempo de observação representa virtual impedimento para condução de um estudo desta natureza em humanos e salienta as vantagens de se investigar esta hipótese em modelos pré-clínicos, como o empregado no presente estudo.

Os nossos resultados mostraram taxa elevada de detecção de defeitos de perfusão miocárdica em repouso em animais cronicamente infectados por *T. cruzi*, corroborando resultados anteriores do grupo de pesquisa da FMRP-USP, investigando o mesmo modelo de CCC em hamsters (LEMONS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2018; TANAKA, 2019). A topografia, extensão e a taxa de detecção desses defeitos são comparáveis aos previamente descritos nesse mesmo modelo experimental.

Vale ressaltar ainda que o presente estudo empregou sistema de aquisição e processamento de imagens de perfusão miocárdica em SPECT de alta-resolução desenvolvido localmente em nossa instituição (MEJIA; GALVIS-ALONSO; CASTRO; BRAGA *et al.*, 2010) e validado para testes em pequenos animais (OLIVEIRA; MEJIA; CARVALHO; LATARO *et al.*, 2013).

Pioneiramente, investigamos também a presença de defeitos de perfusão reversíveis e paradoxais neste modelo experimental e sua evolução ao longo de 8 semanas de seguimento. Observamos que esses dois tipos de defeito se apresentam com extensão diminuta tanto ao 6º como ao 8º mês pós infecção por *T. cruzi*. Esses resultados contrastam com aqueles relatados em estudos em humanos, que mostraram significativa taxa de defeitos de perfusão reversíveis e paradoxais em pacientes com cardiomiopatia crônica da doença de Chagas, sendo ligados à gravidade da doença (SIMOES; PINTYA; BROMBERG-MARIN; SARABANDA *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que 68% dos segmentos afetados por defeitos de perfusão reversíveis em pacientes com CCC evoluem para defeitos de perfusão em repouso após um intervalo de, aproximadamente, 5 anos (HISS; LASCALA; MACIEL; MARIN-NETO *et al.*, 2009), realçando a importância desse tipo de defeito na fisiopatologia da CCC em humanos.

Portanto, pode-se afirmar que, no modelo experimental de CCC no hamster, o maior acometimento da perfusão miocárdica pode ser encontrado na condição de repouso e que o estresse farmacológico utilizado não induziu o aparecimento de extensão significativa de defeitos reversíveis ou paradoxais. Esse contraste em relação ao que se observa em humanos é de difícil entendimento. Uma das explicações pode ser uma inadequação do estresse farmacológico com dobutamina para induzir heterogeneidade de fluxo e isquemia miocárdica nesse modelo de disfunção microvascular na miocardiopatia dilatada da doença de Chagas. Nesse sentido, comparações com outros estudos não são possíveis, já que não encontramos na literatura médica especializada outro estudo que tenha utilizado cintilografia miocárdica de perfusão aliada ao estresse com dobutamina para investigar isquemia microvascular em modelos de miocardiopatia dilatada em pequenos animais. Também é plausível supor que os graves defeitos de perfusão nesse modelo de CCC já se manifestem em máxima intensidade em repouso e que não haja agravamento da heterogeneidade de fluxo durante estresse farmacológico com dobutamina, ainda que esse tenha sido um estímulo efetivo em aumentar o consumo miocárdico de oxigênio e produzir hiperemia reativa.

No nosso estudo, os defeitos de perfusão em repouso, mas não os demais tipos de defeito, exibiram aumento de extensão ao longo do tempo e se associaram com a progressão da disfunção ventricular esquerda, ou seja, quanto maior o acometimento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, maior a extensão dos defeitos de perfusão em repouso, assim como observado anteriormente por Lemos de Oliveira e cols. (LEMOS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018). Naquele estudo utilizando análises histopatológicas com picrossírius-vermelho e hematoxilina-eosina e o exame de tomografia por emissão de pósitrons (PET) com F-FDG e SPECT com Sestamibi-Tc99m para avaliação da viabilidade miocárdica, verificou-se que as áreas de defeito de perfusão foram associadas topograficamente com áreas de intensa inflamação, e não com área de fibrose, e, portanto, apresentando miocárdio vivo, hipoperfundido e inflamado.

Os parâmetros de remodelamento cardíaco, diâmetro diastólico e sistólico finais do VE, também apresentaram forte correlação positiva isoladamente com os defeitos de perfusão em repouso, reproduzindo os achados de estudos anteriores (OLIVEIRA, 2018). Podemos, portanto, supor que os defeitos de perfusão em repouso observados nesse modelo representem grave isquemia miocárdica capaz de induzir disfunção sistólica e remodelamento ventricular esquerdo por mecanismos semelhantes à hibernação miocárdica descrita na cardiopatia isquêmica aterosclerótica em humanos (RAHIMTOOLA, 1989).

Alterações histopatológicas e defeitos de perfusão em repouso

As alterações de fibrose, considerando a fibrose global (tipo I e III somadas) e avaliando as camadas miocárdicas em conjunto (totalidade da parede), não apresentaram diferença entre os grupos com e sem defeito de perfusão em repouso e com o grupo controle, assim como as análises de correlação da fibrose global com os defeitos em repouso também não se associaram, corroborando os resultados do estudo de Lemos de Oliveira e cols., que mostrou que as área de defeito de perfusão miocárdica em repouso não se correlacionaram com a extensão da fibrose miocárdica (LEMOS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018).

Entretanto, quando analisamos por camadas da parede do ventrículo esquerdo, o subendocárdio revela aumento significativo na fibrose global naqueles animais com redução da perfusão miocárdica em comparação aos animais controles, sugerindo que a fibrose nessa camada esteja mais intimamente associada à presença de distúrbios da perfusão miocárdica. É plausível supor, a partir desses dados, que a isquemia miocárdica, que é habitualmente mais intensa na camada subendocárdica, possa ser fator amplificador e localizador do dano miocárdico causando um maior acúmulo de fibrose nessa camada miocárdica. Esse aspecto pode reforçar o papel do distúrbio de perfusão miocárdica em amplificar a lesão miocárdica na CCC.

Em se tratando do infiltrado inflamatório, todas as camadas transmuralis apresentaram aumento de células mononucleares nos animais com defeito de perfusão em repouso quando comparados aos animais controles, provavelmente retratando um vínculo fisiopatológico entre inflamação miocárdica e desenvolvimento do distúrbio de perfusão miocárdica na CCC, como já sugerido anteriormente (MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMOES, 2007). Estudos experimentais anteriores também encontraram correlação entre a intensidade da inflamação e os defeitos de perfusão miocárdica (LEMOS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018; TANAKA, 2019). Lemos de Oliveira e cols. também mostraram que aqueles animais com hipoperfusão em repouso apresentaram maior grau de inflamação em comparação aos animais infectados sem defeito de perfusão (LEMOS DE OLIVEIRA; THACKERAY; MARIN NETO; DIAS ROMANO *et al.*, 2018), ressaltando que o defeito de perfusão tem associação direta com a intensidade da inflamação aos 10 meses após a infecção

Nossos resultados mostram ainda, quando analisamos as correlações dos distúrbios por camadas, que apenas a camada subendocárdica apresenta correlação positiva com a extensão dos defeitos de perfusão em repouso. Essa observação pioneira, aponta claramente para um vínculo fisiopatológico entre o desenvolvimento do distúrbio de perfusão miocárdica microvascular e a inflamação no subendocárdio.

Essa correlação positiva pode ainda reforçar a participação da isquemia miocárdica microvascular no mecanismo de lesão miocárdica da CCC, funcionando como um fator de localização e amplificação da inflamação nessa camada miocárdica. Esse aspecto se coaduna com o conceito de que a camada subendocárdica é a mais gravemente afetada nos processos de isquemia miocárdica devido aos aspectos anatômicos e funcionais da circulação sanguínea coronária, em que a pressão de perfusão é menor nas porções terminais dos vasos arteriais coronários do subendocárdio, devido à compressão destes vasos pela contração sistólica do coração (GUYTON; HALL, 2011).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo com o modelo experimental de cardiomiopatia crônica da doença de Chagas em hamsters sírios nos permitem concluir que:

- A disfunção sistólica ventricular esquerda correlaciona-se com a intensidade da inflamação e com a extensão da fibrose na camada subendocárdica da parede ventricular esquerda, mas não com as alterações identificadas quando todas as camadas são tomadas em conjunto, indicando que o subendocárdio seja uma região miocárdica mais sensível aos mecanismos lesivos atuantes na CCC.
- O defeito de perfusão miocárdica em repouso associa-se com a progressão da disfunção sistólica ventricular esquerda e com as alterações estruturais cardíacas, nesta fase evolutiva da doença, diferentemente dos defeitos reversíveis e paradoxais que não apresentam essas associações e são de extensão muito discreta nesta fase evolutiva da CCC;
- O defeito de perfusão miocárdica em repouso tem correlação significativa com a intensidade da inflamação, particularmente na camada subendocárdica.
- No conjunto esses resultados indicam que o distúrbio de perfusão miocárdica possa atuar como fator amplificador e localizador da inflamação na camada subendocárdica, indicando um papel relevante da hipoperfusão miocárdica nos mecanismos de lesão miocárdica na CCC

7. BIBLIOGRAFIA

- BARROS FILHO, A. C. L.; MOREIRA, H. T.; DIAS, B. P.; RIBEIRO, F. F. F. *et al.* Feasibility and reference intervals assessed by conventional and speckle-tracking echocardiography in normal hamsters. **Physiol Rep**, 9, n. 5, p. e14776, Mar 2021.
- BILATE, A. M.; SALEMI, V. M.; RAMIRES, F. J.; DE BRITO, T. *et al.* The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. **Microbes Infect**, 5, n. 12, p. 1116-1124, Oct 2003.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Curr Mol Med**, 8, n. 6, p. 510-518, Sep 2008.
- BONNEY, K. M.; LUTHRINGER, D. J.; KIM, S. A.; GARG, N. J. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annu Rev Pathol**, 14, p. 421-447, Jan 24 2019.
- BRITO, A.; SOUSA, D. R. T.; SILVA JUNIOR, E. F. D.; RUIZ, H. *et al.* Acute micro-outbreak of Chagas disease in the southeastern Amazon: a report of five cases. **Rev Soc Bras Med Trop**, 55, p. e0687, 2022.
- BURGER, A. J.; NOTARIANNI, M. P.; ARONSON, D. Safety and efficacy of an accelerated dobutamine stress echocardiography protocol in the evaluation of coronary artery disease. **Am J Cardiol**, 86, n. 8, p. 825-829, Oct 15 2000.
- CALDAS, I. S.; MENEZES, A. P. J.; DINIZ, L. F.; NASCIMENTO, A. *et al.* Parasitaemia and parasitic load are limited targets of the aetiological treatment to control the progression of cardiac fibrosis and chronic cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi-infected dogs. **Acta Trop**, 189, p. 30-38, Jan 2019.
- CAMPOS, F. A.; MAGALHAES, M. L.; MOREIRA, H. T.; PAVAO, R. B. *et al.* Chagas Cardiomyopathy as the Etiology of Suspected Coronary Microvascular Disease. A Comparison Study with Suspected Coronary Microvascular Disease of Other Etiologies. **Arq Bras Cardiol**, 115, n. 6, p. 1094-1101, Dec 2020.
- CASTILLO-RIQUELME, M.; GUHL, F.; TURRIAGO, B.; PINTO, N. *et al.* The costs of preventing and treating chagas disease in Colombia. **PLoS Negl Trop Dis**, 2, n. 11, p. e336, 2008.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze 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 Instituto Oswaldo Cruz**, 1, 1909.
- CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 5, p. 165689, May 1 2020.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop**, 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.
- CUNHA-NETO, E.; BILATE, A. M.; HYLAND, K. V.; FONSECA, S. G. *et al.* Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, 39, n. 1, p. 41-54, Feb 2006.
- DELARISSE, M. L. **Padronização de protocolo de estresse cardíaco com dobutamina em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica em hamsters**. Orientador: (CAPES), C. d. A. d. P. d. N. S. 2020. 77 f. (mestrado) - Clínica Médica, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

DIAS, E.; LARANJA, F. S.; MIRANDA, A.; NOBREGA, G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, 14, n. 6, p. 1035-1060, Dec 1956.

EVANS, C. L.; MATSUOKA, Y. The effect of various mechanical conditions on the gaseous metabolism and efficiency of the mammalian heart. **J Physiol**, 49, n. 5, p. 378-405, Jul 5 1915.

GADIOLI, L. P.; MIRANDA, C. H.; MARIN-NETO, J. A.; VOLPE, G. J. *et al.* Regional myocardial sympathetic denervation precedes the development of left ventricular systolic dysfunction in chronic Chagas' cardiomyopathy. **J Nucl Cardiol**, Jan 4 2022.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, 71, n. 3, p. 1185-1193, Mar 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica** Tradução AL., A. M. J. e. Rio de Janeiro : Elsevier, 2011. 1173 p. 978-85-352-4980-4.

HAZARI, M. S.; CALLAWAY, J.; WINSETT, D. W.; LAMB, C. *et al.* Dobutamine "stress" test and latent cardiac susceptibility to inhaled diesel exhaust in normal and hypertensive rats. **Environ Health Perspect**, 120, n. 8, p. 1088-1093, Aug 2012.

HIGUCHI, M. D.; DEBRITO, T.; REIS, M. M.; BARBOSA, A. *et al.* Correlation between Trypanosoma-Cruzi Parasitism and Myocardial Inflammatory Infiltrate in Human Chronic Chagasic Myocarditis - Light-Microscopy and Immunohistochemical Findings. **Cardiovascular Pathology**, 2, n. 2, p. 101-106, Apr-Jun 1993.

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

HISS, F. C.; LASCALA, T. F.; MACIEL, B. C.; MARIN-NETO, J. A. *et al.* Changes in myocardial perfusion correlate with deterioration of left ventricular systolic function in chronic Chagas' cardiomyopathy. **JACC Cardiovasc Imaging**, 2, n. 2, p. 164-172, Feb 2009.

HSIA, C. C.; HYDE, D. M.; OCHS, M.; WEIBEL, E. R. *et al.* An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. **Am J Respir Crit Care Med**, 181, n. 4, p. 394-418, Feb 15 2010.

KELM, N. Q.; BEARE, J. E.; LEBLANC, A. J. Evaluation of Coronary Flow Reserve After Myocardial Ischemia Reperfusion in Rats. **J Vis Exp**, n. 148, Jun 28 2019.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, 6, p. 63-116, 1968.

KUSCHNIR, E.; SGAMMINI, H.; CASTRO, R.; EVEQUOZ, C. *et al.* [Chronic Chagas' cardiomyopathy: effects of dipyradamole on ventricular dynamics]. **Arq Bras Cardiol**, 41, n. 5, p. 373-378, Nov 1983.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect Dis**, 13, n. 4, p. 342-348, Apr 2013.

LEMOS DE OLIVEIRA, L. F.; THACKERAY, J. T.; MARIN NETO, J. A.; DIAS ROMANO, M. M. *et al.* Regional Myocardial Perfusion Disturbance in Experimental Chronic Chagas Cardiomyopathy. **J Nucl Med**, 59, n. 9, p. 1430-1436, Sep 2018.

MAHRHOLDT, H.; WAGNER, A.; DELUIGI, C. C.; KISPERT, E. *et al.* Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. **Circulation**, 114, n. 15, p. 1581-1590, Oct 10 2006.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, 115, n. 9, p. 1109-1123, Mar 6 2007.

MARIN-NETO, J. A.; MARZULLO, P.; MARCASSA, C.; GALLO JUNIOR, L. *et al.* Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. **Am J Cardiol**, 69, n. 8, p. 780-784, Mar 15 1992.

MARIN-NETO, J. A.; SIMOES, M. V.; RASSI JUNIOR, A. Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. **Rev Soc Bras Med Trop**, 46, n. 5, p. 536-541, Sep-Oct 2013.

MARIN-NETO, J. A.; SOUSA, A. C.; MACIEL, B. C.; GALLO JUNIOR, L. *et al.* [Radionuclide angiocardigraphic evaluation of the effect of isosorbide dinitrate in patients with Chagas' disease]. **Arq Bras Cardiol**, 51, n. 5, p. 367-371, Nov 1988.

MARTINS-MELO, F. R.; CASTRO, M. C.; WERNECK, G. L. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000-2019. **Acta Trop**, 220, p. 105948, May 7 2021.

MEJIA, J.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; CASTRO, A. A.; BRAGA, J. *et al.* A clinical gamma camera-based pinhole collimated system for high resolution small animal SPECT imaging. **Braz J Med Biol Res**, 43, n. 12, p. 1160-1166, Dec 2010.

NUNES, M. Coronary Microvascular Dysfunction: Does it Really Matter in Chagas Disease? **Arq Bras Cardiol**, 115, n. 6, p. 1102-1103, Dec 2020.

OKADA, R.; WAKAFUJI, S. Myocarditis in autopsy. **Heart Vessels Suppl**, 1, p. 23-29, 1985.

OLIVEIRA, L. F.; MEJIA, J.; CARVALHO, E. E.; LATARO, R. M. *et al.* Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats. **Arq Bras Cardiol**, 101, n. 1, p. 59-67, Jul 2013.

OLIVEIRA, L. F. L.; ROMANO, M. M. D.; CARVALHO, E. E. V.; MEJIA, J. *et al.* Histopathological Correlates of Global and Segmental Left Ventricular Systolic Dysfunction in Experimental Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Journal American Heart Association**, 2016.

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

OPAS, O. P. D. L. S. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Washington, DC 2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, P. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Washington, D.C.: PAHO 2019.

PEREIRA BARRETTO, A. C.; MADY, C.; ARTEAGA-FERNANDEZ, E.; STOLF, N. *et al.* Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. **Am Heart J**, 111, n. 2, p. 307-312, Feb 1986.

PETKOVA, S. B.; HUANG, H.; FACTOR, S. M.; PESTELL, R. G. *et al.* The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. **Int J Parasitol**, 31, n. 5-6, p. 499-511, May 1 2001.

PETKOVA, S. B.; TANOWITZ, H. B.; MAGAZINE, H. I.; FACTOR, S. M. *et al.* Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Cardiovasc Pathol**, 9, n. 5, p. 257-265, Sep-Oct 2000.

PICK, R.; JANICKI, J. S.; WEBER, K. T. Myocardial fibrosis in nonhuman primate with pressure overload hypertrophy. **Am J Pathol**, 135, n. 5, p. 771-781, Nov 1989.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

RAHIMTOOLA, S. H. The hibernating myocardium. **Am Heart J**, 117, n. 1, p. 211-221, Jan 1989.

RASSI, A., Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr 17 2010.

REIMER, K. A.; JENNINGS, R. B. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. **Lab Invest**, 40, n. 6, p. 633-644, Jun 1979.

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

ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, 30, n. 3, p. 335-340, Mar 1991.

ROSSI, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. **Int J Cardiol**, 66, n. 2, p. 183-194, Sep 30 1998.

ROSSI, M. A.; TANOWITZ, H. B.; MALVESTIO, L. M.; CELES, M. R. *et al.* Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. **PLoS Negl Trop Dis**, 4, n. 8, 2010.

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

SCHURINK, B.; ROOS, E.; RADONIC, T.; BARBE, E. *et al.* Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. **Lancet Microbe**, 1, n. 7, p. e290-e299, Nov 2020.

SHIMOKAWA, H.; YASUDA, S. Myocardial ischemia: current concepts and future perspectives. **J Cardiol**, 52, n. 2, p. 67-78, Oct 2008.

SILVA, P. H.; PARRA, E. R.; ZOCOLARO, W. S.; NARDE, I. *et al.* Immunophenotyping and extracellular matrix remodeling in pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis. **J Bras Pneumol**, 38, n. 3, p. 321-330, May-Jun 2012.

SIMOES, M. V.; PINTYA, A. O.; BROMBERG-MARIN, G.; SARABANDA, A. V. *et al.* Relation of regional sympathetic denervation and myocardial perfusion disturbance to wall motion impairment in Chagas' cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, 86, n. 9, p. 975-981, Nov 1 2000.

SIMOES, T. C.; BORGES, L. F.; PARREIRA DE ASSIS, A. C.; SILVA, M. V. *et al.* Chagas disease mortality in Brazil: A Bayesian analysis of age-period-cohort effects and forecasts for two decades. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 9, p. e0006798, Sep 2018.

SOUZA-LIMA RDE, C.; BARBOSA, M.; COURA, J. R.; ARCANJO, A. R. *et al.* Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**, 46, n. 4, p. 510-514, Jul-Aug 2013.

STARY, H. C.; CHANDLER, A. B.; DINSMORE, R. E.; FUSTER, V. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, 92, n. 5, p. 1355-1374, Sep 1 1995.

TANAKA, D. M. **Efeito do uso prolongado de pentoxifilina em modelo experimental de cardiomiopatia crônica da doença de Chagas no hamster**. Orientador: PAULO, F. d. A. a. P. d. E. d. S. 2019. 101 f. (doutorado) - Clínica Médica, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

TANAKA, D. M.; CARVALHO, E. E. V. d.; OLIVEIRA, L. F. L. d.; ROMANO, M. M. D. *et al.* Prolonged dipyridamole use is associated to amelioration of myocardial perfusion disturbance in experimental chronic Chagas cardiomyopathy. *In: Heart Failure Congress, 2016, 2016, Florença*. **18**. European Journal of Heart Failure, p. 426-427. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejhf.539/epdf>.

TANAKA, D. M.; DE OLIVEIRA, L. F. L.; MARIN-NETO, J. A.; ROMANO, M. M. D. *et al.* Prolonged dipyridamole administration reduces myocardial perfusion defects in experimental chronic Chagas cardiomyopathy. **J Nucl Cardiol**, Feb 1 2018.

TORRES, C. M. [Arteriosclerosis of the fine arterial branches of the myocardium (Chagas' coronaritis) & focal myocytolysis in chronic Chagas' heart disease]. **Hospital (Rio J)**, 54, n. 5, p. 597-610, Nov 1958.

TORRES, C. M. Myocytolysis and fibrosis of the myocardium in Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 58, p. 161-182, Nov 1960.

TREIBEL, T. A.; LOPEZ, B.; GONZALEZ, A.; MENACHO, K. *et al.* Reappraising myocardial fibrosis in severe aortic stenosis: an invasive and non-invasive study in 133 patients. **Eur Heart J**, 39, n. 8, p. 699-709, Feb 21 2018.

VARGAS, A. L.; DIAS, B. P.; MOREIRA, H. T.; SIMÕES, M. V. *et al.* Estudo Prospectivo da Função Ventricular e Sobrevida na Fase Aguda da Doença de Chagas em Modelo Experimental Animal. *In: 41º Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2020, São Paulo*. SOCESP.

VOLPE, G. J.; MOREIRA, H. T.; TRAD, H. S.; WU, K. C. *et al.* Left Ventricular Scar and Prognosis in Chronic Chagas Cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol**, 72, n. 21, p. 2567-2576, Nov 27 2018.

WHO. World Health Organization. First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases, 2010, Geneva. p. 172.

WHO, W. H. O. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. ORGANIZATION, W. H. Geneva: WHO/HTM/NTD/. 2017.01 2017.

YILMAZ, A.; FERREIRA, V.; KLINGEL, K.; KANDOLF, R. *et al.* Role of cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR) in the diagnosis of acute and chronic myocarditis. **Heart Fail Rev**, 18, n. 6, p. 747-760, Nov 2013.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO A



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeito do uso prolongado de dipiridamol sobre os defeitos perfusionais miocárdicos reversíveis e o impacto sobre a progressão da cardiopatia em modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica*”, registrado com o número **128/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de julho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 54 hamsters Sírio-Golden fêmeas pesando 120g oriundos da ANILAB. Vigência da autorização: 29/08/2016 a 15/09/2018.

We certify that the Protocol *n° 128/2016*, entitled “*Effects of prolonged dipyridamole use in the myocardial perfusion reversible defects and the impact on heart disease progression in experimental model of chronic Chagas cardiomyopathy*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *08/29/2016*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 54 female Syrian-Golden hamsters weighing 120g from the ANILAB. This certificate is valid until 09/15/2018.

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2016


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