



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Efeitos da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico sobre o
remodelamento cardíaco em cães apresentando cardiopatia
chagásica crônica**

AUTORA: LILIAN MELO PEREIRA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. DEOCLÉCIO ALVES CHIANCA JR.

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ TALVANI

OURO PRETO
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Efeitos da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico sobre o
remodelamento cardíaco em cães apresentando cardiopatia
chagásica crônica**

Autora: LILIAN MELO PEREIRA SILVA

ORIENTADORES: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr.

E Prof. Dr. André Talvani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica estrutural e fisiológica

Ouro Preto

2009

Ao André, amor da minha vida, meu esposo e melhor amigo, e também meu grande mestre. A quem admiro muito pelo vasto conhecimento e pela seriedade com que conduz a pesquisa. Sou infinitamente grata, pelo amor e cuidado constantes, pela disposição para fazer de mim pedra lapidada. Muito obrigada pela confiança depositada em minha capacidade, e especialmente, pela paciência e profissionalismo. Amor, essa conquista é igualmente sua!

Aos meus pais e à vovó-mãe Ila, que sempre apoiaram, de diferentes formas, minha decisão em trilhar para a vida acadêmica. Agradeço por muitas vezes abdicarem de seus próprios sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Por me darem valiosas instruções, de princípios e valores, que não se aprende nos livros e que são essenciais para o alcance da plena vitória. Muito obrigada, eu amo vocês.

À minha irmã Poliana, que sempre teve muito orgulho de mim e torceu pelo meu sucesso. Obrigada! Te amo maninha!

Aos meus lindos cães... que sem saberem, tornaram possíveis as nossas descobertas. E por me proporcionarem tanta alegria com suas brincadeiras, levadezas e carinho no período em que estivemos juntos!

Agradeço à Deus, por sempre me conduzir em triunfo. Por nos permitir desvendar, aos pouquinhos, os fantásticos segredos da Sua maravilhosa ciência. Por colocar pessoas no meu caminho a fim de torná-lo menos pedregoso, são elas:

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a o Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr. por abrir as portas do laboratório (Fisiologia Cardiovascular) para mim e ter-me proporcionado a oportunidade para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. André Talvani pela inefável co-orientação. Muito obrigada por abrir as portas do laboratório (Doença de Chagas) para mim. Obrigada pelo incentivo, pelos ensinamentos e oportunidades...sua preceptoria foi um presente para mim.

*Agradeço à Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia pela imprescindível colaboração. Obrigada pelo suporte na aquisição de kits e material para a realização de muitos procedimentos e também pelo auxílio intelectual com relação ao *Trypanosoma cruzi* e à doença de Chagas...*

Agradeço à Profa. Dra. Rosália Moraes Torres pela realização dos exames ecodopplercardiográficos. Obrigada pelo compromisso e disposição em meio à pouca disponibilidade. Sua contribuição foi essencial para que o trabalho fosse tão primoroso. Agradeço também pela amizade e conselhos.

Agradeço ao Prof. Dr. Wanderson Geraldo-de-Lima pela valiosa colaboração durante a confecção e análises dos exames histopatológicos. Obrigada pela tão oportuna disponibilidade e inestimáveis sugestões. Agradeço também pela amizade e encorajamento diante das inusitadas oportunidades!

Agradeço ao Prof. Dr. Romuel Figueiredo Machado pela sempre gentil recepção, pela imensurável contribuição com a parte matemática, durante as análises dos testes de esforço. Agradeço também pela amizade e...pelo Aquiles!

Agradeço ao Prof. Dr. George Coelho por ceder o eletrocardiógrafo digital e instruir para a realização dos exames (não mostrados na dissertação, mas guardados para os artigos correspondentes).

Agradeço à UFOP e à PROPP pelos frequentes auxílios prestados.

Agradeço à Rottax LTDA pela doação de uma das esteiras elétricas utilizadas neste trabalho

Agradeço à Sanval LTDA pela doação da Sinvastatina.

Agradeço aos alunos Ivo (doutorado), Maira, Álvaro, Karol e Vivian (Iniciação Científica). Como sempre disse, seria inviável a realização desse trabalho por apenas uma pessoa! Vocês foram imprescindíveis, cada um no seu momento, cada um na sua contribuição específica. Muito obrigada pelo compromisso, dedicação e principalmente, disposição! Não foi fácil, não é?!!

Agradeço, particularmente, aos alunos de IC pela tolerância com meu, muitas vezes chatíssimo, perfeccionismo e por não se chatearem com minhas chamadas de atenção! E principalmente, pelo respeito ao seguir minhas orientações com todo cuidado. Por entenderem que “ser metódico pode ser um bom requisito para se tornar um grande cientista”!

Agradeço ao Álvaro e à Karol pela ajuda durante a formatação dessa dissertação.

Agradeço à Lívia pela ajuda com o RT-PCR (não mostrado na dissertação, mas guardado para o artigo)

Agradeço à Laís, Rafael, Lorena, Renata, Régia pela ajuda durante as necrópsias.

Agradeço à Érica e aos funcionários do biotério, responsáveis pelo cuidado dos cães, pela disposição para ajudar diante das casuais “intercorrências” no canil.

Agradeço à Cida, nossa secretária!, por ser sempre tão prestativa e eficiente ao nos ajudar sempre com as burocracias envolvidas no processo. Agradeço também pela amizade e pelas agradáveis conversas...Olá!!!

Agradeço à Larissa, “amiga à primeira vista”! Os verdadeiros amigos marcam nossa vida para sempre...ainda que nos distanciem pelos ventos da vida, você estará sempre na minha memória e coração.

Agradeço à Arlete e à Fabiana, que conheci no laboratório, mas que se tornaram amigas “para todas as horas”. Gosto muito de vocês.

Agradeço à todos os colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pela gostosa convivência. Em especial, ao João Victor, grande parceiro nessa trajetória.

Agradeço à todos os colegas do Laboratório de Doença de Chagas. Tive o privilégio de ser a “agregada”! e poder conviver com pessoas tão prestativas, amigas e também muito divertidas.

Agradeço à Claudinha, pelo socorro quando meus colaboradores não podiam comparecer..., mas principalmente pela amizade. Obrigada pela aconchegante companhia nos momentos nos quais me sentia tão sozinha.

Agradeço ao meu marido André pela cumplicidade e dedicação. Por ter reacendido a chama dentro de mim para que eu recuperasse o sonho de tornar-me pesquisadora. Por todo o suporte. Pelo seu amor, que é o meu bem mais precioso.

Agradeço ao meu pai, José Antônio, que não tendo as mesmas oportunidades na sua juventude, valorizou e tornou possível cada um dos meus passos como estudante. Agradeço à minha mãe, Regina, que apesar de não ser cientista é apaixonada pela ciência!, por “estudar” comigo diversas vezes! E à ambos, por serem compreensivos quando eu estou ansiosa, por serem luz quando eu às vezes me cego, por serem o socorro quando o medo tenta me intimidar...por chorarem comigo, por vibrarem comigo!

Agradeço à minha vovó-mãe Ila, pelas palavras de conforto nos momentos de alta tensão. Por sempre me encorajar e muitas vezes, “despertar”, com sua sabedoria e exemplo de vida.

Agradeço à minha irmã Poliana, pela amizade e carinho. Por ficar sempre na torcida pelo meu sucesso em tudo o que faço!

Agradeço aos meus sogros, Ângelo e Ana Maria, em especial à minha sogra pelo carinho, orações, pela torcida pelo meu sucesso!, e também por ser a melhor anfitriã que já conheci – nas frequentes estadias em sua casa, quando eu ainda me preparava para as provas de seleção do mestrado...

*“Todo caminho é resvaloso. Mas cair não prejudica demais...
A gente levanta, a gente sobe, a gente volta...
O correr da vida é assim: esquentando e esfria, aperta e daí afrouxa.
Sossega e depois desinquieta*

O que ela quer da gente é a coragem!”

João Guimarães Rosa

A fisiopatologia do remodelamento cardíaco na cardiomiopatia chagásica (CC) está baseada na presença do *Trypanosoma cruzi* e de seus antígenos no tecido cardíaco e na complexa resposta inflamatória capaz de induzir fibrose miocárdica, além de alterações na geometria e função cardíacas. Estratégias para amenizar a inflamação e desacelerar o remodelamento cardíaco na CC tornam-se importantes focos de investigação. No presente trabalho, avaliou-se o papel da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico (TFA) sobre a resposta inflamatória e a função cardíaca empregando-se o modelo canino por sua similiaridade clínica/fisiopatológica com o desenvolvimento da CC em humanos. Cães sem raça definida, de ambos os sexos (4 meses de idade), foram infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos, previamente, ao teste de esforço padronizado em esteira elétrica utilizando o limiar de lactato sanguíneo como a condição para definir a frequência cardíaca do TFA. Os cães (20) foram treinados e/ou tratados com 20 mg de Sinvastatina (Sanval), diariamente, durante 3 meses (fase aguda) e 6 meses (fase crônica). Os animais foram submetidos a avaliações ecodopplercardiográficas e imunopatológicas. Nossos resultados mostraram que o TFA aumentou as concentrações plasmáticas de TNF-alfa e IFN-gama nas fases aguda e crônica da infecção, enquanto a Sinvastatina foi capaz de normalizar os níveis plasmáticos dessas citocinas durante ambas as fases da doença. O TFA também reduziu a concentração de Il-10 na fase crônica da doença, resultado não observado para o grupo tratado com Sinvastatina. Além disso, a Sinvastatina reduziu a fibrose no tecido cardíaco dos cães sedentários e treinados, amenizando o remodelamento cardíaco induzido pela inflamação e melhorando significativamente os parâmetros de função ventricular (delta D, índice cardíaco, fração de ejeção e diâmetro sistólico/diastólico do ventrículo esquerdo). As estatinas mostraram-se capazes de modular a resposta inflamatória e propiciar benefícios funcionais cardíacos, revertendo o processo de aceleração do remodelamento cardíaco durante a CC, principalmente em associação com o TFA. Nossos resultados sugerem que as estatinas (Sinvastatina) devem ser melhor investigadas como provável terapia profilática e/ou complementar contra o remodelamento cardíaco na CC.

Palavras-chaves: Cardiopatia chagásica – remodelamento cardíaco- Sinvastatina –
treinamento físico aeróbico – resposta inflamatória

The pathophysiology of Chagas cardiomyopathy (CC) remodeling is based on the presence of *Trypanosoma cruzi* in heart tissue and on a complex inflammatory response that leads to a myocardium fibrosis and alterations in conductive and functional heart parameters. New strategies are emerged to avoid this cardiac inflammation/remodeling during CC. Here, we evaluated the role of statins and the exercise training (ET) on the inflammatory response and on heart functionality using the dog model due its high similarity to human CC. Male and female Mongrel dogs (4 months) infected with Y strain of *T.cruzi* were, previously, submitted to a standardized treadmill testing using the blood lactate threshold as a condition to define the training cardiac frequency. Dogs (n=20) were trained and/or treated orally with 20mg of Simvastatin (Sanval) daily during three (acute phase) and six months (chronic phase). Animals were submitted to the ECG, echocardiogram and immune-pathology evaluations. Our preliminary results showed that ET increases the plasma concentration of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-10 after 6 months of ET while Simvastatin was able to normalize the plasmatic level of these cytokines during acute and chronic phase of infection. In addition, Simvastatin reduces the inflammatory infiltration/fibrosis in heart tissue from sedentary and ET, avoiding inflammatory-induced cardiac remodeling and ameliorating functional ventricular parameters (delta D, cardiac index, ejection fraction and the end diastolic/systolic diameter of left ventricle) in those trained dogs. Our data suggest that statins must be better investigated as a complementary and/or prophylactic therapy against cardiac remodeling in CC, especially by its capacity to bring good benefits to immune and ventricular parameters, specially, in association with aerobic labor activities.

Keywords Chagasic Cadiopathy – Cardiac remodelling – Simvastatin – Aerobic training – inflammatory response

Tabela 1 – Características farmacológicas das estatinas

Tabela 2 – Parâmetros individuais para o estabelecimento do programa de treinamento para os cães infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*

Tabela 3 – Relação E/A sob influência da Sinvastatina e da atividade física aeróbica em cães com cardiopatia chagásica crônica

Figura 1 – Curva de interpolação para determinação do *Individual Anaerobic Threshold*

Figura 2 – Estabelecimento da frequência cardíaca de treinamento individual

Figura 3 – Curva de parasitemia

Figura 4 - Efeitos da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias

Figura 5 - Efeitos da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico sobre a síntese de citocinas anti-inflamatórias

Figura 6 – Representação morfológica do coração dos cães

Figura 7 – Relação existente entre o peso do coração e o peso corporal dos animais

Figura 8 – Sinvastatina reduz o infiltrado inflamatório no ventrículo direito

Figura 9 – Sinvastatina reduz a deposição de colágeno no ventrículo direito

Figura 10 – Fotomicrografia de cortes de fragmentos do ventrículo esquerdo

Figura 11 – Sinvastatina reduz a deposição de colágeno no ventrículo esquerdo

Figura 12 – Sinvastatina reduz o infiltrado inflamatório no átrio direito.

Figura 13 – Sinvastatina reduz a deposição de colágeno no átrio direito

Figura 14 – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Figura 15 – Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.

Figura 16 – Fração de ejeção ventricular esquerda “Simpson”

Figura 17 – Fração de encurtamento/Delta D

Figura 18 – Volume diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo

Figura 19 – Índice Cardíaco

Figura 17 – Volume diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo

TGF-beta	Fator de Crescimento Tumoral
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral
IgM	Imunoglobulina M
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
FCI	Fase Crônica Indeterminada
CCC	Cardiopatía Chagásica Crônica
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
BCRD	Bloqueio Completo de Ramo Direito
HBAE	Hemibloqueio
BCRE	Bloqueio Completo de Ramo Esquerdo
IFN-gama	Interferon gama
IL	Interleucina
NO	Óxido Nítrico
HMG-CoA	b-hidroxi-b-metil-glutaril-CoA
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
MMP	Matríz Metaloproteinase
Th1	T Helper tipo 1
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
FC	Frequência Cardíaca
FC tr	Frequência Cardíaca de Treinamento
IAT	<i>Individual Anaerobic Threshold</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino
PBS	salina tamponada com fosfato
IP	Índice de Peso
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P
DVED	Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Diástole
DVES	Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Sístole
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
VVES	Volume do Ventrículo Esquerdo na Sístole
VVED	Volume do Ventrículo Esquerdo na Diástole

VE	Ventrículo Esquermo
DC	Débito Cardíaco
TLR	<i>Toll like receptor</i>
Myd88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1.Introdução.....	1
1.1 – Remodelamento cardíaco.....	1
1.2 – A doença de Chagas.....	4
1.3 – Cardiopatia Chagásica Crônica: aspectos clínicos e imunopatológicos.....	6
1.4 – A aplicabilidade do modelo canino no estudo da cardiopatia chagásica.....	9
1.5 – O remodelamento na cardiopatia chagásica – uma visão imunopatogênica.....	9
1.5 (i) – O grupo farmacológico das estatinas.....	12
1.5 (ii) – O treinamento físico aeróbico.....	15
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Animais, material e Métodos.....	19
3.1 – Descrição do modelo canino.....	19
3.2 – Infecção pelo <i>T.cruzi</i>	19
3.3 – Confirmação da infecção e avaliação da parasitemia.....	20
3.4 – Esquema terapêutico com a Sinvastatina.....	20
3.5 – Metodologia para o estabelecimento da frequência cardíaca de treinamento utilizando o método do limiar de lactato sanguíneo ou limiar anaeróbico.....	20

3.6 – Treinamento físico diário dos animais.....	23
3.7 – Venupunção para avaliação imunológica.....	24
3.8 – Ensaio imunoenzimático (ELISA) para TNF-alfa, IFN-gama e IL-10.....	24
3.9 – Avaliação ecodopplercardiográfica.....	25
3.10 – Necrópsia e coleta de fragmentos cardíacos.....	27
3.11 – Avaliação histopatológica do tecidos cardíaco.....	28
3.12 – Análise Estatística.....	29
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 – Determinação da frequência cardíaca de treinamento para os cães previamente à infecção pelo <i>T.cruzi</i>	30
4.2 – Efeitos da Sinvastatina e do treinamento aeróbico sobre o <i>T.cruzi</i> circulante.....	33
4.3 – Efeitos da Sinvastatina e do treinamento aeróbico sobre a resposta de citocinas pró- e anti-inflamatórias na doença de chagas experimental.....	36
4.4 – Avaliação macroscópica e histopatológica do tecido cardíaco após o uso diário de Sinvastatina e do treinamento físico.....	40
4.5 – Efeitos da Sinvastatina e da treinamento físico aeróbico sobre a função cardíaca.....	52
 5. CONCLUSÃO.....	62
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1.0. Introdução

1.1. Remodelamento cardíaco

O remodelamento cardíaco é um processo que envolve um conjunto de alterações genéticas, moleculares, neurohumorais, celulares e intersticiais cardíacas, manifestas clinicamente como modificações de tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta à determinada agressão aguda ou crônica (Jessup et al. 2003; Cohn et al. 2000; Remme 2003). O termo não necessariamente define uma condição patológica, pois durante o desenvolvimento normal do coração, o remodelamento cardíaco é considerado fisiológico (Sutton et al. 2000). Além disso, ele pode ser adaptativo e benéfico, como aquele observado em atletas (Cohn et al. 2000). Apesar dessas situações normais se enquadrarem aos mecanismos de remodelamento, o termo é geralmente usado para descrever as alterações patológicas comuns à múltiplas agressões ao coração. Ele pode ocorrer em resposta às distintas condições etiológicas, mas as rotas moleculares e bioquímicas desencadeadas por um agente/situação agressora, e que geralmente aceleram seu desenvolvimento, são comparáveis.

Streeter e Basset (1966 e 1969) descreveram a complexa arquitetura do miocárdio e o papel chave que a matriz extracelular desempenha para manter o alinhamento dos cardiomiócitos nas paredes cardíacas. Eles demonstraram que a orientação dos cardiomiócitos e os ângulos das fibras cardíacas são altamente organizados e direcionados de forma contínua, do endocárdio para o epicárdio. Estes autores mostraram ainda, que a rede de proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno do tipo I e do tipo III, é que fornece a integridade estrutural aos cardiomiócitos adjacentes. Portanto, essa rede contribui consideravelmente para a função de bomba do coração, que se dá através do encurtamento coordenado das fibras cardíacas.

Vários estudos mostraram também que a matriz extracelular do miocárdio contém uma extensa reserva de moléculas bioativas (Booz et al. 1995; Briest et al. 2004; Chen et al. 2004), como a angiotensina II e a endotelina-1 que parecem estar cerca de 100 vezes mais concentradas dentro do interstício do miocárdio que no plasma (Dell'Italia et al. 1997; Ergul et al. 2000; Wei et al. 1999). Citocinas regulatórias, anti e pró-inflamatórias encontram-se, também, altamente compartimentalizadas dentro do interstício do miocárdio (Diwan et al. 2004) enquanto fatores de crescimento, como TGF-beta, apareceram estocados em forma latente na matriz extracelular (Nakajima et al. 2000). Essas e outras reservas formam uma fonte de moléculas que podem ser ativadas por

diferentes estímulos e perturbar diretamente o arranjo da matriz extracelular e consequentemente, a função dos cardiomiócitos (Lee et al. 1997; Thihault et al. 2001). Os cardiomiócitos, além de sofrerem necrose e apoptose devido à múltiplos possíveis estímulos, podem apresentar sua morfo-fisiologia diretamente afetada por alterações na estrutura da matriz extracelular. Diante de determinados estímulos estas células podem se submeter, por exemplo, à hipertrofia que é o aumento no tamanho de elementos contráteis (MacKenna et al. 2000; Zimmerman et al 2000; Borer et al. 2002; Cheung et al. 2006) e talvez hiperplasia ou aumento no número de miócitos (Leri et al 2002; Anversa & Kajstura 1998). Qualquer que seja a resposta da célula contrátil mediante alguma agressão sua consequência será, em maior ou menor grau, a desestruturação e disfunção global do miocárdio, ainda que à longo prazo.

É amplamente reconhecido, que o remodelamento cardíaco pode ser desencadeado pelo estiramento mecânico das paredes cardíacas, como nas condições nas quais há sobrecarga de pressão ou volume, assim como pela perda direta dos cardiomiócitos (ex. infarto do miocárdio, miocardites, processos autoimunes) ou pela liberação anormal de moléculas sinalizadoras (Kohn et al. 2007; Pepys et al. 2006; Saini-Chohan & Hatch 2009; Karpinski et al 2009). Esta última, com repercussões potencializadoras dos resultados do estresse fisiológico sobre os cardiomiócitos remanescentes (no caso de morte celular) ou não (no caso de sobrecarga sobre os cardiomiócitos). A perda de cardiomiócitos pode ocorrer por necrose ou apoptose, sendo a primeira em geral, consequente de eventos isquêmiantes ou ocasionada por toxicidade e inflamação. A necrose é a principal forma de morte celular, que leva à rápida destruição dos miócitos e pode desencadear uma resposta inflamatória significativa (Cotran et al. 1999). Essa forma de morte celular poder ser denominada de (i) localizada - como ocorre no infarto do miocárdio ou (ii) difusa - como nas cardiomiopatias dilatadas.

Por outro lado, a apoptose, ou morte celular programada, requer a ativação de uma cascata molecular que leva à degradação do DNA sem resposta inflamatória. Os fatores que propiciam a apoptose são diversos, incluindo neurohormônios, citocinas, hipóxia, ativação de receptores da superfamília do TNF etc (Haunstetter et al. 1998, Khoynzhad et al. 2007). Entretanto há cada vez mais evidências a respeito de um possível *cross over* entre estes dois tipos de morte celular, onde há uma passagem de um evento para o outro, sob algumas condições patológicas que compartilham mecanismos similares (Umansky & Tomei 1997, Dorn 2009). A existência de ambos os tipos de morte

celular simultaneamente no miocárdio pode determinar o grau final de lesão miocárdica (James 1998, Dorn 2009).

Uma visão pessimista dessa situação é sustentada pela expressão “aquilo que gera a morte celular também gera fibrose reparativa” e esta, em última instância, levará a um declínio das funções cardíacas (Colucci et al. 2005). Diante da perda de elementos contráteis e, numa tentativa compensatória de se manter a função cardíaca, é desenvolvido o quadro de hipertrofia das células contráteis ainda preservadas e também, aumento no número e tamanho daquelas não contráteis. A deformação mecânica (em determinado grau) das paredes cardíacas, sem solução de continuidade (após a perda celular) ou mesmo com esta íntegra, leva à alteração na expressão de genes no miocárdio capazes de intervir na modificação da função de canais iônicos do sarcolema, via ativação de mediadores de hipertrofia, como o sistema de cálcio-calmodulina e calcineurina (Yamazaki et al. 1998). Nesse ponto, deve-se ressaltar a participação de moléculas presentes na matriz extracelular não mais em forma latente ou compartimentalizada, mas sim circulantes e ativas. Uma série de neurohormônios e mediadores autócrinos/parácrinos de hipertrofia são expressos, como noradrenalina, angiotensina II, endotelina-1, citocinas, quimiocinas e outros peptídeos bioativos (Saini-Chohan & Hatch 2009; Adams 2009). Os sinais desses e de outros mediadores são transmitidos via proteínas sinalizadoras, incluindo as proteínas ras, Gαq e Gαs, que ativam uma família de enzimas capazes de induzir a expressão de genes fetais que alterarão a síntese de proteínas contráteis - marca da hipertrofia patológica (Braunwald et al. 2000; Weber et al. 1991). Sendo assim, a hipertrofia, inicialmente, amenizaria os desequilíbrios desencadeados, permitindo a manutenção da função até certo ponto. Porém, em determinado momento (no qual a sobrecarga ultrapassa a capacidade do coração de hipertrofiar) passa a se estabelecer um círculo vicioso que levará à alteração da geometria cardíaca com consequente alteração da contratilidade e relaxamento cardíacos. A partir desse ponto, como o remodelamento cardíaco será sempre insuficiente e ineficiente, as alterações progressivas tornar-se-ão deletérias e associadas a um mau prognóstico (Gaudron, 1993; White 1987; Timonen 2008). Essas alterações progressivas fornecerão a base para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca observada em cardiopatias de diferentes etiologias (Cohn et al. 2000; Zornoff et al. 2002; Saini-Chohan & Hatch 2009), inclusive na cardiopatia deflagrada a partir da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Garzoni et al. 2008; Benchimol-Barbosa 2009).

1.2. A doença de Chagas

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado intracelular, é o evento desencadeador da doença de Chagas, descoberta e descrita pelo médico sanitário brasileiro Carlos Chagas na cidade de Lassance/MG (Chagas 1909). Estima-se que existam 13 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi*, e que haja 75 milhões de pessoas em áreas de risco para a infecção (WHO 2005). Além disso, em países considerados endêmicos para a doença, a infecção através de transfusões e transplantes representa ainda um sério problema de saúde pública (Schmunis 2007). Apesar da descrição original da doença completar um século neste ano de 2009, seu impacto sobre a população latino-americana ainda é desastroso. A forma mais usual de transmissão do *T. cruzi* é pela inoculação transcutânea do mesmo através das excretas contaminadas de vetores hemípteros hematófagos da família Reduviidae, popularmente conhecidos como barbeiros. Contudo, o *T. cruzi* pode ser transmitido frequentemente por via oral, via congênita e por transfusão de sangue, e menos comumente por acidentes de laboratório, aleitamento materno e transplante de órgãos. Uma outra via, teoricamente possível, mas extremamente rara, é a transmissão sexual (Brener et al. 1987).

Fase aguda da doença:

Os sintomas de fase aguda da infecção iniciam-se aproximadamente uma semana após a entrada do parasito na circulação. Nesta fase, o indivíduo pode apresentar sinais relevantes como febre, linfadenopatia e um complexo oftálmico-ganglionar (sinal de Romanã). Ainda, é possível que alguns indivíduos apresentem meningoencefalite ou uma miocardite aguda, caracterizada por uma intensa reação inflamatória adjacente à ruptura dos ninhos de amastigotas (após instalação do parasito no miocárdio). Estas manifestações podem, com uma baixa frequência, ocasionar a morte do indivíduo durante a fase aguda da doença de Chagas.

Os indivíduos chagásicos, com vários anos de infecção, geralmente não se recordam desta sintomatologia de fase aguda. Isso ocorre devido a uma analogia feita a outras infecções frequentes como a gripe, infecção bacteriana, helmíntica ou mesmo uma resposta inflamatória de cunho inespecífico. Desta forma, a busca pelo atendimento médico há 30 ou 40 anos certamente foi ocasional, visto que o homem do campo era

adaptado a combater alguns de seus males com infusões, auto-medicação ou até mesmo através de orações (benzeções). E pelo curto período de permanência da fase aguda, estes artefatos curativos provavelmente induziam um falso aspecto de eliminação da infecção.

A fase aguda ainda mantém uma característica peculiar que auxilia em seu diagnóstico: a alta prevalência de formas tripomastigotas no sangue circulante. Desta forma, basta uma análise de uma gota de sangue entre lâmina-lamínula para a identificação do parasito, como realizado por Carlos Chagas em Lassance, no início do século passado. Ainda hoje, tanto em países com zonas endêmicas de infecção ou mesmo em laboratórios de pesquisa experimental, o aumento da parasitemia no sangue circulante é um bom indicativo de fase aguda (exceto para os casos de imunossupressão, onde uma “reagudização” ocorre em paralelo com as manifestações estabelecidas na fase crônica).

Aliado ao exame hematológico direto, a evolução da fase aguda possibilita, após 2 a 3 meses de infecção, a detecção de anticorpos IgM circulantes contra o *T. cruzi* (com alta incidência de resultado falso-positivo).

Fase crônica da doença:

A fase crônica da doença de Chagas inicia-se aproximadamente dois meses após infecção inicial. Nesta fase, os parasitos tornam-se dificilmente detectáveis na corrente sanguínea, sendo necessário a utilização de métodos indiretos, como xenodiagnóstico (Bronfen et al. 1989), hemocultura (Chiari et al 1989), sorologia (Luquetti 1990) ou a técnica direta da reação de cadeia da polimerase – PCR (Jones et al, 1993; Vago et al. 1996) para sua detecção. Existem 16 a 18 milhões de pessoas afetadas pela fase crônica da infecção chagásica ocasionando aproximadamente 50.000/ano (Umezawa et al. 2001). Na fase crônica, alguns indivíduos apresentam manifestações clínicas características e outros, nenhum sinal ou sintoma. Essa diferença levou às subclassificações da fase crônica em: forma indeterminada ou assintomática, forma cardíaca e forma digestiva.

A forma indeterminada da doença de Chagas acomete cerca de 50% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, em áreas endêmicas. Em 1984, o conceito de forma crônica indeterminada (FCI) foi reavaliado por peritos reunidos em Araxá, MG, tendo sido estabelecidos os seguintes critérios para sua caracterização (I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, 1984):

- (i) positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas;

- (ii) ausência de sintomas e/ou sinais da moléstia;
- (iii) eletrocardiograma convencional normal;
- (iv) estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

Porém, sabe-se hoje que, se por um lado a terminologia “ausência de alterações ou sinais” ainda é eficaz para uma visão populacional global ou epidemiológica dos indivíduos infectados, por outro lado ela pode apresentar falhas para uma visão individualizada da doença. Com o advento de novas estratégias biotecnológicas para o diagnóstico cardíaco, alguns indivíduos anteriormente diagnosticados com FCI, quando submetidos a exames mais sensíveis, apresentam alterações não desprezíveis do ponto de vista clínico, e com valor prognóstico de evolução da doença (Ribeiro & Rocha, 1999; Rocha et al. 2002, Rocha et al. 2007).

Anualmente, 2 a 5% dos indivíduos apresentando a forma crônica indeterminada evoluem para a forma cardíaca ou digestiva da doença. As razões para esta evolução ainda são objetos de pesquisa básica e aplicada.

1.3. Cardiopatia chagásica crônica: aspectos clínicos e imunopatológicos

A forma cardíaca da doença de Chagas, isto é, a cardiopatia chagásica crônica (CCC) acomete 30 a 40% dos indivíduos infectados pelo *T.cruzi*, e suas alterações compreendem a principal causa de óbito na doença de Chagas. Em geral, as alterações cardiovasculares, ocorrem 15 a 20 anos após a infecção inicial, coincidindo com a fase adulta do indivíduo. Essa observação, juntamente, com o fato da maioria dos indivíduos chagásicos provavelmente ter se infectado ainda na infância, explicaria o número crescente de pacientes com faixa etária entre 20 e 70 anos nos principais centros de referência para doença de Chagas do país (Prata, 2001). A cardiopatia chagásica crônica apresenta como característica principal o caráter progressivo e fibrosante. O que se compreende como caráter progressivo está, muitas vezes, ligado à série crescente de eventos imunopatológicos envolvendo o órgão cardíaco infectado pelas formas amastigotas do parasito. Observa-se, nesta série de eventos, destruição direta dos cardiomiócitos, gerando no indivíduo chagásico alterações na contratilidade miocárdica (dispnéia, cansaço e edema). Este quadro está, em parte, associado ao caráter fibrosante descrito inicialmente para a CCC (Andrade & Andrade, 1980). Além da perda de

cardiomiócitos, há também destruição de feixes nervosos do coração que leva à quadros clínicos de comprometimento da condução e do ritmo (síncope e palpitações) (Dávila et al. 1998).

A existência de um infiltrado inflamatório desencadeado pela presença do parasito ou de seus fragmentos antígenicos no miocárdio de chagásicos crônicos (Higuchi et al 1993; Jones et al 1993) amplifica a resposta inflamatória local, através de mediadores químicos e escalona-se ao longo do endomísio, dissociando os feixes de fibras cardíacas, afastando-as entre si e dos próprios capilares sanguíneos. Como consequência dessa inflamação local, observa-se predomínio de edema e congestão vênulo-capilar que também contribui para o afastamento das fibras miocárdicas. Com o processo inflamatório, surge também uma neoformação conjuntivo-vascular a partir do endomísio, a qual substitui as fibras cardíacas - “fibrose de substituição” (Lopes et al 1987). Esse depósito de tecido conjuntivo, circundando os miócitos cardíacos, enfraquece a bomba cardíaca, e contribui mais tarde, para a hipertrofia miocárdica. Outro fator que, além de constituir o quadro gerador da morte súbita associada à doença de Chagas, contribuirá para o efeito final de dilatação das câmaras cardíacas, é a disautonomia, gerada pela destruição do sistema nervoso intracardíaco. O acúmulo de alterações é responsável pela instalação da disfunção contrátil do coração na cardiomiopatia chagásica.

A insuficiência cardíaca congestiva (ICC) é uma das principais manifestações geradas pela cardiopatia chagásica crônica. Durante os eventos da ICC há o predomínio da descompensação ventricular direita ou biventricular, retorno venoso prejudicado, edema de membros inferiores, ingurgitação de jugular, hepatomegalia, ascite e outros sinais de congestão sistêmica, principalmente após congestão pulmonar. Além disso, a cardiopatia dilatada torna-se outro fator importante durante a ICC. Em consequência da dilatação, expressa pela expansão e contratilidade prejudicada, observa-se sinais de baixo débito e pressões intracardíacas aumentadas (Davies et al. 2000). Outro aspecto a ser relatado durante a CCC é a lesão vorticilar ou aneurisma de ponta. Esta alteração, identificada através da ecocardiografia, possui maior prevalência em pacientes com insuficiência cardíaca. A lesão vorticilar caracteriza-se por um adelgaçamento e hipotrofia do miocárdio na região vorticilar, predispondo os eventos arritmogênicos e fenômenos tromboembólicos.

O entendimento dos fenômenos tromboembólicos tornou-se fundamental durante a CCC, principalmente pelo acometimento de órgãos vitais como pulmões, cérebro, rins, baço e mesentério. Sabe-se, por exemplo, que durante a CCC existe a

formação de zonas de estase sanguínea principalmente no átrio esquerdo e extremidade ventricular esquerda. Este processo é responsável para a formação de trombos murais principalmente em associação à fibrilação atrial. O desprendimento destes trombos acarreta embolia e aparecimento secundário de infartos em diversos órgãos, tanto da pequena quanto da grande circulação. Clinicamente, o tromboembolismo associado à CCC apresenta-se por uma manifestação súbita de dispnéia, dor torácica, podendo ser acompanhado de cianose, distensão jugular, choque e finalmente um quadro sincopal.

Além dos fenômenos tromboembólicos, sabe-se que o caráter arritmogênico da miocardiopatia chagásica crônica é também responsável pela elevada prevalência de 30% das mortes súbitas avaliadas em pacientes necropsiados provenientes de áreas endêmicas e 49,4% dos casos avaliados em ambiente hospitalar (Rocha & Moura 1999, Prata et al. 1985). Dentre os distúrbios mais comuns na formação e condução do estímulo elétrico encontra-se o bloqueio completo do ramo direito (BCRD) associado em 40% dos casos com o hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE). O BCRD isolado é indicativo de lesão com significado prognóstico variável; porém, quando associado ao HBAE demonstra um comprometimento geralmente mais grave da função cardíaca. Estes bloqueios, quando associados à extra-sístolia ventricular freqüente ou multifocal, remetem o quadro do paciente a um caráter de maior gravidade.

O aparecimento das extra-sístolias ventriculares são bastante comuns durante a CCC, sendo encontradas em bigeminismo, múltiplas ou polifocais, com tendência a surgirem ou se intensificarem com o esforço físico. Na cronologia das alterações eletrocardiográficas, as extra-sístolias ventriculares representam um fenômeno de aparecimento tardio em relação aos distúrbios de condução ventricular. A gravidade das extra-sístolias encontra-se relacionada com a predisposição a períodos de taquicardia ventricular não-sustentada, fibrilação ventricular e possível morte súbita (Rocha & Moura 1999). Acredita-se, inclusive, que a arritmia ventricular complexa seja mais comum em pacientes chagásicos que em outras cardiopatias dilatadas. Fato interessante é que estas arritmias complexas, incluindo a taquicardia ventricular não-sustentada e sustentada, podem ocorrer em pacientes chagásicos com função ventricular esquerda global preservada (Marin-Neto et al. 1999).

Finalmente, dentre os distúrbios de condução encontrados durante a CCC, são considerados de pior prognóstico os bloqueios atrioventriculares completos, a fibrilação

atrial, o bloqueio completo de ramo esquerdo (BCRE), além das já pré-citadas extra-sístoles ventriculares multifocais.

1.4. A aplicabilidade do modelo canino no estudo da cardiopatia chagásica

Para o melhor entendimento dos eventos imunopatológicos pertinentes à doença de Chagas crônica, a identificação de um modelo experimental que reproduza parte dos eventos imunopatogênicos e clínicos observados em seres humanos, torna-se primordial. Apesar de o modelo murino ser largamente empregado devido ao seu fácil manuseio, baixo custo e apresentação de resultados mais homogêneos devido à vasta rede de linhagens genéticas desenvolvidas para esses roedores (Araújo-Jorge & Castro, 2000), a vida média desses animais torna-se um fator limitante. Apresentando uma vida média de aproximadamente dois anos, o modelo murino não reproduz algumas alterações fisiopatológicas inerentes dos seres humanos.

Ao contrário dos roedores, o cão apresenta-se como um modelo de estudo um pouco mais oneroso (espaço físico, alimentação e cuidados médicos), mas em contrapartida constituem animais de fácil manuseio, capazes de sobreviver de 15-20 anos e sendo o animal jovem altamente susceptível à infecção pelo *T. cruzi*. Nesse sentido, tal qual o homem, o cão apresenta a fase aguda e crônica (forma indeterminada e cardíaca) de forma bem distinta, apresentando para a forma cardíaca um caráter inflamatório, fibrosante e evolutivo. Diferentes trabalhos, inclusive de nosso laboratório, têm demonstrado que cães infectados pelo *T. cruzi* apresentam um quadro clínico-patológico e alterações eletrocardiográficas superponíveis àqueles observados em seres humanos com a cardiopatia chagásica crônica (Laranja 1953, Lana et al. 1992, Guedes et al. 2009).

Diante dos atuais achados imunopatológicos e clínicos, o cão preenche todos os requisitos necessários para o modelo ideal estabelecido pelo Comitê de doença de Chagas do Programa Especial de Treinamento e Pesquisa em Doenças Parasitárias da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1984): (i) permitir o isolamento do parasito ao longo da infecção; (ii) apresentar reações sorológicas positivas indicativas da persistência da infecção; (iii) apresentar manifestações clínicas da doença de Chagas crônica; (iv) desenvolver miocardite,

miosite e outras alterações patológicas que caracterizem a doença e, finalmente, (v) induzir a resposta imune contra o tecido do hospedeiro.

1.3. O remodelamento na cardiopatia chagásica – uma visão imunopatogênica

A participação do *T. cruzi* na etiologia da forma crônica da doença de Chagas tem sido objeto de intensa discussão nas últimas décadas, embora o papel do parasito na patologia da fase aguda seja um consenso (Brenner & Gazzinelli 1997). Alguns estudos demonstram que respostas auto-reativas podem ocorrer durante a infecção pelo *T. cruzi* e, por isso, por longo tempo a hipótese da autoimunidade foi considerada como um fator desencadeador da patologia de fase crônica e, por conseguinte, da cardiopatia chagásica (Kalil & Cunha-Neto 1996, Engman & Leon 2002). Além disso, é postulado que respostas auto-reativas de células T e B sejam resultado de um mimetismo molecular entre antígenos do parasito e antígenos do hospedeiro, ou mesmo de uma ativação *by stander* devido à grandes proporções de antígenos próprios que o hospedeiro liberaria devido à lise de células durante a infecção (Engman & Leon 2002). De acordo com essa hipótese, após o desencadeamento dessas respostas autoimunes, o parasito não mais seria o principal agente desencadeador da patogênese, mas sim a resposta autoimune. Dessa forma a fase crônica seria considerada uma doença autoimune pós-infecciosa. Contudo, nos últimos anos, essa hipótese de autoimunidade da fase crônica tem sido rediscutida à luz de alguns achados como (i) a ausência de correlação entre a presença de anticorpos auto-reativos e a patologia (Tarleton 2001), (ii) a presença de DNA ou antígenos de *T. cruzi* associados às lesões inflamatórias em pacientes (Palomino et al. 2000) ou mesmo (iii) a exacerbação da infecção com o *T. cruzi* em situações de imunossupressão (Cançado 1999).

Atualmente, a hipótese melhor aceita seria que a persistência do *T. cruzi* juntamente com uma resposta imune descontrolada em alguns indivíduos resultaria em uma inflamação auto-sustentada em tecidos infectados (podendo ter inclusive eventos autoimunes), o que poderia ocasionar lesões graves durante a fase crônica da doença (Dutra et al. 2007, Teixeira et al. 2002). Esses achados sugerem que a eliminação do *T. cruzi* e de seus componentes antigênicos poderia estabilizar a evolução da doença e suas consequências irreversíveis nos órgãos afetados (ex. coração). Assim, o componente inflamatório passa a ser um fator predominante na gênese da cardiopatia chagásica e, peça chave para o processo de remodelamento pós-inflamação.

Já na fase aguda da doença, devido ao elevado parasitismo circulante, uma intensa produção/expressão de citocinas pró-inflamatórias é desencadeada tanto pelas células imunes circulantes quanto pelo próprio miocárdio (Talvani et al. 2000; Guedes PM et al. 2009). A produção elevada de mediadores é então importante para a contenção replicativa do parasito, visto que o controle existe. A resposta responsável por tal evento é principalmente do tipo 1, ou seja, dependente de IFN-gama. Linfócitos do tipo CD8+ expressando granzima A e macrófagos produtores de TNF-alfa são as células inflamatórias que predominam no miocárdio (D'avila Reis et al. 1993). A resposta inflamatória celular, juntamente com produção de intermediários reativos de oxigênio/nitrogênio (Silva et al. 2002) e de outros mediadores inflamatórios contribuiria para o aparecimento de necrose e fibrose nas lesões cardíacas associadas à infecção pelo *T. cruzi*.

De fato, a resposta imune desenvolvida na infecção pelo *T. cruzi* é bem caracterizada. Em camundongos em fase inicial da infecção, por exemplo, macrófagos reconhecem tripomastigotas através de receptores do tipo *Toll* (TLR-2, TLR4 e TLR-9), ativando a transcrição de genes de citocinas via Myd88, uma molécula adaptadora intracelular (Campos & Gazzinelli, Bafica et al. 2008). As citocinas IL-12 e TNF-alfa são produzidas e facilitam a polarização de células T CD4+ e T CD8+ para o tipo 1 (Campos & Gazzinelli 2004). O IFN-gama é essencial para o controle da infecção e produzido por essas células e, juntamente com o TNF-alfa, ativam macrófagos fazendo-os exercerem um papel essencial no controle da replicação parasitária através da produção de óxido nítrico - NO (Silva et al. 2002). Contudo, há evidências de que mecanismos independentes de NO, mas dependentes de IFN-gama também são importantes para esse controle parasitário (Santiago et al. 2005). As citocinas IL-4 e IL-10 também são produzidas de forma a controlar a resposta imune do tipo 1 e a excessiva inflamação que esse tipo de resposta desencadeia, mas sabe-se que essas citocinas podem potencialmente interferir na capacidade de eliminação e controle parasitário no hospedeiro mamífero (Soares et al. 2001).

Finalmente, um grupo especial de citocinas também exerce papel fundamental no processo de remodelamento cardíaco induzido pela inflamação: as quimiocinas. As quimiocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular com características comum no recrutamento seletivo de diferentes tipos leucocitários para o sítio da inflamação, através de gradientes de concentração e conforme a expressão de seus receptores nessas populações celulares (Frangogiannis 2004; Filippatos G et al. 2003). Essas quimiocinas apresentam participação na doença de Chagas tanto na fase inicial quanto no estabelecimento e evolução da cardiopatia chagásica e, parte delas, apresenta-se dependente de IFN-gama (Talvani et al.

2000, Teixeira et al. 2002). Estudos realizados em seres humanos identificaram importantes correlações clínicas entre peptídeos/proteínas inflamatórias circulantes, em alto grau de especificidade, com a disfunção ventricular esquerda em portadores de CCC. Estes resultados demonstraram que a síntese de algumas citocinas/quimiocinas como TNF-alfa, CCL2/MCP-1 e seus receptores apresentavam boa correlação com o aumento da disfunção cardíaca (Talvani et al. 2004 a,b), o que reforça a importância desses mediadores inflamatórios no mecanismo desencadeador ou perpetuador do remodelamento cardíaco na doença de Chagas.

Sendo assim, uma vez que o parasito persistirá liberando seus antígenos no hospedeiro, conseqüentemente, haverá uma estimulação constante do sistema imune tornando-se persistente o processo inflamatório no miocárdio, conclui-se que a resposta imune na fase crônica da doença de Chagas é fundamental para o desenvolvimento de lesões cardíacas severas. Por isso, torna-se extremamente relevante investigar possíveis formas de manipulação direta ou indireta dessa resposta inflamatória durante a infecção chagásica. Mais recentemente, algumas novas abordagens têm sido levantadas à luz dos conhecimentos atuais sobre imunofarmacologia e fisiologia do exercício: (i) a efetiva ação de fármacos cardiovasculares e (ii) da atividade física afetando diretamente a resposta imune humana. Neste sentido, a avaliação desses fatores, diretamente associados à rotina diário dos pacientes acometidos pela doença, contribuiria direta ou indiretamente para a compreensão do quadro de remodelamento e evolução clínica da CCC.

1.4. O grupo farmacológico das estatinas:

As estatinas são os fármacos mais prescritos no mundo, dada sua importância sobre o efeito redutor do colesterol endocelular em todas as células do organismo e, por conseqüência, também atuarem na prevenção e controle de doenças cardiovasculares (Sposito et al. 2007, Findlay 2007). Seu mecanismo de ação se dá através da inibição competitiva da ligação entre a enzima b-hidroxi-b-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) à sua enzima alvo, a HMG-CoA redutase, bloqueando de forma eficiente a produção do mevalonato e demais produtos da via de biossíntese do colesterol (Endo 2004). Em conseqüência disso, a síntese de colesterol torna-se reduzida nos hepatócitos levando a uma supra-regulação de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Rader 2007). A presença de maior número de receptores LDL determina maior captação de partículas LDL (ricas em colesterol) da circulação reduzindo a

concentração sérica de colesterol. Os receptores de LDL, além de internalizar LDL, internalizam também remanescentes de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), ou seja, as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) que são capturadas pelos hepatócitos reduzindo, dessa forma, os níveis de triglicerídeos na circulação (Mckenney 2001). Outro possível mecanismo para diminuição de triglicerídeos pelas estatinas baseia-se no fato de que o colesterol é um componente essencial para a formação de VLDL pelo fígado e, portanto, a inibição da biossíntese de colesterol limitaria sua disponibilidade para produção e secreção de VDL (Rader 2007, Dergunov et al. 2008).

Os compostos químicos pertencentes à classe dos inibidores da redutase são: sinvastatina, cerivastatina, lovastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pravastatina. As formas ativas desses compostos constituem análogos estruturais e intermediários da HMG-CoA. A administração das estatinas acompanha o ritmo funcional circadiano, provavelmente pelo mecanismo de ação da enzima redutase ser dependente dos corticóides adrenais (Jones 1990). Em humanos, a dose diária máxima recomendada de algumas estatinas (ex. Sinvastatina) é 80 mg para o tratamento da hipercolesterolemia. Porém, esses compostos diferem entre si quanto à lipofilicidade e permeabilidade tecidual, como simplificado na tabela 1.

Tabela 1. Características farmacológicas das estatinas.

Estatina	Absorção Intestinal (%)	Ligação proteínas plasmáticas (%)	Meia-vida plasmática (horas)	Doses em comprimidos (mg)	Hidrofilia
Sinvastatina	61-95	98	1-3	5, 10, 20, 40, 80	Não
Fluvastatina	>90	>99	0,5-0,8	20, 40, 80	Não
Lovastatina	31	>95	15	10, 20, 40	Não
Pravastatina	34	43-48	2	10, 20, 40, 80	Sim
Rosuvastatina	36	88%	19	5, 10, 20, 40	Sim
Atorvastatina	>95	>98	14	10, 20, 40, 80	Não

Adaptado de Vaughan and Gotto

2003.

Além de sua ação preventiva na hipercolesterolemia, o grupo das estatinas tem apresentado efeitos pleiotrópicos, nos últimos anos: (i) evidências de sua função antiinflamatória relatada através da redução dos níveis séricos de proteínas C reativas (Ridker et al. 2001), redução de níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (Ascer et al. 2004, Naoumova et al. 2003), redução da síntese de quimiocinas (Wachre et al. 2003, Veillard et al. 2006), inibição da expressão de receptores de quimioquinas induzidas por citocinas (Veillard et al. 2006, Han et al. 2005), bloqueio das proteínas Rho-A relacionadas aos processos de migração celular e sinalização leucocitária (Dunn et al. 2006) e estabilização da placa aterosclerótica (Crisby et al. 2001).

Nos últimos anos, estudos demonstraram a ação imunomoduladora dos inibidores da HMG-CoA redutase através da redução na produção de algumas citocinas. As estatinas inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias IFN-gama, TNF-alfa, IL-1 e IL-6 (Schonbeck & Libby, 2004). Em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com estatinas houve uma redução nos níveis séricos de TNF-alfa, IL-6, IL-1 e IL-8 (Ascer et al. 2004) e, naqueles com hipercolesterolemia familiar heterozigótica, houve redução de IL-12, mas não de IL-10 (Naoumova et al. 2003). Foi demonstrado também que as estatinas, além de reduzir migração leucocitária induzida por CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1 (Ortego et al. 1999), reduzem a secreção de MIP-1alfa e IL-8 em indivíduos com doenças arteriais (Wachre et al. 2003) e bloqueavam a secreção de metaloproteinases (MMP), enzimas que facilitam a passagem das células pela lâmina basal do endotélio e matriz celular (Xu et al. 2003). A saber, essas MMP e quimiocinas encontram-se altamente relacionadas ao mecanismo de remodelamento cardíaco.

As investigações sobre os efeitos das estatinas em doenças inflamatórias também trouxeram grandes aplicações às enfermidades autoimunes, devido à capacidade desses compostos em inibirem a indução da resposta do tipo Th1 (Marai & Shoenfeld 2007). Porém, há controvérsias quanto às ações das estatinas polarizando a resposta imune no sentido do fenótipo Th2. Uma justificativa para esse fato seria a variabilidade de doses aplicadas e os diferentes modelos experimentais utilizados para o estudo das doenças inflamatórias. De qualquer forma, o mecanismo exato da intervenção das estatinas no balanço Th1/Th2 evidenciada em vários trabalhos ainda permanece não esclarecido. Mas sabe-se que a diferenciação para Th2 induzida pela estatina pode ser revertida pela administração do mevalonato (Youssef et al. 2002), o que demonstra que os metabólitos da via da síntese de colesterol influenciam a diferenciação para Th1.

Do ponto de vista clínico, trabalhos desenvolvidos em seres humanos e modelos experimentais demonstraram que doses moderadas de estatinas propiciavam uma melhora na função ventricular esquerda, além de promover uma sobrevida nos grupos avaliados (Greer et al. 2006, Linthout et al. 2007, Biria et al. 2008). Parte destes múltiplos efeitos das estatinas parecem estar associados a uma dependência direta da ativação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e, reforçado, pela inibição direta das proteínas Rho e Rho-quinases nas doenças cardiovasculares e inflamatórias (Shimokawa H & Takeshita A 2005).

Em suma, após a demonstração que as doenças cardiovasculares apresentavam componentes inflamatórios relevantes para sua patogênese e que, essa era parcialmente revertida em indivíduos que utilizavam diariamente estatinas (Hennekens et al. 2004), alguns grupos propuseram a ampliação do uso de estatinas pela produção de polipílulas contendo diversos fármacos de ação cardiovascular e como agentes profiláticos da doença cardíaca em indivíduos normocolesterolêmicos (Law 2003, Rudnicka 2003). Nesse contexto, torna-se altamente desejável a avaliação desses compostos inibidores da HMG-CoA redutase no processo inflamatório e no mecanismo de remodelamento da cardiopatia chagásica crônica.

1.5. O treinamento físico aeróbico:

Desde primórdios da humanidade, o homem pré-histórico despendia extrema força, velocidade e resistência para sobreviver. Suas constantes migrações em busca de moradia o obrigavam a longa caminhada junto às quais lutava, corria, saltava tornando-o, dessa forma, um ser extremamente ativo fisicamente. Atualmente, a atividade física pode ser interpretada como qualquer movimento corporal produzido pela musculatura esquelética que resulte em gasto energético (Caspersen et al. 1985), co-existindo componentes e determinantes de ordem biopsicossocial, cultural e comportamental.

Após a era epidemiológica das doenças crônico-degenerativas surgem inúmeros estudos relacionando a atividade física como um meio de promoção da saúde (Kohl 2001, McKelvie et al. 2002, Fang & Marwick 2003). É preconizado, de acordo com esses estudos, que a prática regular de atividade física ou mesmo a aptidão física apresentam-se associados à prevenção de inúmeras doenças cardiovasculares e/ou bioquímicas. Porém, torna-se importante diferenciar atividade física de aptidão física, sendo a primeira uma opção comportamental e a segunda, parcialmente determinada por padrões genéticos.

O treinamento físico aeróbico é, atualmente, considerado uma importante ferramenta terapêutica no manejo de algumas doenças cardiovasculares (Niederseer et al. 2007). Uma atividade física é considerada aeróbica quando a maior parte da demanda energética é suprida através do metabolismo aeróbico. A atividade física executada de forma sistemática e regular desencadeia uma série de adaptações crônicas benéficas em todo o organismo, tais como redução da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso em indivíduos hipertensos, elevação no consumo máximo de oxigênio, elevação da expressão e da atividade de enzimas anti-oxidantes e melhora substancial da resposta imune (se a atividade física for realizada em intensidade leve ou moderada) (Caspersen et al. 1985, Kohl 2001, Gielen et al 2003).

Os efeitos anti-inflamatórios da atividade física aeróbica têm sido extremamente avaliados (Gielen et al. 2003, Costga & Vaisberg 2002). De forma geral, existe um consenso entre os investigadores que a atividade física aeróbica de alta intensidade e de longa duração exerça uma função pró-inflamatória enquanto aquela de leve ou moderada intensidade, apresentando média ou longa duração exerceria uma resposta anti-inflamatória (Petersen & Pedersen 2005, Pedersen & Toft 2000, Moldoveanu et al. 2001). Parte dos efeitos imunomodulatórios da atividade física aeróbica tem sido demonstrado em eventos de aterosclerose, diabetes, câncer e doenças cardíacas isquêmicas (Petersen & Pedersen 2005). Foi demonstrado que a atividade física aeróbica de baixa intensidade é capaz de regular inúmeras citocinas e/ou quimiocinas como IL-1beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, CCL2 (Moldoveanu et al. 2001, Zieker et al. 2005, Pedersen & Toft 2000). Em contrapartida, foi sugerido também que a inflamação aguda ocasionada pelo exercício físico de alta intensidade pode ser provocada pelo aumento do estresse oxidativo que proporciona uma intensa migração de células do sistema mononuclear fagocitário para a musculatura em atividade excessiva (Aoi et al. 2004).

O exercício físico aeróbico é capaz de modular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo (Costa Rosa & Vaisberg 2002, Linke et al. 2005, Gielen et al. 2003). Os mecanismos responsáveis por essas respostas são hormônio-dependentes (Jonsdottir et al. 1997), metabólicos (Curi et al. 1999) e/ou mecânicos (Evans et al. 1991). Embora a atividade física seja normalmente denominada como um estímulo estressante, cabe lembrar que normalmente ocorrem duas respostas distintas ao exercício: (i) a resposta aguda e (ii) a resposta crônica. Segundo Costa Rosa, “A resposta aguda é reação transitória ao estresse, enquanto o estímulo crônico gera a resposta de adaptação crônica ao exercício, que habilita o organismo a tolerar de maneira mais adequada o estresse” (Costa Rosa & Vaisberg 2002).

Finalmente, um outro importante paradigma acompanha as atividades físicas: a explosão aguda de atividade física e o treinamento físico condicionado. A “explosão aguda” de

exercícios físicos, ao contrário do condicionamento físico, pode gerar um aumento de marcadores inflamatórios favoráveis aos processos inflamatórios vasculares e sistêmicos como moléculas de adesão (VCAM e p-selectina), citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e IL-6, além de hipóxia periférica, formação de radicais livres e indução de apoptose no músculo esquelético (Jenkins 1988, Adams et al. 1999). Neste sentido, a atividade física atuaria como uma estratégia deletéria para os indivíduos com insuficiência cardíaca e por isso mesmo, de acordo com a etiologia dessas doenças cardíacas, necessita ser compreendida de forma particularizada.

Em suma, torna-se também desejável a compreensão de potenciais fatores de intervenção clínica que possam ser aplicados na cardiopatia secundária à infecção pelo *T. cruzi*, seja como um método preventivo do remodelamento cardíaco (ex. atividade física aeróbia antecessora ao início do processo inflamatório) seja como método preventivo-paleativo para aqueles que já apresentam o remodelamento em graus variados (ex. uso diário das estatinas). Essas intervenções, se comprovadamente benéficas, poderiam auxiliar enormemente no manejo clínico da doença de Chagas humana através de estratégias de baixo custo para o paciente e reduzido efeito colateral.

2.0. Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico (iniciado anteriormente ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica) e do uso diário de Sinvastatina (um inibidor da HMG-CoA redutase) sobre o remodelamento cardíaco em cães experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, durante as fases aguda e crônica da doença.

2.1. Objetivos específicos

- (i) Desenvolver um programa de treinamento físico para cães, baseado no teste de esforço previamente validado em seres humanos.
- (ii) Avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico e do tratamento com a Sinvastatina sobre a parasitemia e a mortalidade dos cães infectados pelo *T. cruzi*.
- (iii) Determinar o efeito do treinamento físico aeróbico e do tratamento com a Sinvastatina, isoladamente e em associação, sobre o perfil plasmático das citocinas IFN-gama, TNF-alfa, IL-10 e óxido nítrico, durante as fases aguda e crônica da infecção.
- (iv) Determinar o efeito do treinamento físico aeróbico e do uso de Sinvastatina, isoladamente e em associação, sobre a intensidade do infiltrado inflamatório e fibrose no miocárdio na fase crônica da infecção (6 meses).
- (v) Avaliar, trimestralmente, os efeitos do treinamento físico aeróbico e do tratamento com Sinvastatina sobre os eventos ecocardiográficos durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas.

3.0. Animais, Material e Métodos

3.1. Descrição do modelo canino

Para esse estudo, foram utilizados cães, sem raça definida, provenientes de uma única ninhada para cada experimento. Os cães foram obtidos e mantidos no canil da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram alimentados com ração comercial para cães e água *ad libitum*. Previamente à inclusão dos mesmos neste estudo, eles foram tratados com anti-helmínticos e imunizados contra doenças infecciosas.

Um total de 20 cães foi inoculado com a cepa Y do *T. cruzi* e esses cães divididos em quatro grupos com cinco animais cada: Um grupo que não praticava atividade física regular e não recebia nenhuma intervenção farmacológica, um grupo que não praticava atividade física regular, mas que recebia o tratamento com Sinvastatina. Grupos de dez cães foram submetidos ao treinamento físico aeróbico, sendo que cinco deles receberam o tratamento com Sinvastatina e cinco não.

Todos os procedimentos realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Infecção pelo *T. cruzi*

Quatro grupos de cinco de cães, para constituir os grupos sedentário, sedentário e tratado, treinado, treinado e tratado, respectivamente, foram inoculados aos 120 dias de idade com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas/Kg corporal, via intraperitoneal. Os parasitos foram obtidos de camundongos Swiss, infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, à partir da coleta de sangue dos mesmos no período de pico de parasitemia. Após esse procedimento, foi realizada a contagem dos tripomastigotas em uma amostra isolada do material. Essa amostra foi posteriormente diluída em solução salina a fim de determinar a existência de 2×10^3 parasitos em 0,5 ml de solução, que foi inoculada em cada animal.

3.3. Confirmação da infecção e avaliação da parasitemia

A partir do 10º dia de inoculação foi coletado, diariamente, sangue da veia marginal da orelha dos cães para a confirmação da infecção através da análise microscópica do sangue à fresco.

A parasitemia dos cães foi avaliada diariamente, após a positividade, através da amostra de 5µl de sangue, coletado da veia marginal da orelha dos animais, em exame ao microscópio para a detecção de parasitos. A quantificação dos parasitos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Brener (1962) até cinco dias após a negatividade.

3.4. Esquema terapêutico com a Sinvastatina

Para o tratamento diário dos animais foram empregados comprimidos, contendo 20 mg de Sinvastatina (Sanval Ltda, S.P.), administrados individualmente por via oral. Os animais não apresentavam dificuldades para deglutir o medicamento em forma de comprimido, e foi ofertada água por via oral através de uma seringa concomitantemente com o comprimido no intuito de facilitar e assegurar a deglutição do medicamento. A dose foi estabelecida em função da dose humana, empregada não para a reversão da hipercolesterolemia primária, mas para prevenção de eventos cardiovasculares (Rosendo et al. 2007).

O tratamento foi iniciado junto com a infecção. O medicamento foi administrado no final da tarde (17–18 horas), horário aproximado do período noturno preconizado para a administração de estatinas.

3.5. Metodologia para o estabelecimento da frequência cardíaca de treinamento utilizando o método do limiar de lactato sanguíneo ou limiar anaeróbico

Para que as rotinas de treinamento aeróbico possam produzir adaptações na direção desejada, é necessário o estabelecimento de uma combinação entre os componentes básicos: frequência, duração e intensidade dos esforços físicos. Uma atividade física aeróbica deve apresentar um esforço de longa duração e com intensidade moderada.

Qualquer treinamento aeróbico precisa de uma prescrição de treino correta, baseada no nível de condicionamento físico/cardiovascular atual, para garantir segurança de bem-estar. A progressão deve ser gradual e acompanhando os ajustes cardiovasculares alcançados com o treinamento.

Há diversas maneiras de se estabelecer a frequência cardíaca de treinamento, que é o parâmetro mais seguro para definir um treinamento aeróbico dentro da capacidade individual.

(i) Fase inicial para adaptação à esteira

Para a realização da atividade física, nos primeiros cinco dias que antecederam o programa, os animais foram treinados e ambientados para caminhar na esteira. Para isso, eles foram submetidos à uma baixa velocidade (2,5 Km/h) e foi dado estímulo verbal e com íscas continuamente, sempre pelas mesmas pessoas (juntas). As sessões de adaptação foram realizadas diariamente pelo período de cinco dias, durante 20 minutos. Todos os animais se adaptaram após esse período.

(ii) Fase secundária para aplicação do teste de esforço

Após a fase de adaptação os animais foram submetidos à um teste de esforço para a determinação da FC de treinamento (FC tr). Antes de serem submetidos ao esforço, cada cão foi isolado do grupo e induzido, durante um período de 10 minutos, à quietude e repouso para a aquisição da FC e lactato capilar, no estado basal. Os dois parâmetros foram obtidos como será descrito mais abaixo. Após esse período, foi aplicado um teste de exercício submáximo, usando o limiar anaeróbico ou limiar de lactato como critério para a interrupção do mesmo. O protocolo, modificado de Stegmann e colaboradores (1981), constituiu-se de quatro estágios com duração de três minutos cada. A intensidade do esforço foi aumentada, através do incremento da velocidade em 2 Km/h à cada estágio. O teste foi iniciado a uma velocidade de 1.5 Km/h, na qual o cão apenas caminhava, e seguiu-se com 3.5; 5.5 e 7.5 Km/h, respectivamente, até o final de 12 minutos constituindo o período de esforço. A FC foi monitorada durante todo o período do teste, através de um monitor de FC (Polar), ajustado ao tórax do animal. Foi registrada a média da FC dos últimos 15 segundos de cada estágio e o teste foi interrompido por menos de um minuto, para a coleta de sangue da veia marginal da orelha do cão, ao final de cada estágio. Foram feitas dosagens de lactato nas amostras colhidas através do kit *Accusport* (lactímetro portátil e fitas), marca Roche, para a construção de uma curva de lactato. A curva de lactato de cada cão teve uma curva de FC, correspondente, obtida pelos valores registrados para cada estágio do teste. O teste apresentou duração de 43 minutos, pois, ao final do período de esforço foi iniciado o período de recuperação constituído de cinco estágios – 1, 2, 4, 8 e 16 minutos pós-esforço. Ao final de

cada estágio do período de recuperação foram feitas quantificações de lactato capilar, da mesma forma como a descrita acima. Igualmente, a FC também foi registrada. Os valores para ambos, FC e lactato, do período de recuperação também foram usados para a construção das curvas.

(iii) Fase terciária: construção das curvas de lactato versus frequência cardíaca de esforço

Seguindo o modelo matemático proposto por Stegmann e colaboradores (1981) para a identificação do IAT (*individual anaerobic threshold*) foram construídas duas curvas (i) concentração de lactato em função do esforço e (ii) frequência cardíaca em função do esforço. A seguir foram determinados dois tempos característicos na curva de concentração de lactato, o tempo tA , onde o gradiente de lactato entre o sangue e o músculo e a taxa de difusão são máximos. O tempo tB , deveria representar o ponto onde, após o acúmulo máximo de lactato no sangue ocorrido no período pós esforço, a concentração de lactato voltasse à atingir o valor que apresentava em tA , nesse mesmo período. De posse desses dois tempos, era determinado o tempo do IAT, onde a taxa de eliminação é igual a taxa de produção de lactato.

Como após o IAT, a taxa de eliminação é constante e igual ao seu valor máximo Em , a taxa de variação da concentração de lactato no sangue é dada por

$$dn/dt = Em + Mc(\zeta C) \quad (1)$$

onde Mc é a constante de membrana e ζC é o gradiente de lactato entre o sangue e o músculo. Esse gradiente atinge o seu valor máximo em $t = tA$. Logo, dn/dt é máximo nesse instante e na curva de lactato tA é um ponto de inflexão, isto é, nesse ponto

$$d^2n/dt^2 = 0$$

Para determinar tA temos que achar o instante t que satisfaça a equação acima. Para tal, interpolamos via *spline cúbica* os dados correspondentes às medidas realizadas em dez instantes diferentes do teste de esforço para cada ação. De posse da curva interpolada, resolvemos numericamente a equação número 2, usando o método de Newton-Raphson. O tempo tB é determinado pela solução numérica (Newton-Raphson) de

$$n(t) - n(tA) = 0$$

Para determinar o IAT procuramos o ponto (x, y) na curva de lactato interpolada tal que

$$Dy/dx = f(tB) - y/tB - y$$

isto é, o único ponto da curva onde a reta tangente, traçada à partir de tB , intercepta. A curva da frequência cardíaca foi correlacionada com a de concentração de lactato, logo, no tempo IAT, além de uma concentração específica de lactato para cada animal, havia uma FC também específica. Essa FC foi determinada e usada como a frequência cardíaca de treinamento (FC_{tr}).

3.6. Treinamento físico diário dos animais

O treinamento físico foi realizado numa sala separada do canil da Universidade Federal de Ouro Preto. Essa sala era naturalmente ventilada e iluminada. Foi utilizada esteira elétrica da marca Rottax e Caloi, contendo sensor digital para avaliação da velocidade (em Km/h), adaptadas para os cães com a utilização de cercas de madeira com aberturas na frente e laterais na altura dos olhos dos cães, para permitir sua visão do ambiente e não gerar desconforto para os animais. Além dessas aberturas, a parte traseira da cerca era vazada para permitir defecações pelos animais (eventos frequentes), sem que a esteira fosse comprometida.

A partir do resultado do teste de esforço (identificação do IAT e FC correspondente), a FC_{tr} foi estabelecida a fim de garantir que o treinamento fosse aeróbico e de moderada intensidade, como indicado para condicionamento cardiovascular. Foi estabelecida como FC_{tr} a FC correspondente ao IAT, o que definiu o treinamento como aeróbico. O treinamento dos cães foi iniciado após a inoculação dos mesmos. Os cães foram colocados na esteira em baixa velocidade (2,5 Km/h) por cinco minutos para adaptação e ajustes cardiovasculares, e logo em seguida a velocidade foi aumentada afim de que a FC_{tr} fosse alcançada. A FC dos cães foi continuamente monitorada durante todas as sessões de treinamento através do cardiofrequencímetro da marca Polar. Os animais foram treinados por 20 minutos na primeira semana, 30 minutos na segunda semana e 40 minutos da terceira semana em diante. A intensidade do treinamento foi continuamente ajustada de acordo com a FC_{tr} previamente estabelecida. A partir do terceiro mês após a infecção, postulado nesse estudo como início da

fase crônica, os animais passaram à ser treinados três vezes por semana durante 50 minutos afim de acumular 30 minutos diários de exercício (OMS). Nessa fase a intensidade do exercício foi diminuída para 70-80% da FC tr estabelecida no início. Nesse período, os cães foram monitorados mais cuidadosamente, devido à presença de comprometimento cardíaco em maior ou menor grau. No caso de inquietação, choro ou ofegação, a intensidade era diminuída até o desaparecimento dos mesmos. Na presença de taquicardias ou bradicardias persistentes, ou na não cessação de sinais de mal-estar, como os citados anteriormente, o treinamento era interrompido naquele dia. Nenhum animal morreu ou seu treinamento foi interrompido devido à intolerância ao esforço até o final dos experimentos.

3.7. Venunpunção para avaliação imunológica.

Foram coletados 10 mL de sangue de cada animal, através da veia femural. As amostras foram, imediatamente após a coleta, centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante (soro) foi armazenado em tubos eppendorf de 0,5 mL à -80°C. As coletas sanguíneas dos animais foram feitas antes da inoculação dos parasitos, e mensalmente durante os seis meses da infecção.

3.8. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para TNF-alfa, IFN-gama e IL-10

Os ensaios imunoenzimáticos para as citocinas TNF-alfa, IFN-gama e IL-10 foram realizados utilizando-se o soro de animais infectados sedentários e treinados, submetidos ao tratamento diário ou não com Sinvastatina. Utilizando placas de 96 poços, serão adicionados 100 ul de anticorpo monoclonal contra a proteína (ou peptídeo) a ser dosada, diluídos em PBS contendo 0.1% de albumina de soro bovino - BSA (SIGMA). Após incubação por 12 horas à temperatura ambiente, os anticorpos não adsorvidos foram descartados e as placas bloqueadas com 300 ul/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a 37° C. As amostras de soro, previamente padronizadas por nosso grupo, serão aplicadas em um volume de 100ul para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada será diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão e, a seguir, realizada incubação por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente os anticorpos secundários serão diluídos em PBS-BSA 0.1% e incubados por duas horas à temperatura ambiente. Finalmente, 100 ul de

estreptoavidina ligada à peroxidase na diluição de 1:4000 em PBS-BSA 0.1% serão adicionados à placa e a mesma mantida sob agitação por 30 minutos. O cromógeno escolhido para revelação será o OPD (θ -phenylenediamine -SIGMA) ou tetrametilbenzidina, diluído em tampão citrato de acordo com recomendação do fabricante. No momento da aplicação de 100ul desta solução nos poços, será ainda adicionado 2ul/placa de H_2O_2 30 volumes como catalisador da reação. Após 20 minutos de incubação em ausência de luz, a reação sofrerá bloqueio adicionando-se 50 ul de H_2SO_4 3M por poço. A leitura da intensidade de marcação será realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 nM. Serão utilizados kits para estes ensaios e possíveis alterações poderão ocorrer no protocolo acima, de acordo com cada fabricante.

3.9. Avaliação ecocardiográfica

Os animais foram anestesiados com 0,5 mL/Kg corporal de Tiopental sódico (0,03 g/mL de solução salina 0,9%) por via endovenosa e logo após posicionados em decúbito lateral direito, com os membros mantidos em ângulo de 90º em relação ao corpo, sobre uma superfície isolante elétrica.

A avaliação ecodopplercardiográfica foi realizada de forma sistematizada, por um só examinador experiente, utilizando-se aparelhagem de ecocardiografia portátil *Cypress* dotada dos modos Unidimensional, Bidimensional, *Doppler* pulsado, contínuo, mapeamento de fluxo em cores e adaptado para obtenção do Doppler tecidual. Utilizou-se transdutor multifrequencial de 3,0-3,5 MHz, com registro eletrocardiográfico simultâneo.

Utilizou-se a técnica convencional de exame, já estabelecida na literatura (Sahn et al. 1978; Feigenbaum 1994), empregando-se as diversas modalidades do exame ecocardiográfico acima descritas. Os cortes ecocardiográficos foram realizados com o paciente posicionado em decúbito lateral esquerdo, inicialmente

na posição paraesternal, onde foram obtidos os cortes longitudinais do ventrículo esquerdo e cortes transversais ao nível da valva mitral e músculos papilares e, em seqüência, na posição apical, onde foram obtidos os cortes de quatro, duas e cinco câmaras (Oh et al. 1995).

Através da análise combinada das técnicas Unidimensional, Bidimensional e *Doppler* foram avaliadas as dimensões cardíacas, a funções sistólica e diastólica ventricular esquerda e a contratilidade global e segmentar do VE. Ao longo da sistemática do exame, procurou-se identificar a presença de trombos, aneurismas, regurgitações valvares, hipertensão pulmonar e alterações pericárdicas.

As medidas ao Unidimensional foram guiadas pela imagem ao Bidimensional e realizadas no pico da onda R, identificado através do registro eletrocardiográfico simultâneo de uma derivação. Foram seguidas as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia para obtenção das medidas ecocardiográficas. Foram mensurados os diâmetros diastólicos da raiz de aorta, do átrio esquerdo e do ventrículo esquerdo, a espessura diastólica do septo interventricular; a espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo e o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. A partir dessas medidas e utilizando-se o sistema de cálculos automáticos do equipamento, foram calculados os parâmetros ecocardiográficos de avaliação da função sistólica ventricular esquerda ao Unidimensional fração de ejeção do ventrículo esquerdo pela fórmula de Teichholz et al. (1976) e o percentual de encurtamento sistólico. A massa ventricular esquerda foi calculada segundo recomendações da *American Society of Echocardiography*.

A avaliação ao Bidimensional envolveu a mensuração dos volumes sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo nos cortes apicais de duas e quatro câmaras, utilizando-se a fórmula de Simpson biplanar para cálculo da fração de ejeção (Wyatt et al. 1980). Qualitativamente, foram também avaliadas, ao Bidimensional, ao *Doppler* e ao color *Doppler*, a morfologia e movimentação das valvas cardíacas, o grau de regurgitação valvar, a morfologia e dimensões das câmaras cardíacas, a espessura e textura miocárdicas. Avaliou-se, ainda, qualitativamente, a contratilidade global e segmentar das paredes do ventrículo esquerdo utilizando-se o modelo de subdivisão do ventrículo esquerdo em 16 segmentos, segundo proposto pela *American Society of Echocardiography* nas projeções paraesternal e apical (Oh et al. 1995), presença de trombos, aneurismas e alterações pericárdicas. Sempre que possível obteve-se uma estimativa da pressão sistólica em artéria pulmonar através da mensuração da velocidade máxima da regurgitação tricúspide.

(i) *Avaliação da função diastólica ventricular esquerda*

A avaliação da função diastólica ventricular esquerda foi realizada através da análise combinada de medidas ecocardiográficas obtidas ao *Doppler* que incluíram o estudo do fluxo mitral ao *Doppler* pulsado associado à análise do fluxo venoso pulmonar e do *Doppler* tecidual ao nível do anel valvar mitral (basal septal e basal lateral). De acordo com os dados obtidos, a função diastólica foi categorizada como normal (Grau 0), relaxamento alterado (Grau 1); pseudonormal (Grau 2) e restritiva (Grau 3) (Oh et al. 1995).

(ii) *Avaliação ao Doppler tecidual*

O equipamento utilizado neste estudo foi adaptado para obtenção do *Doppler* tecidual. O registro da movimentação longitudinal do anel mitral foi realizado ao *Doppler* tecidual pulsado orientado pelo modo colorido, com a amostra posicionada sobre o anel mitral nas bordas lateral e septal, a partir do corte apical de quatro câmaras, posicionando-se o cursor nos segmentos miocárdicos em estudo.

(iii) *Avaliação da contratilidade ventricular*

A avaliação qualitativa da contratilidade segmentar do ventrículo esquerdo foi feita utilizando-se o modelo de subdivisão do ventrículo esquerdo em 16 segmentos, segundo proposto pela *American Society of Echocardiography* (In: OH *et al.* 1995), nas projeções paraesternal (longitudinal e transversal ao nível da valva mitral, músculos papilares e apical) e apical (quatro e duas câmaras).

3.10. Necrópsia e coleta de fragmentos cardíacos

Os cães foram anestesiados com 0,5 mL/Kg corporal de Tiopental sódico (0,03 g/mL de solução salina 0,9%) por via endovenosa. Uma vez anestesiados, os animais foram eutanasiados através de choque elétrico de 110V e a necrópsia conduzida pelo patologista de nossa equipe. Assim, o coração foi removido para as análises macro e microscópica. Para isso, o peso do órgão foi determinado e relacionado com o peso de cada animal, obtendo-se um índice de peso (IP) $[(IP = \text{Peso do órgão(g)} \div \text{Peso do cão(Kg)})]$. Em seguida, foram feitos cortes da parede atrial direita e parede ventricular esquerda de todos os cães. O átrio direito é a região onde a miocardite chagásica canina processa-se com maior intensidade (Caliari *et al.*

2002). Os fragmentos obtidos foram armazenados em formol 10% tamponado (temperatura ambiente) para análises histopatológicas e em frascos estéreis à -80°C, para posterior análise molecular.

3.11. Avaliação histopatológica do tecido cardíaco

(i) Técnica de Hematoxilina & Eosina

Para visualização do infiltrado inflamatório nos cortes de tecido cardíaco dos animais, os fragmentos teciduais foram corados pela Hematoxilina & Eosina. Secções com 4µm de espessura da parede atrial direita e ventricular direita e esquerda foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), 10 minutos em cada, lavados em água corrente por 10 minutos e em tampão fosfato (PBS) pH 7,2 por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela Hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado, e logo após lavados novamente em água corrente. Depois, foram corados pela Eosina durante 1 minuto. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas com os cortes, foram colocadas na estufa à 56°C para secagem. Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e *Etellan* e submetidos à análise em microscopia óptica.

(ii) Técnica de Tricômico de Masson

Para a observação do tecido conjuntivo fibroso e, por conseguinte, determinação da fibrose cardíaca, os fragmentos cardíacos foram corados pela técnica de Tricômico de Masson. Após a desparafinização e hidratação das secções da parede atrial direita, ventricular direita e esquerda dos corações dos cães, estas foram coradas pela Hematoxilina por dois minutos, lavadas em água corrente e coradas durante cinco minutos em solução contendo 90mL Sudam 1% em solução alcoólica, 10mL fucsina ácida 1% em solução aquosa e 1 mL de ácido acético glacial. Logo após, os cortes foram lavados em água corrente, corados por 10 minutos em solução composta de 2,5g de ácido fosfotúngstico e 2,5g de ácido fosfomolibdico em 100mL de água destilada e, novamente, lavados em água corrente. Em seguida, os cortes foram imersos, por cinco minutos, em uma solução final contendo 2,5g de azul de anilina e

2mL de ácido acético glacial em 100mL de água destilada, lavados e submetidos à solução de água acética 10% durante cinco minutos. Após a realização do último processo de lavagem, os cortes foram para a estufa (56°C) e, posteriormente, submetidos à montagem similar à Hematoxilina & Eosina.

(iii) Quantificação da inflamação e tecido conjuntivo fibroso na área cardíaca

Todos os núcleos celulares e áreas de colágeno presentes no microfragmento do átrio direito, ventrículo direito e esquerdo dos cães foram contados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $2,24 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40x foram digitalizadas através de microcâmera Leica DM 5000 B (Leica Application Suite versão 2.4.0R1) e processadas por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin V3.

3.12. Análise Estatística

Os parâmetros avaliados serão apresentados através da média de seus valores e respectivos “erro médio padrão - SEM” ou então, pelos valores absolutos com respectiva média (gráficos de dispersão). Foi utilizado OneWay ANOVA para múltiplas comparações - testes de Tukey-Kramer HSD e Bonferroni. Todas as análises serão realizadas através dos programas *INSTAT* e *GraphPad Prism*.

4.0. Resultados e discussão

4.1. Determinação da frequência cardíaca de treinamento para os cães previamente à infecção pelo *T. cruzi*.

Para se determinar os parâmetros de aptidão aeróbica e anaeróbica dos cães infectados pelo *T. cruzi*, optou-se pela utilização do protocolo de cinética do lactato, segundo (Stegman et al. 1981).

Durante o trabalho do músculo esquelético o suprimento de oxigênio necessário para sustentar o metabolismo oxidativo é esgotável. Com isso, fontes anaeróbicas de energia são utilizadas e o lactato surge como um produto desse processo biológico. O teste de lactato sanguíneo é amplamente reconhecido como meio de determinação da capacidade funcional individual e é amplamente correlacionado com a FC e o $\text{VO}_2\text{máx}$. (Weber et al. 1987). A determinação não invasiva do limiar anaeróbico ou limiar de lactato pode ser adquirida de formas diferentes. Respostas fisiológicas ao exercício são alteradas com a intensidade do esforço físico, momento onde ocorre o acúmulo de lactato – exemplo: acidose metabólica, VO_2 alterado, drive ventilatório aumentado, resistência diminuída (Wasserman 1987). Testes de esforços fazem parte da rotina para avaliação de pacientes com insuficiência cardíaca. Estes são usados para estratificação do risco e medida da capacidade funcional (Lainchbury & Richards 2002). A cinética do lactato parece ser o mais sensível parâmetro durante o teste de exercício submáximo (Larsen et al. 2001). A viabilidade de um teste de esforço realizado em humanos tem sido investigada para aplicação em cães (Kittleson et al. 1996), usando um teste submáximo e medidas de limiar anaeróbico. O teste de lactato, ou limiar anaeróbico, foi realizado neste trabalho por ser um método pouco invasivo (apenas coleta de microlitros de sangue), de fácil aplicação e principalmente, por ser um meio não subjetivo de adquirir as variáveis necessárias para a prescrição de um treinamento aeróbico. Testes de esforço que leva em consideração apenas a sensação de fadiga apresenta reduzida confiabilidade para aplicação em cães.

A Fig. 1 é indicativa dessa avaliação do lactato, realizada de forma individual, para cada animal submetido ao treinamento físico. Através de uma curva de interpolação, os valores de t_A e t_B foram estabelecidos e limiar anaeróbico individual (IAT) calculado. A seguir, como exemplificado na Fig. 2, o valor do IAT foi utilizado como parâmetro para identificação da frequência cardíaca de treinamento para cada animal isoladamente (Tabela 2) possibilitando, dessa forma, o início do treinamento físico diário.

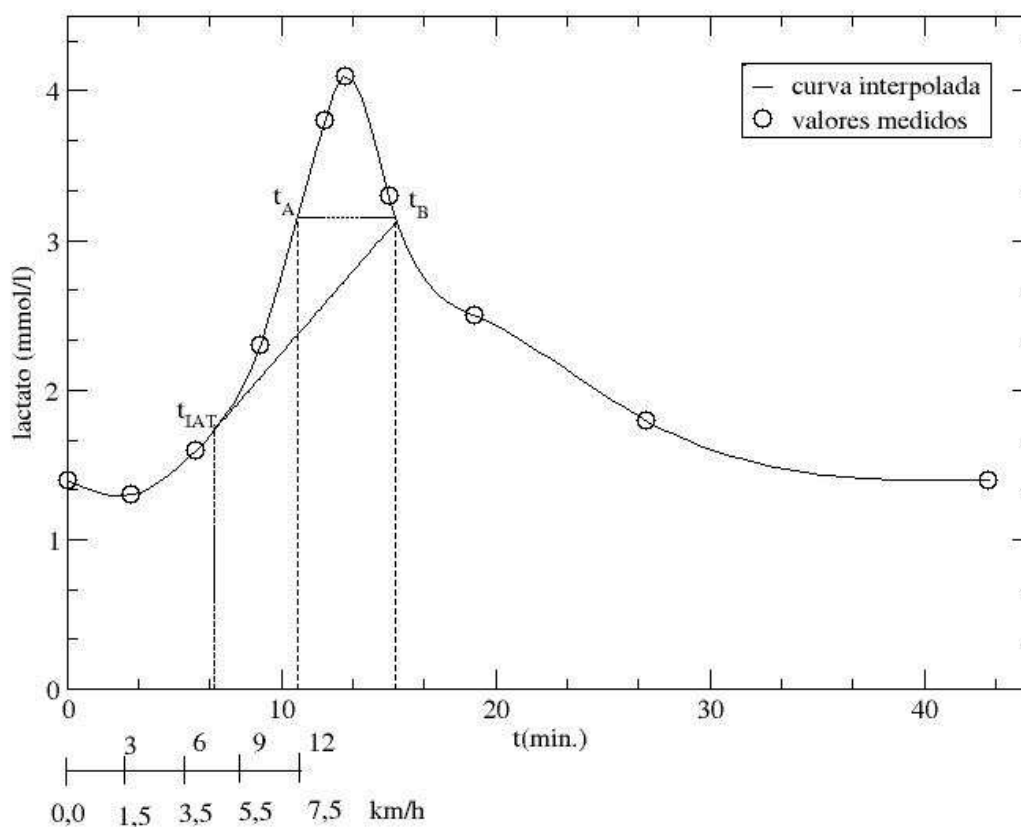


Figura 1. Curva de interpolação para determinação do *Individual Anaerobic Threshold*. Essa figura é representativa do resultado de interpolação de um dos animais submetidos ao teste de esforço submáximo, onde uma amostra de sangue foi coletada pela veia marginal da orelha após diferentes velocidades estabelecidas através da esteira elétrica (eixo X) e o lactato correspondente (eixo Y) avaliado. Através dos pontos t_A e t_B , o IAT foi estabelecido para cada animal. Símbolos da figura: t_A : tempo A, t_B : tempo B e IAT: índice anaeróbico de treinamento.

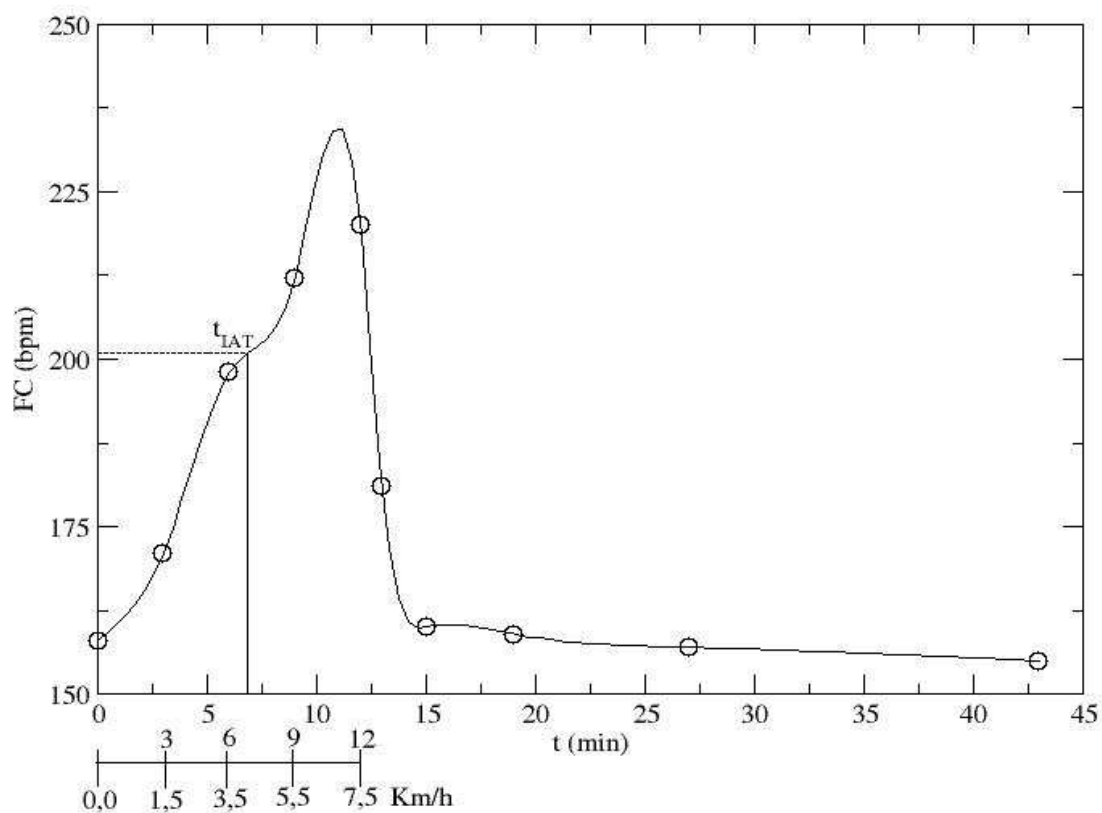


Figura 2. Estabelecimento da frequência cardíaca de treinamento individual. A partir da pré-determinação do valor do índice anaeróbico de treinamento (IAT) e sua respectiva correlação com a velocidade de treinamento (esteira elétrica), foi identificada a frequência cardíaca (Fc) correspondente a esse IAT para posterior acompanhamento, através de um cardiofrequencímetro, do ritmo de treinamento diário para esses animais. Curva representativa para de apenas um animal.

Tabela 2. Parâmetros individuais para o estabelecimento do programa de treinamento para os cães infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Cão	Variáveis utilizadas para estabelecimento do programa de treinamento				
	Tempo t _A (min)	Tempo t _B (min)	Tempo IAT (min)	[] de Lactato (mmol/L ⁻¹) no IAT	Frequência cardíaca (bpm) no IAT
T1	12.00	14.43	5.49	1.80	224
T2	12.32	14.08	5.20	0.86	219
T3	12.00	14.66	10.46	1.36	243
T4	12.28	14.36	3.60	1.18	190
T5	12.29	14.30	10.88	1.93	246
TS1	12.05	13.76	3.24	1.11	161
TS2	7.70	14.08	6.87	2.53	187
TS3	10.74	15.31	6.82	1.73	201
TS4	12.00	14.16	6.03	1.80	200
TS5	NST				

T= cão infectado treinado

TS= cão infectado treinado e tratado com 20mg de Sinvastatina

NST= não submetido ao teste de esforço

4.2. Efeitos da Sinvastatina e do treinamento aeróbico sobre o *Trypanosoma cruzi* circulante.

A resposta imune na doença de Chagas aparece como condição *sine qua non* para o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* nas células hospedeiras. De posse dessa informação, sabe-se que o tempo médio para detecção sanguínea desses parasitos em modelos experimentais (ex. camundongos) ocorre em torno de 3 dias após a infecção. Esse período é correspondente ao tempo de penetração da forma tripomastigota nas primeiras células, seguido de sua diferenciação para a forma replicativa amastigota e posterior retorno à forma tripomastigota infectante. Após a primeira observação desse parasito circulante (denominado de período pré-patente), observa-se um crescimento exponencial na quantidade de parasitos no sangue até o estabelecimento de um pico máximo nesses animais, caracterizando o pico de

parasitemia. Após todo esse período, acredita-se haver tempo suficiente para o estabelecimento de uma resposta imune específica contra o *T. cruzi* e, a partir de então, a tendência desses hemoflagelados é reduzir até desaparecer por completo na circulação. Vale ressaltar que os picos de parasitemia, bem como as características da curva de parasitemia são diretamente dependentes da cepa do parasito e das características genéticas do hospedeiro avaliado (Brener 1973, Toledo et al. 2004).

Em nosso estudo, observamos que cães sedentários apresentaram um pico de parasitemia no 18º dia após a infecção pelo *T. cruzi*, enquanto aqueles animais também sedentários, porém tratados com o inibidor da HMG-CoA redutase, Sinvastatina, ocorreu antecipação do pico de parasitemia para o 14º dia (Fig. 1 A). Ressalta-se que nesse estudo, foi utilizada a cepa Y do *T. cruzi*, previamente reportada por nosso grupo (Guedes et al. 2007) com picos de parasitemia entre no 15º dia após a infecção. Nessa análise individualizada da curva de parasitemia, é possível inferir sobre dois aspectos: (i) ao contrário de Guedes et al. 2007, que utilizou cães da raça Beagle, em nosso estudo foram utilizados animais de raça não definida, o que justificaria parcialmente a diferença encontrada para o momento do pico de replicação sanguínea; (ii) potencial padrão anti-inflamatório desencadeado pela atividade sistêmica da Sinvastatina nos animais infectados, retardando a ação das células inflamatórias e ocasionando, assim, a antecipação do pico parasitêmico. Essa hipótese poderia ser sustentada pelos efeitos anti-inflamatórios previamente descritos para as estatinas, capazes de reduzir os níveis séricos de mediadores inflamatórios essenciais para a contenção e eliminação do *T. cruzi* como o TNF-alfa, a IL-12 e o IFN-gama (Ascer et al. 2004, Naoumova et al. 2003). Esses mediadores inflamatórios constituem pilares da resposta inflamatória anti-*T. cruzi* por serem os grandes responsáveis pela ativação de células inflamatórias e potencialização da cascata inflamatória (produção de citocinas, quimiocinas e indutores de óxido nítrico, altamente tóxico para os parasitos) tanto de forma sistêmica quanto sítio-dependente (Abrahamssohn & Coffman 1995, Brener & Gazzinelli 1997, Golgher & Gazzinelli 2004)

Por outro lado, ao submetermos os cães infectados à atividade física aeróbica diária, ditos treinados, nenhuma diferença foi observada no período pré-patente, de forma similar aos animais sedentários. Porém, ao administrarmos 20mg de Sinvastatina diariamente aos animais treinados, foi observada uma redução significativa nos parasitos circulantes após o 14º dia de infecção (Fig. 3B). A única exceção ocorreu para o pico de parasitemia, observado para ambos os grupos no 12º dia e sem diferenças significativas entre eles (Fig. 3B). Independente das hipóteses apresentadas para a antecipação do pico de parasitemia nos animais sedentários tratados com Sinvastatina (Fig 3A), a intensidade da replicação máxima dos parasitos

permaneceu inalterada para todos os grupos estudados, inclusive aqueles submetidos à atividade física -aproximadamente 3×10^3 parasitos/0.1ml de sangue (Fig. 3A, B).

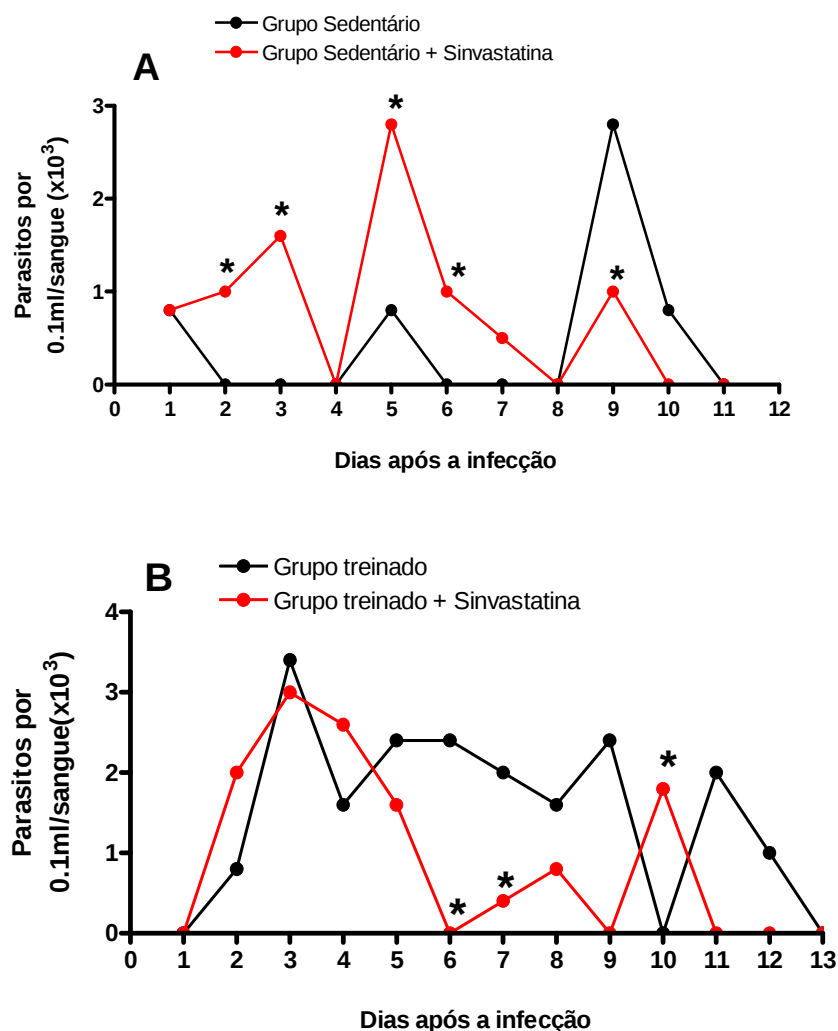


Figura 3: Curva de parasitemia. Os animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* foram submetidos ao tratamento com Sinvastatina 20mg em associação com o estado de sedentarismo (A) ou de treinamento físico (B) desses animais sendo a parasitemia avaliada, diariamente, através da coleta de sangue pela veia marginal da orelha. Os dados são apresentados como média do grupo/dia. * $p < 0.05$ quando diferente do grupo não tratado com Sinvastatina.

Sabe-se que, além de suas propriedades anti-hipercolesterolêmicas e anti-inflamatórias, a via metabólica das estatinas atua como inibidor competitivo do mevalonato, importante enzima para o metabolismo do *T. cruzi* (Schonberck & Libby 2004). O *T. cruzi* realiza a biossíntese de ergosterol, como etapa essencial de sua via metabólica havendo, nessa via, enorme divergência quanto aos mecanismos previamente conhecidos em células de mamíferos daqueles descritos para o parasito (Buckner FS 2008). Nesse contexto, inúmeros pesquisadores têm investido em alvos quimioterápicos anti-*T. cruzi* envolvendo a via metabólica do ergosterol (Maldonado et al. 1993, Corrales et al. 2005). Em nossa avaliação da Sinvastatina na doença de Chagas experimental, acreditamos que esse composto tenha catalisado a redução do NADP, dependente de HMG-CoA, para mevalonato. Dessa forma, a administração da Sinvastatina em concomitância com a fase aguda da doença de Chagas atuaria positivamente como um inibidor competitivo do mevalonato presente em mitocôndrias de diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (Pena-Dias et al. 2004). Fato interessante a ser observado é a redução dos parasitos circulantes ocorrer após o 14º dia pós-infecção (Fig 3 A e B) e, uma possível explicação para essa lenta atuação da Sinvastatina sobre o mevalonato do *T. cruzi* seria pela reduzida biodisponibilidade do fármaco (administração via oral) e pela primeira passagem hepática (Willke et al. 2008). De qualquer forma, a ação sinérgica da Sinvastatina e da resposta imune na fase inicial da doença de Chagas aparecem como mecanismos promissores e complementares para a área de quimioterapia anti-*T. cruzi*.

4.2. Efeitos da Sinvastatina e do treinamento aeróbico sobre a resposta de citocinas pró- e anti-inflamatórias na doença de Chagas experimental.

Estudos em modelo murino mostraram, no passado, que as citocinas desempenhavam um papel crucial no controle da infecção pelo *T. cruzi*. A resposta imune inata e adaptativa, desencadeada em função da presença do parasito e de suas moléculas antigênicas (ex. GPI) durante a fase inicial da doença, atuava como mecanismo de produção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN-gama, TNF-alfa e de quimiocinas como IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 (Talvani et al. 2000, Teixeira et al. 2002). Assim, para promover a contenção dessa infecção macrófagos e células dendríticas iniciam a endocitose das formas tripomastigotas do *T. cruzi* e conseqüente liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF-alfa e outras moléculas co-estimuladoras. Essas citocinas promovem a ativação de células T produtoras de IFN-gama que, por sua vez, tornam-se as moléculas

chaves para a estimulação em massa da resposta imune contra o *T. cruzi* e para a produção de uma grande variedade de quimiocinas que promoverão a migração leucocitária para os sítios de infecção (Teixeira et al. 2002). Em conjunto, essas etapas ocorrerão durante um período curto da infecção inicial, mas auxiliarão na construção de uma resposta celular e humoral contra o *T. cruzi* levando ao controle ou à eliminação do parasito.

Vale ressaltar que essas citocinas acima mencionadas, produzidas na fase inicial da doença de Chagas contribuem para o controle parasitário, mas na fase crônica da doença atuam na perpetuação da resposta inflamatória em sítios-específicos de infecção. Em nosso estudo com o modelo cão, avaliamos a cinética de IFN-gama/TNF-alfa (perfil Th1) e da citocina regulatória (perfil Th3) durante a fase aguda e crônica de infecção pelo *T. cruzi*.

Nossos resultados demonstraram que os cães infectados e submetidos ao treinamento físico aeróbico apresentaram um aumento na produção sérica de IFN-gama (Fig 4A) e TNF-alfa (Fig 4C) entre o mês 1 e 2 de infecção. Em contrapartida, a administração diária de Sinvastatina foi capaz de reduzir significativamente a produção inicial de ambas as citocinas pró-inflamatórias. Além disso, animais submetidos ao treinamento físico aeróbico diário apresentaram níveis ainda mais elevados de IFN-gama (Fig 4B) e TNF-alfa (Fig 4D) em relação aos animais sedentários e, de forma similar, a administração de Sinvastatina foi capaz de reduzir essa produção no final da fase aguda e início da fase crônica. Nem a Sinvastatina (Fig 5A) nem a atividade física aeróbica (Fig 5B) foram capazes de alterar a síntese de IL-10 no soro desses animais, exceto naqueles animais treinados em uso de Sinvastatina no 6º mês de infecção (Fig 5B). A título de informação, a última análise de citocinas desses animais ocorreu no 6º mês pós-infecção, o que corresponderia a uma fase crônica ainda inicial.

Na infecção crônica humana pelo *T. cruzi*, o perfil de citocinas dominante é exclusivamente do tipo Th1 (ex. IFN-gama) induzindo uma supressão de citocinas do tipo Th2 (ex. IL-4) e elevando os níveis de TNF-alfa (Abel et al. 2001, Gomes et al. 2003). Além disso, através da citometria de fluxo, foi possível definir que células T CD4+ de pacientes apresentando cardiopatia chagásica crônica produziam mais IFN-gama e menos IL-10 do que as mesmas células de pacientes com a forma clínica assintomática/indeterminada (Gomes et al. 2003). Esse fato sustentaria a hipótese de indivíduos que evoluem da forma indeterminada para a forma cardíaca desenvolveriam uma resposta imune do tipo Th1 exacerbada e, em contrapartida, aqueles que prevalecerem com uma resposta exacerbada do tipo Th2 apresentaria maior proteção cardíaca (Bilate & Cunha-Neto 2008).

Na doença de Chagas, estudos clínicos têm apontado para o TNF-alfa circulante como um excelente marcador de prognóstico clínico para a cardiopatia chagásica. Não foi objetivo de

nosso grupo estabelecer, nesse momento, correlações clínicas entre os valores de TNF-alfa circulante nos cães e seus respectivos achados ecocardiográficos. Porém, nosso grupo e de outros pesquisadores demonstraram que o TNF-alfa apresentava altíssima correlação clínica com a redução da fração de ejeção ventricular e com o aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (Talvani et al. 2004, Abel et al. 2001). Ainda, pacientes chagásicos apresentando cardiopatia chagásica grave que apresentavam alelos de TNF-alfa associado com alta produção dessa citocina apresentaram redução na sobrevida se comparado com outros carregando outros alelos (Drigo et al. 2006). De fato, as citocinas inflamatórias alcançaram grande destaque na área clínica da doença de Chagas sendo avaliada, mais recentemente, através de estudos com polimorfismos gênicos em outros genes pro-inflamatórios (ex. CCL2, BAT 1), ambos apresentando associação com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica (Ramasawmy et al. 2006 a,b).

De acordo com nossos achados no modelo cão, o desenvolvimento de atividade física em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, sem o uso diário de fármacos do grupo das estatinas, elevaria o perfil de citocinas pró-inflamatórias. Não se pode afirmar se necessariamente esse aumento contribuiria para uma resposta exacerbada ao coração ou se ele é, ao contrário, uma resposta da sobrecarga fisiológica e inflamatória do coração, como demonstrado pelos trabalhos clínicos em seres humanos. De qualquer forma, seja na condição sedentária, seja na condição de atividade física aeróbica (traduzida na rotina dos pacientes como um caminhar até o trabalho, como uma atividade laborativa no campo etc), o uso de estatinas exerceria um papel antiinflamatório que poderia trazer benefícios ao coração – menor inflamação, menor fibrose e menor remodelamento cardíaco.

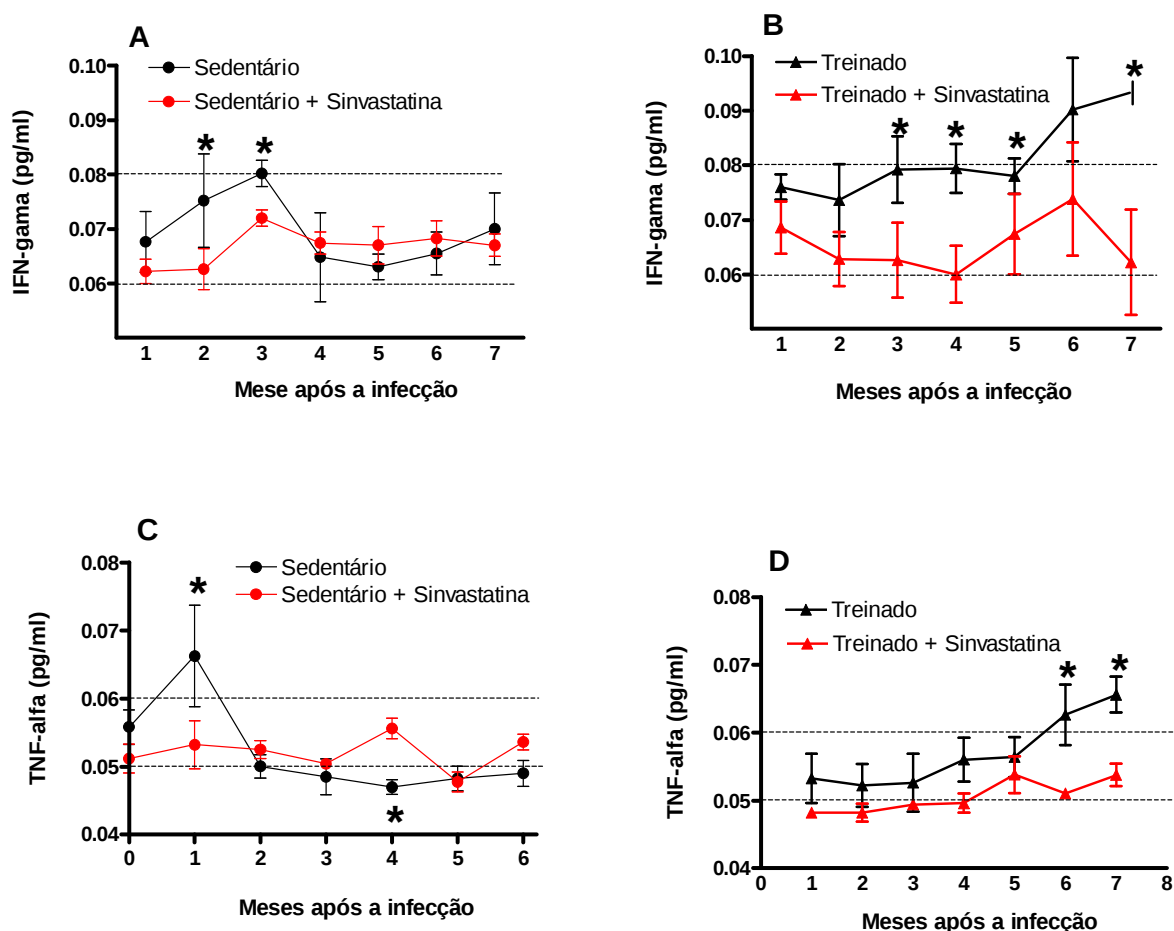


Figura 4. Efeitos da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Amostras de sangue foram coletadas mensalmente para avaliação da síntese de IFN-gama em animais sedentários e/ou tratados com Sinvastatina 20mg (A) e em animais treinados e/ou tratado com Sinvastatina 20mg (B). Também foi avaliada a síntese de TNF-alfa tanto em cães sedentários (C) quanto em cães treinados (D), ambos submetidos ou não ao tratamento diário com Sinvastatina 20 mg (D). Os pontos da curva são representativos da média +/- SEM para cada mês, sendo significativo * $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado com Sinvastatina.

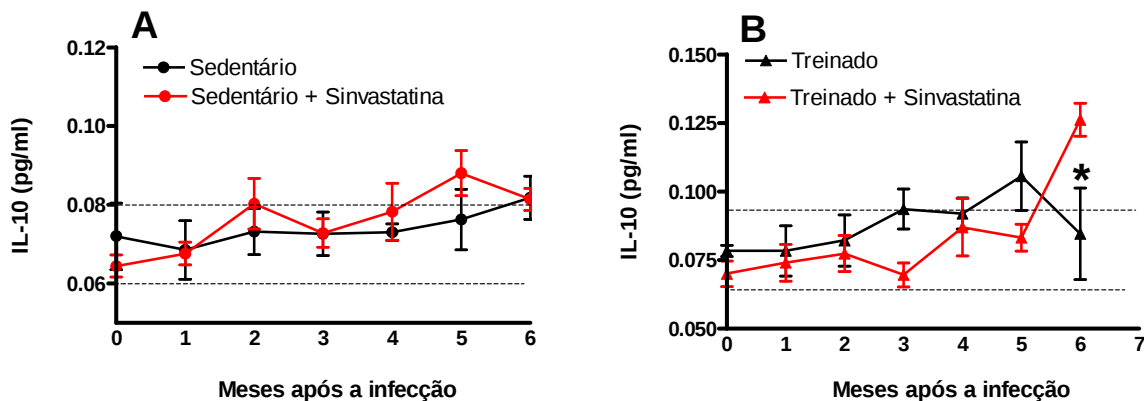


Figura 5. Efeitos da Sinvastatina e do treinamento físico aeróbico sobre a síntese de citocinas anti-inflamatórias. Amostras de sangue foram coletadas mensalmente para avaliação da síntese de IL-10 em animais sedentários e/ou tratados com Sinvastatina 20mg (A) e em animais treinados e/ou tratados com Sinvastatina 20 mg (B). Os pontos da curva são representativos da média $\pm$ SEM para cada mês, sendo significativo * $p < 0.01$ em relação ao grupo tratado com Sinvastatina.

4.3. Avaliação macroscópica e histopatológica do tecido cardíaco após o uso diário de Sinvastatina e do treinamento físico.

Estabelecido um padrão parcial de resposta encontrado nos cães de raça não definida para a infecção com a cepa Y do *T. cruzi*, a próxima etapa inicia uma avaliação direta no foco de nosso trabalho: o remodelamento cardíaco dependente do processo inflamatório. O remodelamento cardíaco, com previamente definido nesse trabalho, é uma condição induzida por qualquer injúria ao tecido cardíaco. Essa injúria pode ocorrer a partir de um infarto do miocárdio, de uma cardiopatia não isquêmica (ex. cardiopatia chagásica), em estágios finais de valvulopatias (especialmente as regurgitantes), em estágios finais de estenose aórtica, em doença hipertensiva e até mesmo em doenças infiltrativas que causam diminuição na função

dos miócitos (ex. cardiopatia chagásica) (Hill & Olson 2008, Cohn et al. 2000, Buckberg et al. 2008).

Em nossa avaliação macroscópica dos corações eutanasiados, observamos que 50% dos animais infectados pelo *T. cruzi*, porém sedentários, apresentaram uma leve flacidez de átrio direito (Fig. 6A), sendo o coração dos demais cães com aparência normal. Já no grupo sedentário tratado com a Sinvastatina, apenas um animal apresentou flacidez acentuada no átrio direito (Fig. 6B). Para nossa surpresa, o condicionamento prévio dos animais e seu treinamento físico diário proporcionaram inalteração macroscópica nesses órgãos em 100% dos animais (Fig. 6C), enquanto a administração de Sinvastatina propiciou alterações anátomo-patológica distintas em 100% dos animais (Fig. 6D), sendo as mesmas caracterizadas por: ausência de consistência no átrio direito (AD), pouca consistência no AD, leve ou acentuada flacidez no AD. Ainda, durante os seis meses de avaliação, não houve alteração na relação de peso do coração com o peso corporal dos animais, demonstrando ausência de cardiomegalia nessa etapa inicial da cardiopatia chagásica (Fig. 7).

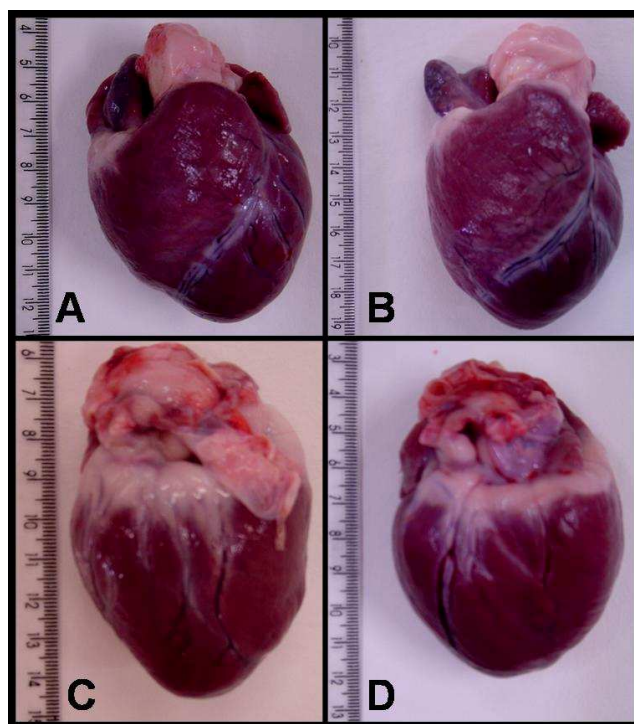


Figura 6. Representação morfológica do coração dos cães. Aspecto macroscópico do órgão cardíaco após seis meses de infecção com a cepa Y do *T. cruzi*, sendo (A) cães

sedentários, (B) cães sedentários tratados com Sinvastatina, (C) cães treinados e (D) cães treinados tratados com Sinvastatina.

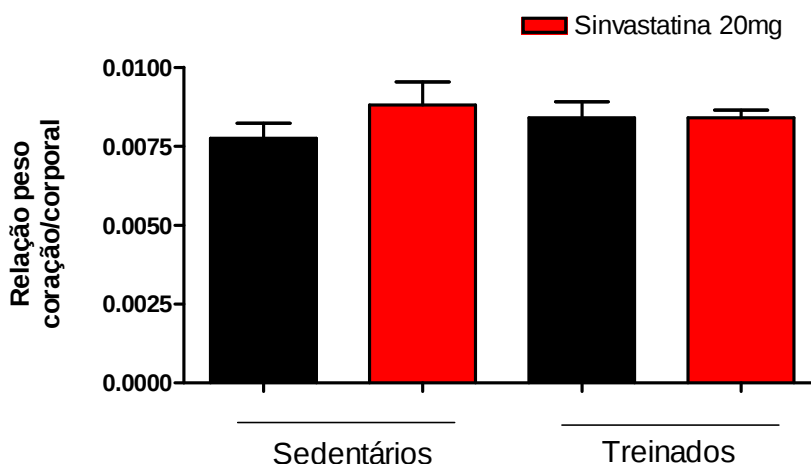


Figura 7. Relação existente entre o peso do coração e o peso corporal dos animais.

Antes da necrópisa, aos seis meses de infecção, os cães infectados pela cepa Y do *T. cruzi* foram pesados e, após a necrópia seu coração pesado. A relação entre o peso do coração e o peso corporal, como indicativo de hipertrofia do órgão, foi apresentada como a média do grupo +/- SEM. * $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado com Sinvastatina.

Nossos resultados proveniente do grupos sedentário sem tratamento apresentaram-se coerentes com as observações patológicas na doença de Chagas. Tal qual em seres humanos, a maioria dos cães infectados pelo *T. cruzi* ainda não apresentou manifestações patológicas representativas (ex. aneurisma de ponta) aos seis meses de infecção, tempo considerado uma etapa ainda precoce da fase crônica da doença. No modelo canino, em especial, tem sido descritos casos de cardiomegalia, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva, porém sem um estudo anátomo-patológico aprofundado. Essa correlação clínica, inclusive, já havia sido observada por Laranja & Andrade (1980), quando descreveram a forma crônica em um cão com dezesseis meses de infecção com características semelhantes às observadas na cardiopatia humana, com miocardite difusa, fibrose focal e intersticial, apresentando degeneração focal de fibras cardíacas em relação ao processo inflamatório. Andrade e colaboradores (1997) também procuraram correlacionar os achados anátomopatológicos com as alterações eletrocardiográficas e com as lesões anatômicas do sistema excito-condutor do coração. Esses

autores investigaram cães jovens inoculados com a cepa 12 SF isolada de caso agudo humano fatal e esses animais desenvolveram quadro agudo grave, com alto índice de letalidade até 21 dias de infecção. Esses animais apresentaram, também, quadros eletrocardiográficos e anátomo-patológicos idênticos àqueles representados pela clínica (humanos), indicando que, no modelo canino, pelo menos na fase aguda, os resultados obtidos experimentalmente poderiam reproduzir a doença de Chagas humana. Na fase crônica da doença de Chagas, ainda utilizando o modelo cão já é possível a identificação de lesões fibrótico-inflamatórias nos segmentos do sistema excito-condutor, possibilitando a compreensão dos eventos eletrocardiográficos característicos da doença (de Lana et al. 1988, de Lana et al. 1992).

É conhecido que o treinamento físico intenso realizado por atletas expõe o coração a intensas sobrecargas ao longo de meses ou anos. Essa freqüente exposição a sobrecargas resulta em alterações no automatismo cardíaco, como bradicardia de repouso, alteração da condução atrioventricular, despolarização e repolarização ventricular (Fang & Marwick 2003, Niederseer et al. 2007). Os ajustes estruturais do coração também são marcantes, podendo levar a aumentos de até 85% na massa do ventrículo esquerdo (Pluim et al. 1999). Nos pacientes com cardiopatia chagásica, o treinamento físico é um fator de alto risco para aqueles indivíduos com alterações moderadas ou graves. No entanto, nossa proposta foi exatamente preparar o órgão cardíaco para que o mesmo pudesse se adaptar as sobrecargas funcionais exercidas pela atividade física diária, antes do desenvolvimento de acometimentos devido à resposta imune contra o *T. cruzi*. Por outro lado, com base na literatura científica, seria esperado que após esse condicionamento físico houvesse uma predominância de um padrão de citocinas pró-inflamatórias (Aoi et al. 2004), aspecto sem maiores transtornos advindos de um indivíduo sem doença inflamatória correlata. Porém, não se sabe como esse padrão de resposta imune atuaria em um indivíduo com uma doença inflamatória progressiva, com é o caso da cardiopatia chagásica. Por outro lado, a administração da Sinvastatina, cujo papel anti-inflamatório em doenças crônicas e propriedade protetora no remodelamento cardíaco, já foi largamente descrita na literatura (Petersen & Pedersen 2005) poderia estabelecer um balanço entre os benefícios da atividade física e a redução do processo inflamatório cardíaco. Porém, observamos exatamente o oposto: macroscopicamente, a Sinvastatina não proporcionou benefício para o coração dos animais treinados.

Uma possível justificativa para essa alteração morfológica associada à administração de Sinvastatina em animais treinados poderia ser encontrada associada aos mecanismos vinculados à síndrome do *overtraining*. Essa síndrome, presente em atletas de alto nível competitivo, baseia-se no princípio da sobrecarga de treinamento físico e, como hipótese, acredita-se que a

exacerbação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-alfa, IL-1) produzidas exerceria ação supressora do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Smith 2000). Nesse sentido, devido a presença de mediadores inflamatórios sucedendo o quadro pró-inflamatório do overtraining, como resposta existe maior propensão a traumas teciduais em diferentes grupos musculares. Provavelmente, a associação entre cardiopatia chagásica e atividade física, complementada por um fármaco com atividade anti-inflamatória exacerbaria a condição de trauma muscular, tanto no músculo esquelético (não avaliado nesse trabalho) quanto no músculo cardíaco. Dessa forma, a análise microscópica e a avaliação funcional do coração (ecocardiografia) tornam-se instrumentos importantes para justificar o processo de remodelamento cardíaco observado na avaliação macroscópica.

Durante a avaliação histológica do tecido cardíaco não foram observados ninhos de amastigotas do parasito aos seis meses de infecção (dados não mostrados através de gráfico/foto). No entanto, um padrão inflamatório de células mononucleares, de caráter difuso, foi observado elevado em todos os grupos avaliados (sedentários e treinados), em relação aos tecidos de animais não infectados obtidos no laminário (banco de dados) do laboratório de doença de Chagas, NUPEB, UFOP.

O ventrículo direito dos animais infectados pelo *T. cruzi*, porém sedentários, apresentou níveis de infiltrado inflamatório semelhantes àqueles observados para o grupo de cães submetidos ao treinamento físico. Porém, apenas no primeiro grupo, a administração de Sinvastatina foi capaz de reverter o processo inflamatório nessa secção do coração (Fig 8). Em contrapartida, a formação de colágeno apresentou-se mais intensa no grupo de animais treinados, em relação aos animais sedentários. Mas de forma similar ao processo inflamatório, a Sinvastatina foi também eficiente ao proteger o miocárdio contra o processo de fibrose apenas no grupo de animais sedentários (Fig. 9).

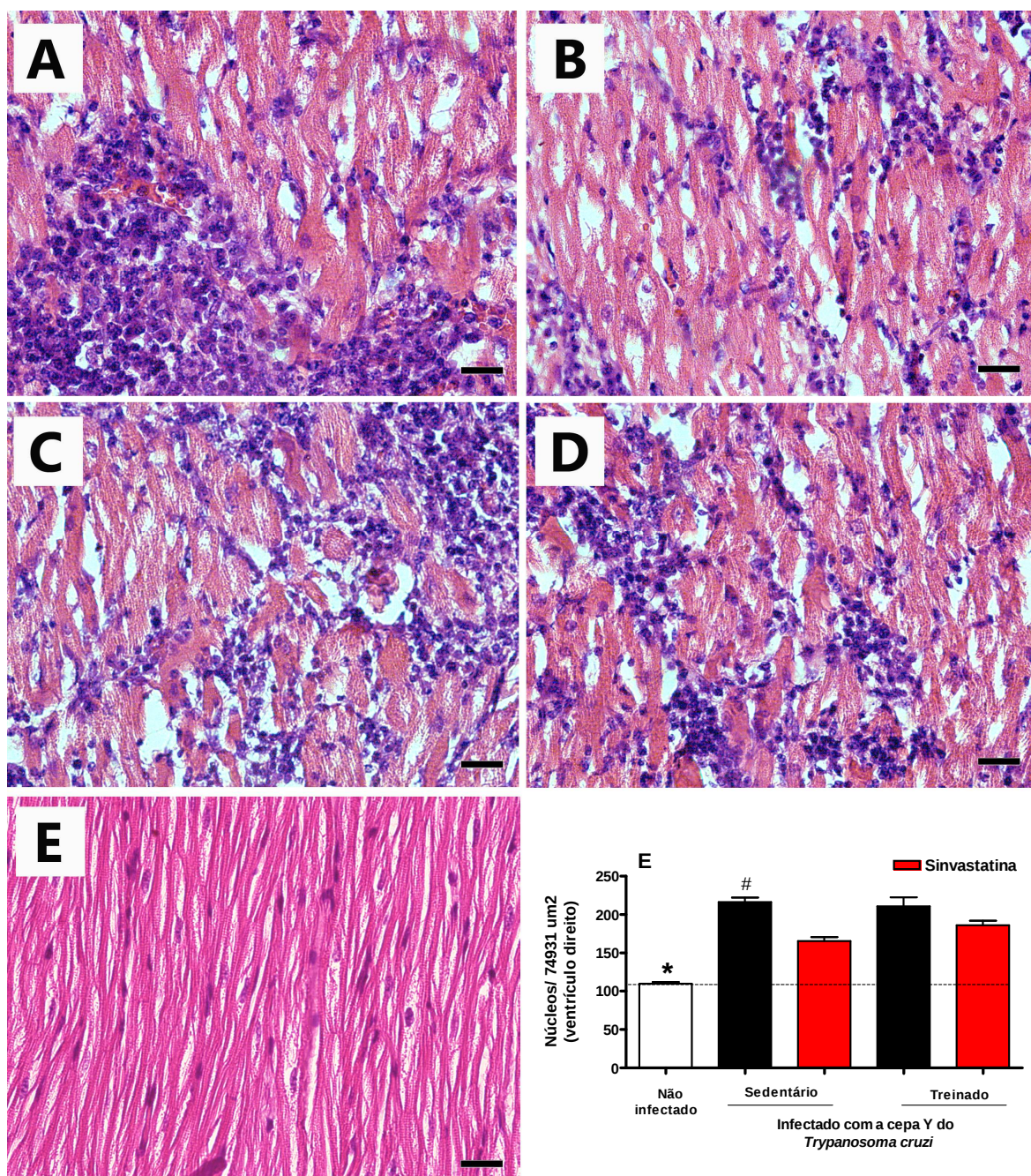


Figura 8. Simvastatina reduz o infiltrado inflamatório no ventrículo direito.

Fotomicrografia de cortes de fragmentos de ventrículo direito de animais sedentários (A e B) ou treinados (C e D) e animais não infectados (E). Observar que animais dos grupos tratados com a Simvastatina 20mg (B e D) apresentaram menor quantidade de células inflamatórias que seus respectivos pares (A e C). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 10 micrometros. Os resultados foram apresentados como média +/- SEM para cada grupo, sendo significativo $p < 0.01$ * em relação aos animais infectados, # em relação ao grupo tratado com Simvastatina no mesmo grupo e & em relação aos animais infectados treinados apenas.

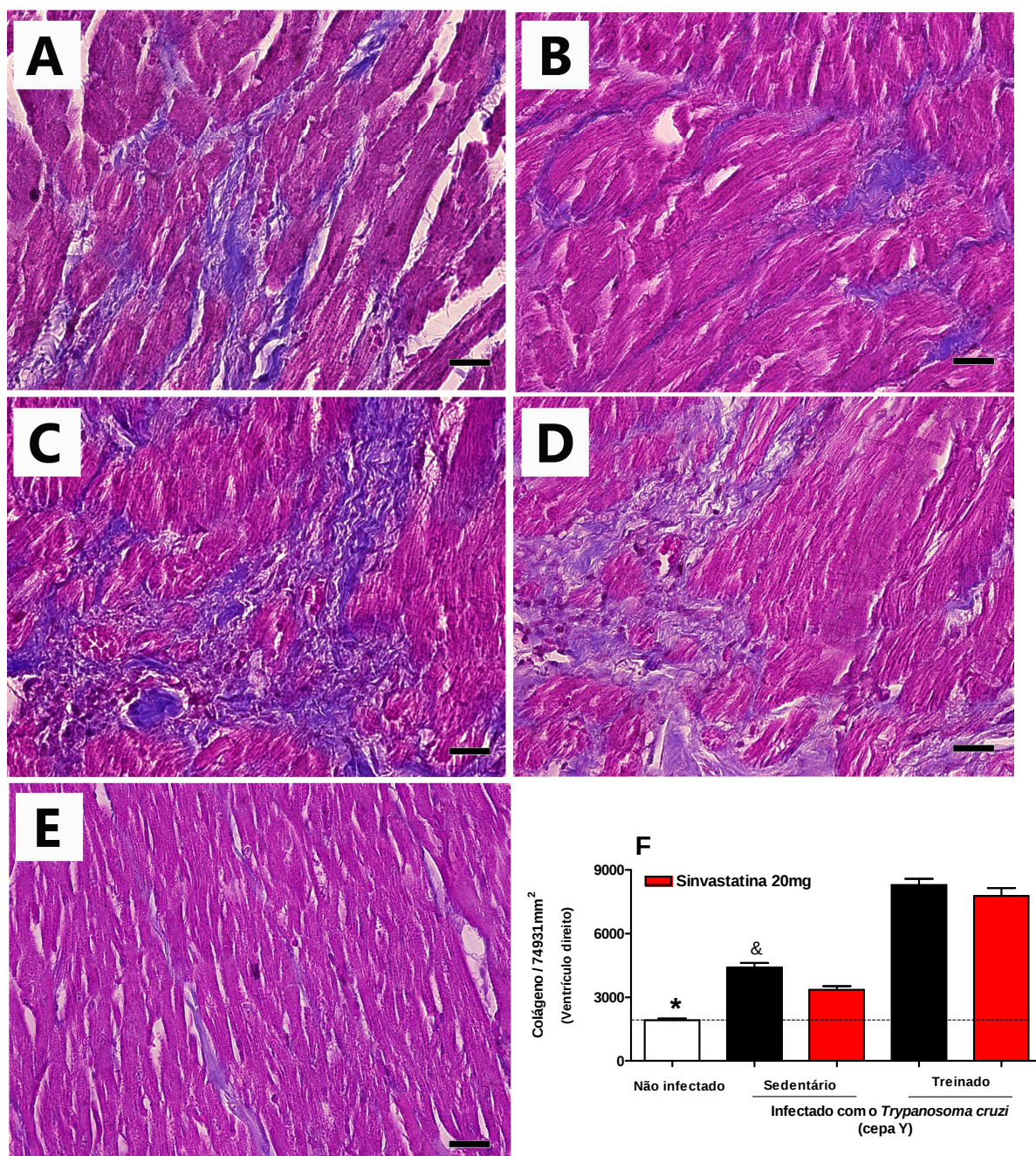


Figura 9. Simvastatina reduz a deposição de colágeno no ventrículo direito. Fotomicrografia de fragmentos do ventrículo direito de animais sedentários (A e B) ou treinados (C e D) e animais não infectados (E). Observar menor disposição de colágeno tecidual em animais sedentários (A e B) que seus respectivos pares treinados (C e D). Coloração: Tricômio de Masson. Barra=10 micrômetros. Os resultados foram apresentados como média +/- SEM para cada grupo, sendo significativo $p < 0.01$ * em relação aos animais

infectados, # em relação ao grupo tratado com Sinvastatina no mesmo grupo e & em relação aos animais infectados treinados apenas.

O ventrículo esquerdo apresentou um quadro diferenciado em relação ao processo inflamatório no tecido. Não houve diferença quanto ao grau de inflamação entre os grupos infectados sedentários ou em treinamento físico, utilizando ou não a Sinvastatina diariamente (Fig.10). Ao contrário do observado para o ventrículo direito, os animais sedentários apresentaram maiores índices de fibrose (representados aqui pela quantificação do colágeno) em relação aos animais treinados, sugerindo que o treinamento exerceu um potencial efeito protetor para essa secção cardíaca. No entanto, novamente apenas no grupo de sedentários, o uso de Sinvastatina foi capaz de reduzir o índice de fibrose no miocárdio (Fig. 11).

Já o átrio direito é considerado a região onde a miocardite chagásica canina processa-se com maior intensidade (Caliari et al. 2002). Na avaliação microscópica do átrio direito foi encontrado um padrão similar àquele observado no ventrículo direito. Assim, os animais do grupo sedentário não tratado com Sinvastatina apresentaram maiores índices de infiltrado inflamatório em relação aos cães treinados. Novamente, o uso da Sinvastatina foi capaz de reduzir esse infiltrado de leucocitário apenas nos animais sedentários (Fig. 12). Porém, de forma diferente daquela observada para os ventrículos, a Sinvastatina reduziu significativamente a fibrose átrio dos animais submetidos ao treinamento físico, mas não naqueles sedentários (Fig. 13). Ainda assim, o processo de fibrose nos animais submetidos ao treinamento físico permaneceu mais intenso do que nos animais sedentários. Esse fato reforça a idéia de que a qualidade da resposta inflamatória, potencializada pela presença do *T. cruzi* e pela condição pro-inflamatória da atividade física, desempenha papel na lesão miocárdica, do ponto de vista microscópico. É importante ressaltar, ainda, que a co-análise do infiltrado inflamatório e da presença de colágeno foi analisada do mesmo fragmento de tecido cardíaco coletado 6 meses após infecção. Em outras palavras, o processo de fibrose observado nos gráficos (Fig 9F, 11F e 13F) refletem a consequência de um processo inflamatório antecessor, o que poderia ser compreendido, de forma indireta, pela quantificação das citocinas pro-inflamatórias avaliadas sistemicamente nos gráficos (Fig 4 e 5). Dessa forma, se não houvesse o sacrifício desses animais no presente momento, provavelmente aqueles microfragmentos avaliados com maiores infiltrados inflamatórios seriam, a seguir, as principais áreas de fibrose/colágeno.

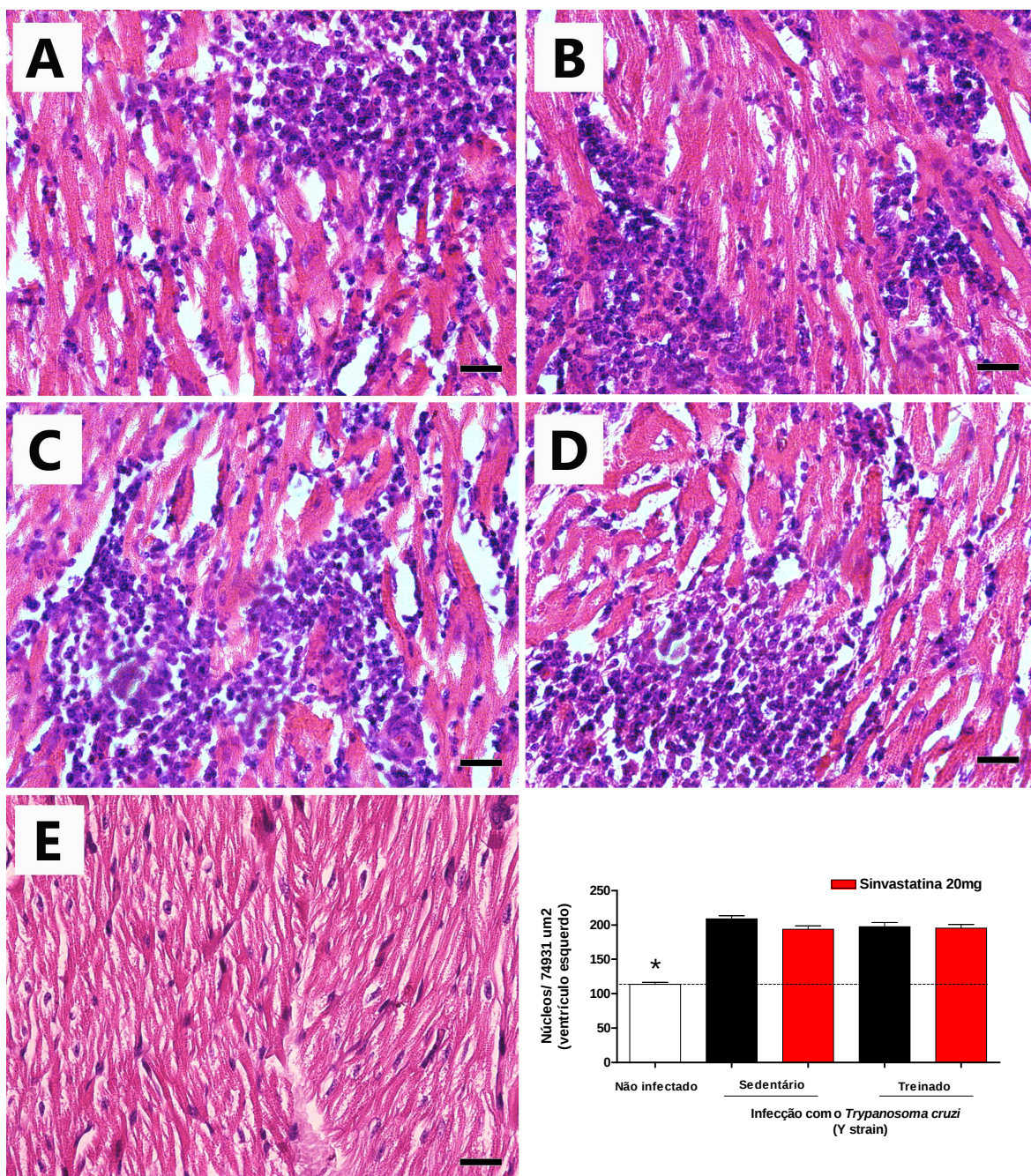


Figura 10. Fotomicrografia de cortes de fragmentos do ventrículo esquerdo. Imagens representativas de fragmentos de ventrículo esquerdo de animais sedentários (A e B) ou treinados (C e D) e animais não infectados (E). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra=10 micrômetros. Os resultados foram apresentados como média +/- SEM para cada grupo,

sendo significativo $p < 0.01$ * em relação aos animais infectados, # em relação ao grupo tratado com Sinvastatina no mesmo grupo e & em relação aos animais infectados treinados apenas.

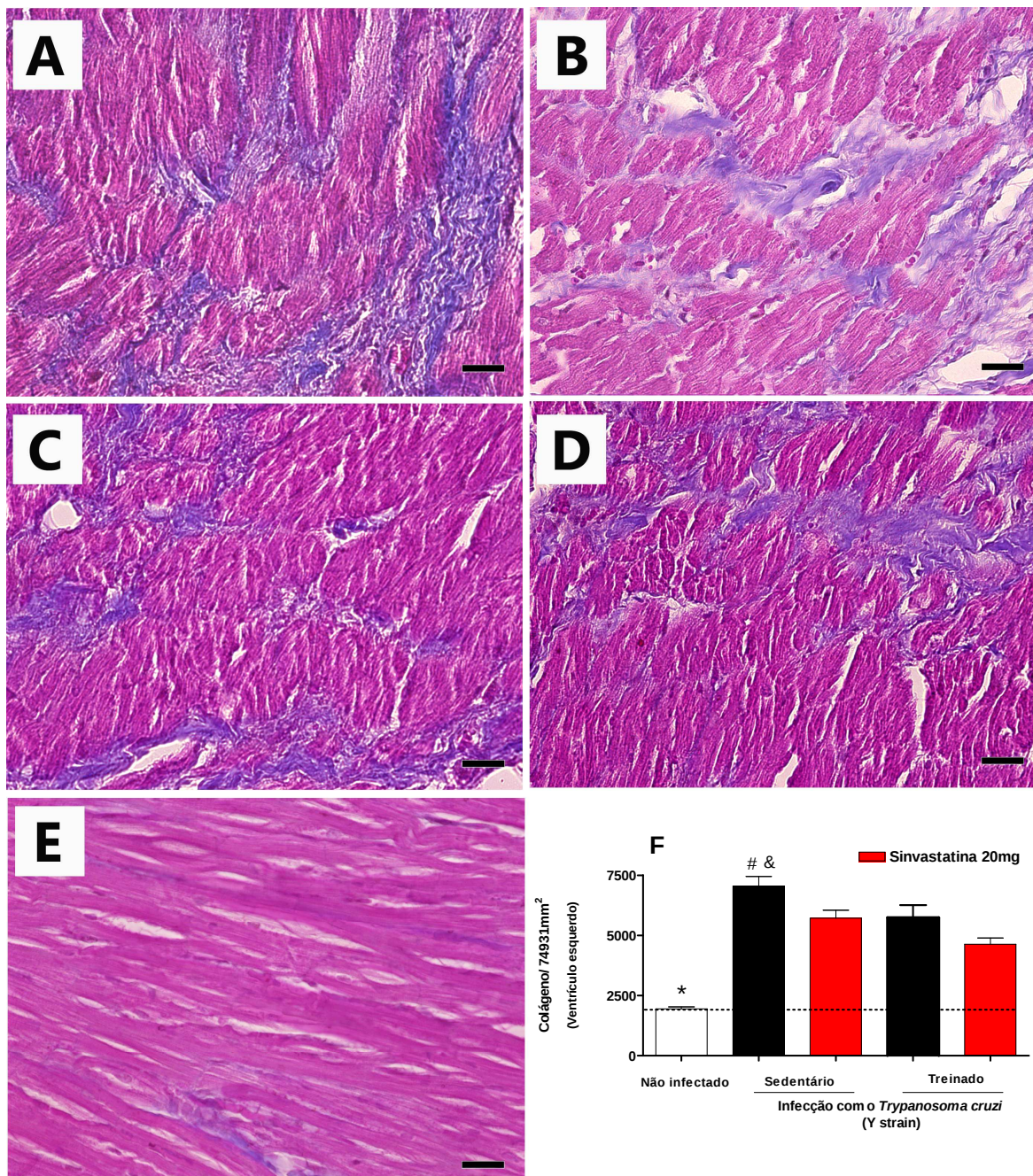


Figura 11. Sinvastatina reduz a deposição de colágeno no ventrículo esquerdo. Fotomicrografias de fragmentos do ventrículo esquerdo de animais sedentários (A e B) ou treinados (C e D) e animais não infectados (E). Observar menor disposição de colágeno tecidual em animais tratados com a Sinvastatina 20mg (B e D) que seus respectivos pares. Coloração: Tricômio de Masson. Barra=10 micrômetros. Os resultados foram apresentados

como média $\pm$ SEM para cada grupo, sendo significativo $p < 0.01$ * em relação aos animais infectados, # em relação ao grupo tratado com Sinvastatina no mesmo grupo e & em relação aos animais infectados treinados apenas.

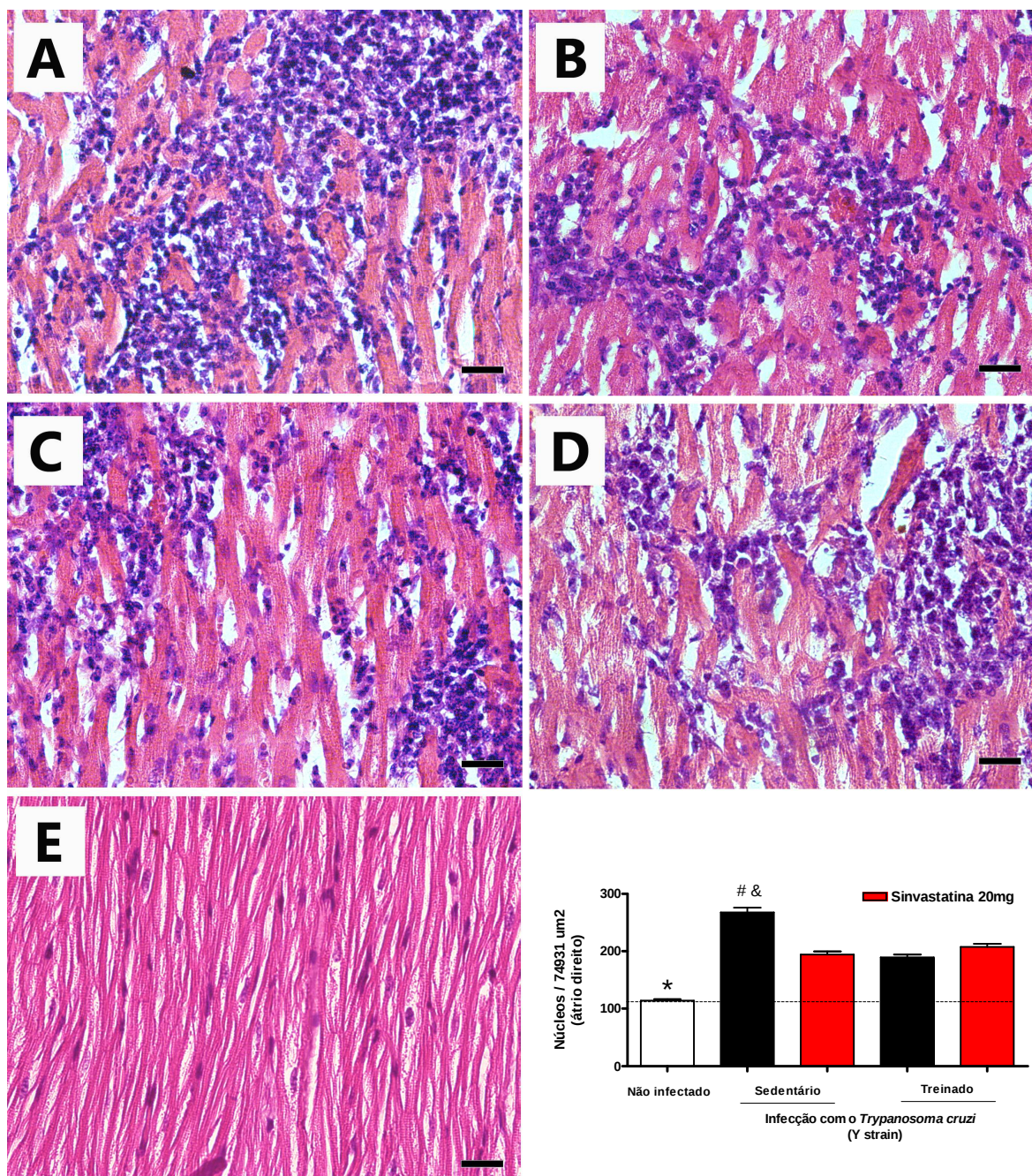


Figura 12. Sinvastatina reduz o infiltrado inflamatório no átrio direito. Fotomicrografias de fragmentos do átrio direito de animais sedentários (A e B) ou treinados (C e D) animais não infectados (E). Observar que animais sedentários não tratados com a Sinvastatina 20mg

apresentam maior número de células inflamatórias que os demais animais sedentários e treinados. Coloração: Hematoxilina & Eosina. Barra=10 micrômetros. Os resultados foram apresentados como média +/- SEM para cada grupo, sendo significativo $p < 0.01$ * em relação aos animais infectados, # em relação ao grupo tratado com Sinvastatina no mesmo grupo e & em relação aos animais infectados treinados apenas.

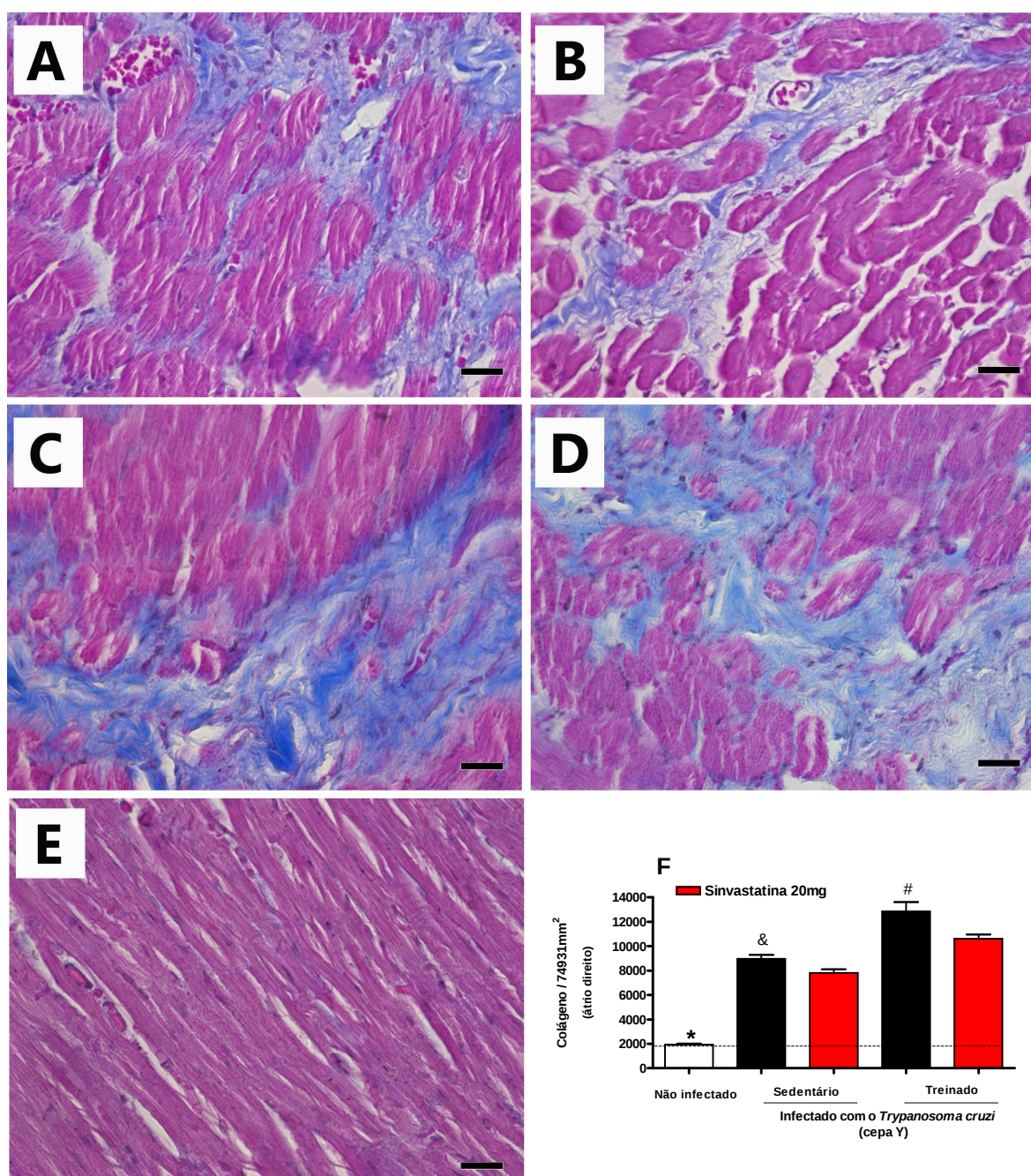


Figura 13. Sinvastatina reduz a deposição de colágeno no átrio direito. Fotomicrografias de fragmentos do átrio direito de animais sedentários (A e B) ou treinados (C e D) e animais

não infectados (E). Observar menor disposição de colágeno tecidual em animais treinados e tratados com a Sinvastatina 20mg (D) quando comparado com o grupo treinado e não tratado ou com os grupos não treinados (B, A e C). Coloração: Tricômio de Masson. Barra=10 micrômetros. Os resultados foram apresentados como média +/- SEM para cada grupo, sendo significativo $p < 0.01$ * em relação aos animais infectados, # em relação ao grupo tratado com Sinvastatina no mesmo grupo e & em relação aos animais infectados treinados apenas.

4.5. Efeitos da Sinvastatina e da atividade física aeróbica sobre a função cardíaca

O remodelamento cardíaco envolve uma série de situações fisiológicas em resposta a determinado estímulo/agressão. Inicialmente esse processo pode ser considerado adaptativo, mas a longo prazo, uma das consequências do remodelamento é o aparecimento de uma disfunção ventricular progressiva, resultado de alterações estruturais, bioquímicas e energéticas. Essas alterações culminam na deterioração da capacidade funcional do coração (Sutton et al. 2000, Remme 2003, Saini-Chohan & Hatch 2009).

Alguns parâmetros ecocardiográficos são largamente empregados para a avaliação da função ventricular: os diâmetros diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo (DVED e DVES), a fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) e a fração de encurtamento do VE (Delta D %). Em nossos estudos, observamos que animais sedentários durante a fase crônica apresentaram um aumento do DVED (Fig 14) e do DVES (Fig 15) mas apenas o DVED, foi totalmente revertido pelo uso da Sinvastatina (Fig. 14A e Fig 15A). De forma semelhante, animais submetidos à atividade física alguns dias antes da avaliação ecocardiográfica (período de adaptação à esteira) e ao longo de seis meses também apresentaram elevação do DVED e do DVES, principalmente aos 3 meses e 6 meses de infecção. Porém em todos os períodos a administração de Sinvastatina foi altamente capaz de impedir esse aumento em ambas as variáveis (Fig 14B e Fig 15B).

A fração de ejeção, medida através do método de discos (Simpson) mostrou-se inalterada nos animais sedentários até o 3º mês de infecção mas, na fase crônica, a fração de ejeção sofreu uma queda até mesmo nos animais sedentários em uso de Sinvastatina (Fig 16 A). Porém, essa suposta queda não pode ser considerada patológica, pois os animais ainda mantiveram 60% de sua capacidade de ejeção, condição considerada normal para os parâmetros funcionais cardíacos (Buckberg et al. 2008). Estando a atividade física em foco nesse trabalho, foi observada redução na FEVE dos animais em fase aguda e em fase crônica da doença (da mesma forma, ainda não caracterizando uma condição patológica). Mas, ainda assim, o uso da Sinvastatina foi capaz de assegurar uma fração de ejeção maior em relação aos

animais sem tratamento (Fig. 16B). O aumento parcial dos diâmetros sistólico e diastólico dos ventrículos e a leve redução da FEVE demonstrada já em uma etapa inicial da cardiopatia chagásica poderia ser reflexo do aumento de colágeno descrito para esses grupos, em decorrência da inflamação gerada pelo *T. cruzi*. Em alguns estudos foi avaliado o uso prolongado da Sinvastatina em doenças cardiovasculares sendo demonstrado que esse fármaco foi capaz de induzir regressão da hipertrofia e da fibrose, funcionando como um fator de proteção da função cardíaca em coelhos que apresentavam hipertrofia cardíaca (Palel et al. 20). Em modelo canino, a Sinvastatina mostrou-se capaz de atenuar a expressão de óxido nítrico induzido por citocinas. Dessa forma, a Sinvastatina parece reduzir o grau de disfunção ventricular esquerda, a resposta pró-fibrótica pelos fibroblastos e modular o remodelamento estrutural atrial em animais com doença cardíaca congestiva (Shiroshita-Takeshita e tla. 2007). Nossos resultados são similares a esses estudos em modelos experimentais (inclusive em relação ao óxido nítrico – dado não mostrado), porém é importante lembrar que a variável “*T. cruzi*” é uma pré-condição para uma resposta inflamatória progressiva e, consequentemente, uma fonte riquíssima de fibrose tecidual. Ainda assim, o uso de Sinvastatina apresenta-se altamente benéfica para reverter esse quadro.

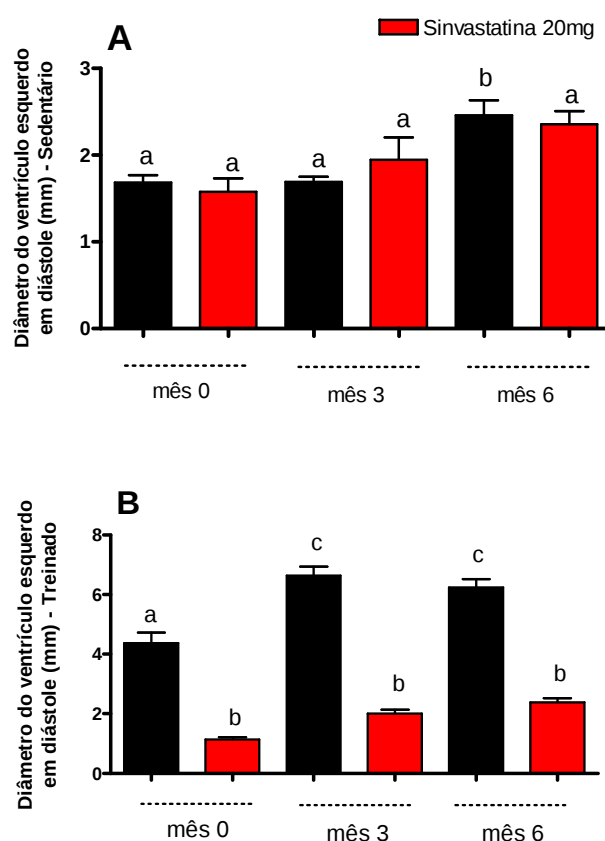


Figura 14. Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. Animais infectados pelo *T. cruzi* mantiveram-se em condição de sedentarismo (A) ou sob treinamento físico aeróbico diário (B) sendo alguns animais tratados com 20mg de Sinvastatina/dia (barras vermelhas) ou não (barras pretas). Trimestralmente, esses animais foram avaliados por ecodopplercardiografia e o diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole foi expresso pela média do grupo +/- SEM, já havendo compensação pelo ganho individual desses animais. Letras diferentes significam diferença estatística $p < 0.01$. Mês 0 = animais não infectados pelo *T. cruzi*.

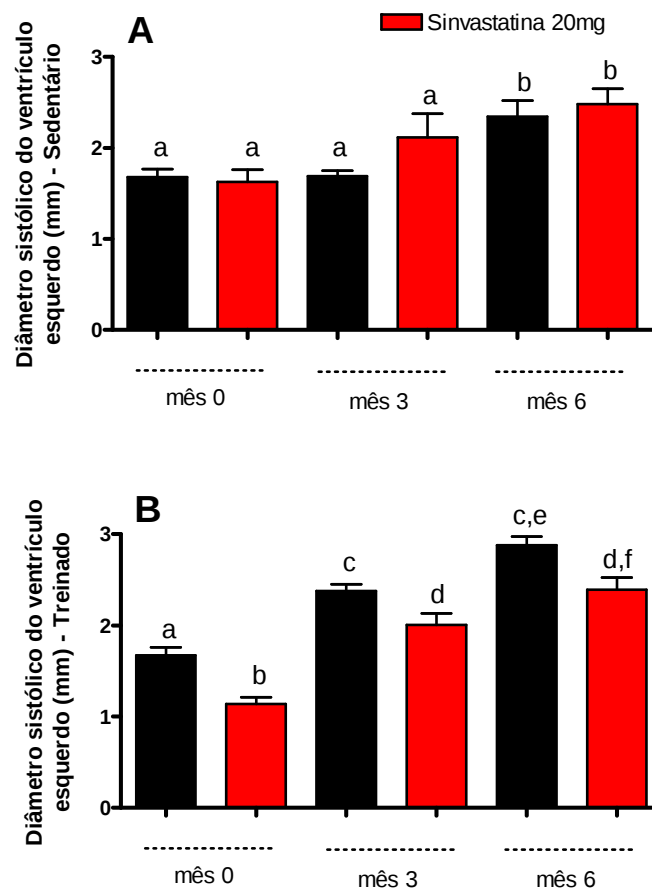


Figura 15. Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. Grupos de 5 cães infectados pelo *T. cruzi* mantiveram-se em estado sedentário (A) ou sob treinamento físico aeróbico diário (B) sendo alguns animais tratados com 20mg de Sinvastatina/dia (barras vermelhas) ou não (barras pretas). Trimestralmente, esses animais foram avaliados por ecodopplercardiografia e o diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole expresso pela média do grupo +/- SEM, já havendo compensação pelo ganho individual dos cães. Letras diferentes significam diferença estatística $p < 0.01$. Mês 0 = animais não infectados pelo *T. cruzi*.

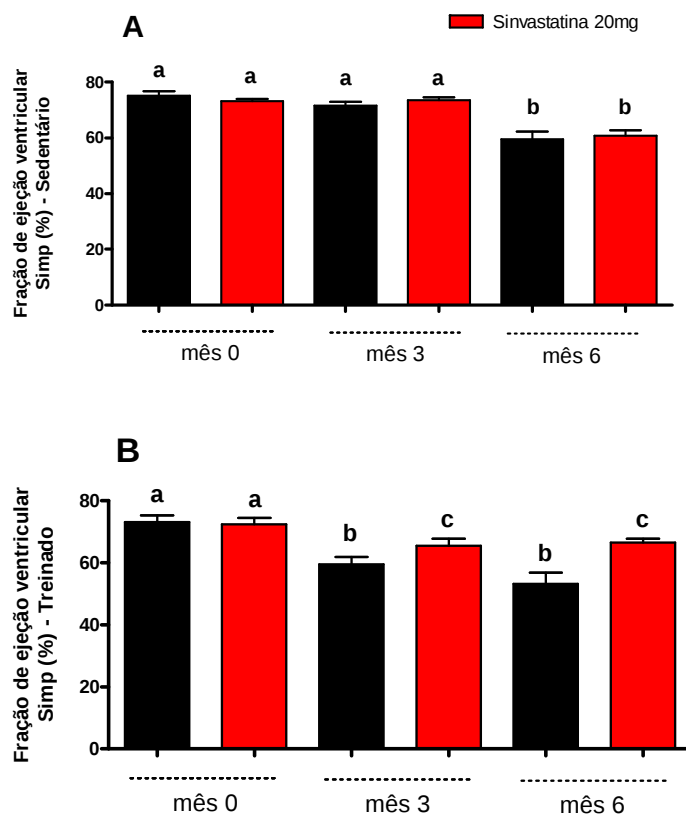


Figura 16. Fração de ejeção ventricular esquerda “Simpson”. Grupos de 5 cães infectados pelo *T. cruzi* mantiveram-se em condição sedentária (A) ou sob treinamento físico aeróbico diário (B) sendo alguns animais tratados com 20mg de Simvastatina/dia (barras vermelhas) ou não (barras pretas). Trimestralmente, esses animais foram avaliados por ecodopplercardiografia e a fração de ejeção expressa pela média das porcentagens dos grupos $\pm$ SEM. Letras diferentes significam diferença estatística $p < 0.01$. Mês 0 = animais antes da infecção pelo *T. cruzi*.

Vale ainda ressaltar que a ecocardiografia permite diferenciar rapidamente alguns parâmetros indicativos da cardiomiopatia em cães (Pascon 2007). Um parâmetro avaliado nesse trabalho e altamente associado à função sistólica foi a porcentagem da fração de encurtamento (Delta D). Essa variável mostrou-se reduzida tanto em cães sedentários quanto em cães submetidos à atividade física (Fig 17A, B) apenas durante a fase crônica da doença e,

nesses animais a Sinvastatina não foi capaz de reverter a tendência de redução dessa variável. Por outro lado, a avaliação ecocardiográfica dos volumes sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo (VVES e VVED), mostrou aumento desses volumes tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas (Fig 18A,C). Fato interessante foi a elevação desses parâmetros nos animais sedentários que receberam tratamento com Sinvastatina. Esse resultado mostra-se incoerente aos aspectos morfológicos previamente descritos durante a necrópsia desses animais, onde animais tratados com Sinvastatina apresentaram maior flacidez atrial direita. Por outro lado, a atividade física, nos cães chagásicos, aumentou tanto o VVES (Fig 18B) quanto o VVED (Fig 18D), porém esses volumes foram reduzidos nos cães tratados com Sinvastatina tanto na fase aguda quanto na crônica.

No modelo canino de cardiomiopatia dilatada, a diminuição da fração de encurtamento, bem como a dilatação ventricular, manifesta pelo aumento dos volumes sistólico e diastólico dos ventrículos, ocorrem principalmente do lado esquerdo do coração e é mais frequente em raças como Boxer e Doberman. Em raças não definidas (mongrel), essa dilatação pode ser bilateral (Cordeiro & Martins 2002).

Por outro lado, a percentagem de encurtamento sistólico do diâmetro ventricular (% Δ D) indica o grau de diminuição do diâmetro menor do VE com a contração ventricular, e é dada por:

$$\% \Delta D = DS/DD \times 100$$

Sendo - DS: diâmetro sistólico do VE e DD: diâmetro diastólico do VE

No coração normal, cerca de 80% do volume de ejeção se devem ao encurtamento do diâmetro menor, e apenas 20% ao encurtamento do diâmetro maior. Portanto, o encurtamento sistólico do diâmetro menor é o principal responsável pela diminuição volumétrica da cavidade ventricular esquerda e pela fração de ejeção, existindo uma boa correlação entre esta fração e a % Δ D. Fortuin e colaboradores mostraram ser possível separar coração com função ventricular esquerda anormal dos normais através do delta D% (Fortuin 1973). A presença das duas variáveis (exercício físico e uso de Sinvastatina) têm sido largamente estudadas em condições de disfunções cardíacas, inclusive, em modelo canino (Billman 2006), mas nunca em associação com a infecção pelo *T. cruzi*.

Alguns autores apontam para o exercício físico aplicado por quatro semanas como um fator benéfico para os efeitos hemodinâmicos na cardiopatia congestiva em cães, principalmente por seus efeitos nas propriedades diastólicas (Todaka et al. 1997). Parte dos

efeitos positivos da atividade física estão relacionadas aos seus efeitos sobre o metabolismo periférico e sobre as funções endoteliais (Adampoulus et al. 1993). Há evidências de que a atividade física leve, moderada e, principalmente intensa é responsável por drástica mudança no perfil inflamatório dos animais ou seres humanos em condicionamento. No caso dos eventos observados para a cardiopatia chagásica crônica, a persistência desse perfil pró-inflamatório tem demonstrado efeitos não interessantes para os cães infectados pelo *T. cruzi*, mesmo que condicionamento físico seja anterior ao desenvolvimento da cardiopatia propriamente dita.

Finalmente, foi avaliado ainda o índice cardíaco e a relação E/A nesses animais. Em relação à avaliação da função diastólica global, o *doppler* tecidual pode ser útil na diferenciação entre padrões de fluxo de enchimento ventricular normal e pseudonormal, pois, ao avaliar a velocidade miocárdica e não o fluxo transvalvar, sofre muito pouco influência da pré-carga. A presença de relação $E'/A' < 1$, ao *Doppler* tecidual, medida no anel mitral, em indivíduos com padrão de fluxo mitral normal ao *Doppler* pulsátil, é indicativa de disfunção diastólica Grau 2, ou pseudonormal (Yamada et al. 2002). Admite-se, inclusive, que em presença de qualquer grau de disfunção diastólica global, a velocidade da onda E' no anel mitral estará reduzida, sendo inferior a 8 cm/s no adulto e 10 cm/s nos indivíduos jovens.

Uma outra aplicação do *Doppler* tecidual consiste na possibilidade de se estimar a pressão atrial esquerda. Embora haja outros parâmetros, a medida mais simples e exequível consiste avaliação da relação E/E', isto é, a razão entre a velocidade da onda E do fluxo mitral e a onda E' do *Doppler* tecidual do segmento miocárdico ao nível do anel mitral, medida esta que mostra boa correlação com os valores de pressão de enchimento ventricular, considerando-se como valor normal relação $E/E' < 8$ (Nagueh et al. 2001). Para esse grupo de pesquisadores, a a relação $E/E' > 10$ tem valor preditivo para pressão capilar pulmonar média superior a 15mmHg e, o uso da Sinvastatina em modelo experimental (coelhos transgênicos) ou seres humanos foi capaz de melhorar a função cardíaca, reduzir a hipertrofia e prevenir aumento de fibrose no órgão avaliado (Patel et al. 2001). Outros autores (Ommen et al. 2000), informam que a pressão de enchimento ventricular

esquerdo pode ser classificada como alta, indeterminada ou normal de acordo com a relação E/E' ao *Doppler* tissular (>15; entre 8 e 15 e <8, respectivamente).

Em nosso achados, observamos que em cães sedentários submetidos apenas ao tratamento com a Sinvastatina, houve um aumento do índice cardíaco tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas (Fig 19A). Por outro lado, a atividade física mostrou-se benéfica por elevar o índice cardíaco nos animais tanto na fase aguda e quanto na fase crônica (Fig 19B).

Ao contrário do índice cardíaco em que o uso da Sinvastatina não alterou os parâmetros clínicos, na relação E/A houve aumento significativo para os animais sedentários sob tratamento (Tabela 3). Apesar de nenhum dos grupos avaliados ter apresentado uma relação E/A menor que 1, indicativo de disfunção diastólica grau 1, o uso de Sinvastatina foi capaz de diferenciar essa relação em relação aos animais não infectados e em relação aos animais também sedentário sob tratamento. Portanto, seja nos parâmetros de resposta imune, histopatológicos ou funcionais cardíacos, nossos dados reforçam os cuidados com a atividade física (lazer ou laborativa) do paciente chagásico e a necessidade de maiores estudos envolvendo as estatinas para o tratamento profilático do remodelamento cardíaco associado à doença de Chagas.

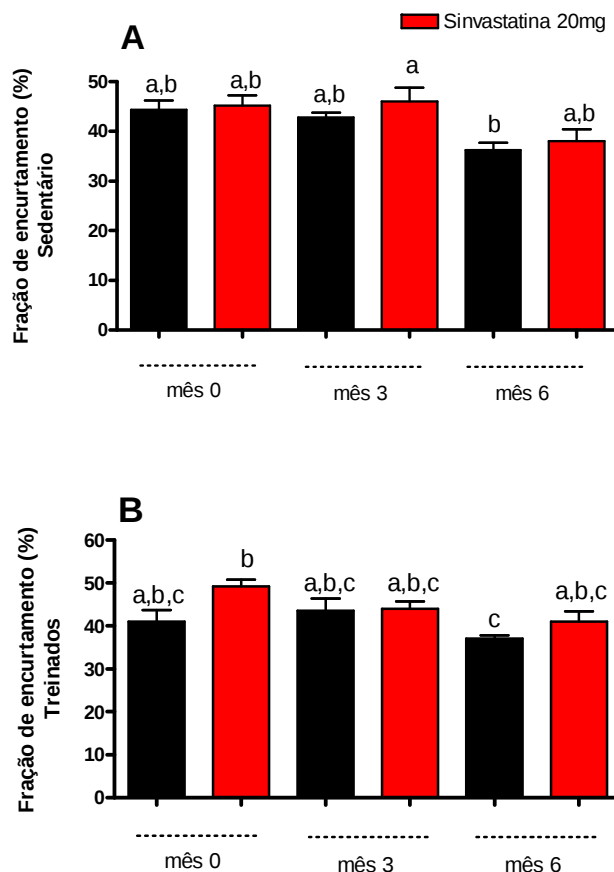


Figura 17. Fração de encurtamento/Delta D. Grupos de 5 cães infectados pelo *T. cruzi* mantiveram-se em estado sedentário (A) ou sob treinamento físico aeróbico diário (B) sendo alguns animais tratados com 20mg de Simvastatina/dia (barras vermelhas) ou não (barras pretas). Trimestralmente, esses animais foram avaliados por ecodopplercardiografia e o percentual de encurtamento das fibras cardíacas (delta D) expresso pela média das porcentagens do grupo $\pm$ SEM. Letras diferentes significam diferença estatística $p < 0.01$. Mês 0 = animais não infectados pelo *T. cruzi*.

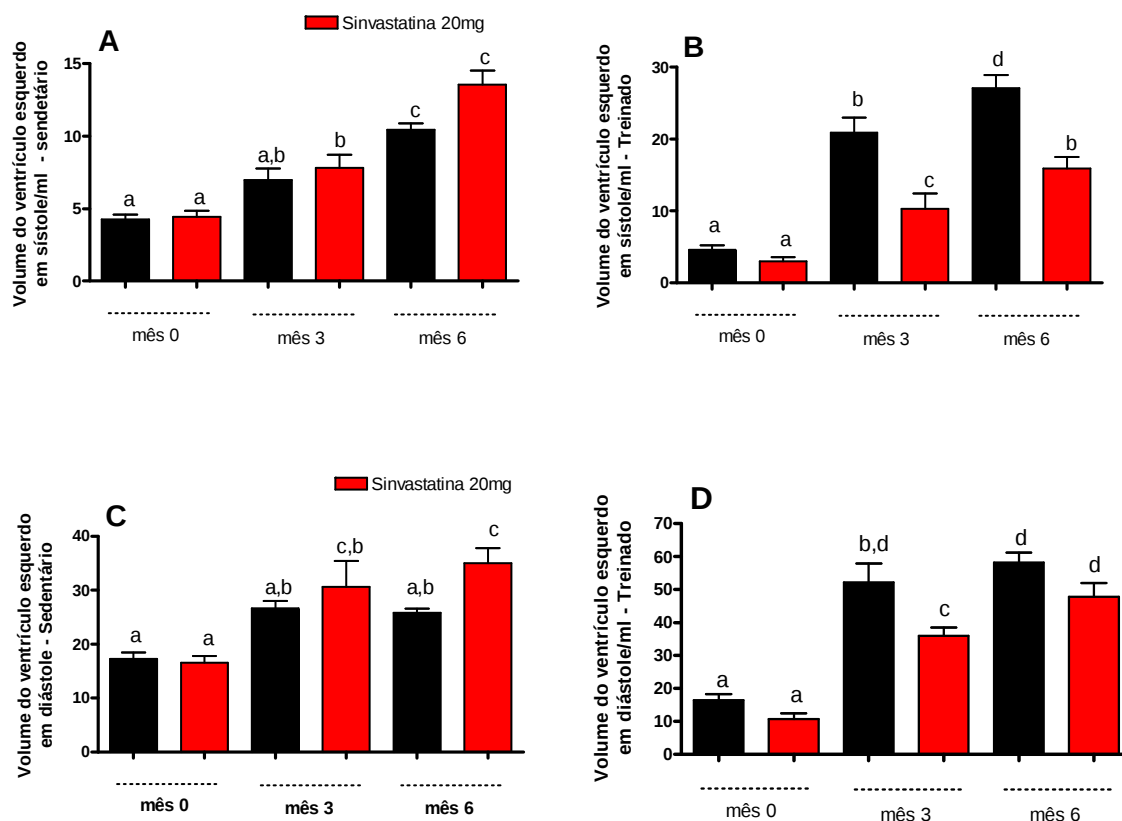


Figura 18. Volume diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo. Grupos de 5 cães infectados pelo *T. cruzi* mantiveram-se em estado sedentário (A,C) ou sob treinamento físico aeróbico diário (B,D) sendo alguns animais tratados com 20mg de Simvastatina/dia (barras vermelhas) ou não (barras pretas). Trimestralmente, esses animais foram avaliados por ecodopplercardiografia e volume do ventrículo esquerdo em sístole (A,B) e em diástole (C,D) expressos pela média das porcentagens do grupo $\pm$ SEM. Letras diferentes significam diferença estatística $p < 0.01$. Mês 0 = animais não infectados pelo *T. cruzi*.

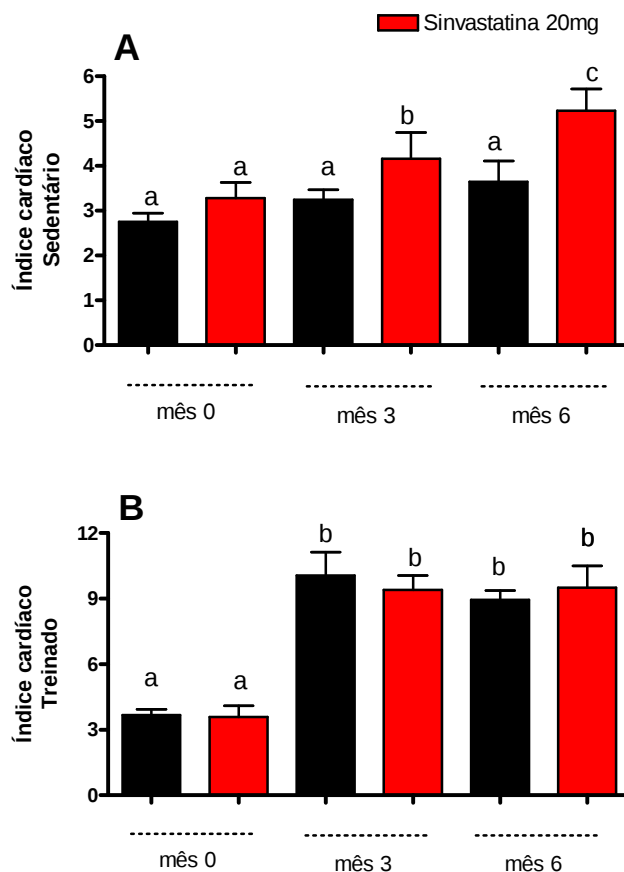


Figura 19. Índice cardíaco. Grupos de 5 cães infectados pelo *T. cruzi* mantiveram-se em estado sedentário (A) ou sob treinamento físico aeróbico diário (B) sendo alguns animais tratados com 20mg de Sinvastatina/dia (barras vermelhas) ou não (barras pretas). Trimestralmente, esses animais foram avaliados por ecodopplercardiografia e o índice cardíaco expresso pela média das porcentagens do grupo $\pm$ SEM. Letras diferentes significam diferença estatística $p < 0.01$. Mês 0 = animais não infectados pelo *T. cruzi*.

Tabela 3. Relação E/A sob influência da Sinvastatina e da atividade física aeróbica em cães com cardiopatia chagásica crônica.

	RELAÇÃO E/A		
	Mês 0 (média +/- SD)	Mês 3 (média +/- SD)	Mês 6 (média +/- SD)
Sedentário	1.72 +/- 0.177	1.68 +/- 0.203	1.50 +/- 0.147
Sedentário + Sinvastatina	1.35 +/- 0.132	1.64 +/- 0.128	1.87 +/- 0.342 *, #, &
Treinado	1.63 +/- 0.104	1.60 +/- 0.094	1.44 +/- 0.103
Treinado + Sinvastatina	1.43 +/- 0.182	1.56 +/- 0.074	1.46 +/- 0.096

Mês 0= animal não infectado

*p<0.05 se comparado com o grupo de não infectado (mês 0) no grupo sedentário + sinvastatina

p<0.05 se comparado com o grupo sedentário (mês 6)

& p<0.05 se comparado com o grupo treinado + Sinvastatina (mês 6)

5. Conclusão

O remodelamento cardíaco na doença de Chagas (DC) é um mecanismo multifatorial desencadeado inicialmente pela presença do *Trypanosoma cruzi* e dependente em primeira instância de uma resposta inflamatória progressiva e de aspectos endócrinos e neurohumorais. Nesse sentido, após avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico antecedendo a infecção pelo *T. cruzi* (e formação de inflamação/lesão no miocárdio) e os efeitos do uso diário de uma inibidora da HMG-CoA redutase, Sinvastatina, nossas conclusões foram:

- (i) O exercício físico aeróbico, apesar de ser apontado como benéfico para o cardiopatias de outras etiologias, na DC ele ocasionou maior resposta inflamatória contra o miocárdio, maior depósito de colágeno caracterizando um quadro de fibrose e apresentou-se prejudicial para a maioria dos parâmetros funcionais avaliados através da ecocardiografia. No entanto, morfológicamente, a atividade física propiciou uma estrutura aparentemente normal para o coração aos seis meses de infecção.
- (ii) A Sinvastatina, demonstrada anteriormente por suas propriedades anti-inflamatórias, foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias sistêmica, exercer atividade anti-*T. cruzi* na fase aguda, reduzir o quadro de infiltrato inflamatório e fibrose no miocárdio e, principalmente, induzir uma melhora ou bloquear a evolução das disfunções ventriculares na cardiopatia chagásica experimental.
- (iii) Finalmente, concluímos que o cão apresenta-se, inevitavelmente, como o melhor modelo para o estudo da DC em termos comparativo com a clínica e imunopatologia desenvolvidas em seres humanos e,
- (iv) Sugere-se maiores investigações das estatinas aplicadas à cardiopatia chagásica com base nos diversos trabalhos (insuficiência cardíaca congestiva) apontando para suas propriedade de (i) beneficiar a função ventricular esquerda, (ii) impedir a hipertrofia cardíaca e ainda, (iii) modular a resposta inflamatória. Seu uso na clínica da DC poderia trazer benefícios tanto para aqueles indivíduos ainda em fase inicial da cardiopatia chagásica.

6.0. Referências Bibliográficas

Abel L.C., Rizzo L.V., Ianni B., Albuquerque F., Baça F., Carrara D., Bocchi E.A., Teixeira H.C., Mady C., Kalil J., Cunha-Neto E. (2001). Chronic Chaga's disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gama response to *Trypanosoma cruzi* infection. J Autoimmun, v. 17, p.99-107.

Abrahamsohn I.A., Coffman R.L.(1995). Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. The Journal of Immunology, v. 155, p. 3955-3963.

Adamopoulos PN, Macrilakis K, Papamichael C, Malakos I, Panayidis N, Mouloupoulos SD (1993). Physical activity and relationship with coronary heart disease risk factors. Acta Cardiol. ;48(6):523-34

Adams K.F. (2009). Introduction: biomarkers in heart failure. Heart Fail Rev.(epub ahead of print).

Andrade Z.A., Andrade S.G.(1980). Pathology of experimental Chagas disease in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 75(3), p.77-95.

Andrade, Z.A.; Andrade, S.G.; Sadigursky, M.; Wenthold, R.J.; Hilberg, S.L.; Ferrans, V.J.(1997). The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. Am. J. Trop. Hyg., v.57, n.3, p.328-336.

Anversa P., Kajstura J.(1998). Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. Circ Res, v.83, p. 1-14.

Aoi W., Naito Y., Takanami Y., Kawai Y., Sakuma K., Ichikawa H., Yoshida N., Yoshikawa T. (2004). Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. Free Radic Biol Med, v.37, p.480-87.

Ascer E., Bertolami M.C., Venturinelli M.L. et al.(2004). Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*, v. 177, p. 161-66.

Batlouni M., Albuquerque D.C.(2000). Bloqueadores beta-adrenérgicos na insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*, v. 75, p. 339-49.

Benchimol-Barbosa P.R. (2009). Cardiac remodeling and predictors for cardiac death in long-term follow-up of subjects with chronic Chagas' heart disease: a mathematical model for progression of myocardial damage. *Int J Cardiol*, v.131 (3), p. 435-8.

Bern C., Montgomery S.P., Herwaldt B.I., rassi Jr. A., Marin-Neto J.A., Dantas R.O., Maguire J.H., Acquatella H., Morillo C., Kirchhoff L.V., Gilman R.H., Reyes P.A., Salvatella R., Moore A.C.(2007). Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States. *JAMA*, v. 298, p. 2171-81.

Bestetti R.B., Coutinho-Netto J., Staibano L., Pinto L.Z., Muccillo G., Oliveira J.S.(1995). Peripheral and coronary sinus catecholamine levels in patients with severe congestive heart failure due to Chagas`disease. *Cardiology*, v. 86, p. 202-06.

Bestetti R.B., Muccillo G.(1997). Clinical course of Chagas' heart disease: a comparasion with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, Sidney, v.60: p.187-93.

Bilate AM, Cunha-Neto E.(2008). Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.;50(2):67-74

Billman GE. (2006). A comprehensive review and analysis of 25 years of data from an in vivo canine model of sudden cardiac death: implications for future anti-arrhythmic drug development. *Pharmacol Ther* v.111(3), p.808-35.

Biria M., Howard P.A., Vacek J.(2008). Do statins have a role in the management of diastolic dysfunction? *Am J Cardiovasc Drugs*, v. 8(5), p. 297-303.

Booz G.W., Baker K.M.(1995). Molecular signaling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, v. 30, p. 537-43.

Borer J.S., Truter S., Herrold E.M., Falcone D.J., Pena M., Carter J.N., Dumlao T.F., Lee J.A., Supino P.G.(2002). Myocardial fibrosis in chronic aortic regurgitation: molecular and cellular responses to volume overload. *Circulation*, v. 105, p. 1837-43.

Braunwald E., Bristow M.R.(2000). Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation*, v. 102, p.IV.14-IV.23.

Brener Z. (1962). [Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*](#). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.4:389-96.

Brener Z. (1962). [Observations on immunity to superinfections in mice experimentally inoculated with *Trypanosoma cruzi* and subjected to treatment](#). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 4:119-23.

Brener Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review in Microbiology*, v. 27, p. 347-382.

Brener Z., Gazzinelli R.T.(1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas'disease. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 114(2), p.103-10.

Briest W., Homagk L., Rassler B., Ziegelhoffer-Mihalovicova B., Meier H., Tannapfel A., Leiblein S., Saalbach A., Deten A., Zimmer H.G.(2004). Norepinephrine induced changes in cardiac transforming growth factor beta isoform expression pattern of female and male rats. *Hypertension*, v. 44, p. 410-18.

Bronfen E., de Assis Rocha F.S., Machado G.B., Perillo M.M., Romanha A.J., Chiari E.(1989). Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas'disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 84(2), p. 237-40.

Buckberg G., Hoffman J.I.E., Mahajan A., Saleh S., Coghlan C. (2008). Cardiac mechanics revisited: the relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation*, v. 9, p. 2572-2587.

Buckner F.S.(2008). Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. Adv Exp Med Biol, v. 625, p. 61-80.

Caliari M.V., do Pilar Machado R., de Lana M., Caja R.A., Carneiro C.M., Bahia M.T., dos Santos C.A., Magalhães G.A., Sampaio I.B., Tafuri W.L.(2002). Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. Rev Inst Med Trop São Paulo, v. 44(5), p. 273-8, 2002.

Campbell D.A., Westenberger S.J., Sturm N.R. (2004). The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. Cur Mol Med, v. 4, p. 549-62.

Campos M.A., Gazzinelli R.T.(2004). *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators Inflamm, v.13(3), p.139-43.

Cançado JR. (1999). [Criteria of Chagas disease cure](#). Mem Inst Oswaldo Cruz;94 Suppl 1:331-5.

Carl J, Vaughan and Antonio M. Gotto,Jr.(2003). Update on Statins. 110; 886-92.

Caspersen C.J., Powell K.E., Christenson G.M.(1985). Physical activity, exercise and physical fitness. Public Health Reports, v. 100(2) , p.126-31.

Chagas, C.(1909). Nova tripanosomíase humana. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v.1, p.15 90218.

Chen K., Mehta J.L., Li D., Joseph L., Joseph J.(2004). Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. Circ Res , v. 95, p. 1167-73.

Cheung C., Luo H., Yanagawa B., Leong H.S., Samarasekera D., Lai J.C., Suarez A., Zhang J., McManus B.M.(2006). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus induced myocarditis. Cardiovasc Pathol, v.15, p.63-74.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* v.22, p.19-23.

Cohn J.N., Ferrari R., Sharpe N. (2000). Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*, v. 35, p. 569-82.

Collucci W.S., Braunwald E.(2005). Pathophysiology of heart failure. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E (Eds). *Braunwald's heart disease. A text book of cardiovascular medicine*. 7th edition, Elsevier Saunders, Philadelphia.

Costa Rosa L.F.P.B., Vaisberg M.W.(2002). Influência do exercício na resposta immune. *Rev Bras Med Esporte*, v. 8, p. 167-72.

Corrales M.,Cardozo R., Segura M.A.,Urbina J.A.,Basombrío M.A. (2005). Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor,and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*, v.49 (4), p.1556-60.

Crisby M., Nordin-Fredriksson G., Shah P.K., Yano J., Zhu J., Nilsson J.(2001). Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 20, v. 103(7), p. 926-33.

Dávila D.F., Inglessis G, Mazzei de Davila C.A.(1998). Chagas' heart disease and the autonomic nervous system. *Int J Cardiol*, v. 30, p. 66123-27.

Dell'Italia L.J., Meng Q.C., Balcells E., Wei C.C., Palmer R., Hageman G.R., Durand J., Hanks G.H., Oparil S.(1997). Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J Clin Invest*, v. 100, p. 253-58.

Dergunov A.D., Visvikis-Siest S., Siest G. (2008) Statins as effectors of key involved in apoE-dependent VLDL metabolism: review and hypothesis. *Vascul Pharmacol*, v. 48, p.70-5.

[de Souza AP](#), [Olivieri BP](#), [de Castro SL](#), [Araújo-Jorge TC](#).(2000). Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. [Parasitol Res.](#) 86(10):800-8.

Dias J.C.P., Machado E.M.M., Borges E.C., Moreira E.F., Gontijo C., Azeredo B.V.M. (2002).Doença de Chagas em Lassance, MG. Reavaliação clínico-epidemiológica 90 anos após a descoberta de Carlos Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 35, p.167-76.

Diwan A., Dibbs Z., Nemoto S., De Freitas G., Carabello B.A., Sivasubramanian N., Wilson E.M., Spinale F.G., mann D.L.(2004). Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. *Circulation* 109, p. 262-68.

Dorn,G.W.(2009).Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodeling. *Cardiovasc Res*, v.81 (3), p.465-73.

Drigo S.A, Cunha-Neto E., Ianni B., Cardoso M.R. et al.(2006). TNF gene polymorfisms are associated with reduced survival in severe Chagas disease cardiomyopathy patients. *Microbes infect*, v. 8(3), p. 598-603.

Engman D.M., Leon J.S.(2002). Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop*, v. 81(2), p.123-32.

Ergul A., walker C.A., Goldberg A., Baicu S.C., Hendrick J.W., King M.K., Spinale F.G.(2000). ET1 in the myocardial interstitium: relation to myocyte ECE activity and expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 278, p.H2050-H2056.

Evans W.J., Calmon J.G. (1991). The metabolic effect of exercise-induced muscle damage. *Exerc Sports Sci Rev*, v.19, p. 99-125.

Feigenbaum H. (1994).A digital echocardiographic laboratory. *J Am Soc Echocardiog* (7): 105-6.

Filippatos G., Parissis J.T., Adamopoulos S., Kardaras F.(2003). Chemokines in cardiovascular remodeling: clinical and therapeutic implications. *Curr Mol Med*, v. 3(2), p. 139-47.

Fortuin N J..(1973). Children: Dr. Fortuin - Echocardiographic Pattern of Right Ventricular Diastolic Volume Overload .47;432

Frangogiannis N.G.(2004). Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res*, v. 53(11), p. 585-95.

Frangogiannis NG. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research* 58 (7): 88-11.

Garzoni L.R, Adesse D., Soares M.J, Rossi M.I, Borojevic R., de Meirelles M.(2008). Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis*, v.197 (6), p.906-15.

Gaudron P., Eilles C., Kugler I., Ertl G. (1993). Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 87, p .755-63.

Gielen S., Adams V., Mobius-Winkler S., Linke A., Erbs S., Yu J., Kempf W., Schubert A., Schuler G., Hambrecht R.(2003). Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, v. 3; 42(5), p.861-8, 2003.

Girones N., Fresno M.(2003). Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*, v. 19, p. 19-22.

Golgher D., Gazzinelli R.T.(2004). Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, v. 37,p. 399-409.

Gomes J.A., Bahia-Oliveira L.M., Rocha M.O., Martins-Filho O.A., Gazzinelli G., Correa-Oliveira R.(2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*, v.71, p.1185-1193.

Greer J.J.M., Kakkar A.K., Elrod J.W. et al.(2006). Low-dose simvastatin improves survival and ventricular function via e-NOS in congestive heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v. 291, p. H2743-51.

Guedes P.M., Veloso V.M., Afonso L.C., Caliari M.V., Carneiro C.M., Diniz L.F., Marques-da-Silva E.A., Caldas I.S., Do Valle Matta M.A., Souza S.M., Lana M., Chiari E., Galvão L.M., Bahia M.T.(2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha and low IL-10 production during the acute infection phase. Vet immunol Immunopathol.

Guedes PM, Veloso VM, Caliari MV et al.(2007). *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102, p. 141-7.

Hennekens C.H., Sacks F.M., Tonkin A., Jukema J.W., Byington R.P., Pitt B., Berry D.A., Berry S.M., Ford N.F., Walker A.J., Natarajan K., Sheng-Lin C., Fiedorek F.T., Belder R.(2004). Additive benefits of pravastatin and aspirin to decrease risks of cardiovascular disease: randomized and observational comparisons of secondary prevention trials and their meta-analyses. Arch Intern Med, v. 164(1), p. 40-4.

Higuchi M.L., Brito T., Reis M.M., Barbosa A., Belloti G., Pereira-Barreto A.C., Pileggi F. (1993).Correlation between *Trypanosoma cruzi* and myocardial infiltrate in chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. Cardiovasc Pathol, v. 2, p. 101-06.

Hill J.A., Olson E.N. (2008). Cardiac Plasticity. N Engl J Med, v. 358(13),p.1370-80.

Jessup M., Brozena S.(2003). Heart Failure. N Engl J Med, v. 348,p. 2007-18.

Jones E.M., Colley D.G., Tostes S., Lopes E.R., Vnencak-Jones C.L., McCurley T.L.(1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Am J Trop Med Hyg, v. 48, p. 348-57.

Jonsdottir I.H., Hoffmann P., thorèn P.(1997). Physical exercise, endogenous opioids and immune function. Acta Physiol Scand Suppl , v.640, p. 47-50.

Jonsdottir I.H., Johansson C., Asea A., Johansson P., Hellstrand K., Thorèn P., Hoffmann P.(1997). Duration and mechanisms of the increased natural cytotoxicity seen after chronic voluntary exercise in rats. Acta Physiol Scand, v. 160(4), p. 333-9.

Kalil J., cunha-Neyo E.(1996). Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? Parasitol Today, v. 12(10), p. 396-9.

Karpinski L.,Plaksej R.,Derzhko R.,Orda A., Witkowska M.(2009). Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive protein in patients with myocardial infarction treated with primary angioplasty during a 6-month follow-up. Pol Arch Med Wewn, v.119 (3), p.115-21.

Kierszenbaum F.(1999). Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbio Rev , v. 12, p. 2210-23.

Kittleson MD, Johnson LE, Pion PD.(1996). [Submaximal exercise testing using lactate threshold and venous oxygen tension as endpoints in normal dogs and in dogs with heart failure.](#) J Vet Intern Med.;10(1):21-7.

Kohl, H.M.(2001). Physical activity and cardiovascular disease: evidence for a dose response. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 33, p. 472-83.

Kohno T., Anzai T., Naito K., et al.(2007). Impact of serum C-reactive protein elevation on the left ventricular spherical change and the development of mitral regurgitation after anterior acute myocardial infarctionCardiology, v. 107, p. 386-394.

Lainchbury JG, Richards AM.(2002). [Exercise testing in the assessment of chronic congestive heart failure.](#) Heart.;88(5):538-43.

Lana M., Chiari E., Tafuri W.L.(1992). Experimental Chagas's disease in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 87, p. 59-71.

LANA, M. et al. (1988). Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanosomíase cruzi experimental no cão. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.21, n.3, p.113-121.

Laranja F.S.(1953). Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. Rev Brás Méd, v. 107, p. 482-491.

Larsen AI, Aarsland T, Kristiansen M, Haugland A, Dickstein K. (2001). Assessing the effect of exercise training in men with heart failure;comparison of maximal, submaximal and endurance exercise protocols. European Heart Journal v. 22, p.684-92.

Law M.R., Wald N.J., Rudnicka A.R.(2003). Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. BMJ, 28;326(7404):1423-.

Lee A.A., McCulloch A.D.(1997). Multiaxial myocardial mechanics and extracellular matrix remodeling mechanochemical regulation of cardiac fibroblast function. Adv Exp Med Biol, v. 430, p. 227-40.

Leri A., M.D, Kajstura, PhD, Anversa P.,MD. (2002). Myocyte proliferation and ventricular remodeling. Journal of Cardiac Failure, v.8(6), p.

Levin M. J.(1996). In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. Parasitol Today, v. 12, p. 415-16.

Linthout S.V., Riad A., Dhayat N. et al.(2007). Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. Diabetologia,v. 50, p.1977-86.

Luquetti A.O.(1990). Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis-Multicentre trial. Serological and technical aspects. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.85 (4), p. 497-505.

McKelvie R.S., Teo K.K., Roberts R., McCartney N., Humen D., Montague T., Hendrican K., Yusuf S.(2002). Effects of exercise training in patients with heart failure: the Exercise Rehabilitation Trial (EXERT). Am Heart J, v.144(1), p.23-30.

Mackenna D., Summerour S.R., Villarreal F.J.(2000). Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res*, v. 46, p.257-63.

Maldonado R.A., Molina J., Payares G., Urbina J.A.(1993). Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*, v.37(6), p. 1353-9.

Marai I., Shoenfeld Y. (2007) The beneficial effects of statins in autoimmune disease therapy. *Durg News & Perspectives*, v. 20(3), p.165-72.

Marin-Neto J.A., Cunha-Neto E., Maciel B.C., Simões M.V.(2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, v. 115, p.1109-223.

Marin-Neto J.A., Simões M.V., Sarabanda A.V.L.(1999). Chagas'heart disease. *Arq Bras Cardiol*, v. 72, p. 264-77.

Mesquita R.D., Carneiro A.B., Bafica A., Gazos-Lopes F., Takiva C.M., Souto-Padron T., Vieira D.P., Ferreira-Pereira A., Almeida I.C., Figueiredo R.T., Porto B.N., Bozza M.T., Graça-Souza A.V., Lopes A.H., Atella G.C., Silva-Neto M.A.(2008). Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. *Infect Immun*, v. 76(12), p. 5543-52.

Moldoveanu A.I., Shepard R.J., Shek P.N.(2001). The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med*, v. 31, p. 115-44.

Nagueh SF, Bachinski LL, Meyer D, Hill R, Zoghbi WA, Tam JW, Quiñones MA, Roberts R, Marian AJ.(2001). Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy and provides a novel means for an early diagnosis before and independently of hypertrophy.*Circulation*.;104(2):128-30.

Nakajima H., Nakajima H.O., Salcher O., Dittie A.S., Dembowsky K.,Jing S., Field L.J.(2000). Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor beta (1) transgene in the heart. *Circ Res*, v. 86, p. 571:79.

Naoumova R.P., Patel D.D., O'Neill F.H. et al.(2003). Treatment with atorvastatin alters the ratio of interleukin-12/Interleukin-10 gene expression. *Eur J Clin Invest*, v. 33, p.88-91.

Natalie G. Müller, Vanessa L. Cavalcanti, Barbara Ianni, Charles Mady, Jorge Kalil, Anna C. Goldberg.(2006) The Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease. *43:305–311*

Niederseer D., Thaler C., Niebauer J.(2007). The failing heart. *N Engl J Med*, v.14;356(24), p.2546-52.

Nunes V.L., Ramires F.J.A., Pimentel W.S., Fernandes F., Ianni B.M., Mady C.(2006). O papel do acúmulo de colágeno no interstício miocárdico na sobrevida dos pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática e chagásica. *Arq Bras cardiol*, v. 87, p.757-62.

Oh JK, Seward JB, Tajik AJ. (1985). *The Echo Manual – 3th Edition*, Williams & Wilkins.

Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, Tajik AJ.(2000).Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation*.;102(15):1788-94

Onuffer J.J , Horuk R.(2002). Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol Sci*; 23(10):459-67.

Ortego M., Bustos C., Hernández-Presa M.A., Tuñón J., Díaz C., Hernández G., Egido J.(1999). Atorvastatin reduces NF-KappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*, v. 147(2), p. 253-61.

Packard CJ.(2003). Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans*.;31(Pt 5):1066-9. Review

Palomino S.A., Aiello V.D., Higuchi M.L.(2000). Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 94(6), p.571-9.

Pascon JPE. (2007). AVALIAÇÃO CLÍNICA DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EM CÃES

Patel R., Nagueh S.F., Tsybouleva N., Abdellatif M., Lutucuta S., Kopolen H.A., Quinomes M.A., Zoghbi W.A., Entman M.L., Roberts R., Marian A.J. (2001). Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, v. 104, p. 317-324.

Pedersen B.K., Toft A.D. (2000). Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*, v. 34, p. 246-51.

Peña-Díaz J., Montalvetti A., Flores C.L., Constán A., Hurtado-Guerrero R., De Souza W., Gancedo C., Ruiz-Perez L.M., Gonzalez-Pacanowska D. (2004). Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae. *Mol Biol Cell*, v. 15(3), p.1356-63.

Pepys M.B., Hirschfield G.M., Tennent G.A, et al. (2006). C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*, v. 440, p.1217-1221.

Petersen A.M., Pedersen B.K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*, v. 98, p.1154-62.

Plentz R.D.M., Irigoyen M.C., Muller A.S., Casarini D.E., Rubira M.C., Moreno Jr. H., Mady C., Ianni B.M., Krieger E.M., Consolim-Colombo F. (2006). Disfunção endotelial venosa em pacientes com doença de Chagas sem insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*, v. 86, p.466-71.

Pluim B.M., Zwinderman A.H., Laarse A van der, Wall EE van der. (1999). The Athlete's Heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, v. 100, p. 336-44.

Prata A. (2001). [Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease](#). *Lancet Infect Dis*; 1(2):92-100. Review.

Punukollu G., Gowda R.M., Khan I.A., Navarro V.S., Vasavada B.C. (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*, v. 115, p.279-83.

Rader D.J. Liver X receptor and farnesoid X receptor as therapeutic targets. (2008) *Am J Cardiol* 3:n9-15.

Rajnikant Patel, MD; Sherif F. Nagueh, MD; Natalie Tsybouleva, MD; Maha Abdellatif, MD, PhD; Silvia Lutucuta, MD; Helen A. Kopelen, RDCS; Miguel A. Quinones, MD; William A. Zoghbi, MD; Mark L. Entman, MD; Robert Roberts, MD; A. J. Marian, MD.(2001).Simvastatin Induces Regression of Cardiac Hypertrophy and Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Transgenic Rabbit Model of Human Hypertrophic Cardiomyopathy.104:317

Ramasawmy R, Cunha-Neto E., Fae K.C., Muller N.G., Cavalcanti V.L., Drigo S.A., Ianni B., Mady C., Kalil J., Goldberg A.C. (2006). BAT 1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infectious Dis.* 193(10) p. 1394-9.

Ramasawmy R, Cunha-Neto E., Fae K.C., Muller N.G., Cavalcanti V.L., Drigo S.A., Ianni B., Mady C., Goldberg A.C. (2006). The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human Chagas disease. *Clin Infectious Disease* 43(3) p. 305-11.

Rassi Jr. A., Rassi A., Little W.C., Xavier S.S., Rassi S.G., Rassi A.G., Rassi G.G., Hasslocher-Moreno A., Sousa A.S., Scanavacca M.I.(2006). Validation of a risk score for predicting death in Chagas'heart disease. *N Engl J Med*, v.355, p.799-808.

Reis D.D., Jones E.M., Tostes J.R.S, Lopes E.R., Gazzinelli G., Colley D.G., McCurley T.L.(1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*, v. 48(5), p.637-44.

Remme W.J.(2003). Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovascular drugs and therapy*, v. 17, p.349-60.

Ribeiro A.L., Teixeira M.M., Reis A.M., Talvani A. et al.(2005). Brain natriuretic peptide based strategy to detect left ventricular dysfunction in Chagas disease: A comparison with the conventional approach. *Int J Cardiol*, v. 109(1) p. 34-40.

Ribeiro AL, Cavalcanti PS, Lombardi F, Nunes Mdo C, Barros MV, Rocha MO. (2008). [Prognostic value of signal-averaged electrocardiogram in Chagas disease.](#) J Cardiovasc Electrophysiol;19(5):502-9.

Ricardo Pérez-Fuentes^{a, b}, Jean-François Guégan^b, Christian Barnabé^b, Aurelio López-Colombo^c, Hilda Salgado-Rosas^d, Enrique Torres-Rasgado^d, Bernardo Briones^a, Mónica Romero-Díaz^d, Judith Ramos-Jiménez^a and María del Carmen Sánchez-Guillén.(2003). Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. International Journal for Parasitology, Volume 33, Issue 3, Pages 293-299

Ridker PM. Should statin therapy be considered for patients with elevated C-reactive protein? The need for a definitive clinical trial. Eur Heart J 22(23):2135-7, 2001.

Rocha M.O., Teixeira M.M., Ribeiro A.L.(2007). An update on the management of Chagas cardiomyopathy. Expert Rev Anti Infect Ther, v. 5, p.727-43.

Rosendo A.B., Dal-Pizzol F.,Fiegenbaum M.,Almeida S.(2007). Farmacogenética e efeito antiinflamatório dos inibidores da HMG-CoA redutase. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online], v.51, (4), p. 520-525.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A.(1978). Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation 58(6):1072-83.

Saini-Chohan H.K e Hatch G.M. (2009). Biological actions and metabolism of currently used pharmacological agents for the treatment of congestive heart failure. Curr Drug Metab, v.10 (3), p.206-19.

Santiago H.C., Feng C.G., Bafica A., Roffe E., Arantes R.M., Cheever A., Taylor G., Vieira L.Q., Aliberti J., Gazzinelli R.T., Sher A.(2005). Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to trypanosome cruzi infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. J Immunol , v.15;175(12), p.8165-72.

Schmunis GA.(2007). [Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.](#) Mem Inst Oswaldo Cruz;102 Suppl 1:75-85. Erratum in: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Dec;102(8):2 p following 1009.

Schnaider T.B., Souza C. (2003). Aspectos éticos da experimentação animal / Ethics and animal experiments.Rev Bras anestesiol, v.53(2), p.278-285.

Schonbeck U., Libby P. (2004). Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? Circulation 1;109(21 suppl 1:II18-26.

Sherif F. Nagueh, MD; Linda L. Bachinski, PhD; Denise Meyer, MT; Rita Hill, RN; William A. Zoghbi, MD; James W. Tam, MD; Miguel A. Quiñones, MD; Robert Roberts, MD; A.J. Marian, MD.(2001). Tissue Doppler Imaging Consistently Detects Myocardial Abnormalities in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy and Provides a Novel Means for an Early Diagnosis Before and Independently of Hypertrophy 104:128.

Shimokawa H., Takeshita A. (2005). Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 25, p.1767-75.

Shiroskita-Takeshita, Brundel BJJM, Burstein B, Leung TK, Mitamura H. Ogawa S, Nattel S. (2007). Effects of simvastatin on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with congestive heart failure. Cardiovascular Research, v. 74, p. 75-84.

Smart N, Fang ZY, Marwick TH (2003).A practical guide to exercise training for heart failure patients. J Card Fail.;9(1):49-58

Smith, L.L.(2000). Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? Med Sci Sports Exerc 32:317-31

Soares M.B., Pontes-de Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas'disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet.(2001). An Acad Bras Cienc 73(4):547-59, 2001.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, Lottenberg AM, Chacra AP et al. (2007). IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. Arq Bras Cardiol 88(1):2-19.

Streeter DD Jr., Bassett DL.(1996) An engineering analysis of myocardial fiber orientation in pigs left ventricle in systole. Anat Rec 155:503-11.

Streeter DD Jr., Spotnitz HM, Patel DP, Ross J Jr., Sonnenblick EH.(1969) Fiber orientation in the canine left ventricle during diastole and systole. Circ Res 24:339-47.

Stegmann H, Kindermann W, Schnabel A. (1981). Lactate Kinetics and Individual Anaerobic Threshold. Int J Sports Medicine v.2, p.160-5.

Sutton M.G.S.J, Sharpe N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. Circulation 101 p. 2981-88.

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JCS et al.(2000). Kinetic of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy – tissue parasitism and endogenous IFN-g as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. Microbes and infection 2: 851-866.

Talvani A, Rocha MOC, Cogan J, et al.(2005). Brain natriuretic peptide measurement in Chagas heart disease: marker of ventricular dysfunction and arrhythmia. Int J Cardiol,100: 503-4.

Talvani A, Rocha MOC, Barcelos LS, et al.(2004a) Elevated concentrations of CCL2 and TNF-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clin Infect Dis 38:943-50.

Talvani A, Rocha MOC, Kogar J, et al.(2004b). Brain Natriuretic Peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. Mem Inst Oswald Cruz 99:645-9.

Talvani A, Rocha MOC, Ribeiro ALP, et al.(2004). Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. J. Infect Dis. 189:214-20.

Tarleton RL.(2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int J Parasitol 1;31(5-6):550-4.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. (2002). Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol 18(6):262-5.

Thihault G., Lacombe M.J, Schnapp L.M,Laçasse A., Bouzeghrane F., Lapalme G.(2001) . Upregulation of alpha(8)beta(1) integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factor beta 1 .Am J Physiol. 281: C1457-67.

Todaka K, Wang J, Yi GH, Knecht M, Stennett R, Packer M, Burkoff D.(1997).Impact of exercise training on ventricular properties in a canine model of congestive heart failureAm J Physiol.;272(3 Pt 2):H1382-90

Toledo MJO, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GLL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M. (2004). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes.

Tsukada B., Terasaki F., Shimomura H., Otsuka K., Katashima T., Fujita S., Imanaka-Yoshida K., Yoshida T., Hiroe M., Kitaura Y.(2009). High prevalence of chronic myocarditis in dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: expression of tenascin C as a possible marker for inflammation. Hum Pathol, v.40(7), p. 1015-22.

Umezawa E.S., Stolf A.M., Corbett CE, Shikanai-Yasuda MA.(2001) Chagas'disease. Lancet 10;357(9258):797-9.

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R.(1996). PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas'disease. Lancet 28;348(9031):891-2.

Vaughan CJ, Gotto AM. (2004). Update on Statins:2003. Circulation v.110, p.886-92

Veillard NR, Braunersreuther V, Arnauld C, Burger F, Pelli G, Steffens S, Mach F.(2006) Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 188(1):51-8.

Wachre T, Damas JK, Gullestad L, Holm AM, Pedersen TR, Arnesen KE, Torsvik H, Froland SS, Semb AG, Aukrust P.(2003). Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 7;41(9):1460-7.

Wasserman K. (1987). Determinants and detection of anaerobic threshold and consequences of exercise above it. *Circulation* v. 76(VI), p. 29-37.

Weber KT, Janicki JS, McElroy PA. (1987). Determination of aerobic capacity and the severity of chronic cardiac and circulatory failure. *Circulation* v. 76(VI), p.40-5.

Wei CC, Meng QC, Palmer R, Hageman GR, Durand J, Bradley WE, Farrel DM, Hanks GH, Oparil S, Dell'Italia LJ.(1999). Evidence for angiotensin-converting enzyme and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart in vivo. *Circulation* 99:2583-89.

White HD, Norris RM, Brown MA.(1987). Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from endomyocardial infarction. *Circulation* 76:44-51.

Willke RJ, Zhou S, Vogel RA.(2008). Differences in cardiovascular event rates between atorvastatin and simvastatin among new users: managed-care experience. *Curr Med res Opin* 24(10):2873-82.

Wyatt HL, Meerbaum S, Heng MK, Gueret P, Corday E.(1980). [Cross-sectional echocardiography. III. Analysis of mathematic models for quantifying volume of symmetric and asymmetric left ventricles.](#) *Am Heart J*;100(6 Pt 1):821-8.

World Health Organization.(1984). Report of the scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas's disease. WHO Tech. Rep. Ser., Geneva.

YAMADA H. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction by Doppler echocardiography: Clinical application of the Canadian consensus guidelines Journal of the American Society of Echocardiography, Volume 15, Issue 10, Pages 1238-1244

You Fang Z., Marwick T.H. (2003). Mechanisms of exercise training in patients with heart failure. Am Heart J 145(5):904-11

Youssef S, Stüve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosевич JL, Hur EM, Bravo M, Mitchell DJ, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS.(2002). [The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease.](#) Nature. 7;420(6911):78-84

Zieker D, Zieker J, Dietzsch J, Burnet M, Northoff H, Fehrenbach E.(2005). cDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise. Exerc Immunol Rev, 11:86-96.

Zimmerman SD, Karlson WJ, Holmes JW, Omens JH, Covell JW.(2000). Structural and mechanical factors influencing infarct scar collagen organization. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278:H194-H300.

Zornoff L.A.M., Cicogna A.C., Paiva S.A.R., Spadaro J.(2002). Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo12:371-78.

*Any one whose disposition leads him to attach
more weight to unexplained difficulties than to the
explanation of a certain number of facts Will
certainly reject my theory*

(Charles Darwin, The Origino of Species, 1859)

