

Wallace de Souza Pimentel

**O papel do betabloqueador na miocardiopatia
chagásica experimental: avaliação morfo-funcional**

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pimentel, Wallace de Souza

O papel do betabloqueador na miocardiopatia chagásica experimental : avaliação morfo-funcional / Wallace de Souza Pimentel. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Felix José Alvarez Ramires.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Cardiomiopatia chagásica 3.Cardiomiopatias
4.Beta-antagonistas adrenérgicos 5.Colágeno 6.Modelos animais 7.Mesocricetus

USP/FM/SBD-155/08



Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que nada é ao acaso.

Antoine De Saint-Exupéry

DEDICATÓRIA

Ao amor da minha vida, minha esposa Adriana, pelo companheirismo, imensa ajuda e infinita compreensão. Este trabalho não seria possível sem sua presença, incentivo e apoio em todos os momentos. Parte desta conquista a ela pertence.

Aos meus pais, Valdeci e Renê, pelo apoio e incentivo incondicionais em busca de novos horizontes. Representam o mais puro exemplo de amor, dedicação e ética. Tudo que sou devo a eles. Tudo que construí é reflexo do ensinamento de ambos.

Aos *Hamsters*, pequenos companheiros nesta jornada, que deram sua vida pela ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Felix Ramires, mais que um orientador, conselheiro. Amigo sempre presente neste difícil caminho. Um verdadeiro “mestre”, a quem devo toda esta pesquisa.

Ao Professor Dr. Charles Mady. Seu profissionalismo, sua ética e suas idéias o tornam um guia e exemplo a ser seguido.

Aos amigos Dra. Bárbara, Dr. Edmundo, Dr. Fábio “Amigão”, Dr. Luciano e Dra. Vera. Estes anos de convívio me mostraram quão especial são estas pessoas. Muito obrigado por toda ajuda, apoio e orientação.

Aos amigos Paula, Lucia, Rita, Daniel e Roseli, que me ajudaram a vencer muitas dificuldades, companheiros em todos os momentos. Almas generosas que iluminam os caminhos tortuosos.

À Profa. Dra. Hiro Goto pela ajuda no cuidado aos animais.

À Julia Tizue Fukushima pelo auxílio na análise dos dados.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTAS

Figuras

Tabela

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	12
MATERIAIS E MÉTODOS	14
Inoculação	16
Tratamento	17
Ecocardiograma	17
Eletrocardiograma	18
Análise morfológica	19
Avaliação clínica.....	20
Análise estatística.....	20
RESULTADOS.....	21
Características clínicas.....	22
Eletrocardiograma	23
Remodelamento cardíaco	26
Função cardíaca.....	32
Sobrevida	34
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÕES.....	44
LIMITAÇÕES DO ESTUDO	46
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	

LISTAS

FIGURAS

Figura 1 - Peso médio dos animais.....	22
Figura 2 - Frequência cardíaca média	24
Figura 3 - Variação da frequência cardíaca dos grupos nos diferentes tempos	24
Figura 4 - Eletrocardiograma dos animais	25
Figura 5 - Razão do peso do coração sobre o tamanho da tíbia.....	26
Figura 6 - Desvio padrão da razão do peso do coração sobre o tamanho da tíbia	27
Figura 7 - Razão do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo pelo tamanho da tíbia x 100 dos animais sacrificados.....	29
Figura 8 - Razão do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo pelo tamanho da tíbia x 100 dos animais sacrificados.....	29
Figura 9 - Fotomicrografia do miocárdio.....	31
Figura 10 - Fração de encurtamento.....	33
Figura 11 - Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido.....	33
Figura 12 - Ecocardiograma	34
Figura 13 - Kaplan-Meier.....	35

TABELA

Tabela 1 - Fração do volume de colágeno intersticial nos ventrículos esquerdo, direito e perivascular dos animais sacrificados no final do experimento.....	31
--	----

RESUMO

Pimentel WS. *O papel do betabloqueador na miocardiopatia chagásica experimental: avaliação morfo-funcional* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

A doença de Chagas, descrita há quase 100 anos por Carlos Chagas, continua sendo um problema de saúde pública na América Latina, com 15 milhões de infectados e 28 milhões de indivíduos susceptíveis. Vários mecanismos fisiopatológicos foram propostos para a progressão da miocardiopatia chagásica crônica, entre eles a denervação simpática. O uso do betabloqueador na insuficiência cardíaca congestiva diminuiu morbidade e mortalidade. Entretanto, nenhum trabalho conclusivo incluiu a miocardiopatia chagásica como etiologia. OBJETIVO: Avaliar o papel do carvedilol na sobrevida e remodelamento miocárdico na miocardiopatia chagásica experimental. MATERIAL E MÉTODOS: Foram avaliados 55 *Hamsters Sirius*, divididos em grupo controle, grupo infectado com *Trypanosoma cruzi* com 10^5 formas tripomastigotas via intraperitoneal e grupo infectado, tratado inicialmente com carvedilol 10 mg/Kg/dia e após 6 meses com 15 mg/Kg/dia em dose única por gavagem. Foi analisado o peso do animal; os diâmetros ventriculares, função sistólica e diastólica obtidas pelo ecocardiograma; a frequência cardíaca, a duração do QRS, a presença de extra-sístoles e o ritmo cardíaco usando o eletrocardiograma e a avaliação da mortalidade. Após 12 meses os animais sobreviventes foram sacrificados e realizada a quantificação da fração do volume de colágeno intersticial e perivascular no miocárdio. RESULTADO: A razão dos diâmetros diastólico e sistólico pelo tamanho da tíbia não mostrou diferenças

estatísticas, apesar de maiores nos grupos infectados. A fração de encurtamento também não mostrou diferença estatística, apesar de menor nos grupos infectados. A fração do volume de colágeno do ventrículo esquerdo e perivascular mostrou maior acúmulo nos grupos infectado e carvedilol em relação ao controle de forma significativa ($p < 0,001$), mas sem diferença nos grupos infectados tratados ou não. A mortalidade foi maior nos grupos infectado e carvedilol ($p = 0,001$) e não ocorreu diferença entre estes grupos após 12 meses. Na fase aguda (até 100 dias) o grupo carvedilol apresentou melhor sobrevida ($p = 0,001$) em relação ao infectado. CONCLUSÃO: O carvedilol não mostrou atenuação no remodelamento miocárdico e demonstrou benefício na mortalidade na fase aguda da doença nesse modelo de miocardiopatia chagásica crônica experimental.

Descritores: doença de Chagas, cardiomiopatia chagásica, cardiomiopatias, beta-antagonistas adrenérgicos, colágeno, modelos animais, *Mesocricetus*

SUMMARY

Pimentel WS. *The role of betablockade on experimental chagasic cardiomyopathy: morpho-functional evaluation* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Chagas' disease was described 100 years ago by Carlos Chagas and nowadays it is a public health problem in Latin America yet. There are about 15 million infected people and another 28 million at risk to be infected. Several pathophysiologic mechanisms are suggested to be responsible for the progression of chronic Chagas' cardiomyopathy. Among them the sympathetic denervation seems to be an important issue. The use of beta blockade regarding heart failure has been proving to improve morbidity and mortality. However, none of these papers included Chagas' cardiomyopathy as etiology. OBJECTIVES: To evaluate the role of carvedilol upon survival and myocardial remodeling in a Chagas' cardiomyopathy animal model. MATERIAL AND METHODS: 55 *Hamsters Sirius* were studied and divided into control group, intraperitoneously infected group with *Trypanosoma cruzi* and infected group treated with carvedilol 10 mg/Kg/day by gavage which was increased to 15 mg/Kg/day after 6 months. Ventricular diameters, systolic and diastolic left ventricular function were evaluated by 2D-echocardiogram. The heart rate, QRS lasting, premature ventricular complex and cardiac rhythm were analyzed by ECG. We evaluated clinical parameters as the case for body weight. The survival curve was also studied. After 12 months the survivors were sacrificed and the myocardial interstitial and perivascular collagen volume fraction were analyzed. RESULTS: The ratio of diastolic or systolic diameters over tibia length did not show statistical

differences although it was larger on infected groups. The fractional shortening also did not show statistical differences although it was decreased on infected groups. The left ventricular collagen volume fraction at the interstitial and perivascular area showed a higher accumulation on infected groups compared to control ($p < 0.001$) but no differences were observed between infected and carvedilol treated animals. The mortality was higher in the infected groups compared to control ($p = 0.001$) but no differences were observed between infected and carvedilol group during the total time of the experiment. However, when we divided in acute phase (until 100 days) the carvedilol significantly attenuated mortality compared to infected group ($p = 0.001$). CONCLUSION: Carvedilol did not show benefits regarding myocardial remodeling or total mortality and it did demonstrate a mortality reduction on acute phase of the disease in this experimental model of Chagas' cardiomyopathy.

Keywords: Chagas disease, Chagas cardiomyopathy, cardiomyopathies, adrenergic beta-antagonists, collagen, models animal, *Mesocricetus*

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas foi descrita no início do século XX por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Suas observações iniciais foram em sangue de sagüi, espécies comuns de macacos na região de Lassance, Minas Gerais. Tais descobertas foram realizadas em um vagão de trem durante uma campanha de combate à malária, o que resultou na identificação de um novo protozoário: o *Trypanosoma cruzi*, assim denominado em homenagem ao cientista Oswaldo Cruz. Estudos que se seguiram, realizados no Instituto de Manguinhos, atual Instituto Oswaldo Cruz, revelaram a etiopatogenia e a evolução clínica, tornando conhecida a importância dos insetos hematófagos da família *Triatominae*¹.

A pesquisa de DNA do *Trypanosoma cruzi* realizada em múmias do Atacama, região sul do Peru e norte do Chile, mostra que a doença de Chagas já atingia essa região há nove mil anos. A reação de polimerase em cadeia para o DNA do *Trypanosoma cruzi* mostrou-se positiva em 40,6% dos casos, não havendo diferença significativa entre os diversos grupos culturais que se sucederam com os anos². Existe a possibilidade de Charles Darwin ter contraído essa doença em sua expedição para América do Sul, dado o relato feito por ele a respeito do incidente com o vetor transmissor e das dúvidas existentes sobre a doença que o levou à morte³.

Baseado em dados sorológicos, estima-se que esta doença atinja 15 milhões de latino-americanos que vivem em 21 países dessa região, com 41.200 novos casos e 12.500 mortes anuais. E mais, 28 milhões de indivíduos estão suscetíveis para contrair a doença. Estes dados apresentaram melhora significativa nos últimos anos devido à interrupção da

transmissão da doença em algumas regiões do continente ⁴⁻⁶.

A real prevalência da doença de Chagas é desconhecida; não existem estudos epidemiológicos precisos realizados em todos os países atingidos pela doença. Trabalhos epidemiológicos do Brasil e da Venezuela avaliaram a prevalência das manifestações clínicas e da mortalidade. O peso da doença de Chagas, quando comparado a outras enfermidades transmissíveis da América Latina e do Caribe, medido por anos de vida ajustados à incapacidade, é superado apenas pelo conjunto de enfermidades diarréicas, infecções respiratórias e AIDS, correspondendo a mais do que o dobro da soma de malária, esquistossomose, leishmaniose e hanseníase ⁷.

É importante salientar que a doença de Chagas é uma enzootia, havendo sempre o risco de domiciliação de vetores a partir do ambiente silvestre, além da possibilidade de infecção humana acidental. Esses fatores colaboram para que a doença não seja erradicável ⁸ e apresente o risco de surtos ocasionais e localizados. O primeiro relato de surto ocorreu em 1965, no Rio Grande do Sul, e desde então a literatura registra vários outros episódios, geralmente associados à ingestão oral acidental de grande número de parasitas, como ocorreu no Estado do Pará por meio do açaí e em Santa Catarina, através do caldo de cana, em 2005 ^{9,10}.

A análise do programa brasileiro de controle da doença estima que tenham sido prevenidas 2.339.000 novas infecções, 334.000 óbitos e 11.486.000 anos de vida ajustados para incapacidade entre 1975 e 1995.

Estes dados indicam gastos prevenidos de cerca de US\$ 17,00 para cada US\$ 1,00 aplicado em atividades de controle da doença ¹¹.

Dados sorológicos no Brasil, que mostravam 4,2% de soropositivos na população rural entre 1975 e 1980, contrastam com 0,2% de soropositivos entre escolares de 7 a 14 anos em regiões onde a transmissão estaria interrompida ¹². O melhor controle epidemiológico da doença reflete-se com a diminuição da mortalidade verificada nos últimos anos, talvez devido à ausência de reinfecção pelo *Trypanosoma cruzi* ¹³. As hospitalizações também diminuíram e ocorreu mudança na faixa etária de mortalidade, passando de 35 a 55 anos, para maiores de 60 anos. Algumas possibilidades para justificar tais fatos são o diagnóstico precoce, melhor política assistencial de saúde e menor intensidade da infecção inicial ^{14, 15}.

Do ponto de vista clínico, a doença de Chagas é dividida em fase aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por parasitemia, inflamação e lesão miocárdica. Os pacientes apresentam sintomas cardiovasculares somente em 10% dos infectados ^{16, 17}. Os achados histopatológicos desta fase consistem em miocardite aguda com marcante presença do *Trypanosoma cruzi* no miocárdio, com intenso infiltrado inflamatório formado predominantemente por células T CD8 e CD4. São encontrados também macrófagos ativados e lesão direta dos miócitos, com reposição por fibras de colágeno ¹⁷.

Na fase crônica, aproximadamente 70% das pessoas infectadas evoluem para a forma indeterminada, que se caracteriza por ausência de

sintomas e sinais de comprometimento do coração e do aparelho digestivo, sem alterações em exames não invasivos habituais⁴.

A miocardiopatia chagásica crônica atinge cerca de 30% dos infectados, sendo que 10% desses pacientes podem evoluir para cardiopatia grave^{4, 17, 18}. Os achados histológicos da miocardiopatia chagásica crônica mostram miocardite crônica focal, que promove destruição progressiva das fibras miocárdicas. Esta miocardite é caracterizada por infiltrado de macrófagos (50%), células B (10%) e células T (40%) com predomínio de CD₈. Linhagens destas células T produzem IFN- γ e TNF- α , que promovem mais danos ao miocárdio e evolução da sua disfunção¹⁹. Também são liberadas quimoquinas e óxido nítrico, que participam da agressão tecidual. Estes mecanismos de agressão, associados à presença do *Trypanosoma cruzi* no miocárdio de pacientes portadores de miocardiopatia chagásica crônica, fato que já foi demonstrado por técnicas de biologia molecular e imunohistoquímica, perpetuam a intensa miocardite, provocando perda de miócitos com conseqüente substituição por colágeno e intensa fibrose reparativa²⁰. Esta fibrose leva à desorganização estrutural do miocárdio com perda de alinhamento e conexão entre miócitos vizinhos, diminuição da transmissão de forças de contração para toda a câmara cardíaca, provocando redução funcional do órgão e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva²¹. As lesões também acometem o sistema de condução, causando bloqueios e arritmias cardíacas.

Vários mecanismos fisiopatológicos foram propostos para o desenvolvimento e progressão da miocardiopatia chagásica crônica, mas

nenhum mecanismo definitivo foi identificado. Certamente a associação deles é a causa maior dessa progressão ²².

Na fase crônica não era dada importância à presença do *Trypanosoma cruzi* devido ao fato da existência de miocardite linfocítica e necrose miocárdica em áreas sem a presença do parasita, e à baixa frequência de parasitemia nesta fase da doença de Chagas. Mais recentemente, estudos envolvendo técnicas de imunoistoquímica em biópsias endomiocárdicas, encontraram relação entre antígenos do parasita e focos inflamatórios. Técnicas de biologia molecular detectaram antígenos circulantes do *Trypanosoma cruzi* em número bem maior de pacientes que os trabalhos anteriores que não utilizaram essa técnica ^{17, 23}. O estudo que avaliou a presença do DNA do *Trypanosoma cruzi* detectado por reação de polimerase em cadeia (PCR) em sangue periférico e progressão da doença de Chagas mostrou que a PCR positiva para o DNA do *Trypanosoma cruzi* é uma variável independente para a piora da miocardiopatia chagásica crônica. Portanto, a presença do parasita ou de antígenos dele parece importante na fisiopatologia da progressão da cardiopatia chagásica ²⁴.

Outro possível mecanismo envolvido nessa progressão são alterações ocorridas na microcirculação coronária. A distribuição focal de fibrose intersticial e lise do miócito, que também é observada em modelos experimentais de isquemia, é compatível com a hipoperfusão transitória envolvendo a microcirculação. A presença de trombos ocluindo pequenas artérias coronárias epicárdicas e intramurais sugere distúrbios da microcirculação semelhantes aos produzidos por isquemia ²⁵. Associado a

esses dados, um estudo com perfusão miocárdica usando *Thallium*²⁰¹ mostrou defeitos de perfusão, tanto transitória quanto persistente, e defeito de perfusão paradoxal em pacientes com coronárias normais à cineangiocoronariografia. Esse trabalho envolveu pacientes da forma indeterminada e com miocardiopatia chagásica crônica²⁵.

A agressão inflamatória e autoimune na miocardiopatia chagásica crônica parece ser mecanismo de destaque na patogênese dessa doença, estando associada a distúrbios autonômicos e isquemia microvascular, contribuindo para aumentar a lesão miocárdica. Alguns estudos demonstraram que antígenos do *Trypanosoma cruzi* e do miocárdio apresentam reação cruzada, tendo, assim, anticorpos direcionando-se contra os antígenos do hospedeiro. Este dado justifica a desproporção entre a quantidade de antígenos do parasita e a intensidade da lesão miocárdica encontrada. Em modelo experimental foi identificado o linfócito T CD4+ miosina-específico, que provoca lesão miocárdica após sua injeção em ratos não infectados. A proteína B13, identificada no *Trypanosoma cruzi*, é uma proteína que apresenta reação cruzada com a cadeia pesada da miosina cardíaca. Anticorpos antimiosina de 100% dos pacientes cardiopatas reconheceram a proteína B13 do *Trypanosoma cruzi* contra apenas 14% dos assintomáticos, confirmando assim essa resposta. A transferência de soro de pacientes portadores de miocardiopatia chagásica crônica tem a capacidade de diminuir a atividade elétrica do coração de coelhos, sugerindo a presença de anticorpos que reagem contra o sistema de condução e receptores cardíacos²⁶.

A teoria neurogênica da miocardiopatia chagásica crônica sugere que a doença decorre de um longo desequilíbrio autonômico, sendo as catecolaminas importante causa da progressão da miocardiopatia chagásica crônica. Necropsias realizadas em humanos portadores de doença de Chagas, em diversos estágios da patologia, mostraram intensa denervação cardíaca ¹⁷, sendo este achado reproduzido em modelos animais ²⁷. Trabalho experimental realizado em ratos mostrou afinidade para receptores beta-adrenérgicos cardíacos semelhantes para infectados e não infectados, mas mostrou menor densidade desses receptores em animais chagásicos quando comparados com os controles saudáveis. Nesse trabalho o tratamento com propranolol não alterou essa densidade de receptores ²⁷. Outro estudo experimental realizado com ratos, mas com inoculação de menor número de parasitas e maior duração, mostrou que a afinidade e a densidade dos beta-receptores cardíacos estão alterados durante as fases aguda, indeterminada e crônica ²⁸; variando de acordo com a evolução da infecção. Além disso, anticorpos circulantes contra receptores adrenérgicos e colinérgicos cardíacos já foram demonstrados causando danos ao coração. A gamaglobulina de ratos chagásicos é capaz de interagir com os receptores beta-adrenérgicos, reduzindo o número de sítios de ligação e inibindo a resposta contrátil do coração à norepinefrina exógena, sugerindo a presença de anticorpos circulantes contra estes receptores. A deposição crônica destes auto-anticorpos pode promover a dessensibilização, internalização e/ou degradação intracelular do receptor, levando a progressiva denervação simpática ²⁹. A cintilografia miocárdica com meta-iodobenzilguanidina

(MIBG) para avaliação do sistema nervoso simpático mostra freqüentemente áreas com denervação simpática em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas. Esta é uma evidência funcional de alteração simpática precedendo qualquer anormalidade de contração miocárdica ²⁵. Portanto, é de se discutir que a ação de fármacos que atuem nos receptores beta-adrenérgicos, como o caso dos betabloqueadores, poderia estar modificada nesse cenário de denervação simpática.

O bloqueio beta-adrenérgico passou a ser considerado na insuficiência cardíaca congestiva devido à demonstração da ativação simpática e níveis elevados de noradrenalina nessa síndrome, promovendo assim a progressão da disfunção miocárdica e pior prognóstico. O carvedilol é a 3ª geração de betabloqueadores não seletivos e apresenta ação em receptores adrenérgicos β_1 , β_2 e α_1 , provocando melhora da função e do remodelamento miocárdico, além de diminuir a resistência vascular periférica²¹. Esse fármaco também possui propriedade antioxidante ³⁰. Diversos ensaios clínicos realizados com diferentes fármacos, notadamente carvedilol, metoprolol e bisoprolol, mostraram melhora dos sintomas, da função ventricular e da capacidade funcional, além de diminuir mortalidade e morbidade em pacientes portadores de insuficiência cardíaca congestiva ³¹⁻³⁴.

O uso do betabloqueador na miocardiopatia chagásica crônica ainda é controverso, com trabalhos mostrando resultados distintos. Estudo realizado por Dávila et al. ³⁵ demonstrou melhora da classe funcional e da fração de ejeção após dez semanas de uso de metoprolol, mas este trabalho não

possuía grupo placebo, foi realizado com apenas nove pacientes e a frequência cardíaca média inicial era de 115 bpm³⁵. Entretanto, outro estudo duplo-cego randomizado que associou carvedilol ou placebo após otimização do inibidor da enzima conversora de angiotensina demonstrou que o uso desse fármaco é seguro em miocardiopatas chagásicos crônicos, mas não verificou diferenças entre estes grupos na fração de ejeção, diâmetros do ventrículo esquerdo e peptídeo natriurético cerebral (BNP)³⁶. Outro estudo que avaliou qualidade de vida em pacientes com miocardiopatia chagásica, através do *Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire*, mostrou que o uso do carvedilol piorou a qualidade de vida³⁷. Por outro lado, trabalho recente que avaliou preditores de mortalidade em miocardiopatia chagásica crônica indicou que a ausência do uso de betabloqueador é fator de pior prognóstico³⁸.

Dada a importância da doença de Chagas em nosso país e considerando sua fisiopatologia no que se refere à denervação simpática e às conseqüências deletérias dessa alteração, desenvolveu-se este estudo com a hipótese do bloqueio beta-adrenérgico, com o uso do carvedilol, apresentar benefício reduzido no que diz respeito ao remodelamento miocárdico e sobrevida na miocardiopatia chagásica experimental.

Trabalho realizado com *Hamsters Sirius* inoculados com 10^5 formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* demonstrou que esse modelo experimental desenvolve miocardiopatia chagásica semelhante à do ser humano. Apresenta miocardite intensa na fase aguda com agressão evidente e evolui, na fase crônica em parte dos animais, com miocardite

crônica focal, depósito intenso de colágeno, dilatação de câmaras cardíacas e piora da função ventricular ao ecocardiograma ³⁹. Este mesmo modelo, na fase crônica, foi usado para avaliar o efeito de outros tratamentos na miocardiopatia chagásica e demonstrou seu efeito nesta fase da doença, com menor acúmulo de colágeno intersticial ⁴⁰. Portanto, nos pareceu um modelo experimental apropriado para o estudo da miocardiopatia chagásica crônica.

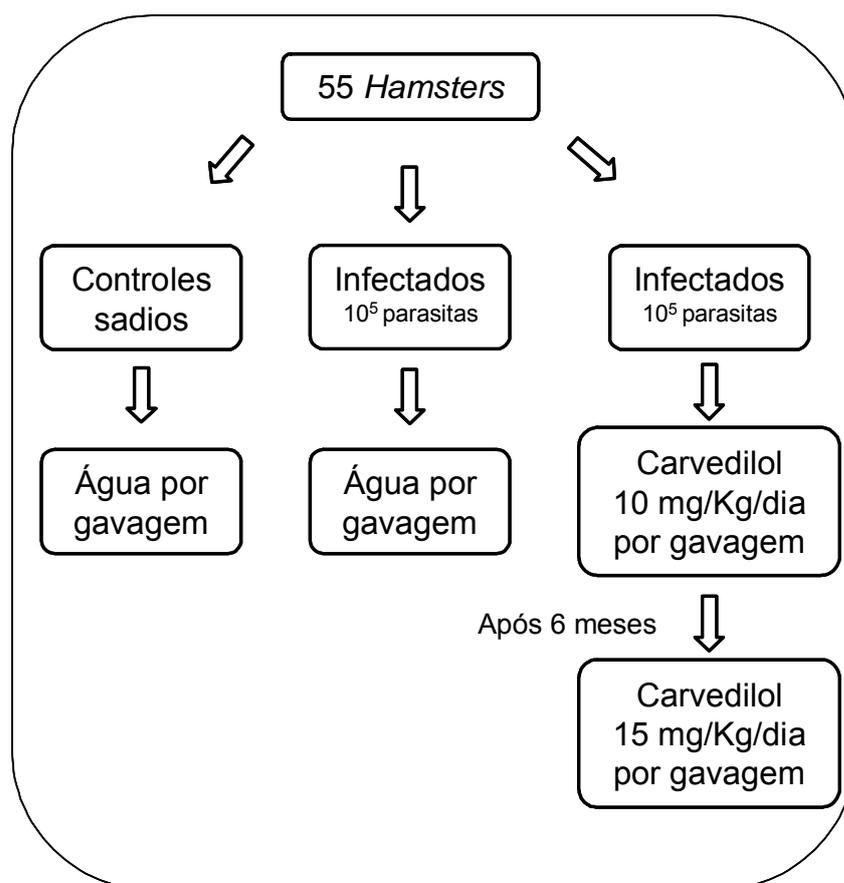
OBJETIVO

- Avaliar o papel do carvedilol na mortalidade e no remodelamento miocárdico em modelo experimental de miocardiopatia chagásica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados 55 *Hamsters Sirius* fêmeas. Os animais foram obtidos do Biotério do Centro de Veterinária da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos em gaiolas com cinco animais recebendo alimento e água *ad libitum* no Biotério do Instituto de Moléstias Tropicais da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Estes animais foram divididos em três grupos:

- 1- Grupo controle com 15 animais normais
- 2- Grupo infectado com *Trypanosoma cruzi* com 20 animais
- 3- Grupo infectado com *Trypanosoma cruzi* com 20 animais tratados com carvedilol 10 mg/kg/dia desde a inoculação.



Os animais foram sacrificados após 12 meses, sob anestesia com tribromoetanol 2 mg/kg intraperitoneal. Foi realizada laparotomia mediana,

com dissecação e punção da veia cava e administração de solução com cloreto de potássio (soro fisiológico 0,9% 80ml + KCl 19,1% 20 ml) até a parada cardíaca.

O coração foi removido por toracotomia mediana e dividido em três partes; a base e a ponta foram congeladas em nitrogênio líquido, a porção média foi mantida em formol 10% e, posteriormente, montada em parafina. Após a retirada do coração, também foi dissecada a tibia. Todos os órgãos foram pesados logo após sua retirada e a tibia foi medida.

O protocolo seguiu os critérios de cuidados com os animais definidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Estudos com Animais) e UFAW (*Universities Federation for Animal Welfare*)^{41, 42}. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP (InCor-HC-FMUSP, SDC: 2432/04/052) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, no. 473/04).

Inoculação

Os *Hamsters* foram infectados com 100.000 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y, via intraperitoneal³⁹. Os parasitas foram obtidos do sangue de animais A/J infectados sete dias antes. Foi realizada a sangria dos animais após a sedação adequada com éter.

O citrato foi o anticoagulante usado para armazenar esse sangue momentaneamente. Após esse procedimento foi realizada a contagem dos tripomastigotas em uma amostra isolada desse material. Essa contagem

definiu a quantidade de parasitas que estavam disponíveis para a infecção. Posteriormente foi realizada diluição com solução salina que permitiu afirmar que em 0,5 ml da solução existiam 10^5 parasitas. Só então foi realizada a inoculação de 0,5 ml intraperitoneal em cada animal. Os animais do grupo controle foram inoculados com solução salina.

Tratamento

Os animais receberam como tratamento o carvedilol na dose de 10 mg/kg/dia⁴³⁻⁴⁵ em uma tomada única diária, por meio de gavagem. Os grupos controle sadio e infectado foram tratados com água comum no mesmo volume que o grupo infectado tratado com carvedilol. Após seis meses de tratamento, depois da análise da frequência cardíaca e tolerabilidade, a dose do carvedilol foi aumentada para 15 mg/Kg/dia.

Ecocardiograma

Ecocardiograma transtorácico modo M, bidimensional e Doppler pulsado foi realizado utilizando-se o aparelho *Acuson, modelo Sequóia 512*, com transdutor de 9 mm e frequência de 13 MHz. O padrão de contração regional e global foi avaliado em tempo real nos cortes paraesternal longitudinal e transversal do ventrículo esquerdo (VE). As dimensões cardíacas sistólicas e diastólicas foram analisadas pelo modo M e normalizadas pelo tamanho da tíbia X 100 no momento final do estudo, após o sacrifício. A função ventricular sistólica foi calculada pela fração de

encurtamento do VE: $\Delta D(\%) = [(DD-DS)/DD] \times 100$. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi avaliado para a análise da função diastólica através do Doppler pulsado na medida do fluxo entre as valvas mitral e aórtica. O TRIV corrigido pela frequência cardíaca foi baseado na fórmula: $TRIV/\sqrt{60/\text{frequência cardíaca}}$. O índice de *performance* miocárdica (IPM) foi analisado pela fórmula: $(a - \text{tempo de ejeção}) / \text{tempo de ejeção}$, sendo “a” o intervalo entre o fechamento e a abertura da valva mitral. Esse índice foi usado para avaliação da função global do coração. O ecocardiograma foi realizado de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia⁴⁶. Os animais foram submetidos a esse procedimento antes do início do estudo e a cada quatro meses, sendo previamente anestesiados com tribromoetanol na dosagem de 2 mg/kg via intraperitoneal. O exame foi realizado de acordo com a sua padronização em pequenos roedores, sendo considerados como normais os valores dos ecocardiogramas de animais sadios do grupo controle. A análise desse exame foi realizada por examinador que não conhecia a que grupo o animal pertencia.

Eletrocardiograma

O eletrocardiograma foi realizado a cada quatro meses, juntamente com o ecocardiograma. Esse exame foi realizado no aparelho *Dixtal - Eletropagina* (eletrocardiógrafo três canais EP-3) conectando-se os eletrodos nas patas dianteiras e traseiras do animal, respeitando as referências: braço direito, braço esquerdo, perna esquerda e perna direita. Foram realizadas as

derivações DI, DII, DIII, aVR, aVL e avF, em ganho de 2N e velocidade de 50 mm/s. O papel usado foi o *ECG recording paper series 4700AH* da *Hewlett Packard*. As variáveis analisadas foram ritmo, frequência cardíaca, duração do QRS e presença de extra-sístoles. A análise desse exame foi realizada por examinador que não conhecia a que grupo o animal pertencia.

Análise morfológica

Após a remoção do coração, o mesmo foi fixado em formol 10% e embocado em parafina, sofreu cortes transversais em secções de 5 μ m ao nível do equador do coração, de modo a analisar ventrículo direito e esquerdo. Os cortes foram corados com *Picrosirius red* e utilizados para análise morfométrica para quantificação da fração do volume de colágeno intersticial no miocárdio. Para isso, um corte de cada coração foi analisado pelo programa *Quantimet 570 Image Analyser, LeicaQwin (Cambridge, UK)* acoplado a microscopia óptica. A quantificação da fração do volume de colágeno intersticial foi determinada calculando-se a percentagem de área de colágeno sobre a área total de miocárdio, analisando-se todos os campos de um corte, utilizando-se a objetiva de 10X, sendo que as frações do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo e direito foram determinadas separadamente. O colágeno perivascular foi determinado pela percentagem de área de colágeno perivascular sobre a área da luz do vaso, medido em todos os vasos do corte. Esta análise foi realizada por examinador que não conhecia a que grupo o animal pertencia.

Avaliação clínica

Os animais foram avaliados diariamente em relação à pelagem, comportamento, alimentação e secreções, sendo a pesagem realizada mensalmente.

Análise estatística

As variáveis classificatórias foram descritivamente apresentadas em gráficos. A associação entre elas foi avaliada com o teste qui-quadrado ou teste da razão de verossimilhança ou teste exato de Fisher.

As variáveis quantitativas foram apresentadas descritivamente em tabelas e gráficos contendo média e desvio padrão. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas com análise de variância e teste de Tukey, caso contrário utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Nos casos em que somente dois grupos foram comparados utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Utilizou-se o método de Kaplan-Meier para construção das curvas de sobrevida e comparadas com o teste *log-rank*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Características clínicas

Quanto às características clínicas, subjetivamente, observamos no grupo infectado e no grupo carvedilol animais mais doentes e prostrados com perda na pelagem e aglomerados na gaiola. Objetivamente, o peso dos animais dos diferentes grupos era semelhante no início do protocolo. No primeiro mês do estudo, os animais do grupo controle apresentavam peso significativamente maior que os outros grupos ($p = 0,003$). No 4º mês do protocolo não ocorreu diferença estatística entre os grupos, mas o peso do grupo carvedilol foi menor, seguido pelo grupo infectado e controle. No 8º e 12º meses o grupo infectado passou a ter maior peso, com diferença significativa para o grupo carvedilol (figura 1).

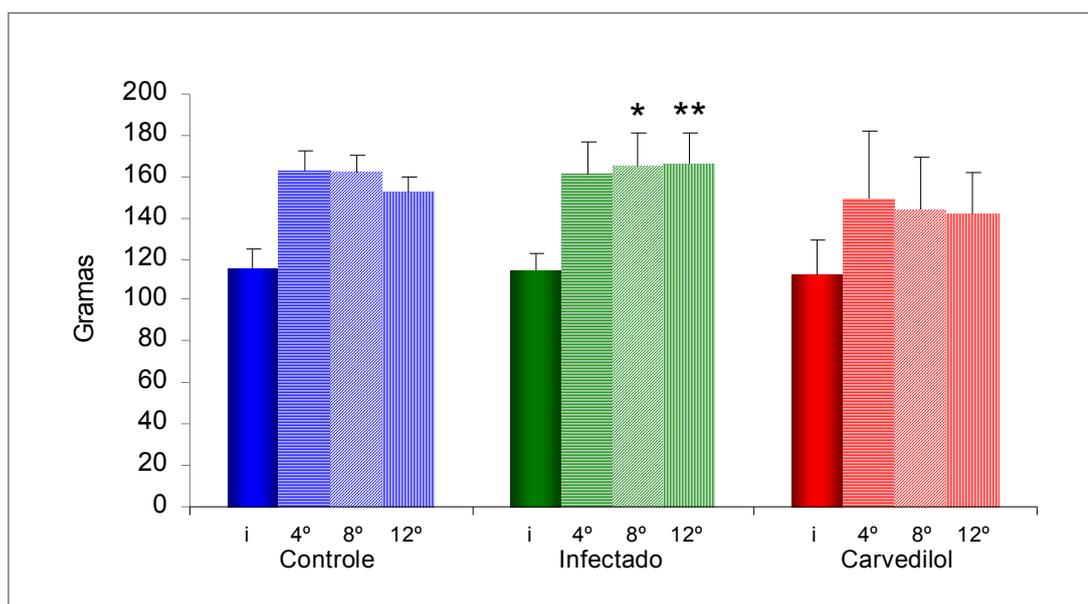


Figura 1 - Peso médio dos animais. * $p < 0,05$ vs controle e carvedilol e ** $p < 0,05$ vs carvedilol (i = inicial, 4º = quarto mês, 8º = oitavo mês, 12º = décimo segundo mês)

Eletrocardiograma

O eletrocardiograma inicial não apresentou diferença entre os grupos em relação ao ritmo sinusal, frequência cardíaca, duração do QRS e presença de extra-sístoles. Os eletrocardiogramas realizados no 4°, 8° e 12° meses mostraram diminuição da frequência cardíaca no grupo carvedilol, mas sem diferença estatisticamente significativa, quando comparado aos grupos controle e infectado (figura 2). Ocorreu, no grupo carvedilol, diminuição da frequência cardíaca média de 8,51% no 12° mês em comparação ao grupo infectado. Quando consideramos tempos diferentes dentro do mesmo grupo, verificamos que a frequência cardíaca do grupo controle permaneceu estável nos 12 meses, sofrendo aumento de apenas 0,35%. O grupo infectado sofreu aumento de 11,5%; no grupo carvedilol, a frequência cardíaca elevou-se apenas 4,0%, menos da metade em relação ao infectado (figura 3). Em relação ao ritmo sinusal, duração de QRS e presença de extra-sístoles, não ocorreram diferenças significativas (figura 4).

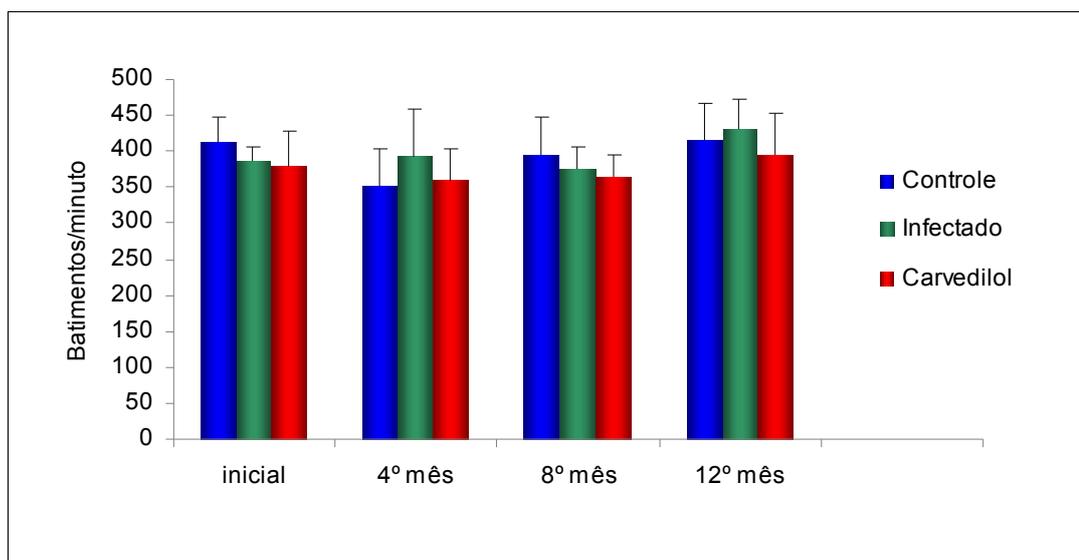


Figura 2 - Frequência cardíaca média

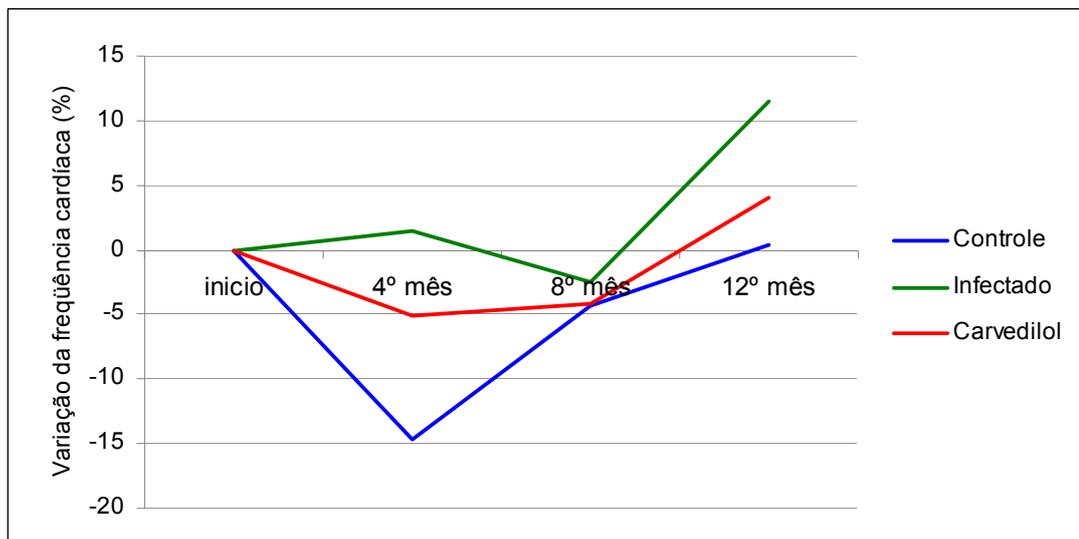


Figura 3 - Variação da frequência cardíaca dos grupos nos diferentes tempos

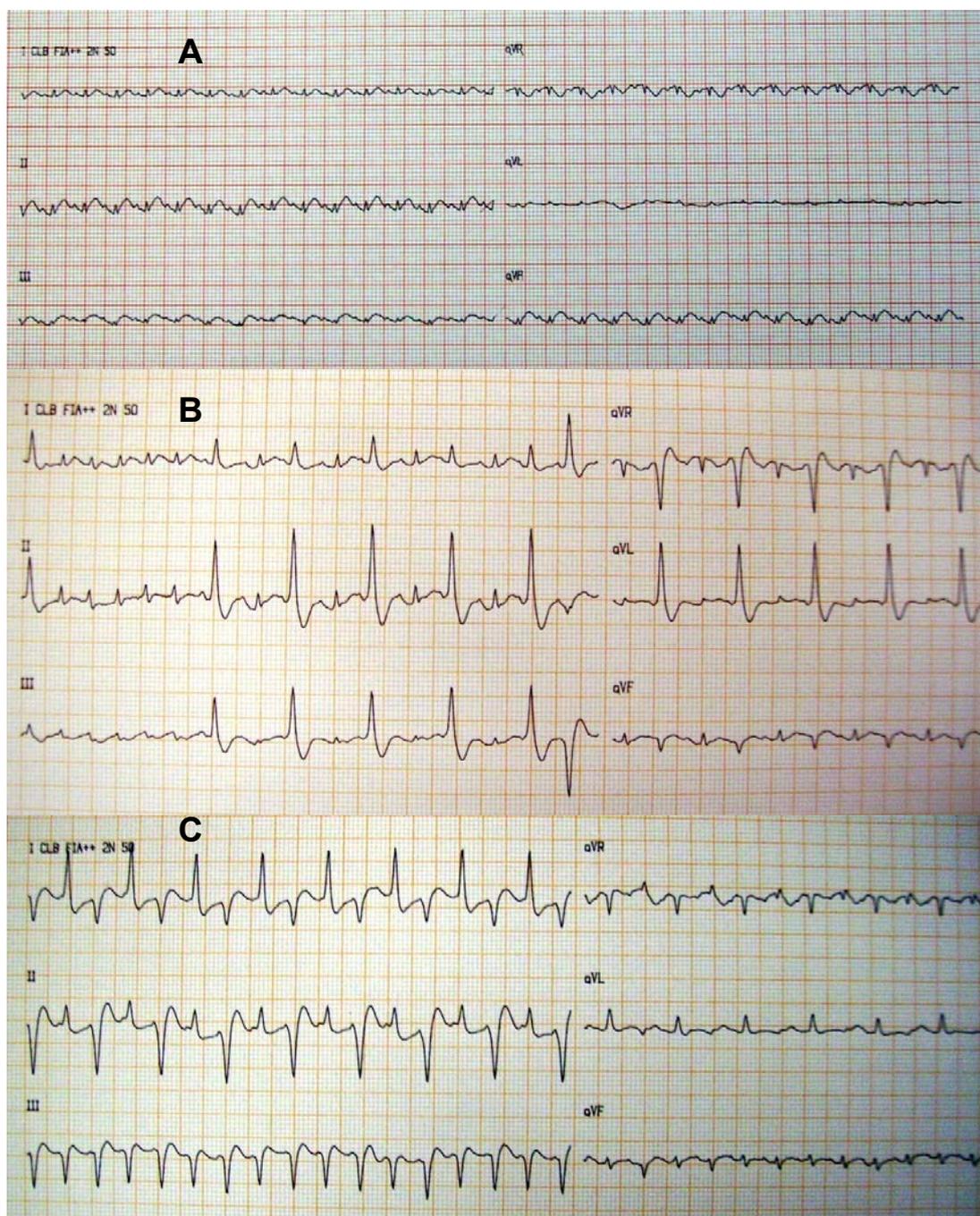


Figura 4 - Eletrocardiograma dos animais dos grupos controle (A) com ritmo sinusal, infectado (B) e carvedilol (C), ambos com bigeminismo ventricular

Remodelamento cardíaco

Utilizamos o peso do coração e sua razão sobre o tamanho da tibia para obtermos uma medida grosseira do remodelamento. Observamos que o peso desse órgão não apresentou diferença estatisticamente significativa, mas o grupo controle tem menor peso quando comparado aos outros grupos (controle: $0,60 \pm 0,081$ g; infectado: $0,62 \pm 0,119$ g; carvedilol: $0,66 \pm 0,270$ g; $p = 0,920$). De forma semelhante, a razão do coração pela tibia também não mostrou diferença estatística significativa (controle: $0,022 \pm 0,003$; infectado: $0,024 \pm 0,005$; carvedilol: $0,026 \pm 0,011$; $p = 0,804$) (figura 5), mas quando consideramos o valor da razão associado ao desvio padrão notamos que os grupos carvedilol e infectado apresentaram maior heterogeneidade que o controle, sugerindo serem compostos de animais com maior variação do peso do coração (figura 6).

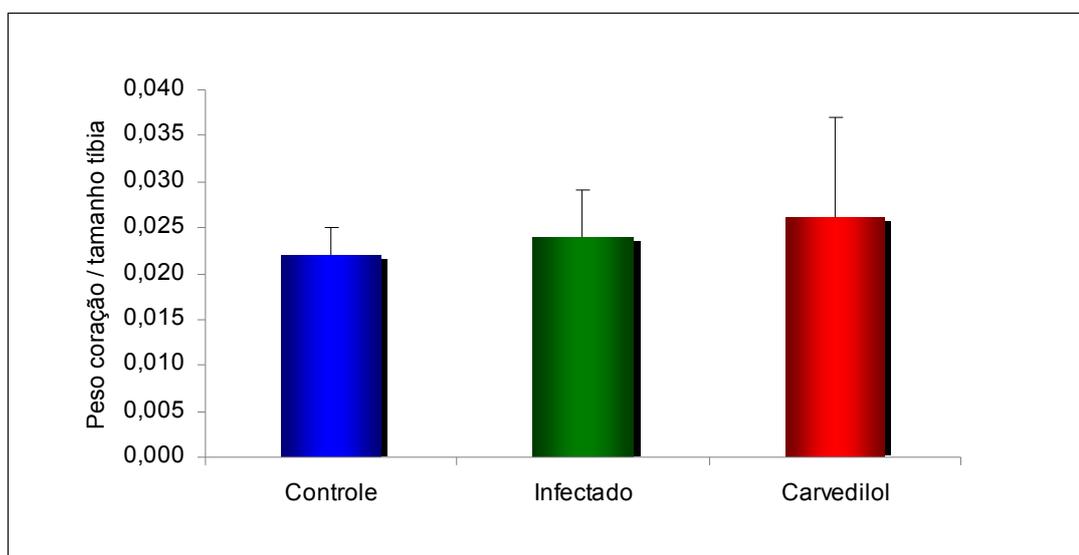


Figura 5 - Razão do peso do coração sobre o tamanho da tibia ($p = 0,804$)

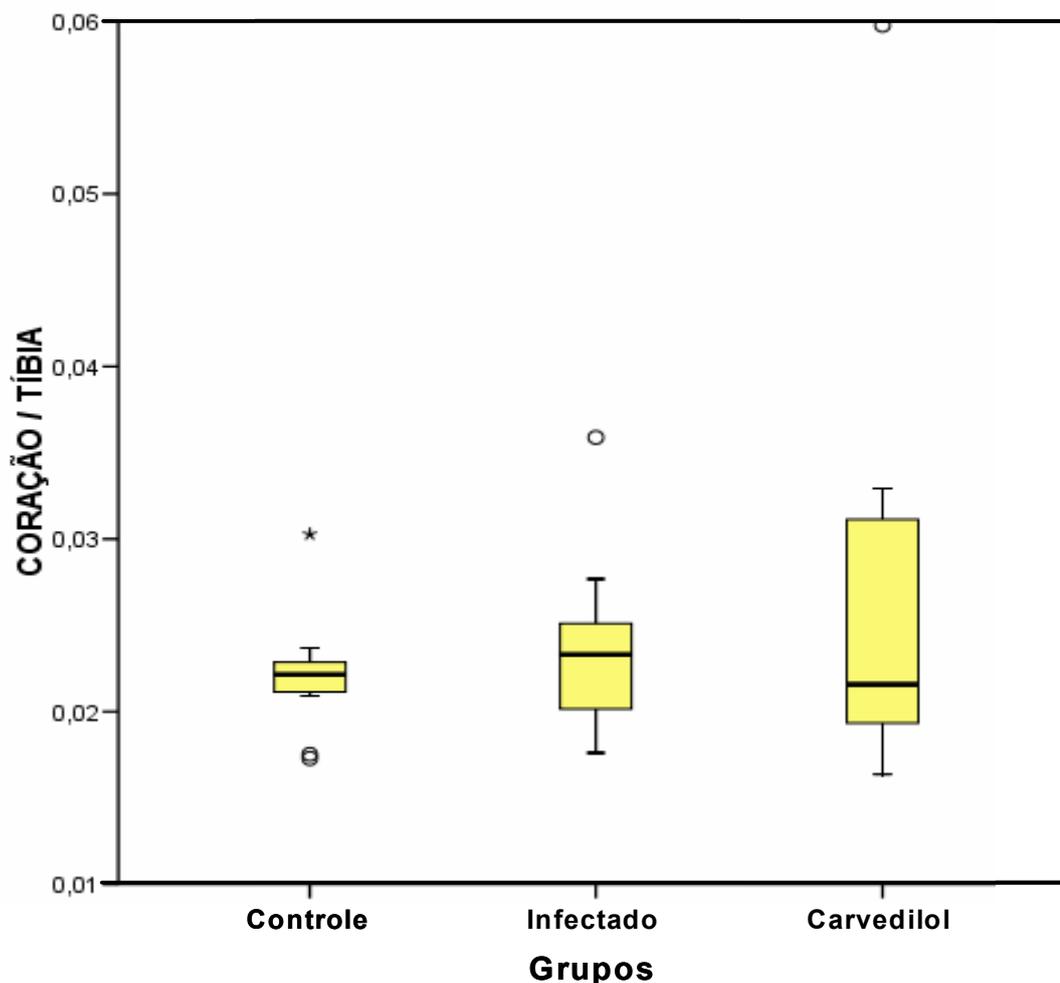


Figura 6 - Desvio padrão da razão do peso do coração sobre o tamanho da tíbia ($p = 0,804$)

A análise do índice do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo possibilitou a avaliação do remodelamento geométrico do coração. Os animais apresentavam os seguintes diâmetros diastólicos no momento inicial: controle: $0,44 \pm 0,05$ cm; infectado: $0,42 \pm 0,04$ cm; carvedilol: $0,39 \pm 0,03$ cm. Observamos que no 8° e 12° meses há aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo nos grupos infectado e carvedilol em comparação com o grupo controle, mas sem diferença estatística (controle 8° mês: $0,54 \pm 0,04$ cm; infectado 8° mês: $0,56 \pm 0,04$ cm;

carvedilol 8° mês: $0,58 \pm 0,12$ cm; $p = 0,519$; controle 12° mês: $0,52 \pm 0,06$ cm; infectado 12° mês: $0,58 \pm 0,10$ cm; carvedilol 12° mês: $0,57 \pm 0,05$ cm; $p = 0,190$). Os animais que foram sacrificados ao final do experimento também apresentavam aumento da razão do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo pelo tamanho da tíbia x 100 (figura 7) nos grupos infectados em comparação com o grupo controle, mas sem diferença estatística. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, de forma similar ao diâmetro diastólico, também mostrou aumento no 8° e 12° meses, mas sem diferença estatística entre os grupos (controle inicial: $0,27 \pm 0,05$ cm; infectado inicial: $0,25 \pm 0,04$ cm; carvedilol inicial: $0,25 \pm 0,04$ cm; $p = 0,163$; controle 8° mês: $0,39 \pm 0,05$ cm; infectado 8° mês: $0,41 \pm 0,06$ cm; carvedilol 8° mês: $0,47 \pm 0,14$ cm; $p = 0,112$; controle 12° mês: $0,36 \pm 0,05$ cm; infectado 12° mês: $0,42 \pm 0,13$ cm; carvedilol 12° mês: $0,43 \pm 0,07$ cm; $p = 0,084$). Os animais sacrificados ao final do experimento também não apresentavam diferença estatisticamente significativa quando se comparava a razão do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo pelo tamanho da tíbia x 100, mas os grupos infectados apresentavam aumento desta razão em relação ao grupo controle (figura 8).

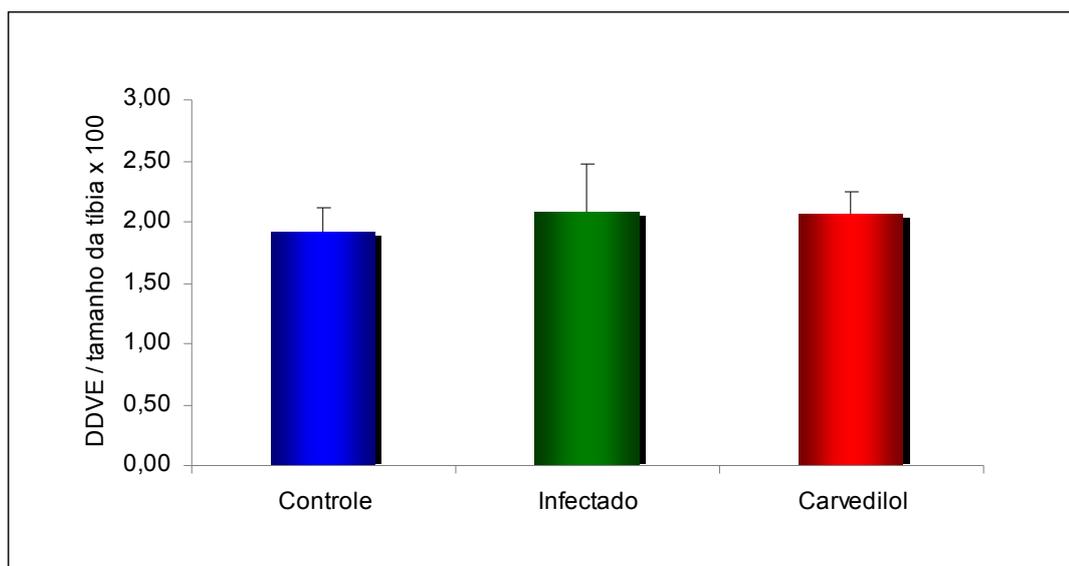


Figura 7 - Razão do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) pelo tamanho da tibia x 100 dos animais sacrificados ($p = 0,238$)

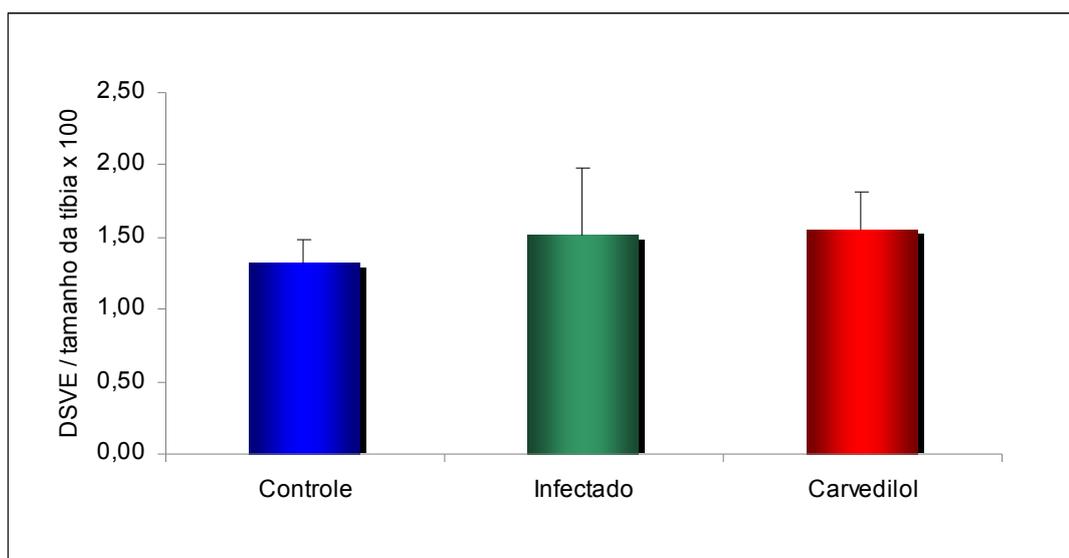


Figura 8 - Razão do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) pelo tamanho da tibia x 100 dos animais sacrificados ($p = 0,065$)

A quantificação da fração do volume de colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo demonstrou grande acúmulo de colágeno no interstício dos animais do grupo infectado e carvedilol, com diferença estatisticamente

significante entre estes grupos, quando comparado ao grupo controle. A quantificação da fração do volume de colágeno intersticial no miocárdio do ventrículo direito também mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado. Ainda, a quantificação da fração do volume de colágeno perivascular mostrou diferença estatística entre os grupos carvedilol e infectado quando comparado ao controle (tabela 1). Foi possível recuperar o coração de alguns animais (no total de 11 corações) que morreram durante o estudo, e nestas peças a análise da fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo e direito não mostrou diferenças significativas entre os grupos carvedilol e infectado (infectado VE: $2,163 \pm 0,759$; carvedilol VE: $1,809 \pm 0,761$; $p = 0,361$; infectado VD: $2,509 \pm 1,14$; carvedilol VD: $5,111 \pm 6,836$; $p = 0,715$). A análise do colágeno perivascular entre estes animais também não mostrou diferença estatística (infectado: $0,551 \pm 0,286$; carvedilol: $0,671 \pm 0,31$; $p = 0,584$). É importante lembrar que não ocorreram óbitos no grupo controle no decorrer do estudo (figura 9).

Tabela 1 - Fração do volume de colágeno intersticial nos ventrículos esquerdo, direito e perivascular dos animais sacrificados no final do experimento

	Grupos			p
	Controle	Infectado	Carvedilol	
Ventrículo esquerdo %	0,812 ± 0,356*	4,242 ± 1,435	3,607 ± 1,951	*p<0,001
Ventrículo direito %	1,284 ± 0,605	5,208 ± 2,511*	4,428 ± 2,353	*p = 0,002 vs controle
Perivascular %	0,810 ± 0,489*	1,490 ± 0,385	1,412 ± 0,597	*p = 0,013

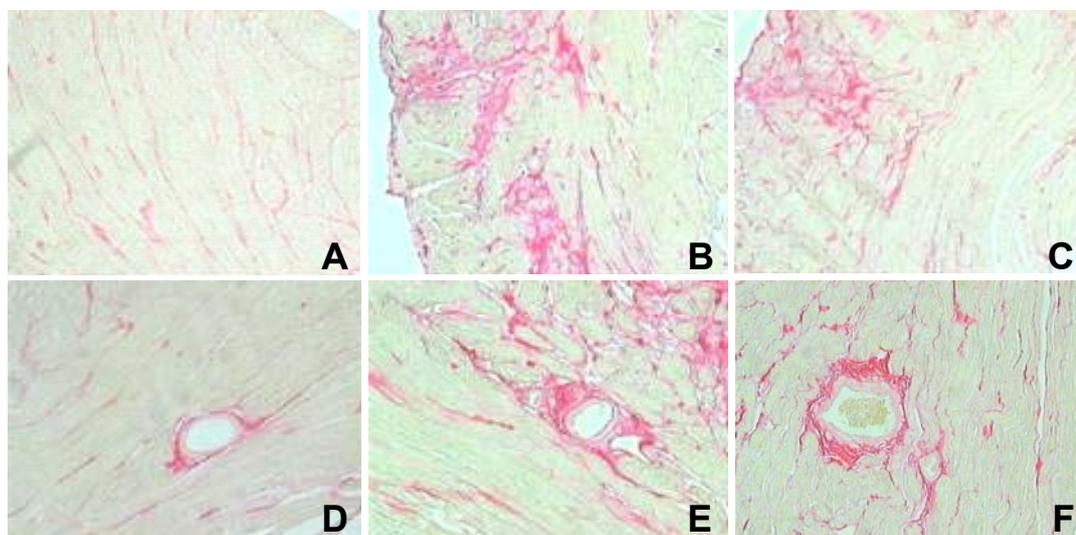


Figura 9 - Fotomicrografia do miocárdio corado com *picrosirius red* (10X): em vermelho o colágeno
A - grupo controle; **B** - grupo infectado; **C** - grupo carvedilol
 Vaso intramiocárdico: **D** - grupo controle; **E** - grupo infectado; **F** - grupo carvedilol

Função cardíaca

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada pela fração de encurtamento (ΔD). No início do estudo, antes da infecção, não houve diferença estatística entre os grupos. Os exames realizados no 8º e 12º meses mostraram ΔD menor nos grupos infectado e carvedilol, principalmente neste último, em relação ao controle, mas sem significância estatística (figura 10). Para avaliar a função global do ventrículo esquerdo usamos o índice de *performance* miocárdica (IPM), que no momento inicial não mostrou diferença entre os grupos (controle: $0,37 \pm 0,09$; infectado: $0,36 \pm 0,11$; carvedilol: $0,44 \pm 0,19$; $p = 0,217$). Este índice também não mostrou diferenças entre os grupos nos demais ecocardiogramas (controle 4º mês: $0,49 \pm 0,13$; infectado 4º mês: $0,48 \pm 0,10$; carvedilol 4º mês: $0,52 \pm 0,13$; $p = 0,736$; controle 8º mês: $0,63 \pm 0,15$; infectado 8º mês: $0,51 \pm 0,08$; carvedilol 8º mês: $0,89 \pm 0,62$; $p = 0,101$; controle 12º mês: $0,67 \pm 0,12$; infectado 12º mês: $0,58 \pm 0,11$; carvedilol 12º mês: $0,62 \pm 0,17$; $p = 0,365$).

A análise da função diastólica do ventrículo esquerdo foi avaliada apenas por um índice, o tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido (TRIV corrigido) e não mostrou diferenças significativas entre os grupos, nos quatro ecocardiogramas realizados (figuras 11 e 12).

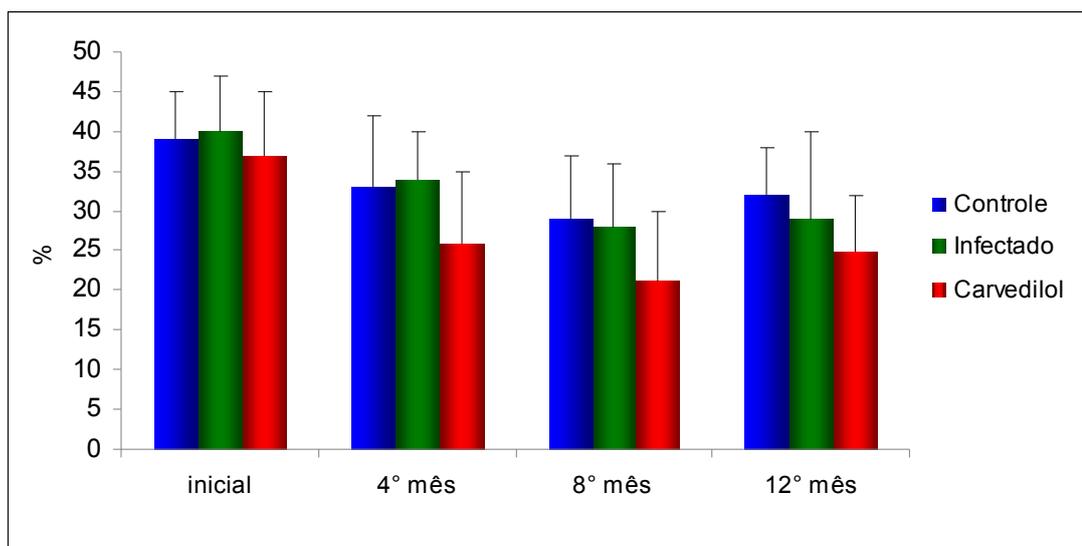


Figura 10 - Fração de encurtamento

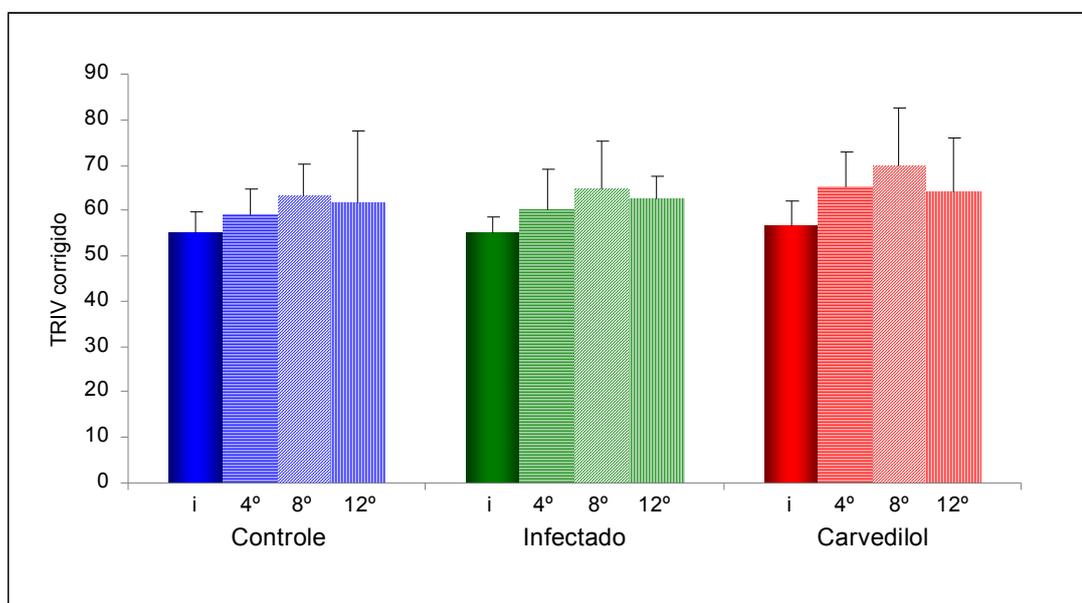


Figura 11 - Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido (TRIV corrigido)

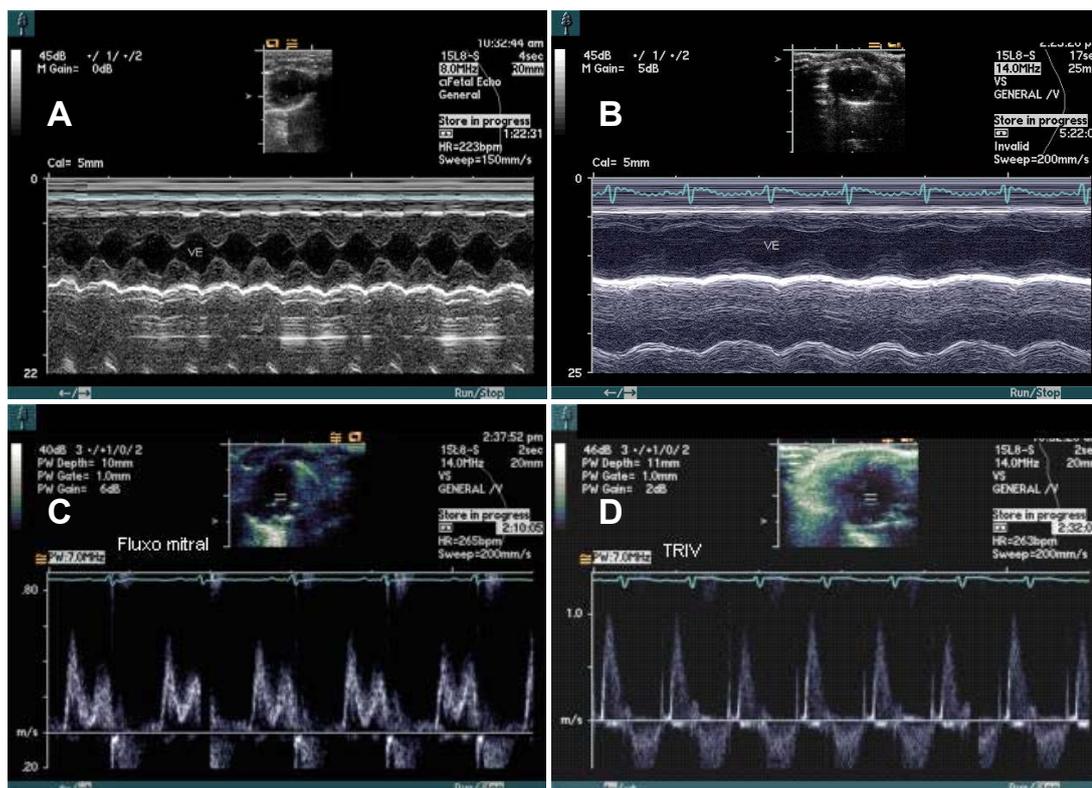


Figura 12 -Ecocardiograma modo M em animais do grupo controle (A) e do grupo infectado (B). Doppler pulsado da via de entrada do ventrículo esquerdo (C) e Doppler pulsado entre as valvas mitral e aórtica para determinação do TRIV (D)

Sobrevida

Analisando-se as curvas de sobrevida e comparando os três grupos, observamos sobrevida significativamente maior no grupo controle em relação aos grupos infectado e carvedilol ($p < 0,001$, figura 13) mas não observamos essa diferença entre os grupos infectado e o grupo tratado durante os 12 meses do protocolo. Entretanto, quando separamos a evolução da doença em duas fases, sendo a aguda considerada até o 100º dia após a infecção, e a crônica após esse período, observamos maior mortalidade no grupo infectado quando comparado ao grupo carvedilol na

fase aguda ($p < 0,001$). Neste período da fase aguda ocorreram 14 óbitos no grupo infectado, 9 óbitos no grupo carvedilol e nenhum óbito no controle. Já na fase crônica ocorreram 3 óbitos no grupo carvedilol e nenhum óbito nos outros grupos. Portanto, chegaram ao final do experimento 6 animais no grupo infectado e 8 no grupo carvedilol.

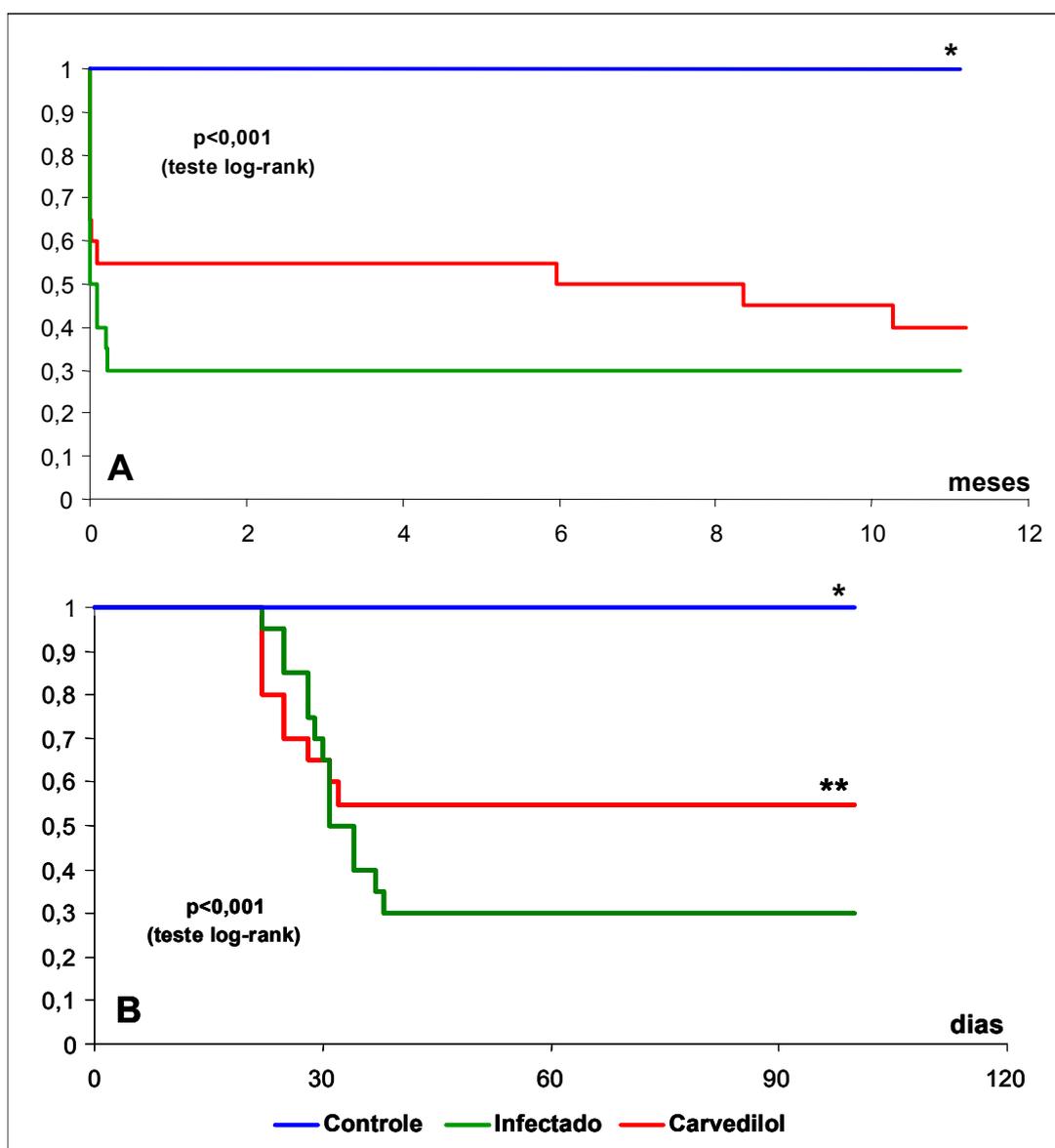


Figura 13 -A – Kaplan-Meier no período total do estudo: * $p < 0,001$ vs grupo infectado e grupo carvedilol

B – Kaplan-Meier na fase aguda, até 100 dias de infecção: * $p < 0,001$ vs grupo infectado e grupo carvedilol e ** $p < 0,001$ vs grupo infectado

DISCUSSÃO

Estudos clínicos já demonstraram o benefício do betabloqueador na insuficiência cardíaca secundária a diferentes miocardiopatias, principalmente de etiologia isquêmica e idiopática, entretanto, esta ação ainda não foi comprovada na miocardiopatia chagásica. Este estudo foi desenhado exatamente para avaliar, em um modelo experimental, o papel do betabloqueio neste cenário. Vale a pena ressaltar que os escassos estudos com pacientes chagásicos foram de curta duração e com número reduzido de pacientes, e alguns sem controle placebo ou cego e com resultados conflitantes. Esses estudos precederam dados experimentais que indicassem o benefício e a segurança do uso do fármaco. Sabemos da maior incidência de bloqueios atrioventriculares e intraventriculares na cardiopatia chagásica, além do papel da denervação simpática na evolução da doença. Portanto, o uso do betabloqueador poderia não ser benéfico e até causador de maior incidência de bloqueios. Então, os dados apresentados neste estudo podem direcionar ou facilitar o desenho de novos estudos experimentais ou clínicos.

No presente estudo a análise do peso dos animais mostrou que no 1º mês o grupo controle apresentava peso maior que os outros grupos ($p = 0,003$), possivelmente devido à agressão pela infecção aguda. Após este período os pesos se equilibraram, mas com maior ganho de peso pelo grupo infectado, podendo corresponder à maior retenção hídrica por insuficiência cardíaca. Já no 8º e 12º meses o grupo carvedilol passou a ter menor peso que o grupo infectado, da mesma forma essa diferença pode estar associada a alguma melhora no quadro hidrópico.

Apesar de outros estudos com roedores ⁴³⁻⁴⁵ utilizarem as doses de carvedilol variando de 2 a 30 mg/Kg/dia, optamos pela dose de 10 mg/kg/dia inicialmente. Entretanto, após a análise da frequência cardíaca definimos aumentar a dose para 15 mg/Kg/dia objetivando melhor bloqueio beta-adrenérgico. Sendo assim, a frequência cardíaca foi menor no grupo carvedilol em todas as medidas após o início do tratamento, apesar de não apresentar diferença estatística mesmo após reajuste da dose. Os estudos que utilizaram doses mais elevadas ^{43, 44} caracterizavam-se por serem estudos agudos, de curta duração e nenhum com modelo de Chagas, daí nossa opção em não atingir doses mais elevadas. Quanto aos parâmetros eletrocardiográficos avaliados não houve diferença entre os grupos. Apesar de maior número de animais com arritmias ventriculares nos grupos infectados, elas também estiveram presentes em alguns animais do grupo controle e não foram atenuadas pelo carvedilol, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos. Outros estudos com betabloqueadores mostraram redução de arritmias e de morte súbita em pacientes com insuficiência cardíaca, porém não em chagásicos ^{31, 33, 34}. É possível que na miocardiopatia chagásica a fisiopatologia das arritmias possa estar relacionada à miocardite intensa e a grande fibrose miocárdica, maior que em outras cardiopatias ⁴⁷.

A análise do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, realizada antes da infecção, mostrou parâmetros semelhantes aos encontrados por Salemi et al. ⁴⁶ em estudo realizado em *Hamsters Sirius* saudáveis. Este mesmo parâmetro não mostrou diferença estatística após a infecção e o

início do tratamento, mesmo tendo o grupo controle diâmetros menores no 8º e 12º meses. Resultado semelhante, porém com diferença estatística, foi encontrado por Bilate et al. no mesmo modelo experimental ³⁹. A razão do diâmetro diastólico pelo tamanho da tíbia x 100 também não mostrou diferenças significativas nos animais que foram sacrificados ao final do experimento, apesar de maior valor nos grupos infectados. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo apresentou evolução semelhante ao diastólico, não tendo diferenças estatísticas detectáveis entre os grupos. No caso desta última variável o $p = 0,065$ pode não ter atingido significância estatística devido ao número reduzido de sobreviventes ou a um tempo reduzido do experimento, porém, essa diferença ficou mais próxima da significância comparando os grupos infectados com o controle mas não entre os infectados. Quando observamos a razão do peso do coração pela sua tíbia, e seu desvio padrão, notamos que os grupos carvedilol e infectado são mais heterogêneos, com maior desvio padrão e provavelmente compostos de animais com e sem dilatação cardíaca. Sabidamente, apenas 10% dos indivíduos evoluem para cardiopatia dilatada, talvez daí a média dos grupos infectados, apesar de mais alta e com maior desvio padrão, não apresentar diferença estatística. Outro ponto a ser observado é o fato dos animais sobreviventes serem os menos doentes, e os animais com maior dilatação cardíaca poderem ter morrido durante o experimento. O trabalho original feito por Bilate et al. ³⁹ difere neste ponto, por apresentar diferença estatística entre o grupo controle e os infectados, mostrando a eficiência do modelo.

O remodelamento reverso com redução do tamanho da cavidade ventricular esquerda e a melhora da função sistólica em pacientes tratados com betabloqueador já foram anteriormente demonstrados ⁴⁸. Ainda mais, a atenuação do remodelamento estrutural com diminuição da fibrose miocárdica também foi evidenciada previamente ⁴⁹. Entretanto, tais alterações não foram estudadas na cardiopatia chagásica. No presente estudo a análise da fração do volume de colágeno intersticial no miocárdio dos ventrículos esquerdo, direito e perivascular mostrou que a agressão miocárdica provocada pela doença de Chagas foi semelhante nos grupos infectado e carvedilol, e estes diferem de forma significativa do grupo controle. Portanto, é possível que, diferente de outras etiologias, o papel da inflamação, agressão auto-imune e, principalmente a denervação simpática, sejam mecanismos fundamentais na fisiopatologia da miocardiopatia chagásica, maior que em outras cardiopatias e que, então, o tratamento com betabloqueador não apresente o mesmo efeito protetor. O trabalho realizado por Nastari ⁵⁰, estudando pacientes com miocardiopatia chagásica e isquêmica, mostrou nível muito menor de norepinefrina no miocárdio dos chagásicos. Então, mais uma vez, o efeito central do bloqueio beta-adrenérgico no coração neste modelo de miocardiopatia chagásica teria o menor benefício justificado. Apesar da ausência de dilatação ventricular com significância estatística neste modelo, sabemos que em pacientes na forma indeterminada da doença, com geometria e função sistólica normais, a fibrose miocárdica já é detectada ⁵¹. Os dados obtidos no presente estudo sugerem que o tratamento com carvedilol não modificou o acúmulo de

colágeno em nenhum dos compartimentos do coração (interstício e perivascular), nem nas diferentes câmaras (esquerda e direita) deste modelo experimental.

A confirmação de maior agressão da doença nos animais que morreram no decorrer do estudo fica prejudicada por serem recuperados poucos corações devido à característica canibal dessa espécie, e por não ocorrerem mortes no grupo controle para compararmos a histologia. Entretanto, nos poucos corações recuperados não havia atenuação do acúmulo do colágeno entre os dois grupos infectados. A sugestão que, nesses animais cujos corações foram recuperados, as mortes não foram por maior fibrose ou insuficiência cardíaca e sim mortes súbitas por arritmias, também não pode ser confirmada com a metodologia aplicada.

Em relação à função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, em repouso, observamos que o ΔD foi maior no grupo controle no 8º e 12º meses, mas sem diferença estatística, quando comparado com outros grupos. Esta semelhança estatística pode ser devido à morte dos animais mais doentes, que poderiam ter pior função cardíaca. Fato semelhante pode ter ocorrido com IPM, que avaliou a função global do ventrículo esquerdo, e com o TRIV corrigido, que avaliou a função diastólica. Entretanto, pode-se observar que os valores do ΔD dos grupos infectados estão abaixo dos valores de referência publicados anteriormente ⁴⁶ e o uso do carvedilol não atenuou essa alteração representativa da função sistólica do ventrículo esquerdo.

Analisando a sobrevivência dos animais, observamos maior mortalidade nos grupos infectados, quando comparados ao controle, principalmente na fase precoce da doença, quando ocorreram 70% de mortes no grupo infectado e 45% no grupo carvedilol contra nenhuma no grupo controle. Este dado sugere, como possível causa de morte, a intensa miocardite nesta fase aguda, com maior incidência de arritmias pelo intenso processo inflamatório. Se compararmos a sobrevivência em 12 meses dos grupos infectado e carvedilol, não observamos diferença de mortalidade, sugerindo que o betabloqueio, com o uso deste fármaco, não apresentou efeito protetor sobre este modelo experimental de miocardiopatia chagásica. Mas quando dividimos a evolução da doença em fase aguda, até 100 dias, e crônica, após este período observamos que a mortalidade no grupo carvedilol foi menor que a do grupo infectado, mostrando benefício do betabloqueador nesta fase da doença. Sterin-Borda et al.²⁹, pesquisando receptores beta-adrenérgicos, auto-anticorpos e sua relação com atenolol em camundongos BALB/c chagásicos mostraram menor mortalidade no grupo tratado com atenolol até a 9ª semana, por redução na fixação de anticorpos nos receptores cardíacos. Fernandez et al.²⁷ em trabalho realizado em ratos albinos suíços, mostrou menor parasitemia na 1ª semana no grupo infectado tratado com propranolol em comparação com o grupo infectado não tratado. Portanto, menor intensidade na miocardite secundária a possível redução da agressão parasitária, associada à menor agressão por ação de auto-anticorpos, justificaria a menor mortalidade na fase aguda observada em nosso estudo com o uso do carvedilol. A prevenção de morte súbita com uso

de betabloqueadores é descrita na literatura por vários pesquisadores^{33, 34, 52}. Com a metodologia aplicada não foi possível determinar se a redução da mortalidade na fase aguda foi decorrente da redução da morte súbita prevenida pelo carvedilol ou por atenuação da insuficiência cardíaca aguda.

Após quase 100 anos de sua descrição, a miocardiopatia chagásica continua tendo uma fisiopatologia complexa, e em alguns pontos obscura, com prognóstico reservado, necessitando de maiores intervenções sociais, melhores cuidados médico-assistenciais e novas pesquisas com o intuito de melhorar sua evolução. Os nossos dados sugerem que o betabloqueador carvedilol não tem efeito benéfico na miocardiopatia chagásica crônica experimental, apresentando certo grau de proteção na fase aguda da doença.

CONCLUSÕES

Neste modelo experimental de miocardiopatia chagásica:

1. o tratamento com carvedilol não reduziu a mortalidade no período total do estudo;
2. o uso do carvedilol reduziu a mortalidade na fase aguda da doença;
3. o uso do carvedilol não atenuou o remodelamento estrutural com fibrose miocárdica ou perivascular.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

1. Devido à alta mortalidade na fase aguda da doença o número de animais a serem analisados no final do estudo foi reduzido.
2. Devido ao canibalismo da espécie em estudo, a maior parte dos corações dos animais que morreram durante o projeto não pode ser recuperada para análise.
3. Quanto aos dados de função diastólica, os mesmos ficaram limitados devido a não adequação do *software* em relação à frequência cardíaca elevada dos animais.
4. A não redução, com significância estatística, da frequência cardíaca limitou o poder de algumas conclusões.

REFERÊNCIAS

1. Dias JCP, Machado EMM, Borges EC, Moreira EF, Gontijo C, Azeredo BVM. Doença de Chagas em Lassance, MG. Reavaliação clínico-epidemiológica 90 anos após a descoberta de Carlos Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:167-76.
2. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers L, Fornaciari G, Allison M. A 9,000 year record of Chagas' disease. *PNAS* 2004;101:2034-9.
3. Bernstein RE. Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. *J R Soc Med.* 1984;77:608-9.
4. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BI, Rassi Jr A, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States. *JAMA* 2007;298:2171-81.
5. Guhl F, Lazdins-Helds JK (ed.). Reporte sobre la enfermedad de Chagas - Grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas, Organización Mundial de la Salud. Buenos Aires, Argentina: Organización Mundial de la Salud; 2007:1-8.
6. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003;19:495-501.
7. Silveira AC. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cad Saúde Pública* 2000;16:35-42.

8. Zeledon R. El triatoma dimidiata y su relación con la enfermedad de Chagas. San José: Editorial Universidad Estatal a Distancia, 1981.
9. Pinto AYN, Valente SAS, Valente VC. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis.* 2004;8:454-60.
10. Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, Soares M, Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TCM, Stoco PH, Murta SMF, Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:25-32.
11. Dariush A. Análise de custo-efetividade do Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil: relatório final. Brasília: Organização Panamericana da Saúde, 1998.
12. Silveira AC, Rezende DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994;27:11-22.
13. Dias JCP. The treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis). *Ann Intern Med.* 2006;144:772-4.
14. Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:603-12.

15. Maguire JH. Focus on research: Chagas' disease- can we stop the deaths? *N Engl J Med.* 2006;355:760-1.
16. Punekollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2007;115:279–83.
17. Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AVL. Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 1999;72:264-77.
18. Rassi Jr A, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med.* 2006;355:799-808.
19. Plentz RDM, Irigoyen MC, Muller AS, Casarini DE, Rubira MC, Moreno Jr H, Mady C, Ianni BM, Krieger EM, Consolim-Colombo F. Disfunção endotelial venosa em pacientes com doença de Chagas sem insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86:466-71.
20. Nunes VL, Ramires FJA, Pimentel WS, Fernandes F, Ianni BM, Mady C. O papel do acúmulo de colágeno no interstício miocárdico na sobrevida dos pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática e chagásica. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87:757-62.
21. Batlouni M, Albuquerque DC. Bloqueadores beta-adrenérgicos na insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2000;75:339-49.

22. Marin-Neto J.A, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007;115:1109-23.
23. Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Omelianiuk M, Guzman S, Moreno Barral J, Caeiro TF, Madoery RJ, Salomone OA. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopath: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart* 2003;89:1186-90.
24. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment – a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006;144:724-34.
25. Simões MV, Pintya A.O, Bromberg-Marin G, Sarabanda AV, Antloga CM, Pazin-Filho A, Maciel BC, Marin-Neto JA. Relation of regional sympathetic denervation and myocardial perfusion disturbance to wall motion impairment in Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2000;86:975-81.
26. Higuchi ML, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* 2003;60:96-107.
27. Fernández R, Enders J, Rivarola W, Palma J, Paglini P. Experimental Chagas' disease: effects of propranolol upon cardiac beta-receptors. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 1998;48:93-8.

28. Enders J, Fernández R, Rivarola W, Paglini P, Palma JA. Cardiac Beta receptors' density or affinity modified by different *Trypanosoma cruzi* amount. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*. 1996;46:139-43.
29. Sterin-Borda L, Gorelik G, Postan M, Cappa SG, Borda E. Alterations in cardiac beta-adrenergic receptors in chagasic mice and their association with circulating beta-adrenoceptor-related autoantibodies. *Cardiovasc Res*. 1999;41:116-25.
30. Dulin B, Abraham WT. Pharmacology of carvedilol. *Am J Cardiol*. 2004;93:3B–6B.
31. Fowler MB. Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Trial: Carvedilol in severe heart failure. *Am J Cardiol*. 2004;93:35B–39B.
32. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure: U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334:1349–55.
33. CIBIS-II Investigators. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;353:9–13.
34. MERIT-HF Investigators. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353:2001–7.

35. Dávila DF, Angel F, Bellabarba GA, Donis JH. Effects of metoprolol in chagasic patients with severe congestive heart failure. *Int J Cardiol.* 2002;85:255-60.
36. Botoni FA, Poole-Wilson PA, Ribeiro ALP, Okonko DO, Oliveira BMR, Pinto AS, Teixeira MM, Teixeira Jr AL, Reis AM, Dantas JBP, Ferreira CS, Tavares Jr WC, Rocha MOC. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2007;153:544.e1-8.
37. Dourado KC, Bestetti RB, Cordeiro JA, Theodoropoulos TAI. Assessment of quality of life in patients with chronic heart failure secondary to Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2006;108:412-3.
38. Theodoropoulos TAD, Bestetti RB, Otaviano AP, Cordeiro JA, Rodrigues VC, Silva AC. Predictors of all-cause mortality in chronic Chagas' heart disease in the current era of heart failure therapy. *Int J Cardiol.* 2008 (2008 Feb 5; [Epub ahead of print] PMID: 18258318;PubMed - as supplied by publisher)
39. Bilate AMB, Salemi VMC, Ramires FJA, Brito T, Silva AM, Umezawa EF, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect.* 2003;5:1116-24.

40. Ramires FJ, Salemi VM, Ianni BM, Fernandes F, Martins DG, Billate A, Neto EC, Mady C. Aldosterone antagonism in an inflammatory state: evidence for myocardial protection. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006;7:162-7.
41. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). In: <http://www.cobea.org.br/index.php>
42. Science in the Service of Animal Welfare. In: <http://www.ufaw.org.uk/>
43. Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y, Zhou JY. Effect of beta-blockers on cardiac function and calcium handling protein in postinfarction heart failure rats. *Chest* 2005;12:1812-21.
44. Inoue A, Yamashina S, Yamazaki J. The effect of beta-blocker on hamster model Bio 53,58 with dilated cardiomyopathy determined using 123I-MIBG myocardial scintigraphy. *Ann Nucl Med.* 2003;17:677-83.
45. Yaoita H, Sakabe A, Maehara K, Maruyama Y. Different effects of carvedilol, metoprolol, and propranolol on left ventricular remodeling after coronary stenosis or after permanent coronary occlusion in rats. *Circulation* 2002;105:975-80.
46. Salemi VMC, Bilate AMB, Ramires FJA, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Cunha-Neto E, Mady C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr.* 2005;6:41-6.

47. Pereira-Barretto ACP, Higuchi ML, Luz PL, Lopes EA, Bellotti G, Mady C, Stolf N, Arteaga E, Pileggi F. Comparação entre alterações histológicas da miocardiopatia da doença de Chagas e cardiomiopatia dilatada. *Arq Bras Cardiol.* 1989;52:79-83.
48. Adamson PB, Gilbert EM. Reducing the risk of sudden death in heart failure with β -blockers. *J Card Fail.* 2006;12:734-46.
49. Nanjo S, Yamazaki J, Yoshikawa K, Ishii T, Togane Y. Carvedilol prevents myocardial fibrosis in hamsters. *Int Heart J.* 2006;47:607-16.
50. Nastari L. *Relação entre norepinefrina intramiocárdica e função ventricular esquerda em pacientes portadores de cardiopatia da doença de Chagas.* Tese [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.
51. Mady C, Ianni BM, Arteaga E, A Montes GS, Caldini EG, Andrade G, Giorgi MCP, Saldiva PHN. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *Am J Cardiol.* 1999;84:354-6.
52. Adamson PB, GILBERT EM. Reducing the risk of sudden death in heart failure with b-blockers. *J Cardiac Fail.* 2006;12:734e-46

APÊNDICES

APÊNDICE A-1 – Banco de dados – Grupo controle

Controle	Peso inicial	peso 4	peso 8	peso 12	FC inicial	FC 4	FC 8	FC 12
3775	106	145	159	137	428	428	500	428
4ADD	106	145	151	150	428	375	375	375
54DE	117	166	170	150	428	230	500	428
5150	111	148	168	xx	428	375	375	428
D41B	116	164	181	xx	428	333	428	375
6369	131	158	170	167	428	375	375	375
3260	111	147	166	140	375	428	375	428
A540	110	140	158	154	500	333	333	428
263B	119	149	169	151	428	333	333	428
XXXX	118	144	160	156	375	333	375	272
2F16	123	155	165	150	428	428	375	500
3AB2	105	143	162	161	375	333	428	428
27A3	130	160	160	152	375	333	428	428
3A6B	103	147	164	153	375	300	375	500
YYYY	128	165	172	154	375	333	333	375

APÊNDICE A-2 – Banco de dados – Grupo controle

Controle	Peso coração	DDVE inicial	DDVE 4	DDVE 8	DDVE 12	DSVE inicial	DSVE 4	DSVE 8	DSVE 12
3775	0,58	0,45	0,43	0,55	0,44	0,31	0,32	0,41	0,29
4ADD	0,47	0,44	0,53	0,46	0,47	0,23	0,41	0,32	0,33
54DE	0,82	0,45	0,55	0,53	0,57	0,33	0,35	0,45	0,34
5150	0,65	0,42	0,48	0,53	0,5	0,26	0,32	0,41	0,43
D41B	0,61	0,44	0,52	0,52	0,55	0,3	0,35	0,38	0,34
6369	0,59	0,43	0,53	0,53	0,52	0,22	0,3	0,3	0,35
3260	0,64	0,38	0,55	0,55	0,59	0,22	0,45	0,43	0,38
A540	0,48	0,34	0,5	0,57	0,54	0,19	0,3	0,4	0,35
263B	0,67	0,52	0,5	0,52	0,53	0,32	0,35	0,38	0,38
XXXX	0,61	0,51	0,65	0,62	0,61	0,33	0,52	0,45	0,42
2F16	0,62	0,42	0,63	0,54	0,53	0,24	0,43	0,34	0,38
3AB2	0,57	0,41	0,44	0,59	0,58	0,24	0,2	0,44	0,4
27A3	0,6	0,47	0,55	0,57	0,47	0,31	0,4	0,4	0,3
3A6B	0,56	0,43	0,55	0,54	0,42	0,27	0,36	0,34	0,27
YYYY	0,61	0,53	0,5	0,55	0,55	0,34	0,31	0,34	0,41

APÊNDICE A-3 – Banco de dados – Grupo controle

Controle	colageno VE	delta D inicial	delta D 4	delta D 8	delta D 12
3775	1,19	0,31	0,26	0,25	0,34
4ADD	0,74	0,48	0,23	0,30	0,30
54DE	0,63	0,27	0,36	0,15	0,40
5150	0,69	0,38	0,33	0,23	0,14
D41B	0,67	0,32	0,33	0,27	0,38
6369	1,15	0,49	0,43	0,43	0,33
3260	0,79	0,42	0,18	0,36	0,36
A540	1,06	0,44	0,40	0,30	0,35
263B	0,83	0,38	0,30	0,27	0,28
XXXX	0,30	0,35	0,20	0,27	0,31
2F16	0,71	0,43	0,32	0,37	0,28
3AB2	0,43	0,41	0,55	0,25	0,31
27A3	0,25	0,34	0,27	0,30	0,36
3A6B	1,51	0,37	0,35	0,37	0,36
YYYY	1,22	0,36	0,38	0,38	0,25

APÉNDICE B-1 – Banco de dados – Grupo infectado

Infectado	Peso inicial	peso 4	peso 8	peso 12	FC inicial	FC 4	FC 8	FC 12
EB2A	118				428			
5347	93				428			
6E 71	116	178	175	170	375	300	375	428
EE0E	125				375			
7F3E	120				428			
86 E4	105	156	153	156	428	375	375	428
727C	115	174	170	166	375	375	428	500
391C	100	138	141	143	375	428	333	375
753B	105				375			
2779	124				428			
569A	119				375			
99B4	120				375			
4DE1	120				375			
3540	108				333			
5B89	116				333			
2A47	118				375			
52F1	117				375			
6E 96	116				375			
2CC8	122	168	185	186	428	500	375	428
9918	113	154	168	175	375	375	375	428

APÊNDICE B-2 – Banco de dados – Grupo infectado

Infectado	Peso coração	DDVE inicial	DDVE 4	DDVE 8	DDVE 12	DSVE inicial	DSVE 4	DSVE 8	DSVE 12
EB2A		0,38				0,26			
5347		0,4				0,29			
6E 71	0,69	0,42	0,53	0,62	0,73	0,28	0,4	0,46	0,63
EE0E	0,5	0,41				0,23			
7F3E	0,5	0,41				0,24			
86 E4	0,56	0,42	0,51	0,51	0,48	0,23	0,34	0,3	0,35
727C	0,65	0,46	0,55	0,53	0,52	0,28	0,35	0,42	0,39
391C	0,5	0,43	0,49	0,56	0,48	0,27	0,28	0,44	0,26
753B		0,42				0,3			
2779	0,9	0,38				0,2			
569A		0,42				0,25			
99B4		0,36				0,22			
4DE1	0,7	0,44				0,23			
3540	0,6	0,41				0,21			
5B89		0,38				0,18			
2A47		0,38				0,21			
52F1		0,51				0,34			
6E 96		0,42				0,26			
2CC8	0,67	0,4	0,59	0,59	0,67	0,22	0,41	0,4	0,49
9918	0,58	0,49	0,5	0,56	0,58	0,32	0,31	0,42	0,39

APÉNDICE B-3 – Banco de datos – Grupo infectado

Infectado	colageno VE	delta D inicial	delta D 4	delta D 8	delta D 12
EB2A		0,32			
5347		0,28			
6E 71	5,21	0,33	0,25	0,26	0,14
EE0E	3,07	0,44			
7F3E	1,68	0,41			
86 E4	2,11	0,45	0,33	0,41	0,27
727C	5,07	0,39	0,36	0,21	0,25
391C	3,20	0,37	0,43	0,21	0,46
753B		0,29			
2779	1,64	0,47			
569A		0,40			
99B4		0,39			
4DE1	1,52	0,48			
3540	2,91	0,49			
5B89		0,53			
2A47		0,45			
52F1		0,33			
6E 96		0,38			
2CC8	5,95	0,45	0,31	0,32	0,27
9918	3,91	0,35	0,38	0,25	0,33

APÊNDICE C-1 – Banco de dados – Grupo carvedilol

Carvedilol	Peso inicial	peso 4	peso 8	peso 12	FC inicial	FC 4	FC 8	FC 12
6F70	123				375			
3E5O	116				428			
2F32	105	141	147	132	428	375	333	375
2627	103	137	135	127	375	333	428	428
9D67	126	159	155		428	333	375	
804B	108				428			
4489	138				375			
3D95	98				375			
5354	161	88	105	116	375	333	375	375
9D1B	91	103	105		375	300	375	
45B4	95	164	160	151	428	375	333	300
54FD	121				375			
C63B	113	196	168	167	375	375	333	428
9DCE	104				375			
AF43	103				300			
956C	105	175	167	158	428	428	375	500
A98E	102	169	170	162	375	428	333	375
4BC3	122	172			375	375		
BE78	91	142	131	124	214	300	375	375
5463	118				375			

APÊNDICE C-2 – Banco de dados – Grupo carvedilol

Carvedilol	Peso coração	DDVE inicial	DDVE 4	DDVE 8	DDVE 12	DSVE inicial	DSVE 4	DSVE 8	DSVE 12
6F70	1,5	0,39				0,22			
3E50		0,37				0,31			
2F32	0,52	0,45	0,52	0,52	0,52	0,32	0,47	0,41	0,39
2627	0,46	0,42	0,52	0,57	0,51	0,21	0,34	0,48	0,35
9D67		0,4	0,75	0,88		0,22	0,64	0,81	
804B	0,8	0,36				0,22			
4489	0,8	0,43				0,28			
3D95	0,8	0,41				0,24			
5354	0,46	0,39	0,47	0,59	0,65	0,21	0,38	0,5	0,54
9D1B		0,32	0,46	0,58		0,21	0,3	0,52	
45B4	0,55	0,39	0,56	0,52	0,53	0,24	0,38	0,33	0,41
54FD		0,43				0,32			
C63B	0,6	0,38	0,54	0,59	0,55	0,22	0,36	0,47	0,4
9DCE	0,6	0,42				0,29			
AF43	0,7	0,4				0,25			
956C	0,57	0,39	0,53	0,48	0,6	0,23	0,35	0,35	0,51
A98E	0,55	0,38	0,59	0,6	0,62	0,22	0,4	0,48	0,45
4BC3		0,39	0,52			0,24	0,43		
BE78	0,45	0,36	0,4	0,46	0,55	0,22	0,3	0,31	0,36
5463		0,4				0,28			

APÊNDICE C-3 – Banco de dados – Grupo carvedilol

Carvedilol	colageno VE	delta D inicial	delta D 4	delta D 8	delta D 12
6F70	3,17	0,44			
3E5O		0,16			
2F32	2,40	0,29	0,10	0,21	0,25
2627	1,38	0,50	0,35	0,16	0,31
9D67		0,45	0,15	0,08	
804B	1,17	0,39			
4489	1,62	0,35			
3D95	1,16	0,41			
5354	2,79	0,46	0,19	0,15	0,17
9D1B		0,34	0,35	0,10	
45B4	1,75	0,38	0,32	0,37	0,23
54FD		0,26			
C63B	7,13	0,42	0,33	0,20	0,27
9DCE	2,15	0,31			
AF43	1,58	0,38			
956C	4,45	0,41	0,34	0,27	0,15
A98E	5,34	0,42	0,32	0,20	0,27
4BC3		0,38	0,17		
BE78	3,62	0,39	0,25	0,33	0,35
5463		0,30			

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)