

Terapia de Resgate com Nifurtimox e Dipiridamol na Miocardite Chagásica Aguda Grave com Insuficiência Cardíaca em Camundongos NMRI

Rescue Therapy with Nifurtimox and Dipyridamole for Severe Acute Chagas Myocarditis with Congestive Heart Failure in NMRI Albino Mice

Daniela Yustiz Aparicio,¹ María González-Hernández,¹ Greybis Hernández-Forero,¹ María Guédez-Ortiz,¹ Sonia Santeliz,¹ Loredana Goncalves,² Rafael Bonfante Cabarcas¹

Unidade de Bioquímica, Escola de Ciências da Saúde, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA),¹ Barquisimeto, Venezuela; Universidad de los Andes,² Mérida – Venezuela

Resumo

Fundamento: A doença de Chagas é um problema de saúde global, sendo necessário o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos. Nosso grupo demonstrou recentemente que o nifurtimox associado ao dipiridamol tem efeitos curativos em camundongos com doença de Chagas aguda. Neste estudo, avaliamos o efeito deste protocolo terapêutico em camundongos chagásicos com insuficiência cardíaca.

Objetivo: Avaliar se o nifurtimox e o dipiridamol são úteis no tratamento de resgate em camundongos com miocardite chagásica aguda com insuficiência cardíaca.

Métodos: Foram divididos em três grupos 42 camundongos com miocardite chagásica aguda e insuficiência cardíaca congestiva: Controle Chagas (n = 11); Nif-Dip, tratados com nifurtimox e dipiridamol (n = 14); e Nif-Dip-Insuficiência Cardíaca, tratados com nifurtimox e dipiridamol, associados com digoxina, furosemida e captopril (n = 17). As doses de nifurtimox e dipiridamol foram de 40 e 30 mg/kg/dia, respectivamente, durante 6 semanas. Os camundongos foram submetidos a avaliações clínicas, eletrocardiográficas, hemoparasitológicas e histopatológicas.

Resultados: Observou-se menor mortalidade no Grupo Nif-Dip (n = 4; 28,57%) em relação ao Controle Chagas (n = 6; 54,54%) e ao Nif-Dip-Insuficiência Cardíaca (n = 9; 52,9%). Clinicamente, os camundongos tratados com nifurtimox e dipiridamol aumentaram o peso corporal e melhoraram a insuficiência cardíaca, sem mostrar esplenomegalia. Nestes grupos, foram erradicadas as parasitemias e os parasitas teciduais; a fibrose, a miocitólise, o infiltrado de células inflamatórias e os mastócitos diminuíram. Os distúrbios de repolarização, os intervalos QRS e o QT prolongados, o aumento da amplitude da onda S e a dissociação atrioventricular foram revertidos pelo tratamento.

Conclusão: O tratamento com nifurtimox e dipiridamol pode ser usado no resgate em camundongos com doença chagásica aguda grave, já que o nifurtimox teve atividade tripanocida, e o dipiridamole potenciou seu efeito. O dipiridamol seria útil na insuficiência cardíaca chagásica. (Int J Cardiovasc Sci. 2017;30(2):145-156)

Palavras-chave: Doença de Chagas; Cardiomiopatia Chagásica; Insuficiência Cardíaca; Camundongos, Nifurtimox; Dipiridamol.

Abstract

Background: Chagas disease is a global health problem; therefore, the development of new therapeutic protocols is necessary. Our group recently demonstrated that nifurtimox associated with dipyridamole has curative effects in mice with acute Chagas disease. In this study, we assess the effect of this therapeutic protocol in chagasic mice with heart failure.

Objective: To evaluate whether nifurtimox and dipyridamole are useful to rescue mice with severe acute chagasic myocarditis with heart failure.

Correspondência: Rafael Bonfante Cabarcas

Av. Libertador con Av. Andrés Bello, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". CEP: 3001, Barquisimeto – Venezuela
E-mail: rbonfantecabarcas@gmail.com

Methods: 42 mice with acute chagasic myocarditis and congestive heart failure were divided into three groups: control chagas ($n = 11$), Nif-Dip treated with nifurtimox and dipyridamole ($n = 14$) and Nif-Dip-heart failure treated with nifurtimox and dipyridamole associated with digoxin, furosemide, and captopril ($n = 17$). Nifurtimox and dipyridamole doses were 40 and 30 mg/kg/day, respectively, for 6 weeks. Mice underwent clinical, electrocardiographic, hemoparasitological and histopathological assessments.

Results: Lower mortality in Nif-Dip (28.57%; $n = 4$) compared to control chagas (54.54%; $n = 6$) and Nif-Dip-heart failure (52.9%; $n = 9$) was observed. Clinically, nifurtimox and dipyridamole-treated mice increased body weight and improved heart failure without splenomegaly. In these groups, parasitemia and tissue parasites were eradicated; fibrosis, myocytolysis, inflammatory cell infiltrate and mast cells decreased. Repolarization disorders, prolonged QRS and QT intervals, increase of S wave amplitude and atrioventricular dissociation were reversed by the treatment.

Conclusion: Nifurtimox with dipyridamole can rescue NMRI mice from severe acute chagas disease, as nifurtimox showed trypanocidal activity and dipyridamole potentiated its effect. Dipyridamole would be useful in chagasic heart failure. (Int J Cardiovasc Sci. 2017;30(2):145-156)

Keywords: Chagas Disease; Chagas Cardiomyopathy; Heart Failure; Mice; Nifurtimox; Dipyridamole.

(Full texts in English - <http://www.onlinejcs.org>)

Introdução

A Doença de Chagas (DC) é um problema de saúde pública global, devido à alta prevalência residual de 1,06% em países endêmicos, onde o ressurgimento da doença tem sido relatado sob a forma de surtos por transmissão oral e também pela globalização da doença, consequência da migração de indivíduos oriundos de países endêmicos para países desenvolvidos, resultando em uma prevalência de 4,2% na população imigrante na Europa.¹⁻⁴

Os casos agudos de DC sintomática têm sido associados à parasitemia patente e à miocardite aguda grave, com alta morbidade e mortalidade.⁵ A lesão cardíaca grave seria um reflexo da ação patogênica do parasita; assim, seria obrigatório realizar intervenções terapêuticas tripanossomicidas agressivas para diminuir a carga parasitária, a morbidade e a mortalidade.

Atualmente, os protocolos de tratamento aceitos para a DC aguda são o nifurtimox e o benznidazole. O uso deste protocolo, mesmo quando os melhores resultados são obtidos, não é totalmente satisfatório. Na Venezuela, estudos com nifurtimox e/ou benznidazole têm sido decepcionantes, com mais de 70% dos casos com presença comprovada de parasitas teciduais, genoma parasitário ou seus antígenos (sorologia positiva) após o uso destes fármacos.^{5,6}

Assim, pode ser útil criar esquemas terapêuticos nos quais estes fármacos sejam combinados com outros, o que poderia aumentar a eficácia do nifurtimox e do benznidazole, e diminuir seus efeitos secundários. Idealmente, estas drogas precisam ter um efeito tripanocida, promover a funcionalidade cardíaca e

neutralizar os fenômenos fisiopatológicos resultantes da infecção, inflamação e geração de radicais livres.

De acordo com a teoria microvascular, o dipiridamol pode ser considerado medicamento adjuvante, porque induz a vasodilatação coronariana por meio do Óxido Nítrico (NO), a melhorando o fluxo sanguíneo. Ele tem efeito antiplaquetário, que impede a formação de trombos; aumenta os níveis extracelulares de adenosina, melhorando a função cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca; promove um efeito anti-inflamatório, suprimindo a formação de radicais livres, e melhora o estado redox das células submetidas a fenômenos inflamatórios.^{7,8}

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o dipiridamol tem um efeito tripanocida *in vitro* com uma CI_{50} de 372 μ M e que potencializa o efeito de doses subterapêuticas de nifurtimox, proporcionando efeitos curativos em camundongos NMRI com DC⁹ aguda. Por este motivo, neste estudo, avaliamos se um resgate terapêutico em indivíduos com Miocardite Chagásica Aguda (MCA) e Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC) grave pode ser realizado com nifurtimox e dipiridamol, permitindo redução da mortalidade e sequelas cardíacas funcionais.

Métodos

Amostra

A amostra incluiu 48 camundongos NMRI machos, adultos, com peso entre 30 e 50 g, obtidos nas instalações do biotério da Universidade Centro-Oeste Lisandro Alvarado (Barquisimeto, Venezuela), que foram

infectados intraperitonealmente com tripomastigotas sanguíneas suspensas em soro fisiológico 0,9%, com dosagem de 100 tripomastigotas por grama de peso corporal. A cepa da linhagem de TcI utilizada está registrada no banco da Organização Mundial da Saúde (OMS) sob a denominação MHOM/VEcepa792/2-92-YBM.⁹ Os parasitas analisados foram obtidos a partir do sangue de camundongos infectados na fase aguda da DC e mantidos em ciclos de vetor/camundongo. Os vetores foram ninfas de *Rhodnius prolixus* de terceiro estágio. Na segunda semana após a inoculação, foi confirmada a parasitemia, e apenas os camundongos positivos foram incluídos no estudo.

Dos 48 camundongos infectados, seis (12,50%) morreram durante as primeiras 6 semanas de infecção, e os 42 camundongos restantes com MCA e sinais clínicos de ICC foram eletrocardiograficamente estudados sob anestesia, depois divididos em três grupos e tratados durante 6 semanas. O Grupo Controle Chagas (CC n = 11) foi tratado com veículo, o Grupo Nif-Dip (n = 14) foi tratado com nifurtimox (40 mg/kg) associado ao dipiridamol (30 mg/kg), e o Grupo Nif-Dip-ICC (n = 17) foi tratado com nifurtimox (40 mg/kg) e dipiridamol (30 mg/kg) associados a fármacos para o tratamento da ICC (captopril 5 mg/kg, digoxina 8 µg/kg e furosemida 2 mg/kg, os dois últimos administrados apenas por 1 semana).

Os camundongos foram distribuídos em gaiolas de aço inoxidável medindo 29 x 30 x 14 cm, com cinco a oito animais por gaiola, com acesso livre à água e aos alimentos (Perrarina®, Protinal, Venezuela), com ciclos de 12 horas de luz/escuridão e média de 27°C de temperatura.

Após 6 semanas de tratamento, os animais foram avaliados clinicamente (peso, piloereção e sinais clínicos de ICC, como dispneia e/ou cianose em repouso ou sob anestesia), bem como submetidos a avaliações parasitológicas (parasitemia) e eletrocardiográficas. Eles foram posteriormente sacrificados por exsanguinação via punção cardíaca sob anestesia, seguido de autópsia, quando os órgãos foram removidos e pesados, e as amostras para histopatologia foram coletadas.

Bioética

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram baseados nos princípios estabelecidos no manual de bioética e biossegurança do Fundo

Nacional de Ciência e Tecnologia do Ministério do Poder Popular para Ciência e Tecnologia da Venezuela.

Eletrocardiografia

Foram realizados estudos eletrocardiográficos sob anestesia com pentobarbital sódico 25 mg/kg e cetamina 25 mg/kg de peso corporal via intraperitoneal, em configuração bipolar utilizando três eletrodos tipo agulha (um positivo, um negativo e um neutro ou de referência), posicionados no tecido subcutâneo. Trabalhamos com um Eletrocardiograma (ECG) de quatro derivações nas seguintes configurações: em DI, um eletrodo positivo foi colocado junto do eletrodo de referência na articulação do ombro esquerdo, enquanto o eletrodo negativo foi posicionado na articulação do ombro direito; em DII, um eletrodo positivo foi posicionado no processo xifoide, enquanto um negativo foi colocado na articulação do ombro direito e o de referência na articulação do ombro esquerdo; em DIII, tanto o eletrodo negativo quanto o de referência foram colocados na articulação do ombro esquerdo, e um eletrodo positivo foi mantido no processo xifoide; e na derivação AVF, um eletrodo negativo foi posicionado na linha mediana cervical acima da fossa supraesternal, enquanto o eletrodo positivo foi colocado sobre o processo xifoide, e o de referência permaneceu na articulação do ombro esquerdo.

Os eletrodos foram ligados a um amplificador BioAmp (AD Instruments, Nova Zelândia), e os sinais analógicos foram convertidos para sinais digitais por um sistema de interfase Powerlab/8sp (AD Instruments, Nova Zelândia), exibidos, gravados e analisados em um computador pessoal utilizando o *software* Chart v4.2.1 (AD Instruments Nova Zelândia). A captura de sinal foi realizada a uma frequência de 1.000 eventos/segundo e filtrada a 60 Hz.

Histopatologia

As amostras do ventrículo direito e do ápice cardíaco foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em PBS, pH 7,4 durante 2 horas. Amostras fixadas de tecido foram imersas sucessivamente em soluções de sacarose a 10, 15, 20, 25 e 30%, até que as amostras migrassem para o fundo do recipiente em cada solução; então as amostras foram armazenadas a -70°C até serem utilizadas. As amostras foram descongeladas e imersas em composto

OCT (Temperatura Ótima de Corte, sigla do inglês *Optimal Cutting Temperature*) e novamente congeladas em nitrogênio líquido, cortadas em um criostato, obtendo amostras de 5 μm , colocadas em lâminas de microscópio e coradas com técnicas de hematoxilina e eosina ou azul de toluidina. Adicionalmente, outro grupo de amostras foi fixado com formalina a 10% em PBS pH 7,4, imerso em parafina, cortado com micrótomo e corado com hematoxilina e eosina.

Análise de dados

Os dados foram expressos como valores absolutos, porcentagens ou média \pm Erro Padrão da Média (EPM). O teste *t* de Student pareado ou não pareado foi utilizado para analisar a significância das diferenças observadas antes e após o tratamento em um grupo, ou para comparar dois grupos não relacionados, respectivamente; enquanto a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, foi utilizada para analisar o significado das diferenças observadas entre os três grupos experimentais. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. O *software* GraphPad Prism 5.0 foi utilizado na análise estatística.

Resultados

Todos os camundongos foram infectados com uma parasitemia média de $4,19 \pm 0,74 \times 10^6$ parasitas/mL na sexta semana pós-infecção antes do início do protocolo de tratamento. Em todos os grupos tratados experimentalmente, parasitas sanguíneos não foram detectados na sétima semana, enquanto no Grupo Controle Chagas, a parasitemia desapareceu entre a oitava e a nona semanas. Todos os grupos apresentavam parasitemia 0 ao sacrifício.

Durante o período pós-anestésico (0 a 48 horas), o Grupo Controle Chagas apresentou taxa de mortalidade de 45,45% ($n = 5$), o Grupo Nif-Dip de 21,42% ($n = 3$) e o Grupo Nif-Dip-ICC de 41,17% ($n = 7$), respectivamente. Durante as 6 semanas seguintes, um animal do Grupo CC, um animal do Grupo Nif-Dip e dois do Grupo Nif-Dip-ICC morreram, resultando em uma mortalidade total de 54,54% ($n = 6$), 28,57% ($n = 4$) e 52,9% ($n = 9$), respectivamente.

Na figura 1, são apresentados os parâmetros clínicos observados no final do protocolo experimental. Os grupos tratados aumentaram significativamente o peso corporal; enquanto o peso do baço e os sinais clínicos de ICC diminuíram significativamente nestes grupos, em comparação com o Grupo Controle Chagas.

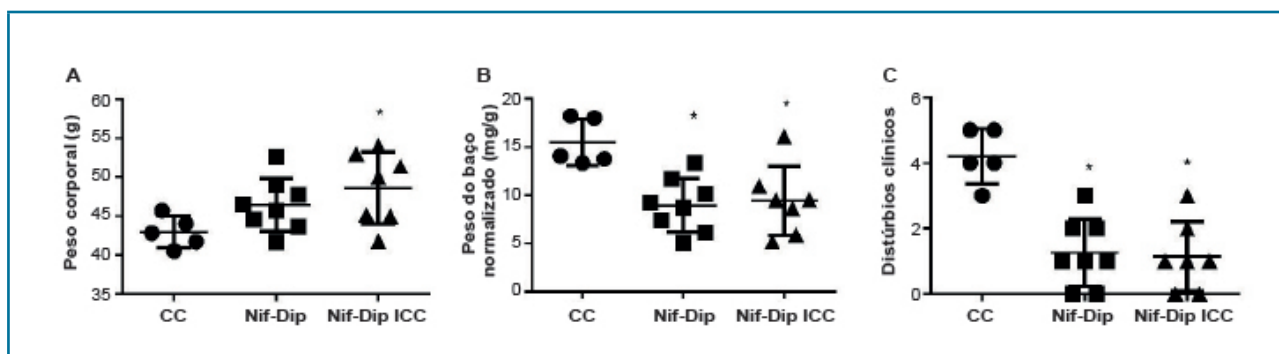


Figura 1 – Parâmetros clínicos quantificados em camundongos com doença de Chagas aguda, tratados ou não com nifurtimox e dipiridamol. Em (A), é mostrado o peso corporal: camundongos submetidos ao protocolo de tratamento aumentaram de peso. Em (B), é mostrado o peso do baço normalizado com base no peso corporal; a esplenomegalia diminuiu em camundongos submetidos ao protocolo de tratamento. Em (C), foi realizada uma análise clínica sumativa baseada na presença (1) ou ausência (0) dos seguintes sinais clínicos em cada camundongo: dispnéia e cianose em repouso ou sob anestesia e piloereção; os camundongos submetidos ao protocolo de tratamento tinham sinais reduzidos de insuficiência cardíaca congestiva ou infecção. * $p < 0,05$ quando comparados os grupos tratados em relação ao grupo Controle Chagas não tratado, utilizando Análise de Variância seguida do pós-teste de Tukey.

A tabelas 1 e 2 mostram os parâmetros eletrocardiográficos quantitativos e qualitativos, respectivamente, antes e depois do início do protocolo terapêutico. Os sinais eletrocardiográficos alterados

encontrados antes do tratamento incluíram diminuição da frequência cardíaca; distúrbios da condução cardíaca, caracterizados como um aumento nos valores dos intervalos QRS e QT; alterações na repolarização ventricular

caracterizadas por distúrbios na amplitude; direção do eixo e decaimento da onda T (Tabela 1 e Figuras 2 e 3). Estes sinais foram revertidos pelo protocolo terapêutico; no entanto, as amplitudes das ondas R e S diminuiram (Tabela 1 e Figuras 2 e 3). Em relação aos distúrbios dos

dados qualitativos, o protocolo terapêutico baseado em nifurtimox-dipiridamol tendeu a diminuir a dissociação atrioventricular e os distúrbios pós-despolarização; no entanto, os distúrbios do ritmo (extrassístoles nodais e ventriculares) tenderam a aumentar (Tabela 2).

Tabela 1 – Parâmetros quantitativos eletrocardiográficos em camundongos com cardiomiopatia chagásica aguda e insuficiência cardíaca, antes e após o início do protocolo terapêutico

Parâmetro	Grupos experimentais			
	Nif-Dip		Nif-Dip-ICC	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pré-tratamento	Pós-tratamento
FC (bpm)	373,40 ± 22,08	431,40 ± 24,35	382,20 ± 39,34	416,10 ± 22,04
PR	57,37 ± 2,87	52,59 ± 3,72	54,70 ± 3,73	58,07 ± 3,94
QRS (ms)	13,83 ± 0,21	11,50 ± 0,74*	14,71 ± 0,69	11,13 ± 0,45*
QT (ms)	101,50 ± 11,54	68,31 ± 12,81*	105,50 ± 11,33	90,01 ± 6,20
QTc (ms)	244,90 ± 22,16	175,00 ± 29,03*	252,30 ± 21,94	230,80 ± 11,50
P (μV)	56,77 ± 10,65	65,57 ± 8,02	34,07 ± 12,74	65,96 ± 4,18*
R (μV)	680,30 ± 82,25	577,40 ± 83,88	755,10 ± 83,82	631,80 ± 82,50
S (μV)	-363,90 ± 62,56	-204,20 ± 40,44*	-252,10 ± 45,81	-40,10 ± 40,48*
T (μV)	218,20 ± 46,28	270,00 ± 41,68	225,60 ± 49,06	255,50 ± 38,40
τ1	5,19 ± 0,71	7,82 ± 1,07	6,30 ± 0,78	8,41 ± 2,63
τ1%	40,63 ± 8,19	79,25 ± 4,21*	47,72 ± 6,91	74,04 ± 6,25*
τ2	67,16 ± 11,69	104,50 ± 23,29	69,88 ± 6,57	67,94 ± 5,07
τ2%	59,70 ± 9,28	23,32 ± 3,76	30,12 ± 6,57	32,06 ± 5,07
D ₅	73,78 ± 2,33	62,24 ± 4,39*	71,47 ± 3,51	59,78 ± 4,55*
D ₁₀	48,69 ± 4,98	30,98 ± 5,46	49,41 ± 4,78	38,56 ± 4,49
D ₂₀	39,06 ± 3,80	20,78 ± 3,01*	38,21 ± 3,97	24,22 ± 3,72*
D ₄₀	37,27 ± 2,85	17,26 ± 3,16*	33,84 ± 3,38	23,43 ± 3,50*
D ₆₀	20,33 ± 3,09	11,64 ± 2,44*	22,69 ± 2,88	14,46 ± 3,04*
Eixo QRS	43,80 ± 21,17	46,90 ± 15,85	70,28 ± 12,26	78,86 ± 6,47
Eixo P	53,17 ± 18,53	53,38 ± 9,87	15,40 ± 18,69	58,32 ± 12,45
Eixo T	68,00 ± 16,83	79,78 ± 5,31*	59,49 ± 17,08	74,61 ± 6,89

* $p < 0,05$ comparando os valores antes e depois do tratamento por meio do teste t de Student pareado. O decaimento da onda T foi analisado por uma equação de decaimento exponencial para dois componentes, obtendo-se valores e constantes de tempo τ_1 e τ_2 com suas respectivas contribuições percentuais ao decaimento; adicionalmente, a porcentagem da amplitude da onda T decaiu a 5, 10, 20, 40 e 60 ms após a quantificação do pico T. Nif-Dip: grupo tratado com nifurtimox (40 mg/kg) associado ao dipiridamol (30 mg/kg); Nif-Dip-ICC: grupo tratado com nifurtimox (40 mg/kg) e dipiridamol (30 mg/kg) associados a fármacos para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (captopril 5 mg/kg, digoxina 8 μg/kg e furosemida 2 mg/kg, os dois últimos administrados apenas por 1 semana); FC: frequência cardíaca; PR: intervalo de tempo entre a onda P e da onda R.

Tabela 2 – Parâmetros qualitativos eletrocardiográficos registrados em camundongos com cardiomiopatia chagásica aguda e insuficiência cardíaca antes e após o início do protocolo terapêutico

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Nif-Dip		Nif-Dip-ICC	
	Antes n (%)	Depois n (%)	Antes n (%)	Depois n (%)
Dissociação atrioventricular	5 (50)	2 (20)	0 (0)	2 (25)
Extrassístoles ventriculares	0 (0)	3 (30)	1 (12,5)	1 (12,5)
Extrassístoles nodais	0 (0)	5 (50)	0 (0)	1 (12,5)
Fibrilação atrial	4 (40)	3 (30)	0 (0)	2 (25)

Nif-Dip: grupo tratado com nifurtimox (40 mg/kg) associado ao dipiridamol (30 mg/kg); Nif-Dip-ICC: grupo tratado com nifurtimox (40 mg/kg) e dipiridamol (30 mg/kg) associados a fármacos para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (captopril 5 mg/kg, digoxina 8 µg/kg e furosemida 2 mg/kg, os dois últimos administrados apenas por 1 semana).

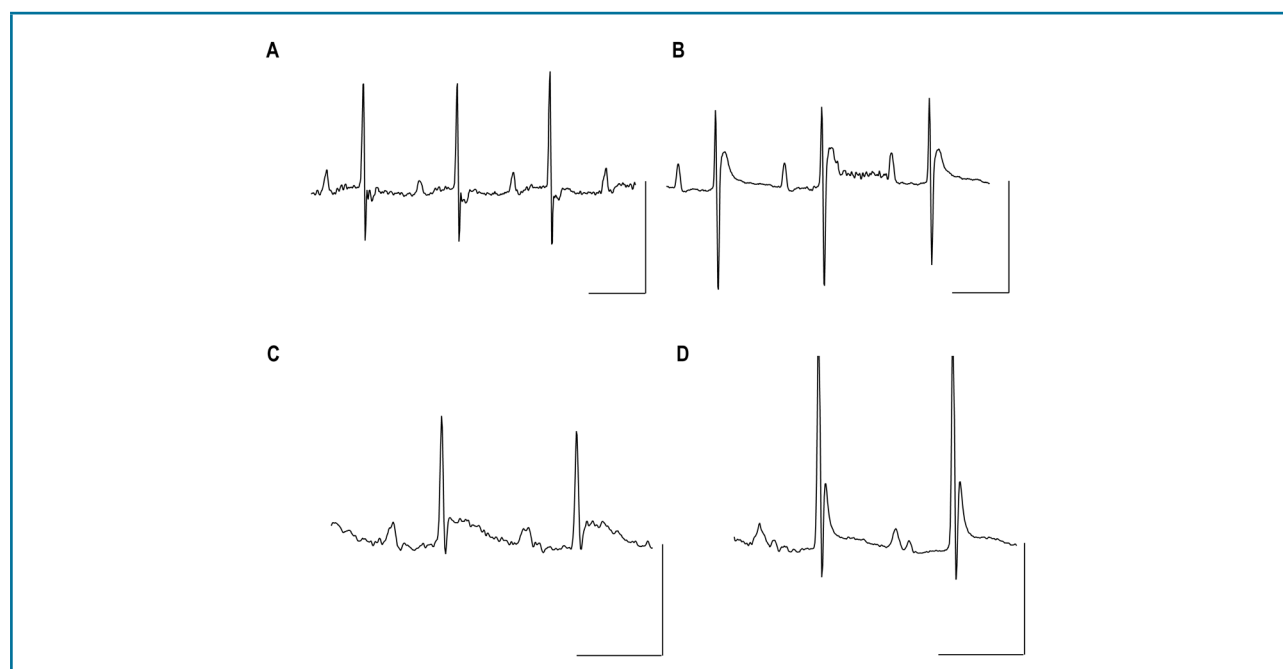


Figura 2 – Alterações eletrocardiográficas observadas antes e após a aplicação do protocolo terapêutico com nifurtimox e dipiridamol associado a medicamentos para insuficiência cardíaca. São apresentados os registros eletrocardiográficos na derivação DIII de dois animais, antes do início do tratamento (à esquerda) ou após o tratamento (à direita). No registro (A), mostramos distúrbios isquêmicos, caracterizados pela inversão da onda T e ponto J abaixo da linha isométrica, os quais foram revertidos pelo protocolo terapêutico com restituição da morfologia e amplitude da onda T (B); adicionalmente, o tratamento induziu uma recuperação da amplitude da onda P. Em (C), pode-se observar uma diminuição das amplitudes do complexo QRS e da onda T, notando-se que a onda T tem um platô prolongado; após o tratamento (D) pode ser observada a recuperação da amplitude do complexo QRS e da onda T, que praticamente recuperou a morfologia normal. As barras verticais indicam 400 µV; as horizontais indicam 100 ms.

A análise histopatológica (Tabela 3) em amostras do ventrículo direito dos camundongos do Grupo Controle Chagas mostrou espessura do epicárdio aumentada, miocitólise e infiltrado inflamatório mononuclear

difuso; enquanto no Grupo Nif-Dip, foram observados apenas infiltrado inflamatório focal reduzido e a espessura do epicárdio diminuída; o grau de fibrose foi semelhante em ambos os grupos. Nas amostras do

ápice cardíaco, a fibrose, a miocitólise, a espessura do epicárdio e o infiltrado inflamatório foram menores nos camundongos tratados com nifurtimox-dipiridamol quando comparados ao Grupo Controle Chagas. Em ambas as amostras, em 60% dos camundongos não tratados, estiveram presentes ninhos parasitários intactos e/ou quebrados, enquanto em amostras obtidas de camundongos tratados com nifurtimox-

dipiridamol não foram observados amastigotas e/ou ninhos parasitários (Figura 4). Além disto, em 60% (n = 3) do Grupo Controle Chagas e em 50% (n = 2) dos camundongos do Grupo Nif-Dip, foram observados mastócitos em amostras do ápice cardíaco; no entanto, o número de mastócitos por campo foi maior no Grupo Controle Chagas ($10,60 \pm 7,53$) do que no Grupo Nif-Dip ($1,00 \pm 0,82$) (Figura 5 e Tabela 3).

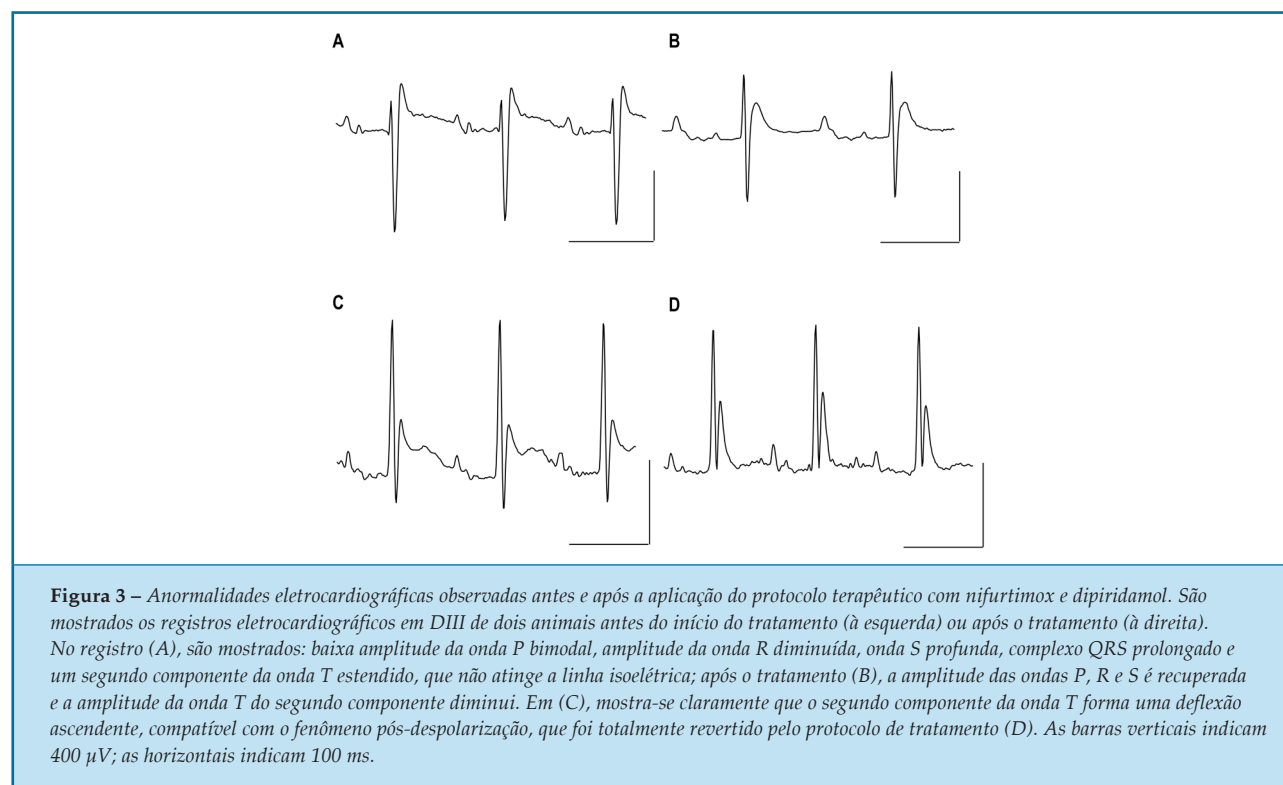


Figura 3 – Anormalidades eletrocardiográficas observadas antes e após a aplicação do protocolo terapêutico com nifurtimox e dipiridamol. São mostrados os registros eletrocardiográficos em DIII de dois animais antes do início do tratamento (à esquerda) ou após o tratamento (à direita). No registro (A), são mostrados: baixa amplitude da onda P bimodal, amplitude da onda R diminuída, onda S profunda, complexo QRS prolongado e um segundo componente da onda T estendido, que não atinge a linha isoeletrica; após o tratamento (B), a amplitude das ondas P, R e S é recuperada e a amplitude da onda T do segundo componente diminui. Em (C), mostra-se claramente que o segundo componente da onda T forma uma deflexão ascendente, compatível com o fenômeno pós-despolarização, que foi totalmente revertido pelo protocolo de tratamento (D). As barras verticais indicam 400 µV; as horizontais indicam 100 ms.

Tabela 3 – Análise histopatológica em amostras do ventrículo direito e do ápice cardíaco de camundongos com cardiomiopatia chagásica aguda e insuficiência cardíaca tratados ou não com nifurtimox e dipiridamol

Parâmetro	Grupos experimentais			
	Controle Chagas		Nif-Dip	
	VD	Ápice	VD	Ápice
Ninhos de parasitas	6,00 ± 2,47	3,00 ± 1,91	0*	0*
Fibrose	1,40 ± 0,50	1,75 ± 0,47	1,40 ± 0,50	0,25 ± 0,25*
Miocitólise	2,00 ± 0,44	1,50 ± 0,28	1,40 ± 0,24	0,25 ± 0,25*
Espessura do epicárdio	1,80 ± 0,20	1,75 ± 0,25	1,20 ± 0,20	0,75 ± 0,25*
Infiltrado inflamatório	2,80 ± 0,20	2,00 ± 0,57	1,80 ± 0,37*	0,50 ± 0,28
Mastócitos	--	10,60 ± 7,53	--	1 ± 0,82

* $p < 0,05$ quando comparados os valores para a mesma região cardíaca, com e sem tratamento com nifurtimox e dipiridamol, por meio do teste t de Student não emparelhado. Nif-Dip: grupo tratado com nifurtimox (40 mg/kg) associado ao dipiridamol (30 mg/kg); VD: ventrículo direito.

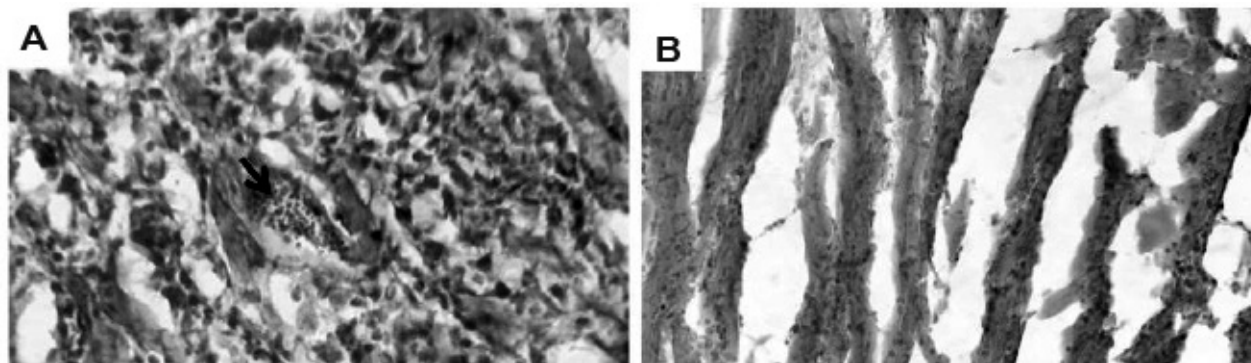


Figura 4 – Características histopatológicas do tecido cardíaco de camundongos com doença de Chagas aguda, tratados ou não com nifurtimox e dipiridamol. Trata-se de amostras de tecidos fixadas com paraformaldeído a 4%, criopreservadas com sacarose a 30%, imersas em solução especial (OCT) para temperatura ótima de corte e coradas com hematoxilina e eosina. Em (A), amostra do coração de um indivíduo do grupo Controle Chagas, na qual se observam um ninho de amastigotas (seta), infiltrado difuso mononuclear e miocitólise (aumento de 1.000X). Em (B), amostra do coração de camundongos tratados com nifurtimox e dipiridamol, podendo ser observados a integridade das fibras musculares e um infiltrado de células mononucleares muito discretas; a separação das fibras é produto da técnica de criopreservação (ampliação 400X).

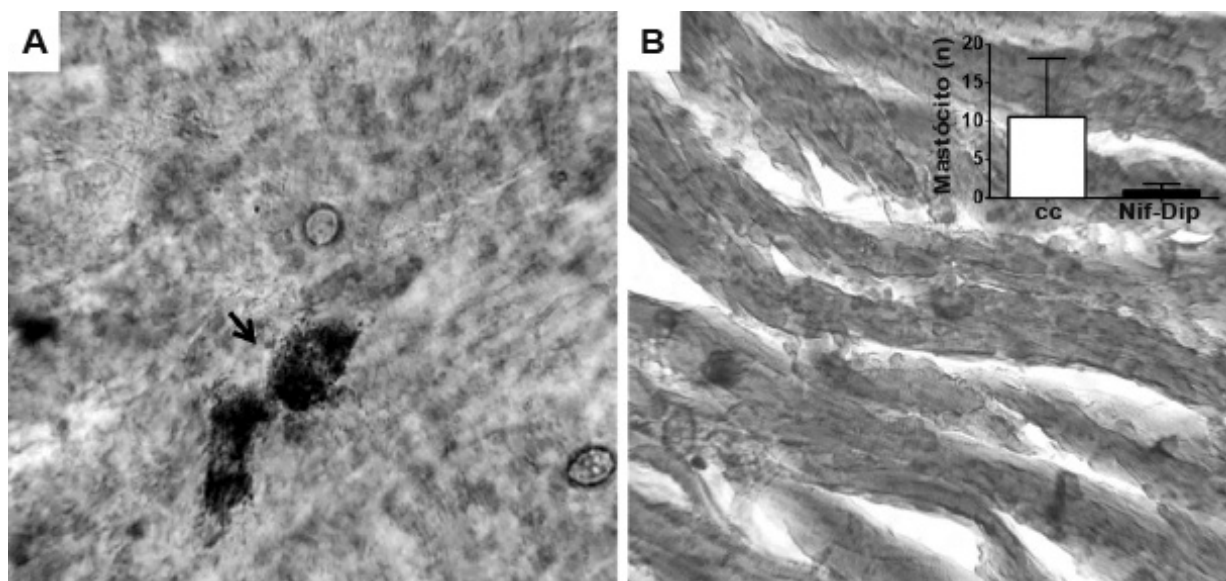


Figura 5 – Expressão de mastócitos no tecido cardíaco de camundongos com doença de Chagas aguda, tratados ou não com nifurtimox e dipiridamol. São apresentadas amostras de tecidos fixadas com paraformaldeído a 4%, criopreservadas com sacarose a 30%, imersas em solução especial (OCT) para temperatura ótima de corte e coradas com azul de toluidina. Em (A), amostra do coração de camundongo do grupo Controle Chagas, na qual podem ser vistos dois mastócitos em processo de degranulação (ver seta, ampliação de 1.000x). Em (B), amostra do coração de um camundongo tratado com nifurtimox e dipiridamol, na qual não estão presentes mastócitos (aumento de 400X). No canto superior direito mostramos um gráfico de barras com o número médio de mastócitos em dez campos e os valores do erro padrão da média obtidos em amostras cardíacas do grupo Controle Chagas (barra branca) e do grupo tratado com nifurtimox (40 mg/kg) associado ao dipiridamol (30 mg/kg) (barra preta).

Discussão

Neste estudo, demonstramos que a combinação de nifurtimox com dipiridamol foi terapeuticamente útil em camundongos com MCA e ICC, uma vez que, em comparação com os camundongos de controle não tratados, reduziu a mortalidade, diminuiu ou erradicou a infecção, e, além disto, os sinais clínicos e histopatológicos de MCA grave foram revertidos. Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado em modelos animais para avaliar o tratamento de resgate terapêutico baseado em nifurtimox-dipiridamol em camundongos com MCA grave.

O efeito tripanocida do nifurtimox foi testado no presente estudo, demonstrando ausência da parasitemia após a primeira semana de tratamento e ausência de amastigotas ou ninho de parasitas nas amostras cardíacas do ventrículo direito e nas amostras histopatológicas do ápice. Estes resultados coincidem com os relatados por Santeliz et al.,⁹ que demonstraram que a combinação de nifurtimox (40 mg/kg) e dipiridamol (30 mg/kg) erradicava os parasitas teciduais e sanguíneos em camundongos com DC aguda sem ICC. O efeito tripanocida, mostrado no presente estudo, poderia depender unicamente do efeito do nifurtimox na dose de 40 mg/kg, já que tal dose foi relatada curativa mas vários estudos em modelos murinos sobre o uso de nifurtimox no tratamento de DC têm sido controversos

Estudos sobre o efeito do nifurtimox em animais experimentais utilizaram doses elevadas da droga, obtendo resultados conflitantes. Bustamante et al.,¹⁰ porém, trabalhando com camundongos C57BL/6 (Ly5.2+), obtiveram taxa de cura de 95 a 100% com doses de 100 mg/kg em esquemas de 40 dias contínuos ou intermitentes de 13 dias; Wong-Baeza et al.,¹¹ trabalhando com camundongos albinos NIH, obtiveram ligeira diminuição da parasitemia com doses semelhantes em um protocolo terapêutico de 50 dias. Esta discordância observada entre os trabalhos citados e o nosso pode ser explicada pela linhagens de camundongos utilizadas; entretanto, a resposta ao tratamento com nifurtimox pode depender também da cepa de *T. cruzi* testada, como demonstrado no trabalho de Andrade et al.,¹² que encontrou que a cepa tipo I (parasitemia alta e precoce, tropismo de macrófagos) apresentava alta sensibilidade (56 ± 16% de cura); cepas tipo II (parasitemia alta e tardia, tropismo do músculo cardíaco) tinha sensibilidade média a alta (52 ± 11% de cura), e a tipo III (baixa parasitemia e tropismo muscular esquelético) baixa sensibilidade

(0,45 ± 0,45% de cura) aos regimes terapêuticos baseados em nifurtimox 200 mg/kg durante 4 dias, seguidos de 50 mg/kg durante 5 dias por semana, totalizando 90 dias. Adicionalmente, Faúndez et al.¹³ encontraram diminuição da parasitemia utilizando doses de 2,5 e 10 mg/kg, com 25 e 100% de sobrevivência, respectivamente.

O efeito tripanocida do dipiridamol também deve ser considerado. Ele foi relatado em epimastigotas em cultura axênica com CI_{50} de 372 μ M. Este efeito foi reproduzido parcialmente em camundongos NMRI, e este fármaco diminuiu, mas não eliminou a parasitemia.⁹ No entanto, propomos que o efeito mais benéfico do dipiridamol é funcional e está relacionado com seu mecanismo de ação.

A teoria microvascular sugere que o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica reflete um dano endotelial na microcirculação, com formação de trombos plaquetários e sanguíneos, o que acarreta isquemia difusa no tecido cardíaco, causando necrose, remodelamento cardíaco e fibrose, e levando ao desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada com ICC.¹⁴ Como o dipiridamol é um agente antiplaquetário, ele evita a formação de trombos plaquetários e, conseqüentemente, trombos sanguíneos; também devido ao aumento dos níveis de cGMP e adenosina, induz a vasodilatação coronariana mediada pela produção de NO, melhorando os fenômenos isquêmicos no miocárdio chagásico. Do mesmo modo, ao aumentar os níveis de adenosina atuando sobre os receptores A1 e A3, ele tem um efeito cardioprotetor, que permite um melhor manejo das necessidades energéticas do coração em falência e evita fenômenos apoptóticos precoces, respectivamente.¹⁵

Igualmente, foi relatado que a adenosina endógena, atuando sobre os receptores A1, gera um efeito cronotrópico e dromotrópico negativo, reduzindo a incidência de arritmias ventriculares causadas por isquemia-reperusão em corações isolados de camundongos com batimentos¹⁶ e, quando atuando sobre os receptores A2, tem um efeito antiarrítmico na isquemia miocárdica aguda, reduzindo, assim, a frequência de fibrilação ventricular.¹⁷ Desta forma, seria possível evitar arritmias letais observadas na cardiomiopatia chagásica. Também nesta linha de pensamento, foi relatado que a administração oral prolongada de dipiridamol melhora o estado físico e cardíaco de pacientes com ICC leve a moderada, resultando em melhorias ecocardiográficas da fração de ejeção, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e do nível de peptídeo natriurético tipo B.¹⁸

Recentemente, Ramakers et al.,¹⁹ relataram que o tratamento com dipiridamol aumenta os níveis de

Interleucina (IL) 10, que é considerada uma citocina anti-inflamatória capaz de induzir uma diminuição de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e IL-6. Níveis aumentados de TNF- α e IL-6 têm sido associados com estágios avançados de DC e negativamente correlacionados com a função cardíaca,^{20,21} enquanto altos níveis de IL-10 têm sido associados à recuperação da função cardíaca, melhorando a fração de ejeção e reduzindo os diâmetros diastólicos do ventrículo esquerdo, sendo, portanto, um fator cardioprotetor. Na fase indeterminada da DC foram relatados níveis elevados de IL-10, enquanto que, em pacientes que desenvolvem miocardite chagásica crônica, estes níveis estão reduzidos.²²

Evidências sugerem que, durante o curso da infecção por *T. cruzi*, o miocárdio é exposto à lesões causadas por estresse oxidativo contínuo por meio da produção de espécies reativas de oxigênio, que são liberadas continuamente como resultado de lesões mitocondriais durante a progressão da cardiomiopatia chagásica.²³ A estrutura molecular do dipiridamol permite que ele aceite elétrons, funcionando, desta forma, como um eliminador de radicais livres, com uma maior capacidade do que alfa-tocoferol e ácido ascórbico, sugerindo que o efeito benéfico do dipiridamol observado no presente estudo está relacionado com sua capacidade antioxidante.⁷

Neste trabalho, a mortalidade precoce observada em todos os grupos experimentais pode ser explicada pela deficiência funcional cardíaca, causada pela MCA, agravada pela administração de anestesia geral aos camundongos. Em camundongos no estado de vigília, tem-se geralmente uma frequência cardíaca em torno de 580 bpm, enquanto sob anestesia com pentobarbital-cetamina, como relatado no presente estudo, obtém-se um valor entre 373 e 382 bpm. A bradicardia induzida pela anestesia diminui o débito cardíaco e agravou a insuficiência cardíaca, aumentando o risco de morte, o que foi evidenciado na mortalidade do Grupo Controle Chagas. Em contraste, os camundongos tratados com nifurtimox e dipiridamol apresentaram mortalidade mais baixa, o que pode estar relacionado com os efeitos do dipiridamol descritos anteriormente. Inesperadamente, o Grupo Nif-Dip-ICC apresentou maior mortalidade do que o Grupo Nif-Dip; isto pode ser explicado considerando que a administração de fármacos como a digoxina, em um hospedeiro vulnerável, aumenta o risco de arritmias cardíacas e morte súbita, como demonstrado em seres humanos por Madelaire et al.,²⁴ que relataram que o uso de digoxina estava

associado ao aumento do risco de morte em pacientes com insuficiência cardíaca crônica.

Resultados experimentais obtidos no presente estudo confirmaram que todos os camundongos NMRI com DC aguda apresentavam anormalidades de repolarização, que foram melhoradas pelo esquema terapêutico. Alvarado et al.,²⁵ verificaram que os distúrbios de repolarização são sinais característicos de MCA em humanos e camundongos NMRI, o que lhes confere um valor diagnóstico para a DC aguda, fato que foi claramente demonstrado no presente estudo. Distúrbios de repolarização ventricular têm sido associados à isquemia e à sobrecarga ventricular.²⁶

Como nifurtimox tem efeito tripanocida potencializado pelo dipiridamol, isto eliminaria rapidamente a infecção, o que reverteria os fenômenos inflamatórios relacionados ao parasitismo, melhorando a funcionalidade cardíaca. Entretanto, o efeito adjuvante do dipiridamol deve ser crucial, pois reverte fenômenos isquêmicos funcionais, causando vasodilatação coronariana e melhorando o balanço energético dos cardiomiócitos, além de permitir o restabelecimento do equilíbrio iônico transmembrana e normalizar os fenômenos elétricos repolarizantes.

Coincidente com os transtornos de repolarização, no presente estudo, observou-se um aumento na amplitude da onda S, que foi revertido com o esquema terapêutico. Poucos estudos definiram o substrato eletrogênico da onda S, mas, em seres humanos, a onda S reflete uma despolarização tardia da superfície diafragmática ou depolarização das células de Purkinje.²⁷ No entanto, em camundongos, dada a alta densidade das correntes de repolarização precoce, é sugerido que a onda S também caracterize um componente de repolarização precoce,²⁸ e, assim, à medida que os distúrbios de repolarização melhoram, a amplitude da onda S diminui, como foi aqui demonstrado.

Por outro lado, a condução intraventricular retardada, como demonstrado nos valores dos intervalos QRS e QT, melhorou significativamente após o uso do esquema terapêutico. Porém, os valores de condução atrioventricular, caracterizados pelo comprimento do intervalo PR, não apresentaram melhora. A melhora da condução intraventricular pode refletir inflamação e restauração do fluxo sanguíneo em um substrato morfofuncional reversível, enquanto que a irreversibilidade dos distúrbios da condução atrioventricular, incluindo arritmias como a fibrilação atrial, parece ser um reflexo de um dano irreversível de

intensa inflamação, remodelamento e fibrose atrial, que é geralmente observado na DC.²⁹

Do mesmo modo, a amplitude da onda R permaneceu inalterada, o que pode ser por conta de danos irreversíveis à estrutura miocárdica ou ser reflexo de um efeito farmacológico líquido, resultado do efeito inotrópico negativo induzido pelo dipiridamol, mediado pela adenosina, agindo sobre os receptores A1.⁹

Nas amostras histológicas do tecido cardíaco, a densidade de mastócitos foi maior no Grupo Controle Chagas quando comparado ao Grupo Nif-Dip. Os mastócitos são células inflamatórias que aumentam e desencadeiam uma série de respostas aos estímulos inflamatórios e infecciosos envolvidos na miocardite e patogênese da cardiomiopatia dilatada; foi relatada uma correlação entre o grau de fibrose e a densidade de mastócitos nos corações de pacientes com cardiomiopatia dilatada e ICC.³⁰ A este respeito, Rork et al.,³¹ relataram que a degranulação de mastócitos contribui para a lesão miocárdica observada em protocolos de isquemia-reperfusão, e que a ativação de receptores de adenosina (A2A) reduziu a área de infarto.

Conclusão

Este estudo mostrou que o tratamento com nifurtimox (40 mg/kg) e dipiridamol (30 mg/kg) tem efeito benéfico sobre os camundongos albinos NMRI com doença de Chagas aguda e insuficiência cardíaca congestiva. O efeito do nifurtimox está relacionado à sua atividade tripanocida, enquanto o do dipiridamol pode estar relacionado à sua capacidade de potencializar o efeito tripanocida do nifurtimox e à sua capacidade de reverter os fenômenos fisiopatológicos relacionados à miocardite chagásica aguda, como isquemia microvascular, geração de radicais livres, imunomodulação de inflamação e sobrecarga cardíaca. A segurança, experiência baseada no uso e ampla janela terapêutica do dipiridamol

constituem valiosas vantagens para sua inclusão em futuros protocolos terapêuticos de doença de Chagas em seres humanos.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Cabarcas RB. Obtenção de dados: Aparicio DY, González-Hernández M, Hernández-Forero G, Guédez-Ortiz M, Santeliz S, Goncalves L, Cabarcas RB. Análise e interpretação dos dados: Aparicio DY, González-Hernández M, Santeliz S, Goncalves L, Cabarcas RB. Análise estatística: Obtenção de financiamento: Cabarcas RB. Redação do manuscrito: Aparicio DY, González-Hernández M, Santeliz S, Cabarcas RB. Obtenção de financiamento: Cabarcas RB. Redação do manuscrito: Aparicio DY, González-Hernández M, Hernández-Forero G, Guédez-Ortiz M, Santeliz S, Goncalves L, Cabarcas RB. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Aparicio DY, González-Hernández M, Hernández-Forero G, Guédez-Ortiz M, Santeliz S, Goncalves L, Cabarcas RB. Supervisão: Santeliz S, Goncalves L, Cabarcas RB.

Potencial Conflito de Interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por Fondo Nacional para la Ciencia y Tecnología (FONACIT), número: 2007001425, Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y Tecnología, Venezuela.

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

- World Health Organization. (WHO). Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90(6):33-43.
- Requena A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore D, et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(2):1-15.
- Forsyth C, Hernandez S, Olmedo W, Abuhamidah A, raina M, Sanchez D, et al. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 2016;63(8):1056-62.
- Toso A, Vial F, Galanti N. Oral transmission of Chagas' disease. *Rev Méd Chile.* 2011;139(2):258-66.
- Noya B, Díaz Z, Colmenares C, Ruiz R, Mauriello L, Muñoz A, Noya O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):377-86.
- Ingléssis I, Carrasco H, Añez N, Fuenmayor C, Parada H, Pacheco J, et al. Clinical, parasitological and histopathologic follow-up studies of acute Chagas patients treated with benznidazole. *Arch Inst Cardiol Mex.* 1998;68(5):405-10.
- Kim H, Liao J. Translational therapeutics of dipyridamole. *Arterioscler Thromb Vascular Biol.* 2008;28(3):e39-e42.
- Schaper W. Dipyridamole, an underestimated vascular protective drug. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005;19(5):357-63.
- Santeliz S, Caicedo P, Giraldo E, Alvarez C, Yustiz MD, Rodríguez-Bonfante C, et al. Dipyridamole potentiated trypanocidal effect of nifurtimox and improved cardiac function in NMRI mice with acute chagasic myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016 [In Press].
- Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis.* 2014;209(1):150-62.
- Wong-Baeza C, Nogueira-Torres B, Serna M, Meza-Toledo S, Baeza I, Wong C. Trypanocidal effect of the benzyl ester of N-propyl oxamate: a bi-potential prodrug for the treatment of experimental Chagas disease. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2015;16:10.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes A. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ.* 1985;63(4):721-6.
- Faúndez M, López-Muñoz R, Torres G, Morello A, Ferreira J, Kemmerling U, et al. Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1837-9.
- Rossi M, Tanowitz H, Malvestio L, Celes M, Campos E, Blefari V, et al. Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8):e674.
- Hussain A, Gharanei A, Nagra A, Maddock H. Caspase inhibition via A3 adenosine receptors: a new cardioprotective mechanism against myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2014;28(1):19-32.
- Lee Y, Chern J, Yen M. Antiarrhythmic effects of BN-063, a newly synthesized adenosine A1 agonist, on myocardial ischaemia in rats. *Br J Pharmacol.* 1994;112(4):1031-6.
- Schrieck J, Richardt G. Endogenous adenosine reduces the occurrence of ischemia-induced ventricular fibrillation in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(1):123-34.
- Sanada S, Asanuma H, Koretsune Y, Watanabe K, Nanto S, Awata N, et al. Long-term oral administration of dipyridamole improves both cardiac and physical status in patients with mild to moderate chronic heart failure: a prospective open-randomized study. *Hypertens Res.* 2007;30(10):913-9.
- Ramakers B, Riksen N, Stal T, Heemskerk S, van den Broek P, Peters W, et al. Dipyridamole augments the antiinflammatory response during human endotoxemia. *Critical Care.* 2011;15(6):R289.
- López L, Arai K, Giménez E, Jiménez M, Pascuzo C, Rodríguez-Bonfante C. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. *Rev Española Cardiol.* 2006;59(1):50-6.
- D'Angelo Mendoza E, Rodríguez Bonfante C, Camacho I, Martínez J, Perdomo T, Cabrera A, et al. [Patients suffering dilated chagasic cardiopathy or non chagasic cardiopathy show an increased levels of tumor necrosis factor alpha]. *Invest Clin.* 2005;46(3):229-40.
- Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damásio MP, Chaves AT, Ferreira KS, et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. *PLoS One.* 2014;9(3):e87082.
- Vyatkina G, Bhatia V, Gerstner A, Papaconstantinou J, Garg N. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1689(2):162-73.
- Madelaire C, Schou M, Nelveg-Kristensen K, Schmiegelow M, Torp-Pedersen C, Gustafsson F, et al. Use of digoxin and risk of death or readmission for heart failure and sinus rhythm: a nationwide propensity score matched study. *Int J Cardiol.* 2016;221:944-50.
- Alvarado-Tapias E, Miranda-Pacheco M, Rodríguez-Bonfante C, Velásquez G, Loyo J, Gil-Oviedo M, et al. Electrocardiography repolarization abnormalities are characteristic signs of acute chagasic cardiomyopathy. *Invest Clin.* 2012;53(4):378-94.
- De Micheli A, Medrano G. On the electrophysiological concept and ECG manifestations of ischemia, injury and necrosis. *Arch Cardiol Mex.* 2009;79(1):2-4.
- Ashley E, Niebauer J. *Cardiology explained.* London: Remedica; 2004. Chap. 4. [Cited in 2016 Feb 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2204/>
- Boukens B, Rivaud M, Rentschler S, Coronel R. Misinterpretation of the mouse ECG: "musing the waves of *Mus musculus*". *J Physiol.* 2014;592(21):4613-26.
- Novaes R, Penitente A, Gonçalves R, Talvani A, Peluzio M, Neves C, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(4):270-9.
- Battle M, Pérez-Villa F, Lázaro A, Garcia-Pras E, Ramirez J, Ortiz J, et al. Correlation between mast cell density and myocardial fibrosis in congestive heart failure patients. *Transplant Proc.* 2007;39(7):2347-9.
- Rork T, Wallace K, Kennedy D, Marshall M, Lankford A, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces infarct size in the isolated, perfused mouse heart by inhibiting resident cardiac mast cell degranulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(5):H1825-33.