



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Joana Estela Rezende Vilela

**Relação da angiogênese e da densidade de mastócitos com
a fibrose miocárdica em idosos com cardiopatia chagásica
crônica**

**Goiânia
2015**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Joana Estela Rezende Vilela		
E-mail:	joanaerv@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:		UF:	
		CNPJ:	
Título:	Relação da angiogênese e da densidade de mastócitos com a fibrose miocárdica em idosos com cardiopatia chagásica crônica.		
Palavras-chave:	Cardiopatia chagásica, envelhecimento, fibrose, mastócitos e vasos sanguíneos.		
Título em outra língua:	Relation of angiogenesis and mast cell density with myocardial fibrosis in elderly patients with chronic Chagas' disease.		
Palavras-chave em outra língua:	Chagasic cardiopathy, aging, fibrosis, mast cells and blood vessels.		
Área de concentração:	Patologia		
Data defesa: (02/07/2015)			
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador (a):	Prof. Dr ^a Flávia Aparecida de Oliveira		
E-mail:	faoliveiraufg@yahoo.com.br		
Co-orientador (a):*	Prof. Dr ^a Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo		
E-mail:	elizaduarteverissimi@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

JOANA ESTELA REZENDE VILELA

**Relação da angiogênese e da densidade de mastócitos com
a fibrose miocárdica em idosos com cardiopatia chagásica
crônica**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Tropical e
Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás como requisito
parcial para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Tropical e
Saúde Pública.

Orientadora: Profª Drª Flávia Aparecida de Oliveira
Co-orientadora: Profª Drª Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Vilela, Joana Estela Rezende

Relação da angiogênese e da densidade de mastócitos com a fibrose
miocárdica em idosos com cardiopatia chagásica crônica [manuscrito]
/ Joana Estela Rezende Vilela. - 2016.

IX, 49 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Flávia Aparecida de Oliveira; co-orientadora
Dra. Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Cardiopatia chagásica. 2. envelhecimento. 3. fibrose. 4.
mastócitos. 5. vasos sanguíneos. I. Oliveira, Flávia Aparecida de,
orient. II. Veríssimo, Eliza Carla Barroso Duarte, co-orient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Joana Estela Rezende Vilela

Orientadora: Prof.^a Dr^a Flávia Aparecida de Oliveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr^a Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo

Membros:

1. Flávia Aparecida de Oliveira

2. Clever Gomes Cardoso

3. Juliana Reis Machado e Silva

Data: 02-07-2015

DEDICATÓRIA

A meus amores Divino, Vitor e Jordana razão do meu viver. Vocês foram a motivação para mais esta conquista. Valeu a pena toda distância, todas às renúncias... Esta vitória é nossa!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, mostrar o caminho nas horas insertas e superar as dificuldades;

A minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo;

A minha avó Conceição e aos meus pais... pela minha existência, valores e princípios de vida.

Em especial minha orientadora Dr^a Flávia Aparecida de Oliveira, por me mostrar o caminho da ciência e acreditar em mim sempre me motivando em cada etapa contribuindo com o meu crescimento profissional;

A minha amiga e colegas de trabalho Rise Rank pelo incentivo e confiança na minha capacidade;

Aos meus colegas de trabalho da UNIRG Karin Collier, Karla Regina Gama e Fausto Felix;

A minha parceira desta pesquisa Janaina Moreira Lacerda da Silva, e a colega Gabriela Mota do Carmo por colaborarem com esta pesquisa;

Aos professores do setor de patologia do IPTSP Eliza Carla Barroso D. Veríssimo, Juliana Reis Machado e Silva, Liliana Borges Menezes, Mara Rúbia Nunes Celes e Marina Pacheco Miguel por me acolherem tão bem;

A todos os colegas do Minter pelo carinho e apoio: Aline Matos Carvalho, Andreisa Prieb, Carine Gosch, Douglas Oliveira Andrade, Fabiana Candida Queiroz Santos Anjos, Florence Lainscek, Gisela Guadalupe, Natália Moreira Lopes, Poliana Valadares, Tânia Fernandes Machado Silva e Valéria Maciel.

SUMÁRIO

Lista de tabelas e figuras	VI
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
1 - Introdução	1
1.1 - Epidemiologia, Etiologia e Evolução clínica da doença de chagas	1
1.2 - Cardiopatia Chagásica Crônica	4
1.2.1 - Fibrose	6
1.2.2 - Mastócitos	8
1.2.3 - Angiogênese	10
1.3 - Doença de chagas e o envelhecimento	12
2 - Justificativa	15
3 - Objetivos	16
3.1 - Objetivo geral	16
3.2 - Objetivos específicos	16
4 - Métodos	17
4.1 - Casuística	17
4.2 - Quantificação do colágeno	18
4.3 - Análise Morfométrica de mastócitos e vasos	19
4.3.1 - Técnica de Imunoistoquímica	19
4.3.2 - Mastócitos	21
4.3.3 - Vasos sanguíneos	21
4.4 - Análise Estatística	22
5 - Resultados	23
6 - Discussão	32
7 - Conclusão	36
Referências	37
Anexo	49

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

- Tabela 1** Características demográficas dos grupos de pacientes portadores de cardiopatia chagásica.
- Figura 1** Ciclo de transmissão do *T. cruzi* pelo inseto vetor e ciclo de vida no hospedeiro.
- Figura 2** Patogênese da cardiopatia chagásica crônica.
- Figura 3** Microscópio acoplado a câmara digital “*Leica DMC 2900*”.
- Figura 4** Software “*image J*” utilizado para mensurar a quantidade de colágeno.
- Figura 5** Software “*image J*” utilizado para contagem de vasos sanguíneos.
- Figura 6** Fotomicrografia representativa do colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo.
- Figura 7** Comparação da média de colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo entre idosos e não-idosos com ou sem cardiopatia chagásica.
- Figura 8** Fotomicrografia do miocárdio do ventrículo esquerdo apresentando a imunoexpressão de mastócitos triptase positivo.
- Figura 9** Comparação da média da densidade de mastócitos triptase positivo no miocárdio do ventrículo esquerdo entre idosos e não-idosos com ou sem cardiopatia chagásica.
- Figura 10** Fotomicrografia do miocárdio do ventrículo esquerdo apresentando imunoexpressão de vasos sanguíneos.
- Figura 11** Comparação da média da densidade de vasos sanguíneos no miocárdio do ventrículo esquerdo de idosos e não-idosos com ou sem cardiopatia chagásica.
- Figura 12** Correlação entre a porcentagem de colágeno e a densidade de mastócitos no ventrículo esquerdo do grupo de idosos CC.
- Figura 13** Correlação entre a porcentagem de colágeno e a densidade de vasos sanguíneos no ventrículo esquerdo do grupo de idosos CC.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IFN-γ	Interferon Gamma
TGF-β	Fator de crescimento beta
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
IgE	Imunoglobulina E
FcϵR	Receptor de afinidade para IgE
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Agn-1	Angiotensina 1
Agn-2	Angiotensina 2
DAB	Diaminobenzidina
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Idoso CC	Grupo de idosos com cardiopatia chagásica crônica
Idoso SC	Grupo de idosos sem cardiopatia chagásica crônica
Não-idoso CC	Grupo de não idosos com cardiopatia chagásica crônica
Não-idoso SC	Grupo de não idosos sem cardiopatia chagásica crônica

RESUMO

Nas Américas milhões de pessoas são portadoras da doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi*. A cardiopatia chagásica crônica é a forma mais grave da doença, caracterizada por lesões no miocárdio associadas a processo inflamatório e fibrose que muitas vezes evoluem para progressiva diminuição das funções cardíacas. A doença de Chagas durante o envelhecimento pode ter aspectos específicos que precisam ser mais claramente entendido. O objetivo do estudo foi descrever a relação da angiogênese e da densidade de mastócitos com a fibrose miocárdica em idosos portadores de cardiopatia chagásica crônica. Para tanto foram selecionados fragmentos do ventrículo esquerdo de pacientes autopsiados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Formou-se quatro grupos, idosos com cardiopatia chagásica – 6 (Idoso CC); idosos sem cardiopatia chagásica – 5 (Idoso SC); Não-idosos com cardiopatia chagásica – 5 (não idoso CC); Não-idosos sem cardiopatia chagásica - 5 (não idoso SC). Realizou-se a técnica de picrossirius para quantificação da porcentagem de colágeno sob luz comum e objetiva de 10x. A imunohistoquímica foi realizada para obtenção da densidade de mastócitos utilizando o anticorpo monoclonal *antitriptase*, e para a densidade de vasos sanguíneos o anticorpo monoclonal CD34, ambas foram avaliadas sob luz comum e objetiva de 40x. A porcentagem de colágeno foi significativamente maior no grupo de idosos CC, quando comparada aos outros grupos ($p=0,003$). A densidade de mastócitos foi maior no grupo de idosos CC, mas sem diferença significativa ($p=0,226$). A densidade de vasos sanguíneos foi menor no grupo de idosos CC e sem diferença significativa ($p=0,224$). Portanto, foi verificada no grupo de idosos CC maior quantidade de colágeno, e ainda, maior densidade de mastócitos e menor densidade de vasos sanguíneos, embora não significativa, que provavelmente estão relacionados com a etiopatogênese das lesões miocárdicas na cardiopatia chagásica crônica durante o envelhecimento.

Palavras Chave: Cardiopatia chagásica, envelhecimento, fibrose, mastócitos e vasos sanguíneos.

ABSTRACT

In Americas million people are carriers of Chagas disease caused by *Trypanosoma cruzi*. Chronic chagasic cardiopathy is the most severe form of the disease, characterized by lesions in the myocardium associated with inflammation and fibrosis which often evolve to progressive decrease of heart function. Chagas' disease during aging may have specific aspects that require further studies. The aim of the study was to describe the relationship of angiogenesis and mast cell density with myocardial fibrosis in elderly patients with chronic Chagas' disease. To reach this goal we selected left ventricular fragments of autopsied patients at the Clinical Hospital, Federal University of Triangulo Mineiro. The samples were divided into four groups: elderly with chagasic cardiopathy - 6 (CC elderly); elderly without chagasic cardiopathy - 5 (SC elderly); Non-elderly with chagasic cardiopathy - 5 (no elderly CC); Non-elderly without chagasic cardiopathy - 5 (no elderly SC). Picrosirius red staining was performed for quantifying the percentage of collagen in common light and 10x magnification. Immunohistochemistry was performed to obtain the mast cell density, using antitriptase monoclonal antibody, and the density of blood vessels, using CD34 monoclonal antibody. The samples were evaluated under common light and at 40x magnification. The percentage of collagen was significantly higher in the elderly CC group compared to the other groups ($p = 0.003$). The density of mast cells was higher in elderly CC group, but no significant difference ($p = 0.226$). The density of blood vessels was lower in the elderly CC group and no significant difference ($p = 0.224$). Therefore, in elderly CC group there was more collagen, and also higher density of mast cells and lower density of blood vessels, although not significant, which are probably associated to the etiopathogenesis of myocardial lesions in chronic Chagas' disease during aging.

Keywords: Chagasic cardiopathy, aging, fibrosis, mast cells and blood vessels.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Epidemiologia, Etiologia e Evolução Clínica da Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita a mais de cem anos por Carlos Chagas, tem o envolvimento do coração e suas complicações como a principal causa de morbidade e mortalidade (Koberle, 1974; Prata, 2001). Nos países da América Latina a doença é endêmica, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas e 14.000 mortes anuais. Ela é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas do mundo, constituindo um problema de saúde pública na América Latina (WHO, 2010; Nunes *et al.*, 2013).

A endemia da doença de Chagas está relacionada com circunstâncias habitacionais e sócio-econômicas precárias no início da vida, onde a maioria dos indivíduos contrai a doença com menos de 20 anos de idade (Coura *et al.*, 2009; Prata, 2001). Novos casos da doença têm sido notificados em países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, Espanha e Suíça devido à migração populacional e estão relacionados à transmissão congênita e/ou transfusional, tornando-se um problema emergente também nessas regiões (Rassi, 2010; Gascon *et al.*, 2010).

A doença de Chagas tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que é transmitido para o hospedeiro por insetos triatomíneos (Chagas, 1909). A transmissão pode ocorrer também, pela via oral por meio da ingestão de alimentos contaminados com excretas do parasito, transfusão de sangue, transmissão congênita, órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (Prata, 2001; Pুনukollu *et al.*, 2007). O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado que apresenta um ciclo de vida em três formas: tripomastigota metacíclica; amastigota e epimastigota, conforme figura 1 (Andrade *et al.*, 2000).

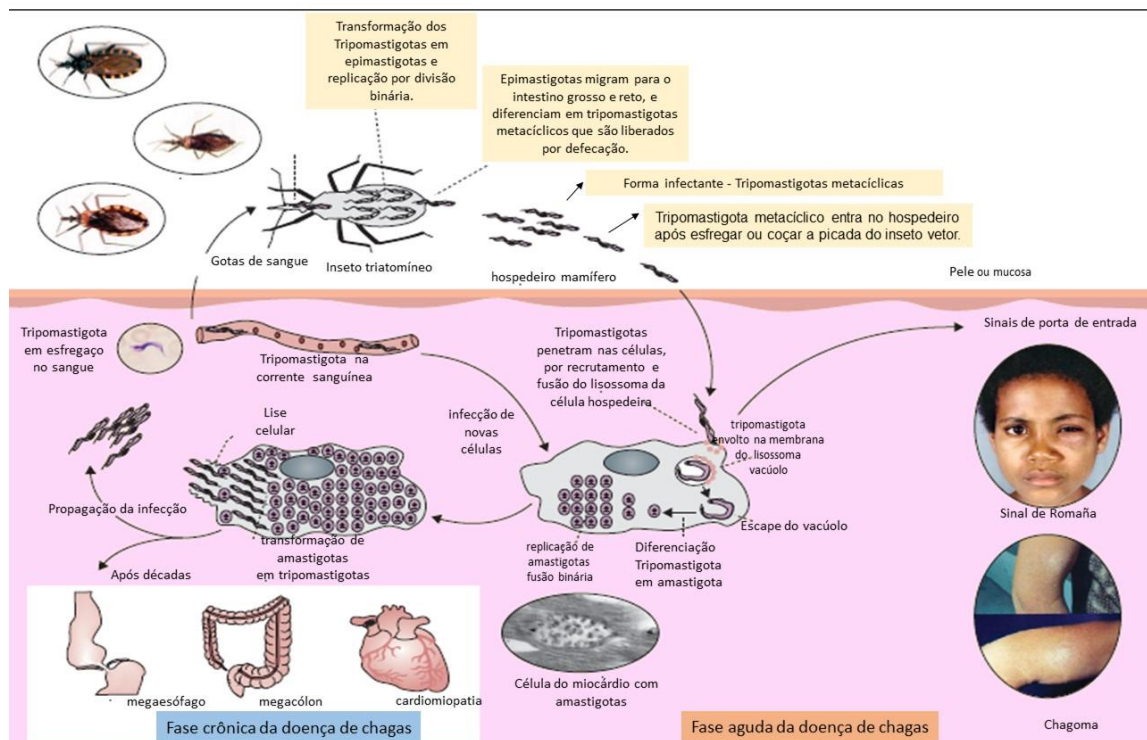


Figura 1 – Ciclo de transmissão do *T. cruzi* pelo inseto vetor e ciclo de vida no hospedeiro. Após a picada do vetor ocorre uma reação no tecido subcutâneo, sinal de romanã e/ou chagoma. Tripomastigotas invadem o citoplasma das células do hospedeiro e transformam em amastigotas que iniciam a replicação, e quando a célula está cheia de amastigotas, transformam em tripomastigotas com o crescimento de flagelos. Estes tripomastigotas lisam a célula infectada e invade tecidos adjacentes, se espalham por meio dos vasos linfáticos e corrente sanguínea para locais distantes, principalmente células do músculo (cardíaco, liso e esquelético) e células ganglionares, onde se iniciam novos ciclos de multiplicação intracelular. Adaptado de Rassi Jr *et al.*, 2010.

Programas nacionais para o controle da transmissão vetorial e transfusional no Brasil têm sido eficientes nos últimos anos, porém as formas de transmissão vertical e oral ganharam importância epidemiológica (Dias, 2009; Kapelusznik *et al.*, 2013). A incidência da doença de Chagas vem diminuindo progressivamente com intervenções de controle (Coura *et al.*, 2009), mas com o crescimento do envelhecimento populacional, houve uma predisposição no aumento do número de adultos já contaminados por *T. cruzi* que chegaram a velhice (Lima-Costa *et al.*, 2011). A distribuição percentual dos idosos portadores de doença de Chagas no atendimento do serviço de referência do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas aumentou passando de 7,4% entre 1980 a 1984 para 17,2% entre 2000 a 2005 (Guariento *et al.*, 2011).

O indivíduo quando contaminado pelo *T. cruzi* contrai a doença de Chagas que apresenta duas fases ao longo da vida até a sua morte: fase aguda

e fase crônica (Andrade, 1999). A fase aguda inicia-se com a transmissão do parasito pelo vetor, causando uma reação inflamatória no tecido subcutâneo com edema local e endurecimento, pode ser observado também, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (Rassi *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2012). Após o sétimo e o décimo dia de contágio, pode aparecer manifestações clínicas tais como, febre, sudorese, mialgias, náuseas, erupção cutânea, irritação meníngea e diarreia que perduram de 4 a 8 semanas (Dias, 1995; Coura, 2007). Esta fase é marcada por um elevado número da forma tripomastigota do parasito no sangue, capaz de infectar vários tecidos como músculo liso, órgãos linfóides, tecidos nervosos e glândulas com intenso parasitismo tecidual (Chagas, 1909; Andrade *et al.*, 2000). A resposta imune inata e adaptativa contra o *T. cruzi* é ativada a fim de obter um controle imunológico do parasito no organismo do indivíduo (Teixeira *et al.*, 2002).

A fase crônica começa de dois a quatro meses após o início da infecção, com baixo parasitismo e níveis de anticorpos elevados e persistentes no hospedeiro (Chagas, 1909; Andrade *et al.*, 2000). Durante esta fase, o indivíduo pode apresentar a forma indeterminada ou a forma determinada com comprometimento cardíaco, digestivo, neurológico e/ou misto (Mangone *et al.* 1994; Ribeiro & Rocha, 1998; Coura 2007; Ribeiro *et al.*, 2012).

A forma indeterminada é assintomática, sem alterações radiográficas e no eletrocardiograma, sendo identificada por sorologia positiva para *T. cruzi* (Higuchi *et al.* 1995). A ressonância magnética cardíaca pode ser uma modalidade útil para avaliar a morfologia e função cardíaca na doença de Chagas (Rochitte *et al.*, 2007), tais como a carga energética do miocárdio e metabolismo (Leme *et al.*, 2010), fibrose (Ribeiro *et al.*, 2012; Regueiro *et al.*, 2013). O indivíduo pode permanecer nesta forma por décadas (Ribeiro *et al.*, 2012) e após 20 a 40 anos pode evoluir para a forma determinada. Na forma determinada, a forma digestiva geralmente evolui com disfunção gastrointestinal, principalmente megaesôfago, megacólon ou ambos ocorrendo em 10 a 15% dos casos (Rassi *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2010). A forma neurológica gera manifestações como meningoencefalite multifocal e lesões no sistema nervoso autônomo. Estas lesões no sistema nervoso são caracterizadas por ganglionite, periganglionite, neurite e perineurite crônica, que contribuem para a destruição neural na fase crônica com intensidade variável de caso para caso (Lopes *et al.*,

1997). A forma cardíaca é a mais grave e frequente com incidência de 20 a 30% dos indivíduos (Higuchi *et al.*, 2003).

1.2 Cardiopatia Chagásica Crônica

Na cardiopatia chagásica crônica é comum manifestações clínicas como arritmias, taquiarritmias, cardiomegalia, tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita (Laranja *et al.*, 1956; Rossi, 1998; Rassi, 2000; Prata, 2001; Marin-Neto *et al.*, 2010;).

O aumento de volume e peso do coração, hipertrofia, dilatação global do órgão, formação de aneurismas apical (Rossi, 1991; Lopes *et al.*, 1997; Andrade 1955; Reis, 2000), fibroelastose endocárdica, epicardite, espessamento fibroso e/ou arterosclerose na valva aórtica e mitral, e trombose (Oliveira *et al.*, 2007) são características macroscopicamente observadas na cardiopatia chagásica crônica. Microscopicamente, as lesões no miocárdio constituem-se de infiltrado inflamatório mononuclear com a presença de macrófagos (Andrade *et al.*, 1989), linfócitos T CD8, CD4 (Higuchi *et al.*, 1993) e mastócitos (Almeida *et al.*, 1975; Meuser-Batista *et al.*, 2008; Rodão *et al.*, 2012), associado a fibrose difusa e acentuada (Rossi, 1998). Além de hipertrofia e necrose de miocardiócitos, destruição de neurônios (Koberle, 1968; Milei *et al.*, 1996) e escassez ou ausência de parasito (Andrade *et al.*, 1989).

A fisiopatologia da cardiopatia chagásica crônica é complexa e algumas teorias são propostas para explicar a progressão da forma clínica da doença. Dentre elas estão a persistência do parasito, a autoimunidade, a neurogênica e as alterações microvasculares (Rossi, 1990; Marin-Neto *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2012).

A presença do parasito em locais específicos no hospedeiro infectado desencadeia o processo inflamatório local causando lesões teciduais acentuada na fase aguda (Andrade *et al.*, 2000). Porém, o mecanismo pelo qual o parasito causa lesões teciduais na fase crônica é obscuro, possivelmente o DNA e antígeno do parasito pode persistir, sendo a provável causa de estimulação da resposta imune (Andrade, 1955; Laranja *et al.*, 1956; Pereira *et al.*, 1992; Biolo *et al.*, 2010). Durante a fase crônica, em pacientes imunocomprometidos o

parasito pode reativar a sua mutiplicação e a proliferação intensificando o seu quadro clínico (Simões *et al.*, 1995; Prata, 2001).

A auto-imunidade ocorre como uma exposição secundária do antígeno, seguido por sensibilização no ambiente inflamatório. O mimetismo molecular em que células T e B reconhecem antígenos parasitários que compartilham epitopos estruturalmente similar com antígenos do hospedeiro, gerando uma resposta imune reativa. Pode ainda, ocorrer ativação policlonal que leva a produção de auto-anticorpo (Higuchi *et al.*, 1993; Cunha-Neto *et al.*, 2006; Marin-Neto *et al.*, 2007; Biolo *et al.*, 2010).

A teoria neurogênica seria uma consequência de lesões direta do parasito nos neurônios, com degeneração periganglionar, causada por reação autoimune antineural (Santos *et al.*, 1979; Santos *et al.*, 1981). Tais eventos promovem lesões no sistema autónomo parassimpático e disfunção ventricular sistólica e diastólica (Souza *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.*, 2001), aumentando progressivamente a vulnerabilidade e malignidade de arritmias e morte súbita (Baroldi *et al.*, 1997). Distúrbios autonômicos parassimpáticos privam a ação exercida pelo nó sinusal, comprometendo a frequência cardíaca e alterando a pressão arterial que contribuem para desarranjos autonômicos que podem desencadear microespasmos (Amorim & Marin-Neto, 1995; Biolo *et al.*, 2010).

Alterações microvasculares ocorrem associadas ao processo inflamatório perivascular (Marin-Neto *et al.*, 2007), resultando em manifestações como microespaço, microtrombos (Higuchi *et al.*, 2003), disfunção de células endoteliais, aumento de plaquetas ativadas e nível elevado de tromboxano (Marin-Neto *et al.*, 1992; Tanowitz *et al.*, 1996). Estes fenômenos colaboram para lesão dos miocardiócitos e formação de fibrose progressiva na fase crônica (Higuchi *et al.*, 2003). Vasodilatação e vasoconstrição anormal (Laranja *et al.*, 1956; Koberle, 1968; Torres *et al.*, 1941; Higuchi *et al.*, 1999), contribuem para distúrbios isquêmicos, reperfusão de baixa intensidade (Rossi, 1990) e exarcebação das lesões como necrose dos miocardiócitos e formação de fibrose (Marin-Neto *et al.*, 1992).

Fatores como a carga parasitária, cepa do parasito, tropismo tecidual, tempo de contaminação e genética do hospedeiro estão relacionados com a eficácia da resposta imunológica no indivíduo (Higuchi *et al.*, 2003; Marin-Neto *et al.*, 2007).

A resposta imunológica na cardiopatia chagásica crônica apresenta uma dinâmica composta por várias células envolvidas na resposta imunológica, dentre elas macrófagos e mastócitos que produzem citocinas pró-inflamatórias Th1, tais como TNF- α , e IFN- γ , que tem um papel importante no controle do parasito (Campos & Gazzinelli, 2004; Machado *et al.*, 2012), por induzir produção de óxido nítrico (Machado *et al.*, 2000). Nível elevado de TNF- α no plasma, presença de citocinas Th1 principalmente IFN- γ , e supressão de citocinas Th2 são descritos em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica e reflete a gravidade na insuficiência cardíaca (Machado *et al.*, 2012; Marin-neto *et al.*, 2007).

1.2.1 Fibrose

A fibrose é uma lesão que ocorre na cardiopatia chagásica crônica que está associada a processo inflamatório e outras lesões miocárdicas, como degeneração e necrose dos miocardiócitos (Andrade, 1978; Andrade *et al.*, 1989; Biernacka e Frandogiannis, 2011). Para proporcionar uma reparação e remodelação progressiva do órgão ocorre um aumento na síntese de colágeno com formação de uma fibrose intersticial densa e difusa, em grau e localização variável, mas sempre presente, que afeta diretamente a morfologia e o desempenho funcional do coração. Além disso, em muitas áreas, a fibrose ocorre de forma intensa e difusa substituindo miocardiócitos (Rossi, 1991; Rossi, 1998).

Na cardiopatia chagásica crônica a fibrose é uma consequência da reação inflamatória devido ao dano citotóxico direto ou indireto, mediado por células do sistema imune (Rossi, 1998; Meuser-Batista *et al.*, 2008; Rassi Jr *et al.*, 2009) incluindo macrófagos, mastócitos e linfócitos T. Um desequilíbrio nos fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios com a participação de quimiocinas, citocinas, espécie de oxigênio reativa (ROS) e estresse oxidativo influenciam na progressão e remodelação da cardiopatia chagásica crônica (Machado *et al.*, 2012). Na infecção crônica, devido ao baixo parasitismo, a possível causa dessas lesões seriam injúrias no miocárdio provocadas pela apresentação contínua do antígeno do *T. cruzi* com uma resposta imune reativa; e/ou distúrbios microvasculares e isquêmicos devido à agregação de plaquetas e

obstrução de capilares no miocárdio, conforme figura 2 (Andrade, 1999; Biolo *et al.*, 2010).

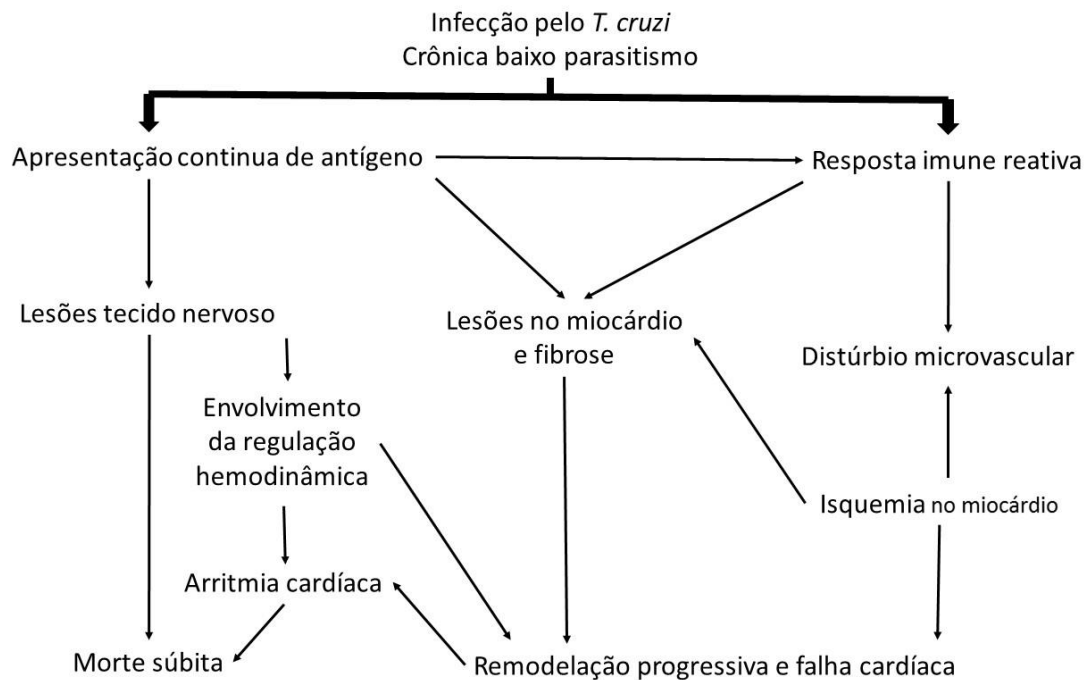


Figura 2 – Patogênese da cardiopatia chagásica crônica. Os Principais mecanismos são a persistência do parasito e a resposta imunológica, ambos causam lesões no miocárdio e fibrose com remodelação progressiva do órgão e arritmia cardíaca. Lesões no tecido nervoso e distúrbios microvasculares contribuem para promoção e remodelação progressiva do órgão, provocando arritmia cardíaca e o aumento do risco de morte súbita. Adaptado de Biolo *et al.*, 2010.

Lesões nos miocardiócitos potencializam a produção e liberação dos fatores de crescimento beta (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), contribuindo para a fibrose, por meio da presença constante de infiltrado inflamatório com células T e macrófagos. Macrófagos quando ativados por citocinas produzem indutores potentes de fibrose, tais como TGF- β e PDGF (Kovacs, 1991; Rossi, 1998). Além disso, aumentam a produção de endotelina-1 por miocardiócitos relacionada com a disfunção ventricular e comprometimento funcional do órgão (Wei *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1996; Rossi, 1998), indicando que os peptídeos destas células também poderiam contribuir para a fibrose do miocárdio por reforçar a síntese de colágeno (Kahaleh, 1991; Rossi, 1998).

O PDGF é sintetizado por várias células, tais como, células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos. Ele atua no mecanismo de proliferação e diferenciação de fibroblasto na matriz extracelular (Scotton, 2007).

Peptídeos pró-fibrogênicos são produzidos pela resposta imune e inflamatória facilitando efeitos que perpetuam durante a fibrose. Uma citocina pró-fibrogênica importante é o TGF- β (Wynn, 2008), que quando liberado tem o potencial de produzir fibrose, estimulando fibroblastos a produzir proteínas na matriz extracelular, como colágeno e fibronectina. Além disso, o TGF- β tem a capacidade de diminuir a produção de enzimas que degradam a matriz extracelular (Brandan *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2007). Aumento da expressão do TGF- β foram relatados durante o envelhecimento, provavelmente para ativação e sinalização que desencadeia a fibrose (Cencetti *et al.*, 2010). A sinalização de TGF- β é constitutivamente ativa em progenitores genéticos envelhecidos, o que pode explicar o aumento da fibrose no envelhecimento (Mann *et al.*, 2011).

Vários mediadores químicos, como IFN- γ e TNF- α , podem influenciar no desenvolvimento da fibrose e hipertrofia na cardiopatia chagásica crônica, por meio da modulação da expressão gênica de proteínas nos miocardiócitos e fibroblastos produzindo efeitos não-imunológicos (Cunha-Neto *et al.*, 2009).

O aumento de colágeno intersticial na cardiopatia chagásica crônica, pode prejudicar o relaxamento ventricular e reduzir progressivamente a conformidade do miocárdio, o que aumenta a pressão atrial esquerda associada à disfunção diastólica e sistólica (Nunes *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012).

1.2.2 Mastócitos

Os mastócitos são células hematopoiéticas envolvidas na resposta inflamatória, na formação de tecido de granulação, na cicatrização de lesões, na angiogênese, na remodelação do tecido (Farahani *et al.*, 2010), nas reações alérgicas, inflamações crônicas e respostas imunes inata e adaptativa mediada por células T (Theoharides *et al.*, 2004; Metz *et al.*, 2007; Metz *et al.*, 2008). Alguns estudos relatam a participação de mastócitos na fibrose de lesões na mucosa da cavidade oral (Farahani *et al.*, 2010) e em quelóide (Ammendola *et al.*, 2013). Na doença de Chagas, há um aumento do número de mastócitos em órgãos como o coração (Almeida *et al.*, 1975), esôfago (Pereira, 1972) e cólon (Pinheiro *et al.*, 2003). No entanto, não foram encontrados trabalhos específicos avaliando a relação de mastócitos e angiogênese com o aumento da fibrose em indivíduos idosos com cardiopatia chagásica crônica.

Em modelos experimentais com a doença de Chagas, observou-se um aumento do número de mastócitos em áreas de reinoculação com *T. cruzi* na pele de ratos (Menezes & Alcântara, 1965), na submucosa e musculatura do intestino em ratos com a doença crônica (Tafari e Brener, 1967). Em ratos albinos, os mastócitos apresentavam-se ausentes ou raros na fase aguda da doença (Chapadeiro *et al.*, 1988).

Os mastócitos podem responder a estímulos diferentes, e assim, participar em uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos, dependendo da sua ativação por uma variedade de receptores. No entanto, a ativação de mastócitos é dependente de IgE, por meio da agregação de antígeno dependente de IgE e do receptor de alta afinidade de IgE, FcεR (Galli *et al.*, 2005). Os mastócitos são células efetoras importantes em respostas imunitárias associada à IgE, incluindo resposta imune contra parasito (Galli *et al.*, 2008). Mastócitos contém grânulos com histamina, mediadores lipídicos e protease como a quimase e a triptase, que quando ativados entram em processo de degranulação destes mediadores pré-formados que estão armazenados em seus grânulos (Kalesnikoff e Galli, 2008; Farahani *et al.* 2010; Overed-Sayer *et al.*, 2014). Após a degranulação ocorre o metabolismo de fosfolipídios e os mastócitos serão capazes de sintetizar e secretar mediadores químicos como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, incluindo o TGF-β, TNF-α, PDGF, FGF e VEGF (McNeil, 1996; Scott & Stockham, 2000; Lappalainen *et al.*, 2004; Kumar e Sharma, 2010; Farahani *et al.* 2010; Overed-Sayer *et al.*, 2014), que estimulam a proliferação de miofibroblastos e a síntese de colágeno (Garbuzenko *et al.*, 2002).

Os mastócitos também induzem a angiogênese (Ribatti *et al.*, 1999; Patruno *et al.*, 2009; Ranieri *et al.*, 2009), por meio de vários fatores pró-angiogênicos clássicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular e fatores pró-angiogênicos não clássicos, tais como triptase e quimase (Norrby, 2002; Somasundaran *et al.*, 2005; Ribatti *et al.*, 2011).

1.2.3 Angiogênese

Angiogênese é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, que ocorre em condições fisiológicas e patológicas com a

participação de inúmeras moléculas que estimulam e inibem a formação dos neovasos (Risau, 1995; Carmeliet, 2003). Ela é um fenômeno fundamental e necessário em eventos como a organogênese e diferenciação durante a embrionogênese, cicatrização de feridas e processo de fibrose (Chen, 2009; Johnson & Dipietro, 2013).

Novos vasos sanguíneos são formados por um conjunto de eventos bioquímicos composto por células endoteliais, macrófagos, mastócitos e fibroblastos que são atraídos para a área da lesão por fatores angiogênicos (Chang *et al.*, 2004). A angiogênese envolve um processo dinâmico e complexo de diversas vias de sinalização intercelulares com interação de fatores pró-angiogênicos VEGF, TGF β , Agn-1, TNF α , heparina e histamina (Maltby *et al.*, 2009).

Em situações dependente de angiogênese, os mastócitos estão presentes (Metcalf *et al.*, 1997; Metz *et al.*, 2007), pois liberam substâncias que estimulam a angiogênese direta ou indiretamente, dentre elas a heparina, histamina e TGF- β (Met calfe *et al.*, 1997; Bochsler & Slauson, 2002).

A remodelação vascular é caracterizada por uma reorganização dos vasos sanguíneos em resposta a alterações fisiológicas no fluxo sanguíneo ou a estímulos fisiopatológicos. A angiogênese é mediada pela proliferação, migração e remodelação de células endoteliais. A desregulação da apoptose das células endoteliais tem efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento do sistema cardiovascular e na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias e degenerativas, por neutralizar a neovascularização no organismo adulto (Dimmeler & Zeiher, 2000).

A matriz extracelular fornece uma estrutura para a angiogênese permitindo sinalizações moleculares essenciais para todas as fases da formação de vasos sanguíneos, incluindo a germinação vascular, formação de lúmen, maturação dos vasos e finalmente, a estabilização dos novos vasos. A adesão e ativação de células endoteliais na matriz extracelular controla a proliferação, sobrevivência e migração da angiogênese. Embora citocinas angiogênicas, como VEGF, sejam apresentadas como mediadoras importantes na neovascularização, há uma crescente evidência que a mudança na dinâmica e composição da matriz extracelular são igualmente importante, particularmente na regulação vascular da morfogênese e na estabilização de novos vasos

sanguíneos. Assim, a matriz extracelular deve ser vista como suporte entre as citocinas e a angiogênese, pois provavelmente ela controla ativamente, a formação, arquitetura, e maturação de novos vasos sanguíneos (Senger *et al.*, 2011).

A formação de uma rede vascularizada tem sua origem com os hemangioblastos que se diferenciam em células hematopoiéticas e células endoteliais. As células hematopoiéticas produzem o fator de coagulação de plaquetas e às células responsáveis pelas respostas imunológicas, dentre elas mastócitos, que colaboram com angiogênese, pela estimulação de fatores pró e anti-angiogênico. As células endoteliais são consideradas progenitoras da angiogênese, por estímulos de Ang-1, PDGF, TGF- β na matriz extracelular a fim de promover a estabilização dos vasos.

Fibroblastos ativados em lesões promovem angiogênese por meio de secreção de fatores pró-angiogênico e fatores que estimulam a migração de células endoteliais, tais como o TGF- β , VEGF e metaloprotéínas (Hartlapp *et al.*, 2001). Porém, quando ocorre um desequilíbrio que diminui a VEGF, Agn-1 e PDGF considerados promotores, e aumenta o IFN- γ , Ang-2 considerados inibidores da angiogênese desencadeia a regressão de vasos (Carmeliet, 2003). Após a regressão de vasos por meio de sinais de apoptose de células endoteliais, pericitos podem ser liberados e desenvolver características de miofibroblastos, precipitando ainda mais o desenvolvimento da fibrose (Dimmeler & Zeiher, 2000; Johnson & Dipietro, 2013).

A dinâmica da angiogênese na fibrose após lesões tem sido geralmente considerada, por envolver a necessidade de oxigênio e nutrientes que permitem o processo de formação da fibrose (Fraisl *et al.*, 2009). Esta atividade angiogênica pode ser mensurada pela análise qualitativa e/ou quantitativa de vasos imunomarcados por anticorpos específicos. O grau da angiogênese pode ser demonstrado pela análise da expressão do CD34 que é um dos marcadores para a identificação de vasos sanguíneos em material parafinado por ser uma glicoproteína transmembrana presente em células endoteliais (Ponce *et al.*, 2014).

1.3 Doença de chagas e o envelhecimento

O envelhecimento da população no Brasil vem aumentando de forma rápida e intensa, a população idosa representava 4,8% em 1991, 5,9% em 2000 e 7,4% em 2010, com previsão de 15% em 2025 (IBGE, 2010). No Brasil há de 2 a 3 milhões de indivíduos na fase crônica da doença de chagas (Martins-Melo *et al.*, 2012). O controle da transmissão vetorial e transfusional, o manejo clínico da doença na atenção primária, os serviços de referência, e programas de intervenções tem determinado um aumento na média da idade dos indivíduos contaminados por *T. cruzi*, aumentando a prevalência da doença na idade avançada (Menegelli *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 2007; Lima-Costa *et al.*, 2011; Martins-Melo *et al.*, 2012).

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado uma redução progressiva de soropositividade para doença de Chagas em faixas etárias jovens (Ostermayer *et al.*, 2011) e o aumento da prevalência de infecção entre indivíduos idosos (Lima-Costa *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2015).

A mortalidade precoce e invalidez causada pela doença de Chagas, que muitas vezes acomete a população mais produtiva e adultos jovens, resultam em uma perda econômica significativa (Franco-Paredes *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2013). Na fase crônica, o indivíduo jovem pode ter evolução clínica desfavorável, incapacitando-o para o trabalho que pode resultar em aposentadorias precoces e/ou morte antes da velhice (Barreto *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 2007).

Complicações cardíacas na doença de chagas, frequentemente conduzem à necessidade de tratamentos a longo prazo e/ou procedimentos cirúrgicos, incluindo implante de marcapasso e transplante de coração, que favorecem com a sobrevivência dos pacientes (Abuhab *et al.*, 2013; Castillo-Riquelme *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2013). No Brasil os custos do Sistema Único de Saúde com o tratamento da doença de Chagas têm aumentado (Dias *et al.*, 2008).

Ao controlar a transmissão da doença de Chagas, surge o desafio de prestar assistência aos pacientes infectados que atingem a velhice. No Serviço de Atendimento Farmacêutico do Laboratório de Pesquisa da Doença de Chagas no Ceará, o perfil de pacientes idosos chagásicos se caracteriza por predominância nas mulheres (50,5%), com idade média de 67 anos, sendo a

maioria aposentados (54,6%), com elevada taxa de analfabetismo (40,2%) e renda familiar igual a um salário mínimo (51,5%). As formas clínicas predominantes da doença de Chagas neste grupo foram cardíaca (65,3%) e indeterminada (14,7%). O número médio de comorbidades por paciente foi de $2,23 \pm 1,54$, com hipertensão arterial sistêmica sendo a mais frequente, 67,0% dos casos. Os idosos com doença de Chagas constituem um grupo vulnerável de pacientes que exige uma atenção especial dos serviços de saúde para garantir a assistência médica e social mais apropriada (Perreira *et al.*, 2015).

No Ambulatório do Grupo de Estudos de Doenças de Chagas do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas entre 1980 a 2005, 12% dos pacientes matriculados eram de idosos, com idade média de $66,3 \pm 5,9$ anos, evidenciando ao longo do tempo um aumento no percentual destes idosos. Dentre eles, predominaram as mulheres, os indivíduos com comprometimento cardíaco e os que apresentaram a doença de chagas associada com pelo menos uma doença crônica, particularmente aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular (Guariento *et al.*, 2011).

Manifestações clínicas como dor no peito atípica, disfunções ventriculares, tromboembolismos e insuficiência cardíaca na cardiopatia chagásica são semelhantes entre indivíduos idosos e não-idosos (Betetti *et al.*, 1987; Almeida *et al.*, 2007). Sendo assim, o mecanismo fisiopatológico, nestes pacientes idosos tem um perfil menos agressivo do que os de pacientes não-idosos (Betetti *et al.*, 1987). Porém, idosos portadores de cardiopatia chagásica estão particularmente vulneráveis, quando há uma associação com outras doenças crônicas (Alves *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2015). Além do mais, os idosos são fisiologicamente e imunologicamente mais susceptíveis a infecções (Francisco *et al.*, 2006) que os predispõem ao aumento de condições crônicas comuns ao processo de envelhecimento (Lima-Costa *et al.*, 2003).

Registros eletrocardiográficos e as radiografias do coração em idosos demonstram que o comprometimento cardíaco pela doença de Chagas, não é grave, e a insuficiência cardíaca congestiva deve-se, à associação de alterações cardíacas próprias do envelhecimento com outras doenças cardiovasculares frequentes nessa faixa etária (Carvalho *et al.*, 1985). Em outro estudo, os idosos com doença de Chagas e sem a doença não apresentaram diferença nas modulações autonômicas cardíacas (Resende *et al.*, 2003). Além disso, as

lesões macroscópicas no coração do idoso com cardiopatia chagásica apresentam-se semelhantes às descritas em indivíduos não idosos, porém mais discretas (Oliveira *et al.*, 2007).

O idoso com doença de Chagas crônica na forma cardíaca, pode desenvolver um quadro clínico leve e evolutivo compatível com uma vida de trabalho normal por muitos anos, permitindo que estes indivíduos sobrevivam e alcancem a idade avançada (Carvalho *et al.*, 1985; Betetti *et al.*, 1987; Resende *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, o perfil do indivíduo com doença de Chagas tem sido influenciado pelo envelhecimento populacional e pelo decréscimo na incidência dos casos agudos, fatores que contribuem com aumento e a sobrevivência de indivíduos idosos contaminados. As alterações que ocorrem no sistema cardiovascular dos portadores da doença de Chagas que chegam aos 60 anos ou mais ainda precisam ser estudados. Na literatura, há estudos sobre a epidemiologia e qualidade de vida, manifestações clínicas e poucos relativos aos aspectos morfológicos em idosos com cardiopatia chagásica crônica. Entretanto, estudos específicos de análise morfométrica envolvendo a relação da angiogênese e de mastócitos com a fibrose em indivíduos idosos com cardiopatia chagásica não foram encontrados. O conhecimento das alterações no coração facilita a compreensão do processo de formação de fibrose nos idosos portadores da cardiopatia chagásica crônica.

3 OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Descrever a relação da angiogênese e da densidade de mastócitos com a fibrose miocárdica em idosos portadores de cardiopatia chagásica crônica.

3.2 - Objetivos específicos

- ✓ Comparar a porcentagem de colágeno no miocárdio entre idosos e não-idosos portadores ou não de cardiopatia chagásica crônica.
- ✓ Comparar a densidade de mastócitos no miocárdio entre idosos e não-idosos portadores ou não de cardiopatia chagásica crônica.
- ✓ Comparar a densidade de vasos no miocárdio entre idosos e não-idosos portadores ou não de cardiopatia chagásica crônica;
- ✓ Correlacionar a densidade dos mastócitos com a fibrose miocárdica em idosos portadores de cardiopatia chagásica crônica.
- ✓ Correlacionar à densidade de vasos sanguíneos com a fibrose miocárdica em idosos portadores de cardiopatia chagásica crônica.

4 MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, sob número de protocolo 2629 (anexo 1). O trabalho foi realizado no Setor de Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG) em parceria com a Disciplina de Patologia Geral da UFTM.

4.1 – Casuística

A seleção dos casos foi feita por meio dos laudos de autópsias realizadas pela disciplina de Patologia Geral, no Hospital das clínicas na UFTM, no período de 1970 a 2012. Os dados levantados nos laudos foram: número da autópsia, idade, gênero, a cor, peso do coração, peso e altura corporais. Após a seleção dos laudos, foi constituído o grupo de indivíduos idosos e não-idosos, chagásicos e não chagásicos, sendo incluídos nos grupos com cardiopatia chagásica, aqueles com sorologia positiva e características morfológicas para a doença (Oliveira *et al*, 2007). Para os casos sem cardiopatia chagásica, excluiu-se os que apresentaram sorologia positiva para a doença de Chagas. Foram excluídos para todos os grupos os casos com cardiopatia isquêmica, hipertensiva, reumática e/ou *cor pulmonale*.

Nos grupos de idosos foram considerados os indivíduos com 60 anos ou mais e não-idosos com até 59 anos. Dessa maneira, 21 casos foram selecionados e distribuídos em quatro grupos: idosos com cardiopatia chagásica crônica – 6 (Idoso CC); idosos sem cardiopatia chagásica crônica – 5 (Idoso SC); não-idosos com cardiopatia chagásica crônica – 5 (não-idoso CC) e Não-idosos sem cardiopatia chagásica crônica - 5 (não-idoso SC).

4.2 – Quantificação de colágeno

A técnica de picrossirius (solução aquosa saturada e ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3b, *Sirius red F3B- Bayer*) com contra coloração pela hematoxilina por um minuto, foi utilizada para a quantificação do colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo. Para isso, foram excluídas as regiões do endocárdio e epicárdio.

O número de campos para a quantificação do colágeno foi definido pelo teste da média acumulada (Willians, 1979). Dessa maneira, foram analisados 45 campos obtidos por marcação com caneta de forma aleatória em todo o corte na lâmina (Figura 3 B). As imagens foram capturadas sob luz comum e objetiva de 10x em microscópio acoplado com uma câmera digital “*Leica DMC 2900*” e ao computador (Figura 3 A). Posteriormente, a morfometria foi realizada utilizando o programa “*Image J 1.48v - National Institutes of Health, USA*” para obtenção do percentual de colágeno por área do miocárdio (figura 4).

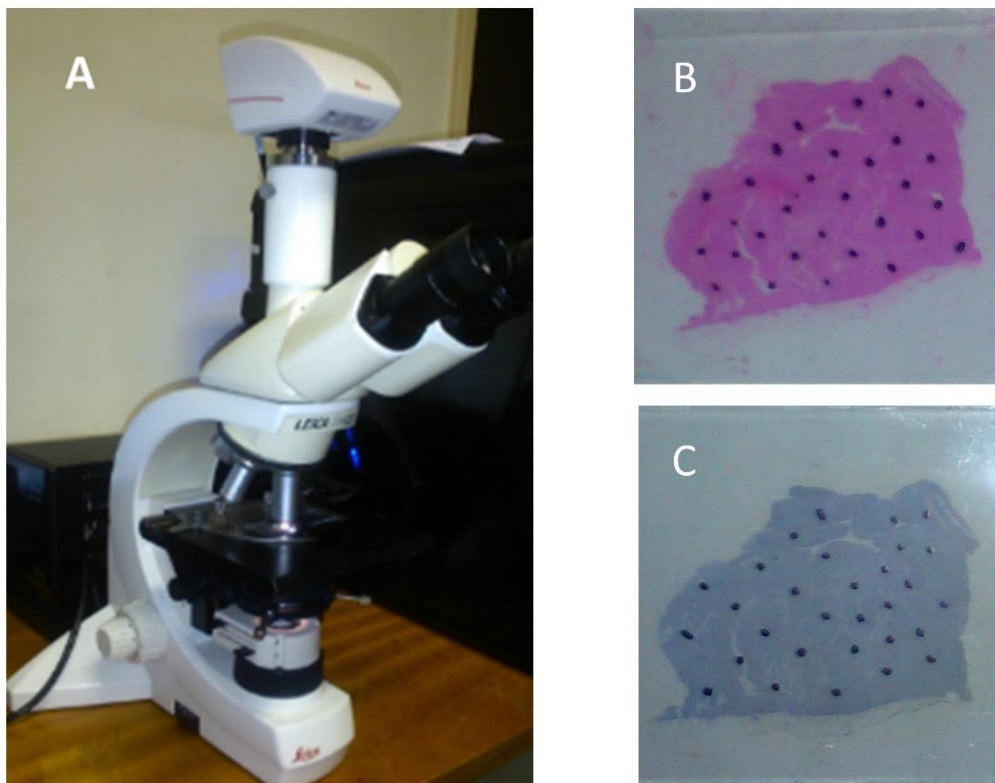


Figura 3 - Microscópio acoplado a câmera digital “*Leica DMC 2900*” e ao computador para capturar os campos aleatoriamente para a análise morfométrica (A); marcação nas lâminas para obtenção dos campos (B e C).

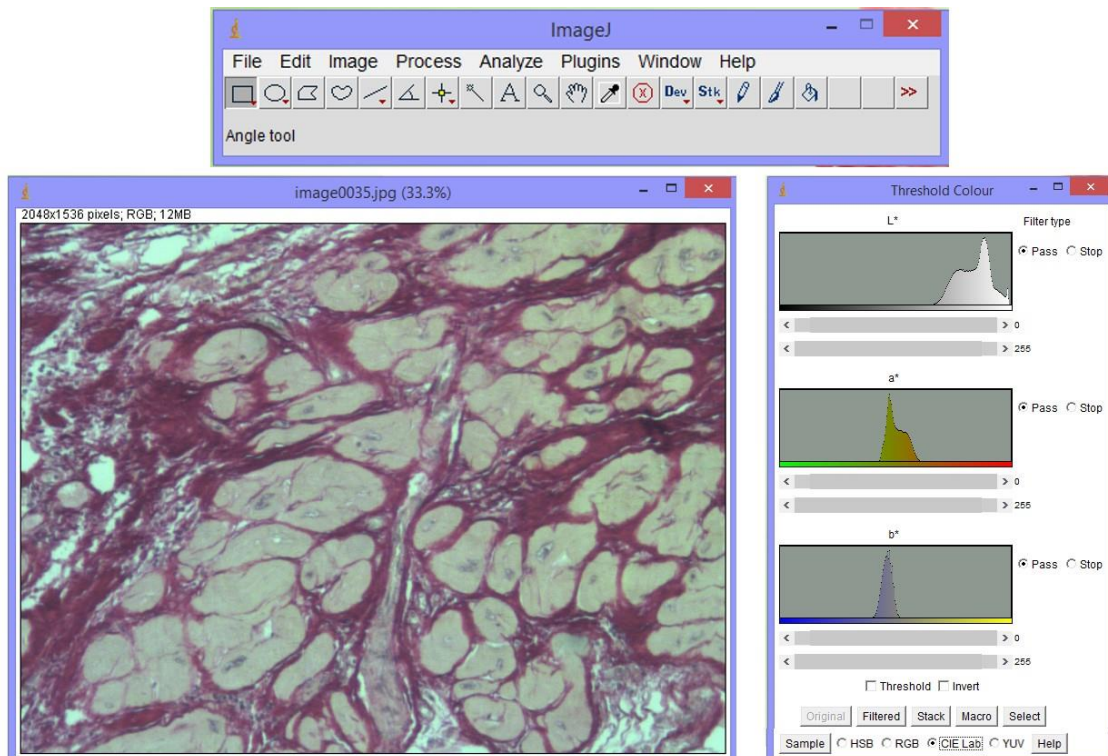


Figura 4: Programa “*image J*” utilizado para mensurar a quantidade de colágeno visto em rosa escuro em relação à área do campo.

4.3 – Análise Morfométrica de mastócitos e vasos

4.3.1 -Técnica de imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi utilizada para a quantificação de mastócitos e vasos sanguíneos, ambos utilizando o mesmo protocolo. As lâminas foram preparadas e silanizadas utilizando 25ml de organo silano (3-aminopropiltrietoxisilano, SIGMA) diluído em 225ml de álcool absoluto. As lâminas permaneceram imersas por 2 minutos na solução de silano, posteriormente foram imersas em cubas com água destilada por duas vezes para retirada do excesso e finalmente dispostas em penal à temperatura ambiente e no dia seguinte colocadas em estufa onde permaneceram por no mínimo 24 horas à 37°C.

Com as lâminas silanizadas foram realizados cortes de 3µm do ventrículo esquerdo, sendo utilizado o kit “*Starr Trek Universal HRP Detection System*” para ambos os experimentos. O anti-Mastócito Humano – Code M7052 Mouse AA1 DAKO) 1/2000 foi usado para identificar mastócitos e para vasos

sanguíneos o anticorpo CD34 (anti-CD34 Humano – Code M7165 Mouse QBEnd-10 DAKO) 1/1400. As lâminas com os cortes passaram pela etapa de hidratação em sequências de álcool (dois banhos de 2 minutos em álcool absoluto, um banho de 2 minutos em álcool 95% e um banho de 2 minutos em álcool 70%). Posteriormente, foram lavadas duas vezes em solução de TBS (11,7g de TRIS e 17g de NaCl em 2 litros de água estando o pH entre 7,2 e 7,4 e adicionado 1 gota de Triton X-100 para cada litro de água) e deixadas por 2 minutos em água destilada morna (aquecida por um minuto em micro-ondas, 60°~70°C).

Seguiu-se com a recuperação antigênica que foi realizada utilizando tampão citrato (1,152g de ácido cítrico em 600ml de água destilada, pH 6,0) em banho maria por 20 minutos a 96°C. Depois de retiradas do banho, as lâminas permaneceram em tampão citrato por 20 minutos para resfriamento progressivo. Foram lavadas em TBS por 2 minutos e posteriormente, incubadas em solução de H₂O₂ a 3% diluída em TBS por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Seguiu-se a lavagem das mesmas em TBS por 2 minutos. O kit “*Starr Trek Universal HRP Detection System*” foi usado com uma solução de proteína bloqueadora padrão denominada “*Background Sniper*” na qual as lâminas permaneceram incubadas por 15 minutos.

Foram retirados os excessos das proteínas bloqueadoras e imediatamente as lâminas foram incubadas na solução do anticorpo primário. O período de incubação foi de 1 hora para mastócitos (1µl de anticorpo em 2000µl de PBS-BSA) e *overnight* para CD34 (1µl de anticorpo em 1400µl de PBS-BSA), sendo todos os anticorpos diluídos em solução de albumina. As sequências das reações se deu com a incubação dos anticorpos secundários kits: “*Link Universal Trekie [MACH4 Mouse Probe]*” seguido por “*TrekAvidin-HRP (Label) – [MACHA4MR HRP – Polymer]*” para o kit “*Starr Trek Universal HRP Detection System*”. Por fim, a reação foi revelada pela incubação em solução DAB por no máximo 3 minutos. A contra-coloração foi realizada em Hematoxilina por 50 segundos.

4.3.2 – Mastócitos

Para a quantificação do número de mastócitos, utilizou-se a técnica de imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-triptase e uma lâmina para cada caso. A quantificação dos mastócitos foi realizada no microscópio por meio da varredura de todos os campos da lâmina sob luz comum na objetiva de 40x. Após o registro da contagem, os dados foram organizados em uma planilha excel, utilizando-se a média de mastócitos por caso para obtenção da densidade por mm², sendo a área de cada campo igual a 0,1520mm².

4.3.3 - Vasos sanguíneos

Para a quantificação de vasos utilizou-se a técnica de imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal CD34, uma lâmina para cada caso. O número de campos para a quantificação de vasos sanguíneos foi definido pelo teste da média acumulada (Willians, 1979). Dessa maneira 30 campos foram obtidos em cada lâmina de forma aleatória usando marcação com caneta em todo o corte (Figura 3 C). As imagens foram capturadas sob luz comum e objetiva de 40x, em microscópio acoplado com uma câmera digital “*Leica DMC 2900*” e ao computador (Figura 3 A). Posteriormente, realizou-se a morfometria utilizando o programa software “*Image J 1.48v - National Institutes of Health, USA*” para obtenção do número de vasos sanguíneos (Figura 5). Em seguida, realizou-se a média de vasos sanguíneos de cada caso, para obtenção da densidade de vasos sanguíneos por área, sendo a área de cada campo igual a 0,020172mm².

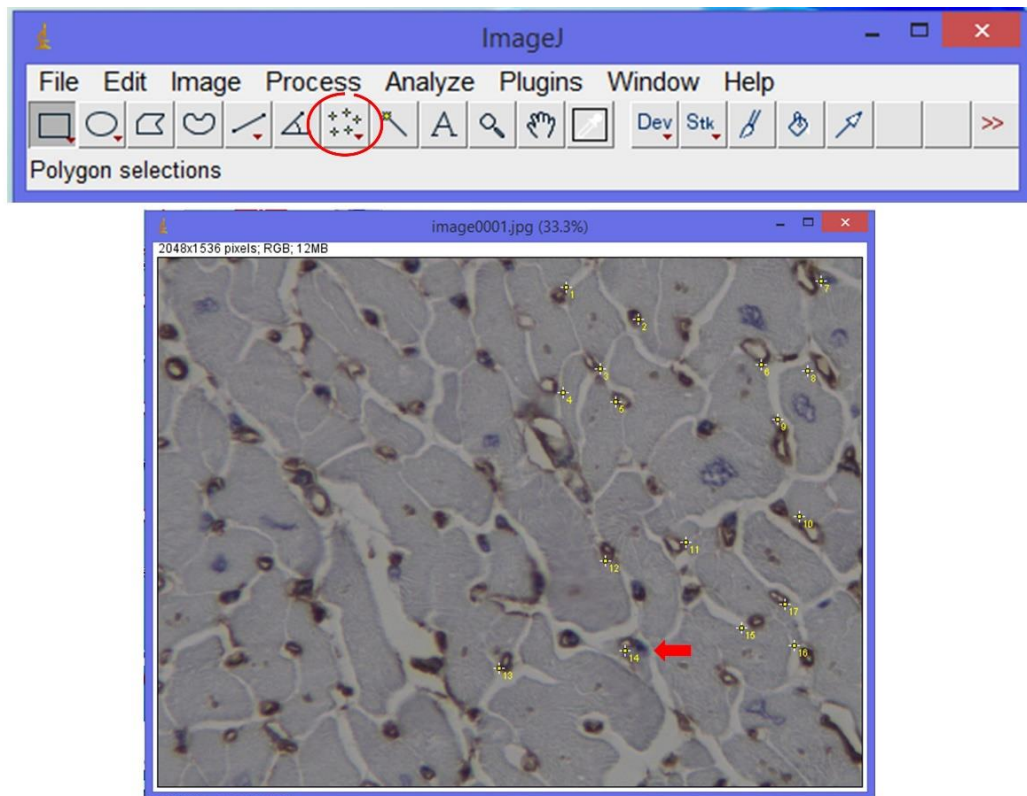


Figura 5 – Programa “*image J*” utilizado para contagem de vasos sanguíneos. O observador identifica os vasos sanguíneos (seta vermelha) e a marcação é identificada por números para a quantificação por campo.

4.5 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa “*SigmaStat2.03*”. As variáveis com distribuição normal, avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e variância homogênea foram comparadas pelo Anova (F) para comparação de mais de dois grupos, seguido pelo teste de Tukey. A correlação entre variáveis com distribuição normal foi analisada pelo teste de Pearson (r). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O estudo foi realizado com 21 indivíduos distribuídos em quatro grupos, sendo 62% masculinos, 52% eram idosos com idade média de $71 \pm 10,8$ anos e 48% não-idosos com idade média de $48 \pm 9,7$ anos (Tabela 1).

Tabela 1 – Características demográficas dos grupos de indivíduos portadores de cardiopatia chagásica crônica.

Características demográficas	Grupos			
	Idosos CC	Idosos SC	Não-idosos CC	Não-idosos SC
Idade (anos)	66,5 ± 4	79 ± 12	48,5 ± 11	46,5 ± 9
Peso cardíaco (g) - média	518 ± 184	299 ± 33	266 ± 33	271 ± 59
Relação Peso Cardíaco / Peso Corporal (%) - média	0,96 ± 0,28	0,54 ± 0,05	0,54 ± 0,06	0,54 ± 0,12
Sexo n (%)				
Feminino	---	3 (14)	2 (10)	3 (14)
Masculino	6 (28)	2 (10)	3 (14)	2 (10)
Cor n (%)				
Cor (branco)	4 (19)	3 (14)	5 (23)	1 (5)
Cor (não branco)	2 (10)	2 (10)	---	4 (19)

As características da síntese de colágeno no miocárdio entre os grupos de idosos e não-idosos com ou sem cardiopatia chagásica crônica podem ser observadas na figura - 6. Nos grupos de idosos e não-idosos com cardiopatia chagásica notou-se um aumento de colágeno no perimísio e endomísio mais espesso e denso. Também foi observado um aumento do colágeno difuso substituindo miocardiócitos devido à morte celular e associado a infiltrado mononuclear. A formação de fibrose nestes grupos ocorreu de forma desorganizada promovendo um desarranjo da matriz extracelular (*Figura 6 - a, c*). Nos grupos de idosos e não-idosos sem cardiopatia chagásica, observou-se a presença de colágeno mais delicado, contornando os miocardiócitos de forma ordenada com preservação da matriz estrutural do órgão (*Figura 6 - b, d*).

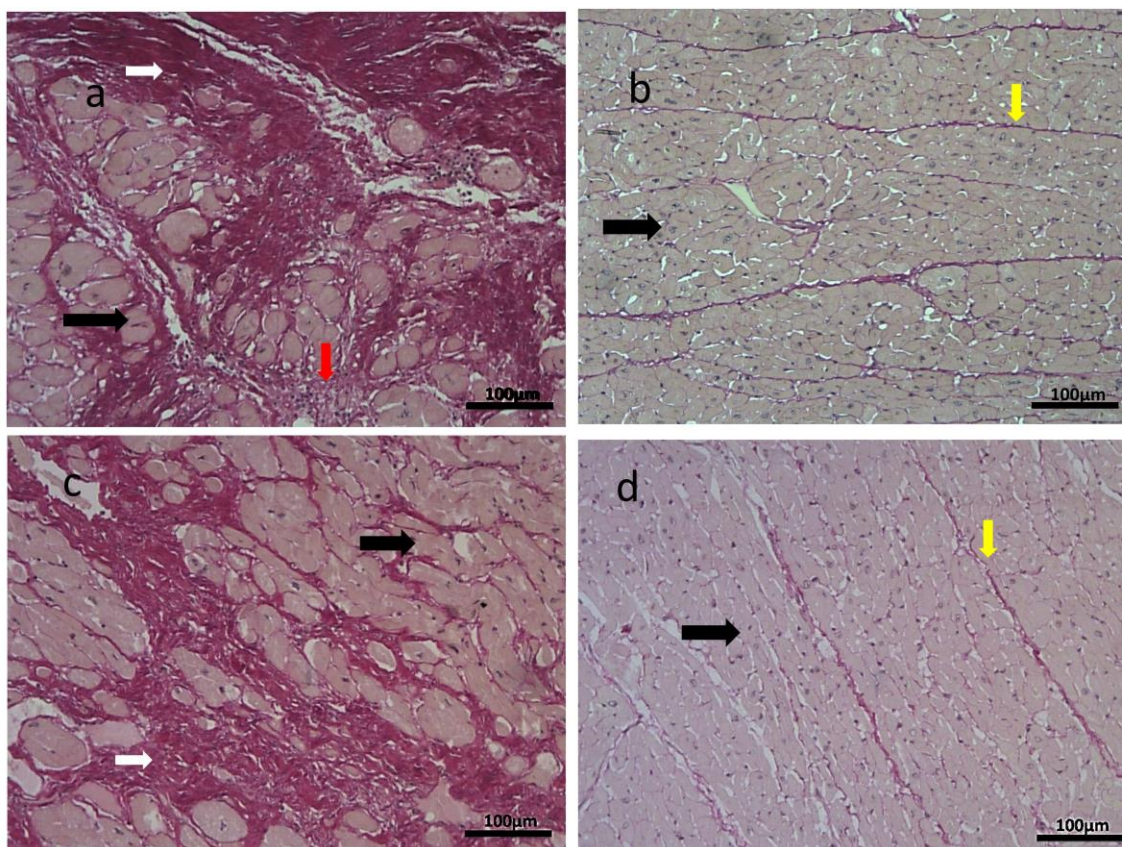


Figura 6 – Fotomicrografia representativa do colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo. Observa-se nos grupos de idosos CC em rosa escuro aumento de colágeno substituindo miocardiócitos (flecha-branca) associado a infiltrado inflamatório mononuclear (flecha vermelha) e miocardiócitos (flecha preta) (*Figura 6 a*); no grupo de idosos SC nota-se um colágeno perimesial (flecha amarela) acompanhando a matriz extracelular com miocardiócitos preservados (flecha preta) (*Figura 6 b*); Observa-se nos grupos de não-idosos CC em rosa escuro aumento de colágeno substituindo miocardiócitos (flecha-branca) e miocardiócitos (flecha preta) (*Figura 6 c*); no grupo de não-idosos SC nota-se um colágeno perimisial (flecha amarela) acompanhando a matriz extracelular, com miocardiócitos preservados (flecha preta) (*Figura 6 d*). (Picosirius, luz comum, objetiva 10x).

A porcentagem da média de colágeno no miocárdio do grupo de idosos CC apresentou maior percentual de colágeno em relação ao grupo de idosos SC, sendo a diferença significativa ($p = 0,003$) (Figura 7).

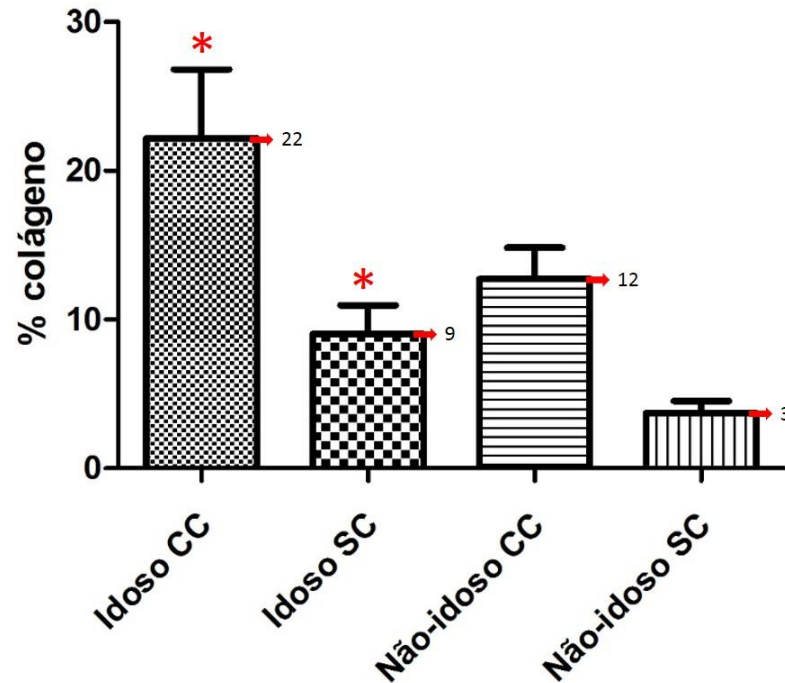


Figura 7 – Comparação da média de colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo entre idosos e não-idosos com ou sem cardiopatia chagásica.

Idoso CC: Idoso com cardiopatia chagásica; Idoso SC: Idoso sem cardiopatia chagásica; Não-idoso CC: Não-idoso com cardiopatia chagásica; Não-idoso SC: Não-idoso sem cardiopatia chagásica.

$F = 7,074$ $p = 0,003$.

Os mastócitos triptase positivos foram verificados em todos os grupos estudados com uma morfologia variável (ovalada, alongada ou arredondada) e com aspecto de degranulação (esfumaçado), sendo distribuídos em todo o miocárdio. Observou-se nos grupos de idosos CC e não-idosos CC uma maior quantidade de mastócitos, na maioria das vezes formando grupos próximos a focos de miocardite e/ou vasos sanguíneos, mas também isolados (Figura 8 - **a**, **c**). Nos grupos de idosos SC e não-idosos SC a quantidade de mastócitos foi menor, estes estavam mais isolados no miocárdio (Figura 8 - **b**, **d**).

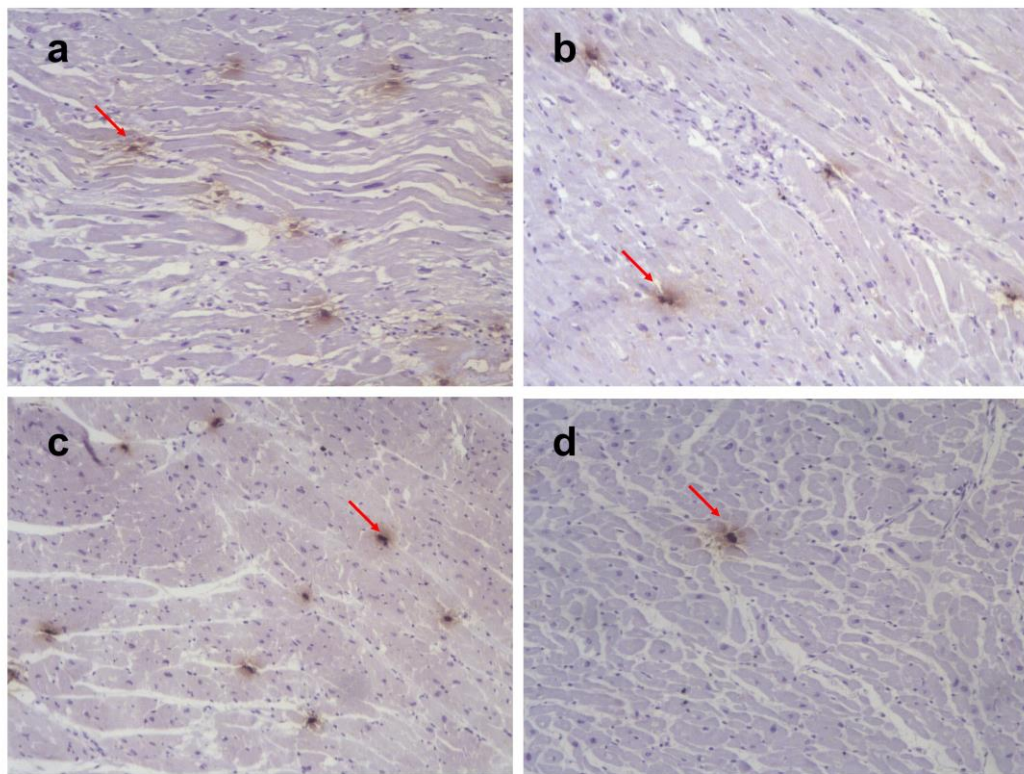


Figura 8 – Fotomicrografia do miocárdio do ventrículo esquerdo apresentando a imunoposição de mastócitos triptase positivos (flecha vermelha). No grupo de idosos CC observa-se um grupo de 9 mastócitos (**a**); no grupo de idosos SC observa-se 4 mastócitos mais isolados no miocárdio (**b**); no grupo de não-idosos CC observa-se um grupo de 5 mastócitos e 3 mais isolados (**c**); no grupo de não-idosos SC observa-se 1 mastócito isolado com miocárdio bem preservado (**d**). (anticorpo monoclonal *antitriptase*, objetiva 40X).

A densidade da média de mastócitos triptase positivos foi maior no grupo de idosos CC, porém não houve diferença significativa quando comparado com os outros grupos ($p = 0,226$) (Figura 9).

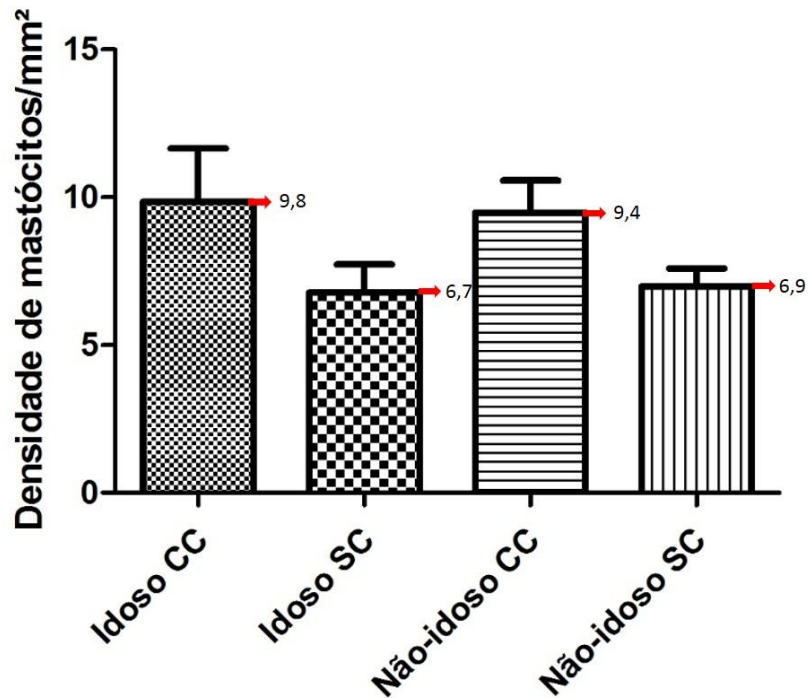


Figura 9 – Comparação da média da densidade de mastócitos triptase positivo no miocárdio do ventrículo esquerdo entre idosos e não-idosos com ou sem cardiopatia chagásica.

Idoso CC: Idoso com cardiopatia chagásica; Idoso SC: Idoso sem cardiopatia chagásica; Não-idoso CC: Não-idoso com cardiopatia chagásica; Não-idoso SC: Não-idoso sem cardiopatia chagásica.

$F = 1,602$ $p = 0,226$.

Em geral, os grupos de idosos CC e não-idosos CC apresentou uma menor quantidade de vasos sanguíneos associado a lesões do miocárdio. Nos grupos de idosos SC e não-idosos SC observou-se uma maior quantidade de vasos sanguíneos no miocárdio preservado (Figura 10).

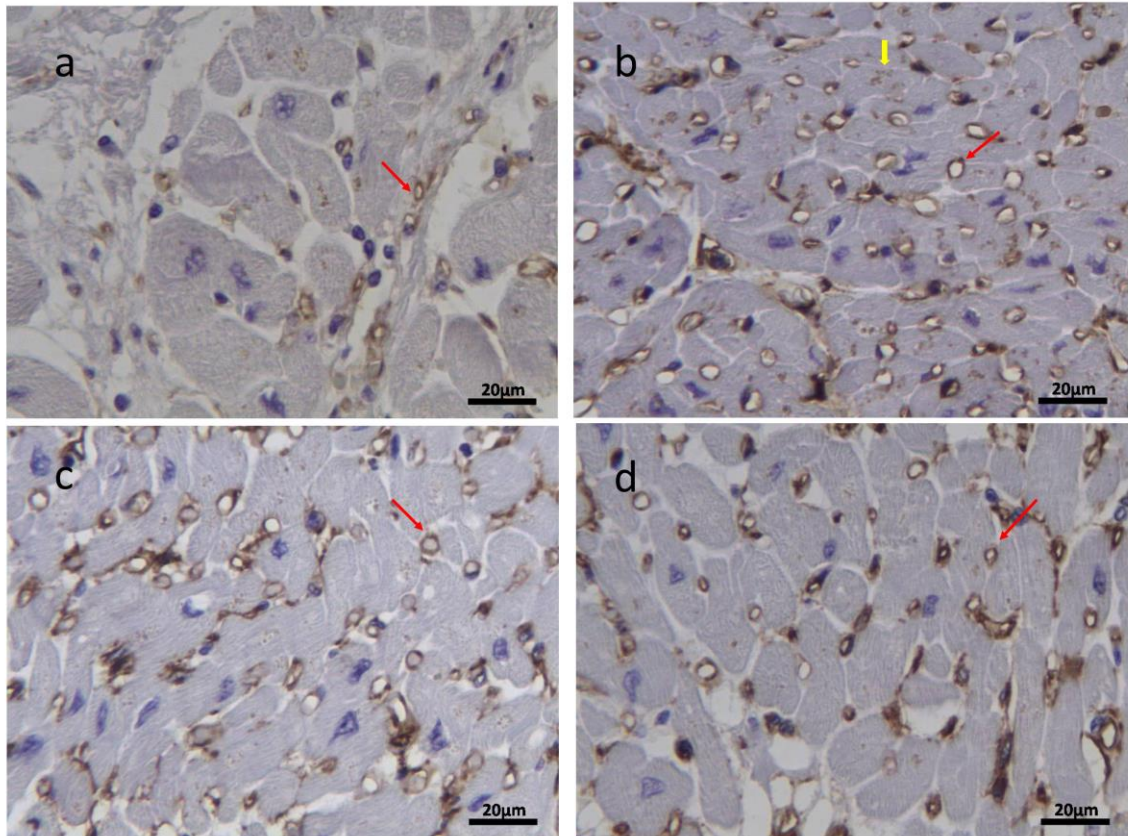


Figura 10 – Fotomicrografia do miocárdio do ventrículo esquerdo apresentando imunoexpressão de vasos sanguíneos (flecha vermelha). No grupo de idosos CC observa-se um menor número de vasos sanguíneos (Figura 10 - **a**); no grupo de idosos SC observa-se vasos sanguíneos e a presença de lipofuscina no citoplasma dos miocárdiocitos (flecha amarela) (Figura 10 - **b**); no grupo de não-idosos CC observa-se os vasos sanguíneos (Figura 10 - **c**); no grupo de não-idoso SC observa-se vasos com miocárdio mais preservado (Figura 10 - **d**). (anticorpo monoclonal CD34 objetiva 40X).

A densidade da média de vasos sanguíneos no grupo de idosos SC e não-idosos SC foi maior, porém não houve diferença significativa quando comparados aos outros grupos ($p = 0,224$) (Figura 11).

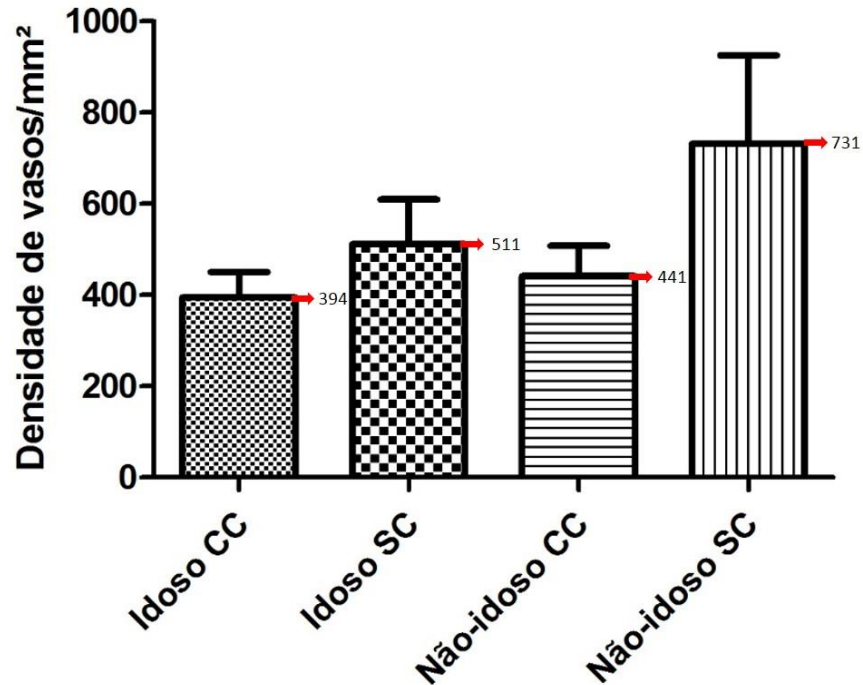


Figura 11 – Comparação da média da densidade de vasos sanguíneos no miocárdio do ventrículo esquerdo de idosos e não-idosos com ou sem cardiopatia chagásica.

Idoso CC: Idoso com cardiopatia chagásica; Idoso SC: Idoso sem cardiopatia chagásica; Não-idoso CC: Não-idoso com cardiopatia chagásica; Não-idoso SC: Não-idoso sem cardiopatia chagásica.

$F = 1,620$ $p = 0,224$.

No grupo de idosos CC foi observado uma correlação positiva entre a porcentagem de colágeno e a densidade de mastócitos. Entretanto, não significativa ($p = 0,419$) (Figura 12).

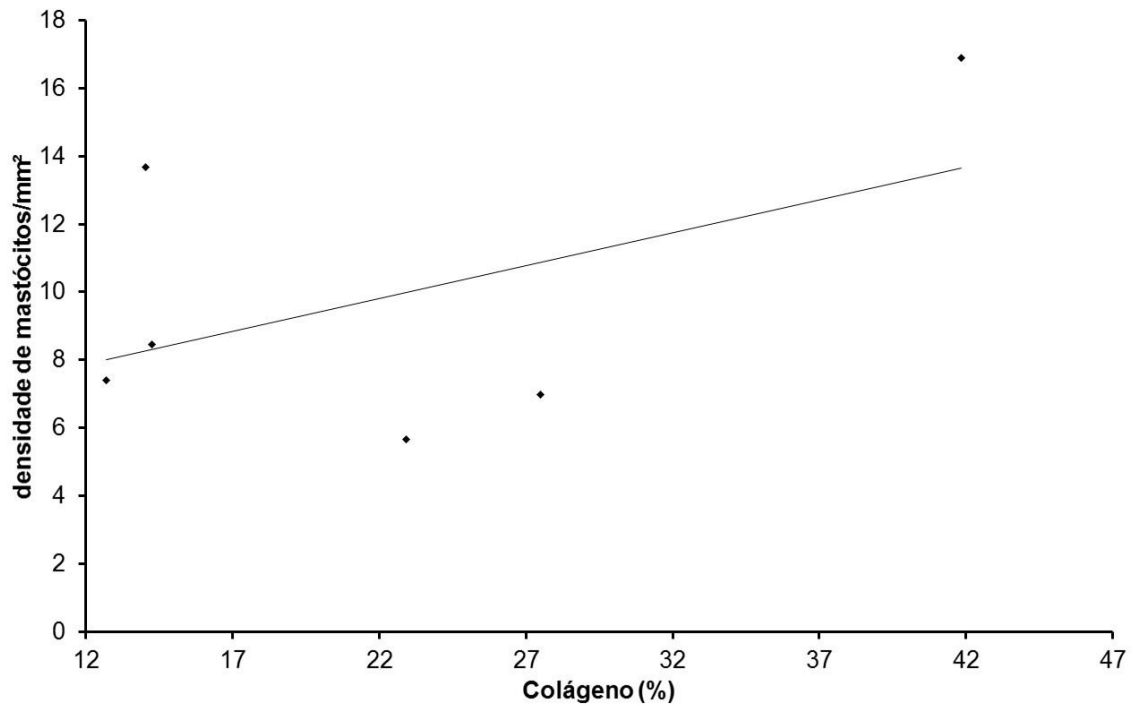


Figura 12- Correlação entre a porcentagem de colágeno e a densidade de mastócitos no ventrículo esquerdo do grupo de idosos CC ($r = 0,475$; $p=0,419$).

No grupo de idosos CC notou-se uma correlação negativa entre a porcentagem de colágeno e a densidade de vasos sanguíneos. Entretanto, esta correlação não foi significativa ($p = 0,352$) (Figura 13).

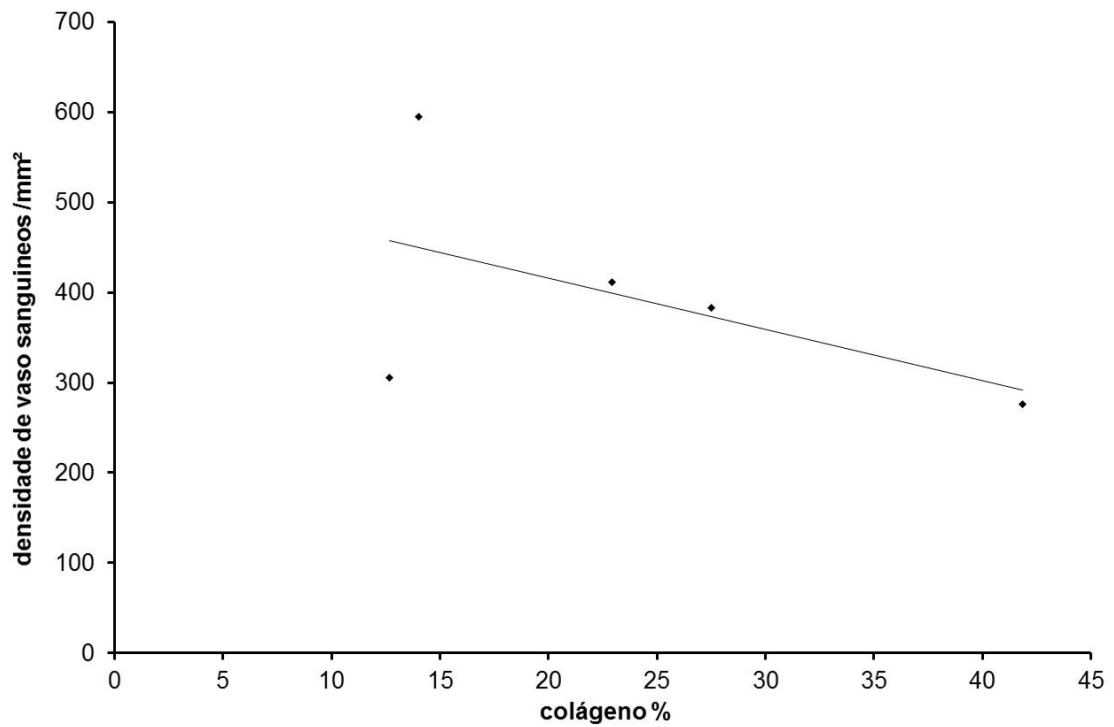


Figura 13 - Correlação entre a porcentagem de colágeno e a densidade de vasos sanguíneos no ventrículo esquerdo do grupo de idosos CC ($r = - 0,536$; $p = 0,352$).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado nos grupos com cardiopatia chagásica crônica um aumento de colágeno mais espesso e denso no perímio e endomímio. Além de áreas difusas de colágeno substituindo miocardiócitos no interstício, associado a infiltrado inflamatório mononuclear, estes resultados foram semelhantes ao descrito por Rossi, 1998. Nos grupos sem cardiopatia chagásica crônica observou-se feixes de colágeno fino e delicado no endomímio e perímio, mantendo a morfologia estrutural da matriz extracelular. Estas características são condizentes ao processo fisiológico do envelhecimento demonstrado por Debessa *et al.*, 2001.

A porcentagem de colágeno no grupo de idosos CC ($22,2\% \pm 11,2\%$) e idosos SC ($9,03\% \pm 4,2\%$) estão condizentes com os estudos abaixo, em indivíduos portadores de cardiopatia chagásica, mas sem o enfoque no idoso. Milei *et al.*, 1996 realizou biópsia endomiocárdica em seres humanos com cardiopatia chagásica crônica e encontrou uma porcentagem de colágeno correspondente a $24,1\% \pm 12,8\%$. Já Rossi, 1998 comparou a fibrose formada no miocárdio de indivíduos chagásicos autopsiados ($30,7\% \pm 8,8\%$) com grupo controle de indivíduos não-chagásicos ($6,5\% \pm 1,6\%$). No entanto, uma porcentagem inferior de colágeno no miocárdio chagásico ($2,66\% \pm 3,3\%$) e não chagásico ($1,46\% \pm 0,78\%$) foi relatada por Roldão *et al.*, 2012, neste estudo foi utilizado a luz polarizada, enquanto os outros estudos citados acima usaram luz comum.

No grupo de idosos CC observou-se um aumento de colágeno significativo em relação aos demais grupos. Este resultado está relacionado com a remodelação da matriz extracelular devido à destruição progressiva dos miocardiócitos predispondo o indivíduo à insuficiência cardíaca e arritmias cardíacas (Rassi Jr *et al.*, 2009). Na cardiopatia chagásica crônica, a fibrose, provavelmente, é desencadeada em resposta a lesões como inflamação, necrose e isquemia que associadas com a hipertrofia gera a dilatação dos ventrículos (Machado *et al.*, 2012). Além disso, durante o processo de envelhecimento ocorre um acréscimo fisiológico na síntese de colágeno com

alterações morfológicas e estruturais que colaboram com o declínio funcional do coração (Biernacka & Frangogiannis, 2011).

A densidade de mastócitos no grupo de idosos CC foi maior em relação aos demais grupos, mas sem diferença significativa. Resultados semelhantes foram relatados por Almeida *et al.*, 1975 que verificou um número maior de mastócitos em corações de portadores de cardiopatia chagásica e Pinheiro *et al.*, 2003 encontrou um maior número de mastócitos em portadores de chagas com megacólon, porém sem enfoque no idoso. Outros estudos experimentais também demonstram um aumento do número de mastócitos na infecção com *T. cruzi* em outros órgãos, como um estudo em camundongos na fase crônica que apresentou um aumento do número de mastócitos na musculatura do intestino (Tafurie e Brener, 1967) e na pele de camundongos infectados com *T. cruzi* (Menezes e Alcântara, 1965).

No grupo de idosos CC houve uma correlação positiva entre a porcentagem de colágeno e a densidade de mastócitos, mas não significativa. Em um estudo envolvendo a língua de indivíduos chagásicos e não-chagásicos autopsiados observou-se uma correlação positiva significativa quando correlacionado a fibrose com a densidade de mastócitos (Pereira *et al.*, 2007). Roldão *et al.*, 2012 estudou pacientes autopsiados e relacionou maior densidade de mastócitos com maior intensidade de fibrose nos indivíduos com doença de chagas quando comparados aos indivíduos sem a doença. Por outro lado, Pinheiro *et al.*, 1992 em estudo experimental sugerem que o aumento do número de mastócitos no miocárdio de ratos está associado à infecção aguda pelo *T. cruzi* e não à miocardite crônica fibrosante.

Conforme os resultados apresentados, possivelmente, a participação dos mastócitos no grupo de idosos CC pode influenciar no aumento da formação de fibrose. Sabe-se que os mastócitos podem exercer funções imunomoduladoras positivas influenciando no recrutamento, na sobrevivência, desenvolvimento, fenótipo e função das células do sistema imune (Galli *et al.*, 2008). Os mastócitos liberam mediadores químicos que estimulam o processo inflamatório (Garbuzenko *et al.*, 2002) e a produção de colágeno por fibroblastos induzidos por TNF- α e TGF- β (Yamamoto *et al.*, 2001). De fato, os mastócitos podem

liberar mediadores que estimulam fibroblastos e colaboram com o processo de fibrose por liberar mediadores pré-formados, tais como histamina, proteoglicano, enzimas proteolíticas, e citocinas fibrogênicas como PDGF, TNF- α , TGF- β (Farahani *et al.*, 2010). Além disso, os mastócitos produzem a IL-13 (Wynn, 2008), que atua na multiplicação de células incluindo os fibroblastos, bem como na inflamação e fibrose. Esta interleucina pode estimular a produção e ativação de TGF- β , produção de colágeno, expressão de metaloprotéínas, proliferação de fibroblasto e diferenciação de miofibroblastos (Fuschiotti, 2011; Fuschiotti *et al.*, 2013).

A densidade de vasos sanguíneos no grupo de idosos CC foi menor quando comparada aos demais grupos, mas não significativa. Este resultado, pode estar associado com o processo inflamatório crônico da cardiopatia chagásica crônica devido a danos microvasculares, incluindo ativação de plaquetas, microtrombos, espasmos microvasculares e disfunção endotelial (Rossi, 1990; Rassi Jr *et al.*, 2009). Tais eventos colaboram com a desorganização tecidual e com o desarranjo da matriz extracelular, dificultando o transporte de nutrientes necessário para a sobrevivência celular. Possivelmente, este fato colabore com a regressão dos vasos sanguíneos apresentado no resultado do grupo de idosos CC. Além do mais, a matriz extracelular fornece suporte básico para a proliferação, sobrevivência, migração de células endoteliais e regula as principais fases da morfogênese do vaso sanguíneo e sua maturação (Senger *et al.*, 2011).

No grupo de idoso CC a correlação entre a porcentagem de colágeno e a densidade de vasos sanguíneos foi negativa, mas não significativa. A angiogênese tem como função fornecer oxigênio e nutrientes a matriz extracelular e células adjacentes (Fraist *et al.*, 2009; Guedes-da-Silva *et al.*, 2015). Porém, a formação de fibrose predispõe a apoptose de células endoteliais favorecendo a regressão de vasos sanguíneos aumentando ainda mais o desenvolvimento desta fibrose (Johnson & Dipietro, 2013). Uma correlação positiva entre o número de mastócitos triptase e a densidade de vasos sanguíneos foi verificada em cicatrizes de quelóides, sugerindo que os mastócitos triptase podem contribuir na angiogênese (Ammendola *et al.*, 2013).

Além do mais, em camundongos infectados com *T. cruzi* na fase aguda, os antígenos da cepa são capazes de promover a neovascularização induzida provavelmente pela resposta inflamatória por mediadores pró-angiogênicos (Guedes-da-Silva *et al.*, 2015).

Portanto, no processo de formação de fibrose os mastócitos participam liberando mediadores químicos, que contribuem com angiogênese e a síntese de colágeno. Porém, quanto mais intensa a fibrose, maior a possibilidade de regressão de vasos sanguíneos associado a lesões microvasculares e ao processo de remodelação do coração em indivíduos idosos portadores de cardiopatia chagásica crônica.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que os indivíduos idosos com cardiopatia chagásica crônica apresentaram um aumento de colágeno significativo, com uma maior densidade de mastócitos e menor densidade de vasos sanguíneos, porém não significativos. Provavelmente, estes resultados estão relacionados com a etiopatogênese das lesões miocárdicas na cardiopatia chagásica crônica durante o envelhecimento.

REFERÊNCIAS

ABUHAB, A.; TRINDADE, E.; AULICINO, G.B.; FUJII, S.; BOCCHI, E.A.; BACAL F. Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. **Int J Cardiol.** V. 168, p. 2375-2380, 2013.

ALMEIDA, E.A.; BARBOSA NETO, R.M.; GUARIENTO, M.E.; WANDERLEY, J.S.; SOUZA, M.L. Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. *Revista da Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V. 40, n. 3, p. 311-315, 2007.

ALMEIDA, H.O; PEREIRA, F.E.L; TAFURI, W.L Estudo Quantitativo dos mastócitos na cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** V. 17, n. 1, p.5 -9, jan-fev. 1975.

ALVES, R.M.A.A.; THOMAZ, R.P.; ALMEIDA, E.A.; WANDERLEY, J.S.; GUARIENTO, M.E. Chagas' disease and ageing: the coexistence of other chronic diseases with Chagas' disease in elderly patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V. 42, n. 6, p. 622-628, 2009.

AMMENDOLA, M.; ZUCCALA, V.; PATRUNO, R.; RUSSO, E.; LUPOSELLA, M.; AMOROSI, A.; GIUSEPPINA VESCOIO, G.; SAMMARCO, G.; MONTEMURRO, S.; SARRO GB SACCO, R.; RANIERI, G. Tryptase-positive mast cells and angiogenesis in keloids: a new possible post-surgical target for prevention. **Springer Italia.** V. 65, p.53–57, 2013.

AMORIM, D.S.; MARIN-NETO, J.A. Functional alterations of the autonomic nervous system in Chagas' heart disease. **São Paulo Med J.** v. 113, p. 772-783, 1995.

ANDRADE, S. G.; PIMENTEL, A. R.; DE SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg.** V. 63, p. 64-70, 2000.

ANDRADE, S.G.; GRIMAUD, J.A.; STOCKER-GUERRET, S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *T. cruzi*. **Am J Trop Med Hyg,** v.40, p. 252-260, 1989.

ANDRADE, Z.A.. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 94, n. 1 p. 71-80, 1999.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. The pathology of Chagas' disease (cardiac chronic form). **Bol Fund G Moniz.** V.6, p. 1–53. 1955.

- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **Am Heart J**. v. 93, p. 316, 1978.
- BAROLDI, G.; OLIVEIRA, S.J.; SILVER, M. D. Sudden and unexpected death in clinically 'silent' Chagas' disease. A hypothesis. **Int J Cardiol** v. 58, p. 263-268, 1997.
- BARRETO, M.; ANDRADE, M.E.B. Impacto da infecção chagásica sobre algumas características demográficas. Resultados de um estudo ecológico. **Cadernos de Saúde Pública** v. 10, p. 273-280, 1994.
- BETELLI, R.B.; RAMOS, C.P.; GODOY, R.A.; OLIVEIRA, J.S. Chronic Chagas heart disease in the elderly: a clinicopathologic study. **Cardiology**. V.74 (5), p. 344-351, 1987.
- BIERNACKA, A.; FRANDOGIANNIS, N.G. Aging and Cardiac Fibrosis. **Aging and Disease** v. 2, n. 2, p. 158-173, 2011.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N. Chagas Cardiomyopathy – Where Do We Stand After a Hundred Years? **Progress in Cardiovascular Diseases**; v. 52, p. 300-316, 2010.
- BRANDAN, E.; CABELLO-VERRUGIO, C.; VIAL, C. Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. **Matrix Biol**, v. 27, p. 700-708, 2008.
- BOCHSLER P.N.; SLAUSON, D.O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3. Ed. St Louis: Mosby, Cap. 4. P. 140-245, 2002..
- CASTILLO-RIQUELME, M.; GUHL, F.; TURRIAGO, B. The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. **PloS Negl Trop Dis**, v. 2, p. 336, 2008.
- CAMPOS, M.A.; GAZZINELLI, R.T. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. **Mediators Inflamm**. V. 13, p. 139–143, 2004.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, V. 9, p.663-660, 2003.
- CARVALHO FILHO, E.T.; FIGUEIRA, J.L.; PASINI, U.; FORTI, N.A.; CURIATI, J.A.E.; FERREIRA, M.L.M.; SERRO, L.G. Aspectos da doença de Chagas no idoso. **Arq Bras Cardiol**. V. 45(2), P. 103-107, 1985.
- CENCETTI, F.; BERNACCHIONI, C.; NINCHERI, P.; DONATI, C.; BRUNI, P. Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts. **Via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis. Molecular biology of the cell**, v. 21, p. 1111-1124, 2010

- CHAGAS, C. Nova espécie ciência do homem, produzida por um trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*). **Brazil Médico**. V. 22, 1909.
- CHANG, H.Y.; SNEDDON, J.B.; ALIZADEH, A.A.; SOOD, R.; WEST, R.B.; MONTOMERY, K.; CHI, J.T.; VANDERI, J.N.M.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. **PLoS Biol** v. 2, p.7, 2004
- CHAPADEIRO, E.; BERALDO, P.S.S.; JESUS, P.C.; OLIVEIRA JR, W.P.; JUNQUEIRA JR, L.F. Lesões cardíacas em ratos Wistar inoculados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev Soc Bras Med Tropical**. V. 21, p. 95-103, 1988.
- CHEN, M.A. Heart failure with preserved ejection fraction in older adults. *Am J Med*. V. 122, p. 713–723, 2009.
- COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 102 (Suppl. I), p. 113-122, 2007.
- COURA, J.R.; DIAS, J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 104 (Suppl 1) p. 31-40, 2009.
- CUNHA-NETO, E.; BILATE, A.M.; HYLAND, K.V. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**. V. 39, p. 41-54, 2006.
- CUNHA-NETO, E.; NOGUEIRA, L.G.; TEIXEIRA, P.C.; RAMASAWNY, R.; DRIGO, S.A.; GOLDBERG, A.C.; FONSECA, S.G.; BILATE, A.M.; KALIL, J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. V. 104, sup. 1, p. 252-258, 2009.
- DEBESSA, C.R.G.; MAIFRINO, L.B.M.; SOUZA, R.R. Age related changes of the collagen network of the human heart. **Mechanisms of Ageing and Development**. V. 122, n. 10, p. 1049-1058, 2001.
- DIAS, J.C. Chagas disease: transmission control. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 104 (Suppl 1I), p. 41-45, 2009.
- DIAS, J.C.P. Natural history of Chagas' disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 65, p. 359–366, 1995.
- DIAS, J.C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Rev Soc Bras Med Trop**. V.41(2), p. 193-6, 2008.
- DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Endothelial Cell Apoptosis in Angiogenesis and Vessel Regression. *Circulation*. V. 87, p. 434-439, 2000.

- FARAHANI, S.S.; NAVABAZAM, A.; ASHKEVARI, F.S.; Comparison of mast cells count in oral reactive lesions. **Pathology – Research and Practice**. V. 206 p. 151-155, 2010.
- FRAISL, P.; MAZZONE, M.; SCHMIDT, T.; CARMELIET, P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. **Dev. Cell**. V.16, p. 167–179, 2009.
- FRANCISCO, P.M.S.B.; DONALÍSIO, M.R.; BARROS, M.B.A.; CÉSAR, C.L.G.; CARANDINA, L.; GOLDBAUM, M. Fatores associados à doença pulmonar em idosos. **Revista de Saúde Pública**. V. 40, p. 428-435, 2006.
- FRANCO-PAREDES, C.; VON, A.; HIDRON, A. Chagas disease: na impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. **BMC Int Health Hum Rights**, v.7, p. 7, 2007.
- FUSCHIOTTI, P.; LARREGINA, A.T.; HO, J.; FEGHALI-BOSTWICK, C.; MEDSGER, T.A.Jr. Interleukin-13 producing CD8+T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**. V. 65, p. 236–246, 2013.
- FUSCHIOTTI, P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. **Cytokine**. V. 56, p.544–549, 2011.
- GALLI, S.J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, 2008.
- GALLI, S.J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M.A.; PILIPONSKY, A.M.; WILLIAMS, C.M.; TSAI, M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 749–86, 2005.
- GARBUZENKO, E.; NAGLER, A.; PICKOLTZ, D.; GILLERLY, P.; REICH, R.; MAQUART, F.X.; LEVI-SCHAFFER, F. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cell skin fibrosis. **Clin Exp Allergy**. V. 32, p. 237-246, 2002.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.J.; Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**. V. 115, v. 1-2, p. 22-27, 2010.
- GUARIENTO, M.E.; CARRIJO, C.M.; ALMEIDA, E.A.; MAGNA, L.A. Perfil clínico de idosos portadores de doença de Chagas atendidos em serviço de referência. **Rev Bras Clin Med**.v. 9, n. 1, jan-fev, p. 20-24, 2011.
- GUEDES-DA-SILVA, F.H.; SHRESTHA, D.; SALLES, C.B.; FIGUEIREDO, V.P.; LOPES, R.L.; DIAS, L.; BARCELOS.; BARCELOS, L.S.; MOURA, S.; ANDRADE, S.P.; TALVANI, A. *Trypanosoma cruzi* antigens induce inflammatory angiogenesis in a mouse subcutaneous sponge model. **Microvascular Research**. v. 97, p. 130-136, 2015.
- HARTLAPP, I.; ABE, R.; SAEED, R.W.; PENG, T.; VOELTER, W.; BUCALA, R.; METZ, C. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB J**. v. 15, p. 2215–2224, 2001.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; REIS, M.M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res** v. 60, p. 96-107, 2003.

HIGUCHI, M.L.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** v. 423, p. 157-160, 1993.

HIGUCHI, M.L. Human Chronic Chagasic Cardiopathy: participation of Parasite Antigens, Subsets of Lymphocytes, Cytokines and Microvascular Abnormalities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 94, Suppl. I: 263-267, 1999.

HIGUCHI, M.L. O parasita e a patogenia da forma crônica da doença de Chagas. **Arq Bras Cardiol**. V. 64, n. 3, p. 251-254, 1995.

KAHALEH, M.B. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. **Arthritis Rheum**. V. 34, p. 978-983, 1991.

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S.J. New developments in mast cell biology. **Nature Immunology**. V. 9, n. 11, p. 1215-1223, 2008.

KAPELUSZNIK, L.; VARELA, D.; MONTGOMERY, S.P.; SHAH, A.N.; STEURER, F.J.; RUBINSTEIN, D.; CAPLIVSKI, D.; PINNEY, S.P.; TURKER, D.; FACTOR, SH. Chagas disease in latin cience immgrants with dilated cardiomyopathy in New York city. **Clin Infect Dis**. V. 57, n.1, p. 7-10, 2013.

KÖBERLE, F. Pathogenesis of Chagas' disease. **Ciba Found Symp**, v. 20, p. 137-152, 1974.

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

KOVACS EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immunol Today**. V. 12, p. 17-23, 1991.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. **Mol Immunol**. V. 48, p. 14-25, 2010.

JOHNSON, A.; DIPIETRO, L.A. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis. **Fabeb journal**. V. 27, n. 10, p. 3893-3901, 2013.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NOBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study. **Circulation**. V.14, v.6, p. 1035-1059, 1956.

LAPPALAINEN, H.; LAINE, P.; MARKKU, O.; PENTIKA, I.; SAJANTILA, A.; KOVANEN, T.P. Mast Cells in Neovascularized Human Coronary Plaques Store

and Secrete Basic Fibroblast Growth Factor, a Potent Angiogenic Mediator. **American Heart Association**. V. 24, p. 1880-1885, 2004.

LEME, A.M. *et al.* Evaluation of the metabolism of high energy phosphates in patients with Chagas' disease. **Arq. Bras. Cardiol.** V. 95, p. 264–270, 2010.

LIMA-COSTA, M.F.; BARRETO, S.M.; GIATTI, L. Condições de saúde, capacidade funcional, uso de serviços de saúde e gastos com medicamentos da população idosa brasileira: um estudo descritivo baseado na Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. **Cadernos de Saúde Pública**. V.19, p. 735-743, 2003.

LIMA-COSTA, M.F.; BARRETO, S.M.; GUERRA, H.L.; FIRMO, J.O.A.; UCHOA, E.; VIDIGALA, P.G. Ageing with *Trypanosoma cruzi* infection in a community where the transmission has been interrupted: the Bambuí Health and Ageing Study (BHAS). **International Journal of Epidemiology**. V. 30, p. 887-893, 2001.

LIMA-COSTA, M.F.; FIRMO, J.O.A.; UCHOA, E. Cohort Profile: The Bambuí (Brazil) Cohort Study of Ageing. **International Journal of Epidemiology**. V. 40, p. 862–867, 2011.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de chagas humana. In. DIAS, J.C.P.; COURA, JR. (org). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro, Fiocruz, p. 486, 1997.

MACHADO, F.S.; DUTRA, W.O.; ESPER, L.; GOLLOB, K.J.; TEIXEIRA, M.M.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; NAGAJYOTHI, F.; TANOWITZ, H.B.; GARG, N.J. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol.** V. 34, p. 753–770, 2012.

MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.; MESTRINER, F.L.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**. V. 102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.

MALTBY, S.; KHAZAIE, K.; MCNAGNY, K.M. Mast cells in tumor growth: Angiogenesis, tissue remodelling and chemomodulation. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1796, p. 19-26, 2009.

MANGONE, C.A.; SICA, R.E.P.; PEREYRA, S.; GENOVESE, O.; SEGURA, E.; RIARTE, A.; SANZ, O.P.; SEGURA, M. Cognitive impairment in human chronic Chagas' disease. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** V. 52, n. 2, 1994.

MANN, C.; PERDIGUERO, E.; KHARRAZ, Y.; AGUILAR, S.; PESSINA, P.; SERRANO, A.L.; MUNOZ-CANOVES, P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Open Access**. V. 1:21, 2011.

- MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMOES, M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**. V. 115, p. 1109-1123, 2007.
- MARIN-NETO, J.A.; MARZULLO, P.; MARCASSA, C.; GALLIO JUNIOR, L.; MACIEL, B.C.; BELLINA, C.R.; L'ABBATE, A. Myocardial perfusion defects in chronic Chagas' disease. Assessment with thallium-201 scintigraphy. **Am J Cardiol**. V. 69, p. 780-784, 1992.
- MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A. JR.; MACIEL, B.C.; SIMOES, M.V.; SCHMIDT, A. Chagas heart disease. In: YUSUF, S.; CAIRNS, J.A.; CAMM, A.J.; FALLEN, E.L.; GERSH, B.J (Ed.). Evidence-based cardiology, 3 ed. London: BMJ Books, p. 823-841. 2010.
- MARTINS- MELO, F.R.; ALENCAR, C.H.; RAMOS, A.N.JR.; HEUKELBACH, J. Epidemiology of Mortality Related to Chagas Disease in Brazil, 1999-2007. **National Institutes of Health**. V. 6, p. 1508, 2012.
- MCNEIL, H.P. The mast cell and inflammation. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**. Sydney. V. 26, p. 216-225, 1996.
- MEKORI, Y.A.; METCALFE, D.D. Mast cell-T cell interaction. **J. Allergy Clin. Immunol**. V.104, p. 517-523, 1999.
- MENEGELLI, U.G.; EJIMA, F.H.; SILVA L.R. Evidências do declínio da ocorrência do megaesôfago e do megacólon chagásicos. **Estudo epidemiológico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Medicina**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 218-224, 1991.
- MENEZES, H.; ALCANTARA, F.G. Os mastócitos da pele de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. **O Hospital**. V. 68, p. 187-190, 1965.
- METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiological Reviews**. V. 77, p. 1033-1079, 1997.
- METZ, M.; SIEBENHAAR, F.; MAURER, M. Mast cell functions in the innate skin immune system. **Immunobiology**. V. 213, p. 251-260, 2008.
- METZ, M.; GRIMBALDESTON, M.A.; NAKAE S., PILIPONSKY, M.; TSAI, M.; GALLI, S.J. Mast cells in yhr promotion and limitation of chronic inflammation. **Immunological Reviews**. V. 217, p.304-328, 2007.
- MEUSER-BATISTA, M.; CORREA, J.R.; SOARES, M.J.; HENRIQUES-PONS, A. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue and Cell**. V. 40, n. 5, p. 309-316, 2008.
- MILEI, J.; ALONSO, G.F.; VANZULLI, S.; STORINO, R.; ROSSI, L. Myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic cardiomyopathy: Immunohistochemical findings . **Cardiovascular Pathology**. V. 5, n. 4, p. 209-219, 1996.

NORRBY, K. Mast cells and angiogenesis. **APMIS** v. 110, p. 355–371, 2002.

NUNES, M.C.P.; DONES, W.; MORILLO, C.A.; ENCINA, J.J.; RIBEIRO, A.L. Chagas Disease an Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology**. V. 62, p.767-776, 2013.

NUNES, M.C.; BARBOSA, M.M.; RIBEIRO, A.L.; COLOSIMO, E.A.; ROCHA, M.O. Left atrial volume provides independent prognostic value in patients with chronic cardiomyopathy. **J. Am. Soc. Echocardiogr**, v. 22, p. 82–88, 2009.

OLIVEIRA, F.A.; TEIXEIRA, V.P.A.; LINO JUNIOR, R.S.; VINAUD, M.C.; REIS, M.A. Aspectos macroscópicos da cardiopatia chagásica crônica no envelhecimento. *Arq. Bras. Cardiol.* V.88, n.4, p. 486-490, 2007.

OVERED-SAYER, C.; RAPLEY, L.; MUSTELIN, T.; CLARKE, D.L. Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? **Frontiers in PHARMACOLOGY**. V. 4:174, 2014.

OSTERMAYER, A.L.; PASSOS, A.D.C.; ANTÔNIO CARLOS SILVEIRA, A.C.; FERREIRA, A.W.; MACEDO, V.; PRATA, A.R. The National Survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001-2008). **Suplemento II**. V.44, p. 108-121, 2011.

PATRUNO, R.; ARPAIA, N.; GADALETA, C.D.; PASSANTINO, L.; ZIZZO, N.; MISINO, A.; LUCARELLI, N.M.; CATINO, A.; VALERIO, P.; RIBATTI, D.; RANIERI, G.; VEGF concentration from plasma activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. **J Cell Mol Med** v. 13, n. 3, p. 555–561, 2009.

PEREIRA, F.E.L. Estudo quantitativo dos mastócitos na musculatura do esôfago de chagásicos crônicos. **Rev Soc Bras Med Tropical de São Paulo**. V. 14, p. 30-32, 1972.

PEREIRA, J.B.; WILCOX, H.P.; COURA, J.R. The evolution of chronic chagasic cardiopathy: the influence of parasitemia. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 25, p. 101–108, 1992.

PEREIRA, L.S.; FREITAS, E.C.; FIDALGO, A.S.O.B.V.; ANDRADE, M.C.; CÂNDIDO, D.S.; FILHO, J.D.S.; ILOWSKY, V.M.; OLIVEIRA, M.F.; QUEIROZ, J.A.N. Clinical and epidemiological profile of elderly patients with chronic disease followed between 2005-2013. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. V. 57(2), p. 145-152, 2015.

PEREIRA, S.A.deL.; SANTOS, V.M.; RODRIGUES, D.B.R.; CASTRO E.C.daC.; REIS, M.A.; TEIXEIRAS, V.P.A. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. **Médecine et maladies infectieuses**. V. 37, p. 229-233, 2007.

PEREIRA, J.B.; SARQUIS, O.; ZAUZA, P.L.; BRITO, C.; MARLI, M.L. Epidemiologia da doença de Chagas em quatro localidades rurais de Jaguaruana, Estado do Ceará. Soroprevalência da infecção, parasitemia e

aspectos clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.41(4), p. 345-351, 2008.

PINHEIRO, M.C.N.; BERALDO, P.S.S.; JUNQUEIRA, L.F.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Análise quantitativa de mastócitos e de granulócitos eosinófilos no miocárdio de ratos wistar cronicamente infectados pelo *trypanosoma cruzi*. Contribuição ao conhecimento da fibrose miocárdica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 25(1), p. 45-50, 1992.

PINHEIRO, S.W. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V. 36, n. 4, 2003.

PONCE, C.C.; CHAUFFAILLE, M.L.L.F.; IHARA, S.S.; SILVA, M.R. Increased angiogenesis in primary myelofibrosis: latent transforming growth factor- β as a possible angiogenic factor. *Rev Bras Hematol Hemoter.* V. 36, n. 5, p. 322-328, 2014.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v.1, p. 92–100, 2001.

PUNOKOLLU, G.; GOWDA, R.M.; KHAN, I.A.; NAVARRO, V.S.; VASAVADA, B.C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**. V. 115, n. 3, p. 279-283, 2007.

RANIERI, G.; AMMENDOLA, M.; PATRUNO, R.; CELANO, G.; ZITO, F.A.; MONTEMURRO, S.; RELLA, A.; DI LECCE, V.; GADALETA, C.D.; BATISTA DE SARRO, G.; RIBATTI, D. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. **International Journal of Oncology**. V. 35:(1), p. 115-120, 2009.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas heart disease. **Clin Cardiol**. V. 23, p. 883–889, 2000.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem inst Oswaldo Cruz**. V.104, p. 152-158, 2009.

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

REGUEIRO, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, A.; SITGES, M.; ORTIZ-PÉREZ, J.T., CARALT, M.T.; PINAZO, M.J.; POSADA, E.; HERAS, M.; GASCÓN, J.; SANZ, G. Myocardial involvement in Chagas disease: Insights from cardiac magnetic resonance. **International Journal of Cardiology**, v. 16, p. 107–112, 2013.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.L.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. **Rev Soc Bras Med Tropical**. V.33, n. 6, p. 509-518, 2000.

RESENDE, R.P.A.L.; CARNEIRO, F.C.A.; FERREIRA, C.D.B.; SILVA, G.A.R.; SILVA, D.J.V.; PRATA, A.; CORREIRA, D. Análise temporal da variabilidade da frequência cardíaca no estado basal em idosos chagásicos na forma indeterminada em área endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 36(6), p 703-706, 2003.

RIBATTI, D.; PRESTA, M.; VACCA, A.; RIA, R.; GIULIANI, R.; DELL'ERA, P.; NICO, B.; RONCALI, L.; DAMMACCO, F. Human erythropoietin induces a proangiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. **Blood**. V.93, n. 8, p. 2627–2636, 1999.

RIBATTI, D.; RANIERI, G.; NICO, B.; BENAGIANO, V.; CRIVELLATO, E. Tryptase and chymase are angiogenic in vivo in the chorioallantoic membrane assay. **Int J Dev Biol**. V. 55, n. 1, p 99–102, 2011.

RIBEIRO, A.L.; MORAES, R.S.; RIBEIRO, J.P.; FERLIN, E.L.; TORRES, R.M.; OLIVEIRA, E.; ROCHA, M.O. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. **Am Heart J**. v.141, n.6, p. 260-265, 2001.

RIBEIRO, A.L.; NUNES, M.P.; TEIXEIRA, M.M.; ROCHA, M.O. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**. V. 9, p. 576–589, 2012.

RIBEIRO, A.L.; ROCHA, M.O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. V. 31, n. 3, p. 301-314, 1998.

RISAU, W.; FLAME, I. Vasulogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol**. V.11, p. 73-91, 1995.

ROCHA, M.O.C.; CORREIA, P.C.; BARROS, M.V.L.; TORRES, ROSÁLIA M.T.; ANTÔNIO L.P.; TEIXEIRA, M.M. Cardiovascular function in elderly patients with chronic chagasic cardiopathy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. V. 36, n. 5, p. 545-550, 2003.

ROCHITTE, C.E. *et al.* Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. **Artif. Organs** v. 31, p. 259–267, 2007.

ROLDÃO, J.A.; BEGHINI, M.; RAMALHO, L.S.; PORTO, C.S.; RODRIGUES, D.B.; TEIXEIRA, V.P.; DE LIMA PEREIRA, S.A. Comparison between the collagen intensity and mast cell density in the lingual muscles and myocardium of autopsied chronic chagasic and nonchagasic patients. **Parasitol Res**. V. 111, n. 2, p. 647-654, 2012.

ROSSI, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. **International Journal of Cardiology**. V. 66, n. 2, p. 183-194, 1998.

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

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

ROSSI, M.A.; TANOWITZ, H.B.; MALVESTIO, L.M.; CELES, M.R.; CAMPOS, E.C.; BLEFARI, V.; PRADO, C.M. Coronary Microvascular Disease in Chronic Chagas Cardiomyopathy Including an Overview on History, Pathology, and Other Proposed Pathogenic Mechanisms. **PloS Negl Trop Dis.** V. 4, n. 8, p. e678, 2010.

SAKAI, S.; MIYAUCHI, T.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI, I.; GOTO, K.; SUGISHITA, Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. **Nature.** V. 384, p. 353–355, 1996.

SANTOS, R.R.; HUDSON, L. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Clin Exp Immunol.** V. 44, p. 349–354, 1981.

SANTOS, R.R.; MARQUEZ, J.O.; FURTADO, C.C.G.; OLIVEIRA, J.C.R.; MARTINS, A.R.; KÖBERLE, F. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. **Tropenmed Parasitol.** V. 30, p. 19–23, 1979.

SCOTT, M.A.; STOCKHAM, S.L. Basophils and Mast Cells. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's: Veterinary hematology.** 5. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 48. P. 308-317. 2000.

SCOTTON, C.J.; CHAMBERS, R.C. Molecular targets in cardiac fibrosis: the myofibroblast in focus. **Chest.** V. 132, p. 1311–1321, 2007.

SENGER, D.R., DAVIS, G.E. Angiogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2011.

SILVA, H.C.; ARAS, R.; GALDAME, A.M.A.; MARTINEZ-SILVEIRA, M.S.; GRASSI, M.F.R.; SILVA, R.J.; CARVALHO, R.B.; BASTOS, C.J.C.; Avaliação clínica na atenção primária e infectologia dos pacientes com doença de chagas na forma crônica. **Revista Baiana de saúde pública.** V.37, p. 7-21, 2013.

SIMÕES, M.V.; SOARES, F.A.; MARIN-NETO, J.A. Severe myocarditis and esophagitis, during reversible long standing Chagas' disease recrudescence in immunocompromised host. **Int J Cardiol.** V.49, p. 272–273, 1995.

SOMASUNDARAN, P.; REN, G.; NAGAR, H.; KRAEMER, D.; MENDOZA, L.; MICHAEL, L.H.; CAUGHEY, G.H.; ENTMAN, M.L.; FRANGOGIANNIS, N.G. Mast cell tryptase may modulate endothelial cell phenotype in healing myocardial infarcts. **J Pathol** v. 205, p. 102–111, 2005.

SOUSA, A.C.; MARIN-NETO, J.A.; MACIEL, B.C.; GALLO-JUNIOR, L.; AMORIM, D. S.; BARRETO-MARTINS, L.E. Systolic and diastolic dysfunction in the indeterminate, digestive and chronic cardiac forms of Chagas' disease. **Arq Bras Cardiol** v. 50, p. 293–299, 1988.

TAFURI, W.L.; BRENER, Z. Lesões dos plexos de Meissner e de Auerbach do intestino do camundongo albino na fase crônica da tripanossomíase cruzi experimental. **Rev Inst Med Tropical de São Paulo.** V.9, p. 149-154, 1967.

- TANOWITZ, H.B.; KAUL, D.K.; CHEN, B.; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. **J Parasitol.** V. 82, p. 124-130, 1996.
- TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol.** V.18, p. 262–265, 2002.
- THEOHARIDES, T.C.; CONTI, P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. **Trends Immunol.** V. 25, p. 235–241, 2004.
- TORRES, C.M. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 36, p. 391-404, 1941.
- WEI, C.M.; LERMAN, A.; RODEHEFFER, R.J.; MCGREGOR, C.G.; BRANDT, R.R.; WRIGHT, S.; HEUBLEIN, D.M.; KAO, P.C.; EDWARDS, W.D.; BURNETT JR, J.C. Endothelin in human congestive failure. **Circulation.** V. 89, p. 1580–1586, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** First WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, p. 172-184, 2010.
- WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol.** V. 214, p. 199-210, 2008.
- YAMAMOTO, T.; HARTMANN, K.; ECKES, B.; KRIEG, T. Role of stem cell factor and monocyte chemoattractant protein-1 in the interaction between fibroblasts and mast cells in fibrosis. **Journal of dermatological science.** V. 26, n. 2, p. 106-11, 2001.
- ZHU, J.; LI, Y.; SHEN, W.; QIAO, C.; AMBROSIO, F.; LAVASANI, M.; NOZAKI M.; BRANCA, M.F.; HUARD, J. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. **J Biol Chem,** v. 282, p. 25852-25863, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar – Bairro Nossa Senhora da Abadia
38029-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854
E-mail: cep@pesqmg.ufim.edu.br

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: "AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA FIBROSE MIOCÁRDICA EM IDOSOS AUTÓPSIADOS PORTADORES DE CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA"
PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: MARLENE ANTÔNIA DOS REIS
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 04/04/2013
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2629

PARECER

De acordo com as disposições da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM considera o protocolo de pesquisa **aprovado**, na forma (redação e metodologia) como foi apresentado ao Comitê.

Conforme a Resolução 196/96, o pesquisador responsável pelo protocolo deverá manter sob sua guarda, pelo prazo de no mínimo cinco anos, toda a documentação referente ao protocolo (formulário do CEP, anexos, relatórios e/ou Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLE assinados, quando for o caso) para atendimento ao CEP e/ou à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Toda e qualquer alteração a ser realizada no protocolo deverá ser encaminhada ao CEP, para análise e aprovação.

O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início da realização do projeto.

Uberaba, 07 de junho de 2013.

Prof.^a  Ann Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP/UFTM