

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

DELMA MARIA CUNHA

O ESTUDO DOS AUTOANTICORPOS
ANTIRRECEPTORES B1 E ANTI-M2 NA
CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

Rio de Janeiro

2012

TESE

DPCDI-IPEC

CUNHA, D.M.

2012

O ESTUDO DOS AUTOANTICORPOS ANTIRRECEPTORES B1 E ANTI-M2 NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

DELMA MARIA CUNHA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas na área de Concentração Cardiologia e Infecção, para obtenção do grau de Doutor do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, sob a orientação do Prof. Dr. Ademir Batista da Cunha e Prof^a. Dr^a. Patrícia dos Santos Costa

Rio de Janeiro

2012

DELMA MARIA CUNHA

**O ESTUDO DOS AUTOANTICORPOS
ANTIRRECEPTORES B1 E ANTI-M2 NA
CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas na área de Concentração Cardiologia e Infecção, para obtenção do grau de Doutor do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Orientadores: Prof. Dr. Ademir Batista da Cunha e Prof^a. Dr^a. Patrícia dos Santos Costa

Banca Examinadora

Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho
Instituto Nacional de Cardiologia (Presidente)

Prof. Dr. Fernando E. S. Cruz Filho
Instituto Nacional de Cardiologia (Membro)

Prof. Dr. Daniel A. Kopiler
Instituto Nacional de Cardiologia (Membro)

Prof. Dr. Wolney de Andrade Martins
Universidade Federal Fluminense (Membro e Revisor)

Prof^a Dr^a. Márcia Bueno Castier
Universidade Estadual do Rio de Janeiro (Membro)

Dr. Vitor Manuel Ferreira Azevedo
Instituto Nacional de Cardiologia (Suplente)

DEDICATÓRIA

In Memoriam: Geraldo Batista da Cunha. Ainda me pergunto sobre a natureza da sua sabedoria, mas posso dizer que inspirou irmãos, amigos, alunos, visto que mestre já o era, mas a naturalidade era dos sábios.

In Memoriam: Crispim Elias da Cunha. “Poderoso é o silêncio da pedra e poderosa é a linguagem que sabe ser silêncio, pedra, mantendo o poder da soberana poesia”.

A minha mãe Geraldina Batista Cunha. Meu pai Juarez Cunha (*in memoriam*) pelo amor e carinho dedicado à família.

Ao Pedro Cunha Tzirulnik cuja sensibilidade como ser humano desperta em mim o significado da existência.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o resultado de um desejo muito especial, em que a intuição precisou tomar forma, discernir símbolos e significados e ser permeada por emoção, pensamento concreto e intelecto. As idéias nele contidas reúnem muita energia, coragem e desprendimento. Meus sinceros agradecimentos às pessoas que me acompanham ao longo do tempo, ou mesmo fora desse tempo. Certamente, todos contribuíram de alguma forma para a finalização dessa tarefa.

Ao Professor Antonio Carlos Campos de Carvalho, chefe do Serviço de Ensino e Pesquisa do INC, pelo seu elevado espírito científico, permitindo a realização desse trabalho, fato que proporcionou a possibilidade de desenvolver o projeto, além de inúmeras sugestões importantes durante a realização dessa pesquisa.

Ao Professor Armando de Oliveira Schubach, chefe do Serviço do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas que muito contribuiu e estimulou a pesquisa clínica no INC.

Ao Professor Ademir Batista da Cunha, meu orientador, amigo, incansavelmente esteve ao meu lado, contribuindo com sua experiência e ao mesmo tempo me proporcionando liberdade de ação e pensamento.

A Professora Patrícia Cristina dos Santos Costa minha co-orientadora, pelo espírito de amizade, pela paciência diante das minhas dúvidas e pela influência na correção do trabalho.

O Professor Fernando E. S. Cruz Filho, chefe do Serviço de Arritmia e Eletrofisiologia do INC que apoiou este trabalho desde a fase inicial, quando era apenas um projeto, o meu especial agradecimento.

Ao Professor Daniel A. Kopiler que muito contribuiu com sua experiência, orientando durante todos os seminários, fazendo considerações pertinentes e se colocando sempre a disposição para ajudar.

A Rosângela Noé estatística da UFRJ pela orientação constante desde o início do projeto até sua finalização.

A César A. S. Nascimento, chefe do Serviço de Ecocardiografia, durante o período da realização desse estudo, que muito contribuiu juntamente com sua equipe, na realização dos exames ecocardiográficos.

A Luiz Henrique Loyola da Cunha, médico do serviço de Arritmias que apresentou imensa contribuição em situações referentes a implante de marca passos e análise de arritmias.

A Neyla Durães Fernandes que não mediu esforços para repetidamente localizar prontuários, exames realizados, o que muito contribuiu para a organização dos dados.

A Pedro Cunha Tzirulnik, acadêmico de medicina, filho, sensível, atento, participou ativamente de todas as questões referentes à pesquisa, desde a compreensão do projeto, pesquisa bibliográfica e fechamento dos resultados finais. A Danton Machado Cunha, acadêmico de medicina, amigo, compreensivo, participou da pesquisa com interesse científico contribuindo em várias etapas do processo de elaboração desse trabalho.

A Berenice Cunha Weaver, Amanda Cunha Weaver e George Weaver, familiares que souberam entender a minha ausência, visto que o amor e a confiança são sentimentos que compartilhamos ao longo do tempo.

a minha ausência, visto que o amor e a confiança são sentimentos que compartilhamos ao longo do tempo.

A Aline Machado Cunha, acadêmica de medicina que mesmo distante participou das idéias que envolvem uma pesquisa clínica e suas abnegações.

A Diogo Moraes Nolasco, acadêmico de medicina sempre disposto à colaborar participou no preenchimento de dados e localização de exames.

A Dalbian Simões Gasparino, acadêmico de medicina, contribuiu com interesse nas etapas de coleta de dados e exames.

A Pedro Augusto Gori Lima, acadêmico de medicina, participou com entusiasmo e acompanhou várias etapas da pesquisa.

A Nena Coelho, professora de português, sempre atenta e paciente às necessidades de mudanças e ordem no texto.

A Hilza Maria Alfredo amiga de longa data que nunca mediu esforços para ajudar, pessoa que sempre contei e que acredito não existirem outras com tanta disposição, carinho e afeto. Expresso aqui minha eterna gratidão.

A Tatiana Presto Coutinho pela sua amizade, responsabilidade com todas as tarefas a ela designadas, sempre atenta e perfeccionista.

A Ludymilli Tainá Avelino da Costa responsável, objetiva. Sempre paciente em justificar minha ausência, quando interesses referentes à pesquisa me faziam mudar agenda e horários. Muito obrigada.

A Michelle Moraes e Karina Vaz, pela atenção dispensada no período. Grata.

“Para que de fato se possa falar da racionalização da experiência, não basta que se encontre uma razão para um fato. A razão é uma atividade psicológica essencialmente politrópica: procura revirar os problemas variá-los, ligar uns aos outros, fazê-los proliferar. Para ser racionalizada, a experiência precisa ser inserida num jogo de razões múltiplas”.(1-Bachelard, 1996, p.51)

Cunha, D.M. **O ESTUDO DOS AUTOANTICORPOS ANTIRRECEPTORES B1 E ANTI-M2 NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA.** Rio de Janeiro, 2012, 133f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Cardiologia e Infecção] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Fundamentos: A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) compromete 20 a 30 % dos indivíduos infectados. No Brasil, 2 a 3 milhões de pessoas estavam infectadas até 1980 e na América Latina 18 milhões de pessoas. Dados mais recentes da OMS (1991) mostram que esse número diminuiu para 11 milhões até 1990. Um dos mecanismos propostos para explicar o dano miocárdico na CCC é o autoimune. Objetivos: Relacionar a titulação dos anticorpos anti β 1 e anti M2 com função ventricular esquerda, disautonomia e arritmias cardíacas. Metodologia: Estudo transversal com 64 pacientes portadores de CCC confirmada sorologicamente por Elisa e Hemaglutinação. A titulação dos anticorpos anti- β 1 e anti-M2 foi obtida pelo imunoensaio ELISA. A análise da função ventricular esquerda foi feita pelo ecocardiograma através da fração de ejeção (FE) pelo método de Simpson. As arritmias cardíacas foram avaliadas pelo Holter cardíaco de 24 h assim como a disautonomia (variabilidade da frequência cardíaca). O teste ergométrico avaliou disautonomia (queda da frequência cardíaca no primeiro minuto de recuperação) e desempenho cardíaco durante o esforço. O eletrocardiograma de alta resolução (ECGAR) avaliou o potencial arritmogênico em pacientes sem distúrbios de condução ao eletrocardiograma (ECG). Resultados: Holter de 24h: existe uma correlação inversa significativa entre a titulação de anti- β 1 com o SDNN index de 2 às 6h ($r_s = -0,313$; $p = 0,041$; $n=43$) e uma correlação direta significativa entre a titulação do anti- M2 com SDANN de 2 às 6h ($r_s = 0,317$; $p = 0,039$; $n=43$). Teste ergométrico: observou-se correlação direta significativa entre a titulação anti- β 1 e o duplo produto ($r_s=0,371$; $p=0,005$, $n=56$). O subgrupo com resposta cronotrópica normal apresentou titulação anti- β 1 significativamente maior que o subgrupo com resposta cronotrópica deprimida ($p = 0,023$). O subgrupo com resposta inotrópica normal apresentou titulação anti-M2 significativamente maior que o subgrupo com resposta inotrópica deprimida ($p=0,044$). Ecocardiograma: FE (Simpson) não correlacionou significativamente com anti-B1 e anti-M2 ($r_s = 0,045$; $p = 0,73$; $n=62$), ($r_s = -0,036$; $p = 0,78$), respectivamente. ECGAR: RMS >20 e LAS <38 não mostrou correlação significativa de RMS com as titulações de anti- β 1 ($r_s = -0,268$; $p = 0,26$; $n=18$) e anti-M2 ($r_s = -0,121$; $p = 0,63$; $n=18$) e de LAS com anti- β 1 ($r_s = 0,006$; $p = 0,98$; $n=18$) e anti-M2 ($r_s = 0,059$; $p = 0,82$; $n=18$). ECG: titulação de anti- β 1 e anti- M2 foram significativamente maiores no grupo com Fibrilação atrial (FA) que no grupo sem FA ($p=0,01$) e ($p=0,029$) respectivamente. O subgrupo com ritmo cardíaco sinusal apresentou anti-M2 significativamente menor que o subgrupo sem ritmo cardíaco sinusal ($p = 0,035$). Análise multivariada: o Duplo Produto ($p=0,016$) foi variável independente, ao nível de 5%, para titulação anti- β 1. SDANN de 2 às 6h ($p=0,13$) foi variável independente ao nível de 15% para explicar a titulação de anti-M2. Conclusões: Os anticorpos anti- β 1 correlacionam de forma inversa e significativa com o SDNN index e o SDANN ao Holter de 24h no período de 2 às 6h, de forma direta com duplo produto ao teste ergométrico, resposta cronotrópica e com

fibrilação atrial ao ECG. Os anticorpos anti-M2 correlacionam diretamente com o SDNN index e SDANN ao Holter, com a resposta inotrópica normal ao teste ergométrico e com a fibrilação atrial ao ECG. Análise multivariada: o duplo produto é variável independente (5%) para anti- β 1 e SDANN(15%) é variável independente para anti- M2.

Palavras- Chaves: 1. Autoanticorpos 2. Cardiopatia chagásica 3. Disautonomia.

Cunha, D.M. **THE STUDY OF ANTI- β 1 AND ANTI-M2 RECEPTORS AUTOANTIBODIES IN CHRONIC CHAGAS' CARDIOPATHY.** Rio de Janeiro, 2012, 133f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Cardiologia e Infecção] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Fundamentals: The chronic chagas' cardiopathy (CCC), whose etiologic agent is the *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), commits 20 to 30 % of the infected subjects. In Brazil, 2 to 3 million people were infected until 1980 and, in Latin America, 18 million people. More recent data from OMS (1991) showed that this number decreased to 11 million until 1990. Thus, one of the mechanisms proposed to explain the myocardial damage is auto-immunity. **Objectives:** To relate anti- β 1 and anti-M2 antibodies titration with left ventricular function, dysautonomia and cardiac arrhythmias. **Methodology:** Cross-sectional study with 64 patients serologically confirmed by ELISA and He- magglutination to have CCC. The titration of the anti- β 1 and anti-M2 antibodies was obtained by ELISA. The analysis of the left ventricular function was performed by echocardiography using the ejection fraction (EF) by the Simpson method. The cardiac arrhythmias were evaluated by 24h Holter and so was the dysautonomia (HEART RATE Variability). The stress test was used to evaluate the dysautonomia (heart rate recovery at the first minute) and the cardiac performance during stress. The signal-average electrocardiogram (SAECG) was used to study the arrhythmogenic potential in patients without conduction disturbances at the electrocardiogram (ECG). **Results:** 24h Holter: there is a significant inverse correlation between the anti- β 1 antibodies titration and SDNN index from 2 to 6h ($r_s = -0.313$; $p = 0.041$; $n = 43$). Also, there is a significant direct correlation between the anti-M2 antibodies titration and SDANN from 2 to 6h ($r_s = 0.317$; $p = 0.039$; $n = 43$). StressTest: we observed a significant direct correlation between the anti- β 1 and the Double Product ($r_s = 0.371$; $p = 0.005$, $n = 56$). The subgroup with normal chronotropic response showed significantly higher anti- β 1 titration than the one with depressed chronotropic response ($p = 0.023$). The subgroup with normal inotropic response showed significantly higher anti-M2 titration than the subgroup with depressed inotropic response ($p = 0.044$). **Echocardiography:** EF (Simpson) had no significant correlation with anti- β 1 and anti-M2 antibodies ($r_s = 0.045$; $p = 0.73$; $n = 62$), ($r_s = -0.036$; $p = 0.78$), respectively. **SAECG:** RMS >20 and LAS <38 didn't show significant correlation between the RMS and the anti- β 1 ($r_s = -0.268$; $p = 0.26$; $n = 18$) and anti-M2 ($r_s = -0.121$; $p = 0.63$; $n = 18$) titration, and neither between LAS and both, anti- β 1 ($r_s = 0.006$; $p = 0.98$; $n = 18$) and anti-M2 ($r_s = 0.059$; $p = 0.82$; $n = 18$), titrations. **ECG:** anti- β 1 and anti-M2 antibodies titrations were significantly higher in the group with atrial fibrillation (AF) than in the one without AF ($p = 0.01$ and $p = 0.029$, respectively). The subgroup with sinus cardiac rhythm showed anti-M2 antibodies titration significantly lower than the subgroup without ($p = 0.035$). **Multivariate Analysis:** the Double Product ($p = 0.016$) was the independent variable, at the level of 5%, for the anti- β 1 titration. SDANN from 2 to 6h ($p = 0.13$) was the independent variable, at the level of 15%, to explain the anti-M2 titration. **Conclusion:** The anti- β 1 antibodies significantly inversely correlate with the SDNN index and the SDANN at the 24h Holter in the period of 2 to 6h, and directly with the double product at the stress test, chronotropic response and atrial fibrillation at the ECG. The anti-M2 antibodies directly correlate with the SDNN index and SDANN at the Holter, with a normal

inotropic response at the stress test and with atrial fibrillation at the ECG. Multivariate analysis: the double product is the independent variable (5%) for anti- β 1 and SDANN (15%) is the independent variable for anti-M2

Keywords: 1. Autoantibodies, 2. Chagas cardiopathy, 3. Dysautonomia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi | 19 |
| Figura 2 | Receptor muscarínico A – Subunidades e B - Domínios presentes em cada subunidade: N-terminal hidrofílico (a), quatro segmentos hidrofóbicos transmembrana (b), domínio hidrofílico variável (c), C-terminal hidrofílico (d) e alças intracelulares formando sítios de fosforilação (e). Adaptada de Ventura ALM, Rev. Psiquiatr. Clín. 37(2), 2010 | 39 |
| Figura 3 | Modelo de distribuição do receptor β -adrenérgico | 42 |
| Figura 4 | Metodologia – Fluxograma | 59 |
| Figura 5 | Determinação do ponto de corte para os ensaios de ELISA | 61 |
| Figura 6 | Dados epidemiológicos | 68 |
| Figura 7 | Classificação da HAS e exame físico | 69 |
| Figura 8 | Classificação da Insuficiência Cardíaca | 70 |
| Figura 9 | Titulação dos anticorpos anti- β 1 e anti-M2 | 71 |
| Figura 10 | Alterações eletrocardiográficas categóricas | 72 |
| Figura 11 | Correlação Anti- β 1 com SDNN index – Holter 24 h | 78 |
| Figura 12 | Correlação Anti-M2 com SDNN index – Holter 24 h | 79 |
| Figura 13 | Correlação de Anti- β 1 com duplo produto - TE | 79 |
| Quadro 1 | Parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca | 63 |
| Figura 1 | Características gerais da Coorte | 68 |
| Tabela 16 | Correlação entre a titulação de anti-M2 e variáveis categóricas ao TE | 81 |
| Tabela 17 | Titulação de Anti- β 1 segundo as variáveis categóricas ao ECG | 81 |
| Tabela 18 | Titulação anti M2 segundo as variáveis categóricas ao ECG | 82 |
| Tabela 19 | Correlação com as titulações Anti- β 1 e anti-M2 com ECGAR. | 82 |
| Tabela 20 | Titulações de anti- β 1 e anti-M2 e função ventricular - ECO | 82 |
| Tabela 21 | Titulações de anti- β 1 e anti-M2 – Escore - ECOCARDIOGRAMA | 83 |
| Tabela 22 | Titulações de anti- β 1, anti-M2, variáveis do HOLTER e TE - Função sistólica ao ecocardiograma | 83 |
| Tabela 23 | Análise de Regressão Múltipla para a titulação Anti- β 1 | 84 |
| Tabela 24 | Análise de Regressão Múltipla para a titulação M2 | 84 |

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh = Acetilcolina
ACV = Aparelho cardiovascular
AL = Anticorpos lútricos
Anti- β 1 = Antirreceptores β 1 adrenérgicos
Anti-M2 = Antirreceptores muscarínicos M2
AMPc = Monosfosfato de adenosina cíclico
APCs = Células apresentadoras de antígenos
ATP = Trifosfato de adenosina
BRD = Bloqueio de ramo direito
BRE = Bloqueio de ramo esquerdo
CCC = Cardiopatia chagásica crônica
CDI = Cardiomiopatia dilatada de causa idiopática
Cx-43 = Conexina 43
DNS = Doença do nó sinusal
ECGAR = Eletrocardiograma de alta resolução
ECG = Eletrocardiograma
ECO = Ecocardiograma
FA = Fibrilação atrial
FC = Frequência cardíaca
Gap = Junções comunicantes
G_s = Proteína G estimulatória
G_i = Proteína G inibitória.
GDP = Difosfato de guanosina
GMPc = Guanosina monofosfato cíclico
GPI = Glicosil-fosfadil-inusitol
GTP = Trifosfato de guanosina
HAS = Hipertensão arterial sistêmica
HBAE = Hemibloqueio anterior esquerdo
ICC = Insuficiência cardíaca congestiva
IFN γ = Interferon gama

IL = Interleucina
INC = Instituto Nacional de Cardiologia
IVE = Insuficiência ventricular esquerda
LAS = Sinais de baixa amplitude
MHC = Complexo maior de histocompatibilidade
NK = Natural killer
PCR = Reação em cadeia de polimerase
PLC = Fosfolipase C
PKA = Proteína cinase A
SNA = Sistema nervoso autônomo
SNC= Sistema nervoso central
SNP = Sistema nervoso periférico
TCLE= Termo de consentimento livre e esclarecido
T.cruzi = *Trypanosoma cruzi*
TGF- β = Fator de crescimento de transformação β
TNF α = Fator de necrose tumoral α
TE = Teste ergométrico
TS = Trans-sialidase
TV = Taquicardia ventricular
TVS = Taquicardia ventricular sustentada
TVNS = Taquicardia ventricular não sustentada
VD = Ventrículo direito
VE = Ventrículo esquerdo
VFC = Variabilidade da frequência cardíaca
WHO = World Healty Organization
JNC-7 = The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention De-
tection, Evaluation, and the Treatment of High Blood Pressure

Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca:

NNs - número de intervalos P-P considerados normais;
NNNs - número de intervalos normais adjacentes durante o registro;
NNmedia - média de todos os ciclos cardíacos avaliados (ms);

RMS = voltagem média dos 40 ms terminais do QRS;

rMSSD - raiz quadrada da média da soma do quadrado das diferenças entre os ciclos adjacentes;

SDNN - Desvio padrão de todos os ciclos P-P mensurados durante o registro (ms).;

SDANN - desvio padrão da média de todos os seguimentos de 5 minutos de registro (ms);

SDNN-index - média do desvio padrão de todos os seguimentos de 5 minutos de registro (ms);

pNN50 - percentual de variação > que 50ms entre os ciclos normais sucessivos durante o registro.

SUMÁRIO

| | | |
|---|--------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 29 |
| | 2.1 - Dano miocárdico | 30 |
| | 2.2 – Disautonomia | 31 |
| | 2.3 - Mecanismo Auto-imune | 34 |
| | 2.3.1 - Receptores Cardíacos | 37 |
| | 2.3.2 – Citocinas | 51 |
| | 2.4 - Distúrbios Microvasculares | 55 |
| 3 | OBJETIVOS | 57 |
| | 3.1 - Objetivo geral | 57 |
| | 3.2 - Objetivos específicos | 57 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 58 |
| | 4.1 - Casuística e Avaliação Clínica | 58 |
| | 4.2 - Resposta de Auto-anticorpos | 59 |
| | 4.3 - Arritmias, VFC e Disautonomia | 61 |
| | 4.3.1 - O ECG | 61 |
| | 4.3.2 - Holter Cardíaco de 24 h | 61 |
| | 4.3.3 - O Teste Ergométrico | 63 |

| | |
|--|----|
| 4.4 - Potenciais Tardios de Ativação Ventricular | 64 |
| 4.5 - Função Ventricular Esquerda - Ecocardiograma | 65 |
| 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 66 |
| 6 RESULTADOS | 67 |
| 6.1 - Análises Descritivas | 67 |
| 6.1.1 - Características Gerais da Coorte | 67 |
| 6.1.2 - Anticorpos Anti- β 1 e Anti-M2 | 70 |
| 6.1.3 – Eletrocardiograma | 71 |
| 6.1.4 - Holter cardíaco de 24 h | 72 |
| 6.1.5 - Teste Ergométrico | 74 |
| 6.1.6 – ECGAR | 75 |
| 6.1.7 – Ecocardiograma | 76 |
| 6.2 - Grau de Associação das Variáveis Numéricas com as Titulações de Anticorpos Anti- β 1 e Anti-M2 | 77 |
| 6.2.1 - Holter de 24 h | 77 |
| 6.2.2 Teste Ergométrico | 78 |
| 6.2.3 – ECG | 81 |
| 6.2.4 – ECGAR | 82 |
| 6.2.5 – Ecocardiograma | 82 |
| 6.3- Análise Multivariada: Regressão Linear Múltipla | 83 |
| 7 DISCUSSÃO | 85 |

| | | |
|----|---|-----|
| 8 | CONCLUSÕES | 101 |
| 9 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 103 |
| | 9.1 - Aplicabilidade Clínica | 103 |
| | 9.2 - Limitações do Estudo | 103 |
| 10 | Referências | 105 |
| | Anexo I - Teste Ergométrico – Medicação em uso | 120 |
| | Anexo II - Classificação da Insuficiência segundo NYHA | 122 |
| | Anexo III - Estudo dos auto-anticorpos circulantes na CCC | 123 |
| | Anexo IV - Banco de Dados – VFC – Holter 24h | 127 |
| | Anexo V - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE | 129 |

1. INTRODUÇÃO

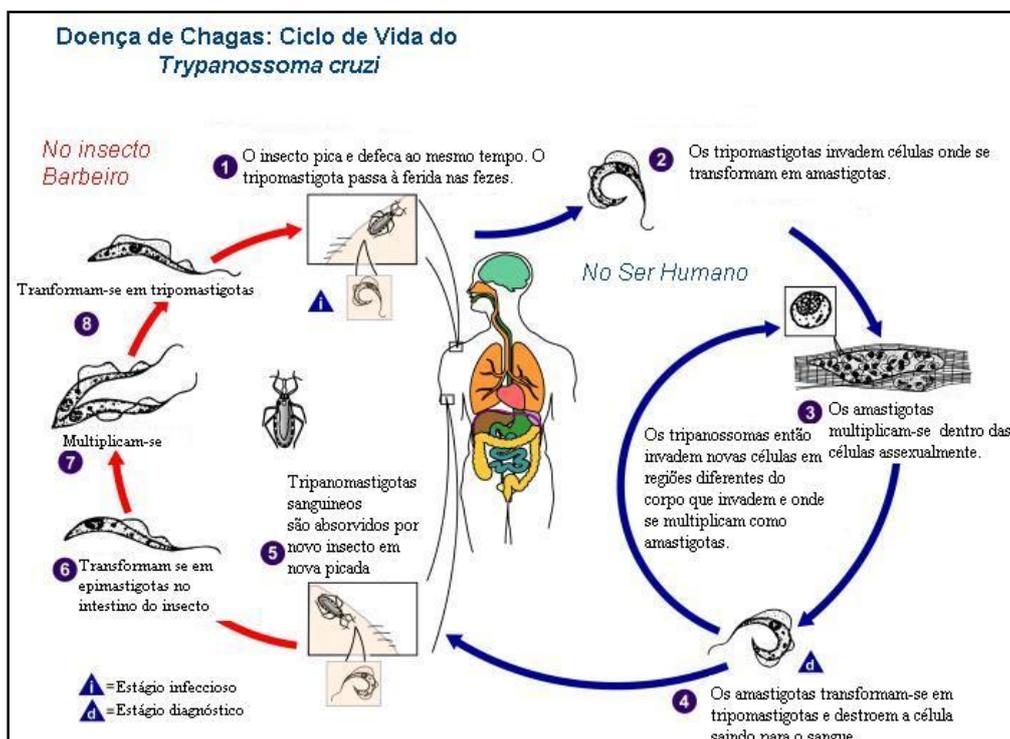
Segundo Charles Rosenberg, as doenças não constituem realidades dadas na natureza a serem “desvendadas” pelos médicos e cientistas, mas são histórica e socialmente construídas, no que diz respeito tanto aos significados sociais a ela atribuídos, quanto às categorias e aos conteúdos pelos quais o conhecimento médico científico as define como fenômenos biológicos particulares. É mediante este processo social de enquadramento (*framing*) que elas assumem o estatuto de entidades conceitualmente específicas e reais ⁽¹⁾.

A doença de Chagas resulta de uma infecção parasitária, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), um protozoário da família *Trypanosomatidae*. Este infecta pelo menos 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens, entre eles, populações de hospedeiros vertebrados tais como seres humanos, animais silvestres, domésticos e invertebrados como os insetos vetores ⁽²⁾.

O *T.cruzi* tem um ciclo evolutivo complexo envolvendo dois hospedeiros intermediários, um triatomíneo, o inseto vetor, e os vertebrados. Apresenta três estágios distintos de desenvolvimento morfológico e funcional: epimastigotas, trypomastigotas e amastigotas. As formas epimastigotas e amastigotas são formas replicativas, sendo que, a forma epimastigota encontra-se no tubo digestivo do inseto vetor e a amastigota no interior das células de mamíferos. As formas não replicativas e infectantes, trypomastigotas metacíclicos, são encontradas nas fezes e urina do inseto vetor e as trypomastigotas circulantes, no sangue de mamíferos ^(2,3,4).

Conforme mostra a Figura 1, inicialmente, o inseto *Triatoma infestans* (*T. infestans*) pica o hospedeiro e defeca ao mesmo tempo. A solução de continuidade permite a entrada da forma trypomastigota metacíclica (1). Os trypomastigotas invadem as células sanguíneas, onde se transformam em amastigota (2). Aí se multiplicam (3) e transformam-se em tripomastigotas sanguíneos (4). As células se rompem e os parasitas são liberados na corrente sanguínea, podendo invadir novas células, onde se multiplicam em amastigotas. Os tripomastigotas sanguíneos ⁽⁵⁾ podem ser sugados por um novo inseto e reinicia-se o ciclo do parasita. No tubo digestivo do inseto, os tripomastigotas sanguíneos transformam-se em epimastigotas ⁽⁶⁾ que se multiplicam ⁽⁷⁾ e diferenciam em tripomastigotas metacíclicos.

Figura 1- Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: TRYPANOSSOMA CRUZI. Disponível em:
http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi

A história tem mostrado que tanto a doença de Chagas quanto outras doenças transmissíveis, evoluem e se adaptam na dependência das condições ecológicas naquele momento. Os triatomíneos não se domicíliam ou disseminam casualmente, mas atrelados a aspectos geográficos e de sua história natural. Sistematizar conhecimentos e formular hipóteses sobre a dispersão dos triatomíneos brasileiros é assunto oportuno face a notícias recentes de transmissão alimentar da doença de Chagas^(4,5,6,7).

O *Trypanosoma* foi observado pela primeira vez, em 1841, por Gabriel Valentin, quando ao analisar o sangue de uma truta, observou entre os eritrócitos, algo em movimento que foi identificado como *Trypanosoma*. David Gruby, posteriormente, em 1843, confirmou a presença do *Trypanosoma* no sangue de um sapo, chamado então

Trypanosoma sanguinis tendo sido a partir daí comunicado a descoberta à academia de Paris. David Bruce e Tomas Lewis, entre 1878 e 1880, detectaram a presença de *Trypanosoma* no sangue de cavalos, na África do Sul. Na Índia, Griffith Evans, médico veterinário, também detectou a presença do protozoário em cavalos, mulas e camelos ⁽⁸⁾.

No Brasil, as primeiras décadas do século XX foram marcadas pela descoberta de Carlos Chagas. Mineiro de Oliveira e sanitarista de Manguinhos que, convidado por Oswaldo Cruz para trabalhar na campanha antipalúdica no interior de Minas Gerais, tomou conhecimento da existência de um inseto hematófago que amolestava as pessoas, particularmente à noite. O inseto se alojava em casa de barro e palha e em sua cloaca observavam-se parasitos com características morfológicas de Crithídias (gênero de protozoário *Trypanosoma* encontrado em intestinos de artrópodos) ⁽⁹⁾.

Carlos Chagas capturou e identificou-o corretamente como inseto (*Panstrongilus megistus*) e enviou a seu mestre Oswaldo Cruz. As Crithídias foram inoculadas em animais de laboratório e, um mês depois o *Trypanosoma* foi encontrado no sangue destes animais. Carlos Chagas então denominou-o *Trypanosoma cruzi* em homenagem à Oswaldo Cruz. Quando em 1909, o chamaram para ver uma menina de dois anos, Berenice, que apresentava um quadro febril com adenomegalia, visceromegalia e *T. cruzi* no sangue, não teve dúvida, estava fechado o ciclo da doença ⁽⁹⁾.

A primeira prova imunossorológica para aplicação diagnóstica, fixação de complemento, foi estabelecida por Guerreiro e Machado. Em 1915, Carlos Chagas apresentou uma revisão sobre a fisiopatogenia da doença com a contribuição de outros nomes como Ezequiel Dias, Artur Neiva, Eurico Villela e outros. Permaneceu à frente dos estudos sobre trypanosomiase americana, até 1934, deixando bastante clara a forma aguda da doença e, bem caracterizada clinicamente a forma cardíaca de evolução crônica ⁽⁹⁾.

Em 1948, instalou-se em Bambuí, Minas Gerais, o Centro de Estudos do Instituto Oswaldo Cruz, ⁽⁹⁾ sob a direção de Emanuel Dias, onde se desenvolveram as primeiras pesquisas para o controle da doença de Chagas. Sensibilizado pelo contato direto com as vítimas do “mal de Chagas”, Dias, tornou-se um exemplo na campanha de profilaxia da doença, defendendo o combate direto aos triatomíneos, a exemplo do que tinha sido feito na Venezuela com resultados promissores ^(1,10).

A grande colaboração de Dias foi tornar notória a dimensão continental da endemia e buscar a participação de organismos internacionais no controle do inseto vetor. Com a sua morte, em 1962, termina sua trajetória, mas continuaria avançando o processo de institucionalização da doença de Chagas no campo científico e da saúde pública ^(1,11).

Apesar dos grandes avanços no controle da doença de Chagas observado ao longo dos cem anos de seu descobrimento, deparamos ainda com novos problemas decorrentes das mudanças sociais e ambientais vividas pela sociedade moderna. A relação e a interação desta nova sociedade com o meio ambiente, os movimentos populacionais, o turismo que atrai pessoas de diferentes regiões geográficas tem transformado uma moléstia latino-americana em doença global ⁽¹²⁾.

Uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que, pelo menos 100.000 pessoas infectadas moram nos Estados Unidos da América. Dados recentes sugerem aproximadamente 300.000 pessoas infectadas. O alto fluxo migratório de indivíduos de áreas endêmicas para não endêmicas explica a transmissão da doença, seja por transfusão sanguínea, acidente laboratorial, transplante de órgãos e transmissão congênita e oral ⁽¹³⁾.

Considerada um sério problema de saúde pública na maioria dos países da América Latina, sabe-se que até 1980, pelos menos, 18 milhões de pessoas estavam cronicamente infectadas e que 200.000 novos casos apareciam a cada ano com mais e 40 milhões de pessoas com risco de contrair a doença. Segundo dados da OMS (1991), esse número diminuiu para 11 milhões até o final da década de 1990. No Brasil, a expectativa era de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas, com uma incidência de 100 novos casos por ano (contaminação via oral) ^(12,13,14,15,16,17,18).

A iniciativa do Cone Sul (Incosul) teve início em 1991 envolvendo os países Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Peru. Tem sido um dos maiores programas de cooperação internacional e desenvolve um importante trabalho de controle do *T. infestans*, principal vetor da doença no Brasil e nestes países. As medidas estabelecidas provocaram importante impacto sobre a redução da mortalidade ⁽¹⁶⁾.

A certificação recebida pela maioria dos estados brasileiros em relação a eliminação da transmissão vetorial da doença de Chagas, diz respeito a espécie *T. infestans* e sabe-se que outras espécies de vetores como o *Triatoma brasiliensis*, até então vetor de menor importância, tem se destacado na transmissão vertical da

doença de Chagas na região que forma o encontro das divisas entre os estados de Tocantins, Piauí e Bahia (Brasil Central). Uma preocupação atual dos epidemiologistas é a endemização da Amazônia porque de 16 espécies de triatomíneos silvestres encontrados nessa região, pelo menos 10 estão infectados com o *T. cruzi* ^(17,18).

Existem dois estágios da doença em humanos, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda caracteriza-se pela picada do inseto vetor, um triatomíneo, que ao picar a pele de um indivíduo, simultaneamente defeca no local liberando assim a forma tripomastigota do *T. cruzi*. A reação local conhecida como chagoma é a porta de entrada para o parasita que, uma vez na circulação, provoca reações sistêmicas que se caracterizam por linfadenopatias, esplenomegalia, hepatomegalia e, algumas vezes reação conjuntival dolorosa com edema palpebral unilateral denominado sinal de Romaña. Alguns casos desenvolvem miocardite, meningo-encefalite que podem ser fatais ^(12,14, 15).

A fase aguda acomete, em geral, jovens abaixo de 15 anos e particularmente crianças de 1 a 5 anos de idade e as manifestações clínicas costumam durar de 4 a 8 semanas, depois da picada do inseto vetor. Grande parte desses pacientes não sabe que estão infectados e só tomam conhecimento do problema de 20 aos 50 anos de idade quando, por alguma circunstância, se submetem a exames sorológicos, levantamentos epidemiológicos ou, se apresentam como doadores de sangue.

A fase crônica começa quando as manifestações clínicas da fase aguda desaparecem. Em paciente não tratado, a resposta imune do hospedeiro diminui a parasitemia e, algumas vezes ele fica protegido para o resto da vida, porém, pelo menos 50 % dos pacientes infectados podem apresentar na corrente sanguínea *T.cruzi* viável durante muitos anos, que só poderão ser identificados por técnicas específicas como xenodiagnóstico e reação em cadeia da polimerase (PCR) considerada padrão ouro para o diagnóstico da doença de Chagas ⁽¹²⁾.

Cerca de 70% dos pacientes infectados permanecem assintomáticos para o resto da vida, sem quaisquer sinais de comprometimento orgânico, conforme, pode ser constatado por exames cardiológicos (eletrocardiograma, ecocardiograma, radiografia de tórax) e estudos radiológicos de esôfago e cólon.

Estudos epidemiológicos indicam que de 10 a 30 % dos indivíduos que são soropositivos para o *T. cruzi*, têm alguma anormalidade eletrocardiográfica e, isto provavelmente, já representa injúria miocárdica. A cardiomiopatia chagásica é, portanto, a manifestação clínica mais importante e os sintomas variam de uma

insuficiência cardíaca leve à morte súbita. Arritmias cardíacas e o tromboembolismo são também frequentemente encontrados. O comprometimento do ventrículo direito (VD) produz ainda edema de membros inferiores e hepatomegalia caracterizando um quadro de insuficiência ventricular direita ⁽¹²⁾.

Os achados mais frequentemente encontrados ao eletrocardiograma (ECG) são o bloqueio de ramo direito (BRD), o hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE), condução átrioventricular prolongada, alterações difusas da repolarização ventricular, extrassístoles ventriculares e supraventriculares isoladas ou em salvas. Ondas Q patológicas e fibrilação atrial (FA) podem ser encontradas em estágios mais avançados da doença ^(14,15).

Portanto, compreender os mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas preocupa e envolve a comunidade científica, desde o início do século. Mecanismos distintos têm sido estudados tanto em humanos com cardiopatia chagásica quanto em modelos experimentais infectados por *T. cruzi*.

Nas décadas de 1960 e 1970, os novos conhecimentos da biologia molecular e a engenharia genética injetaram verdadeira renovação nas ciências biológicas, particularmente no campo de pesquisa básica ^(1,11) e, dentro deste contexto, intensificaram os estudos para compreensão dos mecanismos que explicassem a complexa patogenia da doença de Chagas.

As hipóteses relacionadas à lesão direta do tecido pelo parasita, o dano neuronal e distúrbios microvasculares não eram suficientes para explicar as inúmeras complicações e a evolução da cardiopatia observadas em pacientes chagásicos e, assim, os mecanismos autoimunes aparecem nestas duas décadas como a principal causa da miocardite linfocitária.

Historicamente, Margarinos-Torres em 1929 e Carlos Chagas ^(19,20), foram os primeiros autores que propuseram a hipótese de mecanismos imuno-alérgicos para explicar as lesões inflamatórias encontradas da fase crônica e consideravam que produtos liberados pelo parasita degenerado pudessem ativar tais mecanismos.

Kozma et al. ⁽²¹⁾, em 1960, descreveram a possibilidade de fibras miocárdicas intensamente parasitadas na fase aguda da infecção se romperem liberando no citoplasma antígenos próprios não acessíveis ao sistema imune. O resultado seria a formação de autoanticorpos antimiocárdio. Os autores Okomura e Thales ^(22,23), em 1962, ^(22,23) afirmaram que a miocardite chagásica crônica era resultante da produção

de autoanticorpos contra produtos necróticos do *T.cruzi* e que as alterações inflamatórias eram independentes da presença do parasita no local.

Do ponto de vista experimental, a participação dos processos autoimunes na gênese do dano miocárdico inflamatório surgiu quando se observou que animais imunizados com antígenos do *T.cruzi* apresentaram resposta imune mediada por células contra os antígenos do parasita e também contra antígenos próprios desses animais.

Em 1974, Cossio et al.⁽²⁴⁾ observaram no soro de pacientes chagásicos crônicos a presença de anticorpos circulantes que reagiam contra endocárdio, estrutura vascular e interstício, denominados EVI. Nesta mesma época, Teixeira et al.^(25,26) propuseram que mecanismos autoimunes entravam em ação logo após a infecção e mantinham-se ativos pela contínua estimulação antigênica durante a evolução da doença. Apesar de alguns autores tais como Mortattie et al.⁽²⁰⁾ não terem demonstrado a presença do reconhecimento de fibras miocárdicas autólogas na presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, a participação de mecanismos autoimunes na gênese da miocardite chagásica foi sustentada por trabalhos como os de Cossio⁽²⁴⁾ descritos anteriormente.

Também Sterin-Borda et al.⁽²⁷⁾ em 1976, estudaram a presença dos anticorpos EVI no soro de pacientes chagásicos e avaliaram o efeito desses soros em preparações isoladas de átrio de ratos. Os autores observaram que soros contendo EVI produziam aumento significativo na frequência das contrações atriais e que, estas eram bloqueadas na presença de um bloqueador β -adrenérgico. Nesse estudo o EVI foi capaz de bloquear parcialmente a ação da noradrenalina nesse preparado de átrios. Logo, ficou claro que esses anticorpos provocavam mudanças funcionais semelhantes a dos agonistas parciais β -adrenérgicos e que poderiam bloquear ou atenuar a resposta dos receptores β -adrenérgicos à noradrenalina exógena.

Explicando ainda os processos autoimunes relacionados à miocardite chagásica, Ribeiro dos Santos e Buch^(25,26) propuseram que na fase aguda da infecção, logo nos primeiros dias, a forma amastigota liberaria junto às fibras cardíacas ou neurônios, antígenos que estimulariam a resposta imune humoral e ou celular contra o parasita. Isto levaria a uma destruição das células sensibilizadas por este antígeno e o produto final seria liberação de autoantígenos (antígenos crípticos), agora provocando uma reação autoimune. Conforme os autores, acreditava-se que esta resposta autoimune dependeria da predisposição genética do indivíduo ou do animal de experimentação⁽²⁰⁾.

Em 1975, Teixeira et al.⁽²⁶⁾ demonstraram, experimentalmente, que coelhos imunizados com a proteína P ribossomal do *T. cruzi* desenvolviam uma miocardite compatível com resposta autoimune.

Outros autores conseguiram reproduzir os mesmos resultados ^(27,28,29) até que, em 1989, Levin et al.⁽³⁰⁾ observaram que pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica apresentavam em seus soros presença de anticorpos contra um epítopo da proteína P ribossomal do *T. cruzi*, muito semelhante a proteína ribossomal humana. Os títulos desses anticorpos eram mais altos em pacientes na forma crônica, que naqueles com a forma indeterminada da doença de Chagas.

As décadas de 1970 e 1980 e início da década de 1990 foram marcadas por trabalhos que avaliaram a reação cruzada entre a proteína ribossomal P do *T. cruzi* e a proteína ribossomal humana (mimetismo molecular) e por avanços no conhecimento da estrutura dos receptores β -adrenérgicos, então utilizados como antígenos para rastrear anticorpos específicos β -adrenérgicos na cardiomiopatia dilatada ^(29,30,31).

Estratégias avançadas, também deste período, foram à introdução de combinação de técnicas de clonagem gênica e imunoquímica que permitiram protocolos rápidos e eficientes, capazes de identificar um grande número de antígenos parasitas. Os anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos puderam ser rastreados através das bibliotecas de expressão gênica ⁽³²⁾.

A genômica e a proteômica contribuíram, neste período, para o avanço das pesquisas no final da década de 1980. O estudo das proteínas expressas por um organismo, célula ou tecido facilitam a compreensão de mecanismos envolvidos na patogenia das doenças ^(33,34,35,36).

Dentro desse contexto, em 1985, Hudson et al. propõem que a reação cruzada entre epítomos antigênicos do *T. cruzi* e células cardíacas desencadeiam uma ativação policlonal de linfócitos T durante a fase aguda da infecção. Esses clones seriam perpetuados durante a fase aguda da infecção, explicando assim, os processos autoimunes na doença de Chagas. Em suporte a esta idéia, Levin e Bonfa descrevem, também, a existência de reatividade cruzada entre proteínas ribossomais e antígenos do parasita e Van Voorhis demonstra o mimetismo molecular entre um antígeno associado ao flagelo do *T. cruzi* (160 kD) e uma proteína de 48 kD do sistema nervoso do hospedeiro ⁽²⁰⁾.

Um dado interessante foi a identificação de um epítipo de 6 aminoácidos aminados da cadeia pesada de miosina que apresenta homologia com um antígeno imuno-dominante do *T. cruzi* a proteína B-13.

Cunha–Neto et al.⁽³⁷⁾ demonstraram que 100% dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica apresentam em seus soros anticorpos que reagem com a miosina cardíaca e com a proteína B-13 do *Trypanosoma*. Nos pacientes sem cardiopatia, assintomáticos, isso acontece em apenas 14% deles. Ainda experimentalmente, foi demonstrado pelos mesmos autores que fragmentos cardíacos de pacientes chagásicos crônicos, contendo linhagens de células CD4+, in vitro, são capazes de responder ao estímulo proliferativo tanto da proteína B-13 do *trypanosoma*, quanto da miosina. Porém, o que não se sabe é se esta resposta cruzada é resultante do reconhecimento destas duas proteínas por um mesmo clone ou devido a vários clones de linfócito T, com propriedades antigênicas distintas. Em resumo, a miosina é um antígeno intracelular, mas de que maneira esse antígeno é reconhecido por anticorpos, ainda não está demonstrado.

Estudos de biópsia endomiocárdica, nas décadas de 1980 e 1990, contribuíram muito para compreensão da doença. Molina, em 1984,⁽³⁸⁾ em estudos de biópsia em pacientes chagásicos, detectou IgG, IgA, IgM e C3 em capilares, interstícios, endocárdio e superfície de fibras cardíacas. Higuchi et al.⁽³⁹⁾, em 1986, não demonstraram imunoglobulinas ou complemento em biópsias de chagásicos com insuficiência cardíaca usando técnica de imunofluorescência. Essa mesma autora, posteriormente em estudos de necropsia, demonstrou a associação entre a presença de antígenos do *T. cruzi* e a presença de moderada a severa inflamação miocárdica. Formas amastigotas degeneradas foram encontradas na matriz intersticial, no citoplasma de macrófagos, dentro de fibras miocárdicas e células endoteliais⁽⁴⁰⁾.

Em 1994, Chiale et al.⁽⁴¹⁾ estudaram a prevalência de anticorpos antirreceptores β adrenérgicos na cardiopatia chagásica crônica utilizando peptídeos sintéticos derivados das sequências de aminoácidos dos receptores.

O papel dos marcadores inflamatórios, citocinas, fatores de crescimento e o polimorfismo genético relacionados às doenças cardiovasculares, marcam o embasamento dos novos conhecimentos da patogênese da doença de Chagas na virada do século^(42,43,44,45,46,47).

Atualmente, muitas questões sobre a ação dos anticorpos na doença de Chagas ainda continuam pouco esclarecidas. Seriam os anticorpos capazes de exercer efeitos

estimulantes e ou inibitórios que pudessem intervir na função ventricular e atividade elétrica do coração, funcionando como marcadores de dano miocárdico? Eles exercem efeitos funcionais em todos os pacientes? Eles estão relacionados com disfunção nodal?

O presente estudo tem como objetivo investigar a relação dos autoanticorpos circulantes, antirreceptores β -1 adrenérgicos (Anti- β 1) e antirreceptores muscarínicos (anti-M2) com as complicações da Cardiopatia Chagásica Crônica (disautonomia, disfunção ventricular esquerda e arritmias cardíacas).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) é uma cardiomiopatia resultante de um processo inflamatório focal ou difuso, dependente da interação parasito-hospedeiro e do tropismo do *T.cruzi* por células musculares cardíacas, acarretando uma fibrose progressiva com danos irreversíveis para o coração⁽⁴⁸⁾.

A Cardiopatia dilatada de causa chagásica não é apenas uma desordem de contratilidade miocárdica, mas uma sequência complexa de eventos mediados por neurotransmissores que alteram componentes celulares e moleculares do miocárdio. O desfecho final cursa com atrofia e necrose de cardiomiócitos, perda das miofibrilas, infiltrado intersticial inflamatório, fibrose perivascular e intersticial⁽⁴⁸⁾.

Histologicamente verifica-se uma miocardite linfocitária difusa, escassos ninhos de parasitas, fibrose intersticial difusa e atrofia dos miócitos. Na fase crônica da doença de Chagas a fibrose é uma das alterações mais significativas, associada a infiltrados inflamatórios e degeneração de cardiomiócitos ^(49,50,51).

Sabe-se que a capacidade de proliferação dos cardiomiócitos é extremamente reduzida e isto dificulta sua capacidade de regeneração em casos de dano celular grave, fazendo com que mecanismos compensatórios de aumento global da sua dimensão tentem compensar a perda. Contudo, o que se observa é que o colágeno ocupa o lugar da célula perdida, enquanto, no sítio de tecido lesado ocorre uma fibrose reparativa (cicatrização). Na área próxima a lesão celular, encontra-se uma produção aumentada de TGF- β (fator de crescimento de transformação- β), que contribui para a hipertrofia dos miócitos e processo de deposição de matriz ^(48,49).

A complexa etiopatogenia da doença de Chagas não tem sido totalmente compreendida ao longo desses anos. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar uma variedade de danos miocárdicos observados em pacientes com cardiopatia chagásica crônica: 1- Dano celular relacionado a presença do parasita na célula cardíaca; 2 – Disautonomia; 3 - Resposta autoimune: mimetismo molecular; 4- Distúrbios microvasculares ^(48,49).

2.1. DANO MIOCÁRDICO

Existem evidências de que na doença de Chagas, o *T. cruzi* interage com componentes da matriz extracelular do hospedeiro, levando a um aumento desses componentes. Assim, os antígenos liberados pelo *T. cruzi*, sensibilizam as células hospedeiras, provocando uma resposta imunológica aos antígenos do parasita ^(42,48,49). As células do tecido conjuntivo produzidas localmente são os fibroblastos, os macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas. Os fibroblastos sintetizam as proteínas do colágeno e elastina e participam da produção do fator de crescimento ⁽⁵²⁾ (controlam o crescimento e a diferenciação celular).

O tecido conjuntivo do nosso organismo, dentre inúmeras funções, tem um papel mecânico de sustentação, que é dado por um conjunto de moléculas (matriz) que conecta e liga as células e órgãos ⁽⁵²⁾.

Há evidências que algumas citocinas produzidas por humanos e animais de laboratório infectados pelo *T. cruzi* participam da gênese e regulação da fibrose cardíaca modulando a expressão gênica de células miocárdicas. A TGF- β (Fator de crescimento de transformação β) destaca-se pelo seu importante papel na regulação da formação e degradação da matriz extracelular ^(47,53).

Níveis plasmáticos de TGF β estão aumentados em pacientes chagásicos crônicos, quando comparados a indivíduos normais (0,21ng/ml para 0,4ng/ml) respectivamente. Os níveis mais elevados de TGF β parecem ter relação com formas mais graves de disfunção cardíaca avaliadas por diferentes métodos (eletrocardiograma, ecocardiograma e avaliação clínica) e ainda parecem ser responsáveis pela mudança de plasticidade celular o que leva a perda de contatos celulares mediada pelas proteínas juncionais como as conexinas ⁽⁴⁷⁾.

Métodos histológicos clássicos demonstram a ausência ou pouca quantidade de parasitos no coração de humanos ou de animais de laboratório infectados pelo *T. cruzi*. Contudo, técnicas mais sofisticadas como a PCR (reação em cadeia de polimerase), que amplifica um segmento específico de DNA do parasita, estão sendo utilizadas para sua detecção em pacientes com sorologia positiva ou duvidosa ⁽⁵⁴⁾. Uma observação interessante é que, quando se reduz a carga parasitária após tratamento com tripanosomicida (em humanos e animais de laboratório) reduz-se também a miocardite crônica. Do mesmo modo, a reinfecção pelo *T. cruzi* (imunodeprimidos) é capaz de exacerbar o processo inflamatório e a evolução da doença ⁽⁵⁵⁾.

Assim, a inflamação e agressão tissular direta provocada pela presença do parasita, responde por um dos mecanismos envolvidos na gênese da miocardite chagásica.

2. 2 - DISAUTONOMIA

O termo Sistema Nervoso Autônomo (SNA) foi criado pelo fisiologista inglês John Langley (1853-1925) e é composto de um conjunto de neurônios situados na medula espinhal e no tronco encefálico cujos axônios se comunicam com quase todos os órgãos e tecidos do corpo. Claude Bernard foi o primeiro a perceber que o equilíbrio químico do corpo pode ser controlado pelo sistema nervoso.

Entende-se por disfunção autonômica ou disautonomia cardíaca um distúrbio funcional do sistema nervoso autônomo, de natureza primária ou secundária, que resulta em alterações funcionais ou orgânicas localizadas em um ou em ambos os componentes do sistema nervoso autônomo e em quaisquer de suas estruturas, centros encefálicos, vias aferentes e vias eferentes ^(56,57).

Classicamente, o SNA foi dividido em simpático e parassimpático. Esse sistema se organiza à partir de neurônios centrais situados no tronco encefálico e na medula, cujos axônios emergem do sistema nervoso central (SNC) e constituem nervos, que formam uma segunda população de neurônios, chamados periféricos, que localizam-se em gânglios ou se distribuem em plexos nas paredes das vísceras. Considerando os gânglios como ponto de referência, os neurônios centrais e seus axônios são pré-ganglionares e os periféricos são pós-ganglionares ⁽⁵⁸⁾.

Existe uma diferença estrutural básica entre o sistema nervoso simpático e parassimpático: O simpático possui neurônios pré-ganglionares curtos que localizam-se junto a coluna vertebral. Os axônios pós-ganglionares são longos, incorporam-se aos nervos e estendem-se até os órgãos alvo, por todo o organismo.

No parassimpático, as fibras pré-ganglionares são longas e terminam em gânglios ou plexos praticamente localizados nas paredes das vísceras ou mesmo dentro delas, e suas fibras pós ganglionares são curtas.

Para compreender a disfunção autonômica em pacientes com doença de Chagas, é necessário observar algumas particularidades desse sistema ^(57,58).

A regulação da frequência cardíaca e do inotropismo é exercida pelo SNA. O Sistema nervoso de um vertebrado é constituído de duas partes, uma dentro do crânio e da coluna vertebral que recebe o nome de Sistema Nervoso Central (SNC) e outra distribuída por todo o organismo, sistema nervoso periférico (SNP). Neste, existem células nervosas agrupadas em gânglios situados nas proximidades do sistema nervoso central e junto ou dentro das vísceras.

No SNC está a grande maioria das células nervosas e seus prolongamentos e, no SNP observa-se poucas células, mas um grande número de prolongamentos que são as fibras nervosas, que se agrupam em filetes para formar os nervos.

O SNP não tem função exclusivamente condutora, mas é também capaz de processar informações através dos contatos entre neurônios situados nos gânglios sensitivos (espinhais) e nos gânglios motores ou secreto-motores situados em várias vísceras. O neurônio, unidade morfofuncional do sistema nervoso, é capaz de veicular sinais elétricos que conduzem informações e codificam tudo que percebemos no mundo exterior e no meio interno. Emergindo do corpo neural ou soma dos neurônios, observa-se o axônio, de onde saem as informações eferentes para outras células de um circuito neural.

Os efetores do SNA são, em geral, células ou órgãos que realizam tarefas como resposta a uma mensagem química e, para reconhecer essa mensagem, os efetores precisam expressar na superfície celular receptores moleculares capazes de reconhecer esses mensageiros químicos. A maior parte dos mensageiros químicos autonômicos, os neurotransmissores ou neuromoduladores das fibras pós ganglionares são liberados no meio extracelular e se difundem até os receptores. No coração, os efetores contráteis (células musculares ou mioepiteliais) e os terminais axônicos, localizam-se próximos uns aos outros para que os receptores dos efetores possam reconhecer e responder a mensagem desses terminais.

A informação química produzida pelo neurônio é veiculada eletricamente na forma de potencial de ação até os terminais axônicos onde é transformada e transmitida quimicamente para o neurônio conectado. Uma vez que a informação química é percebida pelo segundo neurônio, volta a ser veiculada eletricamente gerando novo potencial de ação (dupla conversão) ⁽⁵⁹⁾.

Para explicar a patogênese da Cardiopatia chagásica mecanismos como a disautonomia, frequentemente encontrada nesses pacientes, tem sido relatada desde 1922 nos primeiros estudos de Carlos Chagas e Eurico Vilela. Os autores descreveram a discreta resposta cronotrópica observada em pacientes chagásicos após uso de atropina. Muitas décadas se passaram até que Fritz Köerbele, um patologista austríaco, naturalizado brasileiro e professor de patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto desde 1953, publicou os primeiros estudos sistemáticos que conduziu, sobre a padronização da técnica de contagem de neurônios intramurais cardíacos ^(60,61).

Na visão de Köerberle, a cardiopatia chagásica seria essencialmente uma cardiopatia neurogênica, sendo o sistema parassimpático o mais comprometido. Conforme estudos quantitativos que realizou, a redução média de neurônios encontrada foi de 55% em relação ao parassimpático e 35% em relação ao simpático (gânglio estrelado). Outros investigadores usando a mesma técnica de Köerberle, também confirmaram a redução importante de neurônios intramurais ^(62,63,64).

Em estudos experimentais animais infectados pelo *T.cruzi*, mostram uma periganglionite associada a alterações na célula de Schwann e fibras nervosas. Estudos de autópsia confirmam a importante denervação parasimpática em pacientes com morte súbita. A maioria dos gânglios cardíacos intramurais, conforme mostram os estudos de Köerberle, são de origem parassimpática e isto provoca um desbalanço autonômico que induz uma resposta exacerbada às catecolaminas. Esse mecanismo favorece o aparecimento de arritmias cardíacas graves e cardiomiopatia induzida pelas catecolaminas ⁽⁶⁵⁾.

Uma observação importante em relação à disfunção autonômica do paciente chagásico é que ela pode ocorrer antes do aparecimento da disfunção ventricular e em todas as fases da doença, até mesmo nas formas digestivas. A disfunção autonômica que ocorre na insuficiência cardíaca de qualquer etiologia está relacionada a uma dessensibilização pós- sináptica de receptores β adrenérgicos e pode ser parcialmente reversível com o controle clínico ⁽⁶⁶⁾.

Os distúrbios neurogênicos que levam à disautonomia e particularmente à denervação do nódulo sino-atrial causam graves complicações nos pacientes com Cardiopatia Chagásica. A destruição de fibras parassimpáticas pode indiretamente ser responsável pela morte súbita, arritmias cardíacas graves e comprometimento global da função ventricular esquerda ^(66,67).

Estudos experimentais mostram que tanto na fase aguda, quanto na crônica da doença de Chagas pode-se observar distúrbios de condução ventricular. Em culturas de células cardíacas de roedores com infecção aguda nota-se redução de acoplamento celular e dos batimentos sincrônicos. A proteína Cx-43, das junções Gap, está relacionada com estas alterações. Modificações das respostas eletrofisiológicas encontradas no coração, como potencial de ação encurtado, níveis de cálcio em repouso elevados e a resposta aos α agonistas alteradas não são encontradas no grupo controle. Os achados desse estudo sugerem que a infecção chagásica pode causar modificações dos canais iônicos do coração e isso explicaria os distúrbios de condução frequentemente encontrados ⁽⁴³⁾.

Muitos estudos abordando as junções Gap e conexina-43, moléculas responsáveis pela condução do estímulo elétrico, tentam explicar os possíveis danos miocárdicos causados pela infecção chagásica^(47,53,68,69,70).

Estudo experimental recente⁽⁶⁹⁾ sobre disautonomia mostra que ratos modificados geneticamente que apresentam expressão reduzida de vesículas de acetil-colina com conseqüente diminuição da liberação deste neuro-transmissor, apresentam desequilíbrio autonômico que causam remodelamento e disfunção cardíaca.

2.3. MECANISMO AUTOIMUNE

Investigações clínicas e experimentais, ao longo de mais de três décadas têm demonstrado que o mecanismo autoimune é um dos mais importantes na patogênese da doença de Chagas, embora o seu papel na evolução e complicações da doença não esteja ainda esclarecido.

Uma abordagem inicial sobre mecanismos imunológicos e receptores cardíacos β adrenérgicos e muscarínicos facilitam a compreensão da complexa resposta autoimune resultante da interação parasita e cardiomiócito.

Tanto a imunidade humoral ou adquirida, quanto a celular ou inata estão envolvidas na CCC^(71,26).

A imunidade humoral depende de glicoproteínas circulantes no sangue e outros líquidos, os anticorpos, produzidos pelos plasmócitos, células originadas dos linfócitos B ou células B. Na imunidade celular, as células imunocompetentes reagem e destroem células que exibem na superfície moléculas estranhas. Participam desta resposta imune, além dos linfócitos, os leucócitos granulócitos (neutrófilo e eosinófilo) e agranulócitos (monócito, macrófago e linfócito Natural Killer – NK). A resposta de

imunidade celular (linfócito T) é determinada por peptídeos derivados da digestão parcial dos antígenos associados às moléculas de MHC (Major Histocompatibility Complex), localizadas nas membranas das células apresentadoras de antígenos^(72,73). As células apresentadoras de antígenos, APCs (Antigen Presenting Cells), são encontradas na maioria dos órgãos, derivam da medula óssea e são representadas pelas células dendríticas, macrófagos, células de Langerhans da epiderme e linfócitos B.

Através da presença na superfície celular do complexo MHC, o sistema imune distingue as moléculas próprias do organismo daquelas estranhas. OS MHCs possuem uma estrutura que é única para cada pessoa. Existem duas classes de MHC, o tipo I, que está presente em todas as células e o tipo II que é encontrado nas células apresentadoras de antígeno, conforme descritas acima. As moléculas MHC II consistem em um sistema intracelular que coloca o complexo MHC II e o peptídeo na membrana das células apresentadoras de antígenos.

Os precursores dos linfócitos T localizam-se na medula óssea, penetram nos capilares sanguíneos e são retidos no timo, aí se proliferam e diferenciam-se em subpopulações de células *T helper*, *T supressora* e *T citotóxica*. Os linfócitos *T helper* estimulam a transformação de macrófagos em plasmócitos e os *T supressores* inibem a resposta humoral e celular acelerando o término da resposta imune. Assim, linfócitos T helper e T supressores são células reguladoras. Os linfócitos T citotóxicos atuam diretamente sobre células estranhas e infectadas através de dois mecanismos: a produção de proteínas perforinas, que abrem os orifícios da membrana plasmática causando lise das células e indução das células alvo a um processo de morte programada, a apoptose^(71,72,73).

A produção de anticorpos tem sido indicada como importante fator no estabelecimento do controle da infecção. A resposta imunológica tipo T helper (Th1), potencializa e direciona inúmeros mecanismos efetores, incluindo produção de anticorpos, ativação de células fagocíticas para destruir o parasita e a produção de célula T do tipo CD4+ e, mais tardiamente CD8+. A ausência desses mecanismos efetores resulta em infecção aguda incontrolada e letal^(74,75).

Na doença de Chagas, os primeiros estudos relacionados à resposta imune focalizaram-se na resposta humoral. A presença de anticorpos reativos ao parasita tem contribuído de forma importante, para caracterizar a resposta humoral nesses pacientes. Anticorpos reativos à epítopos de galactose são encontrados no soro desses pacientes e denominados anticorpos líticos (AL). Esses encontram-se

elevados em pacientes com forma indeterminada da doença, sugerindo um papel de proteção. Contudo, outras classes de anticorpos reativos à estruturas específicas do hospedeiro estão relacionadas com a patogenia da doença de Chagas crônica e são capazes de ativar a proliferação de linfócitos B e T, especialmente células B CD5+, relacionadas à processos autoimunes. A maioria dos estudos em doença de Chagas provavelmente prioriza a resposta celular devido à destruição tecidual observada nos pacientes com CCC. Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Chagas, células T CD4+ e monócitos produzem citocinas inflamatórias capazes de desencadear um processo imune determinante na evolução da doença ⁽⁷⁶⁾.

O dano celular observado na CCC acompanhado da presença de infiltrado inflamatório contribuiu para que a maioria dos estudos imunológicos tivessem como alvo a resposta celular. Contudo, considerando a importância das interações parasita-hospedeiro é pouco provável que apenas um braço do sistema imunológico esteja associado à evolução da doença ⁽⁷⁶⁾.

A complexidade do ciclo biológico do *T. cruzi* sugere que o controle da infecção envolve uma combinação de respostas imunológicas adaptativas do hospedeiro que opera em vários níveis do sistema imunológico.

2.3.1. RECEPTORES CARDÍACOS

Alguns neurônios têm a capacidade específica de produzir moléculas, os neurotransmissores, e armazená-las em vesículas sinápticas em altas concentrações. A acetilcolina (ACh) é sintetizada pela colina acetil-transferase a partir da colina proveniente da alimentação ou degradação da própria ACh do acetato que o citoplasma possui. As catecolaminas, grupo que inclui a adrenalina, a noradrenalina e dopamina são sintetizadas a partir do aminoácido tirosina. O potencial sináptico produzido pelo neurotransmissor só é possível pela existência de moléculas receptoras. O receptor é um complexo de moléculas de natureza protéica capaz de estabelecer uma ligação química com o neurotransmissor ⁽⁵⁹⁾.

Experiências baseadas em estudos com animais de laboratório mostram evidências de que anticorpos interagem com constituintes celulares, modificam o metabolismo celular e podem comprometer a força mecânica e elétrica do coração. Os anticorpos antirreceptores β_1 , assim como os anticorpos antirreceptores M2 acionam os receptores cardíacos de forma agonista aos seus respectivos neurotransmissores, noradrenalina e acetil-colina. Logo, os anticorpos anti- β_1 são capazes de aumentar a frequência cardíaca e a pressão arterial, enquanto os anti-M2, diminuem a frequência cardíaca, bloqueiam a condução atrioventricular e prolongam o QT *in vitro* ⁽⁷⁷⁾.

Existem duas classes de receptores: os ionotrópicos que são canais iônicos dependentes de ligantes e os metabotrópicos são ativados indiretamente por meio de uma proteína intracelular, a proteína G ou através de ação enzimática intracelular do próprio receptor ^(59,78).

Os receptores ionotrópicos quando acionados pelos neuromediadores, sendo esses receptores o próprio canal iônico, sofrem uma modificação tridimensional (alosteria), que causa a abertura do canal e permite a passagem de íons através da membrana. Se predominar o fluxo de sódio para dentro da célula, a ligação do mediador com o receptor provocará uma despolarização da membrana e ele será chamado de excitatório. Se predominar o fluxo de cloro de fora para dentro da célula ou de potássio de dentro para fora, a resposta ligante-receptor será uma hiperpolarização e o receptor será chamado de hiperpolarizante ou inibitório (não deflagra potencial de ação).

Os receptores metabotrópicos não são canais iônicos, logo, a transmissão da mensagem química é indireta através de reações intracelulares que fosforilam canais iônicos independente dos receptores situados nas regiões adjacentes da membrana. Em geral o que inicia essas reações intracelulares é uma molécula ancorada na face interna do receptor, chamada proteína G que liga trifosfato de guanosina (GTP) ⁽⁷⁸⁾.

Quando um neurotransmissor, ao se ligar no receptor, muda a sua conformação, a proteína G libera o seu difosfato de guanosina (GDP) e o substitui por um GTP retirado do citosol. Quando o GTP se incorpora, separa-se a unidade α do complexo. Esta percorre a membrana até encontrar outras proteínas integrais da membrana que realizam funções diferentes e são chamadas proteínas efetoras (canais iônicos), que completam a transmissão sináptica ⁽⁵⁹⁾.

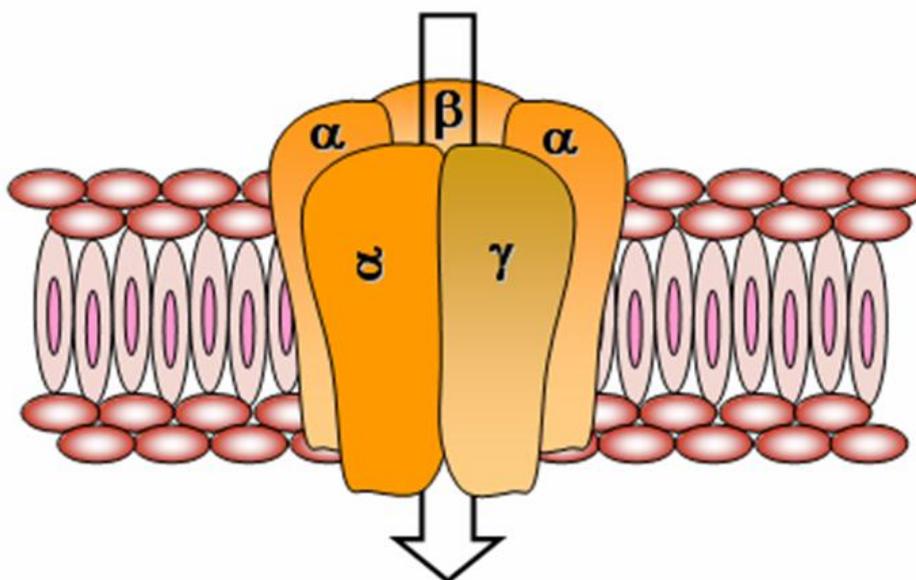
Na célula cardíaca, quando o neurotransmissor Ach se liga aos receptores colinérgicos muscarínicos, esse ativa a proteína G e sua unidade α , provocando a

abertura dos canais de potássio abundantes nas membranas das células miocárdicas. O fluxo de potássio é hiperpolarizante e gera um potencial inibitório.

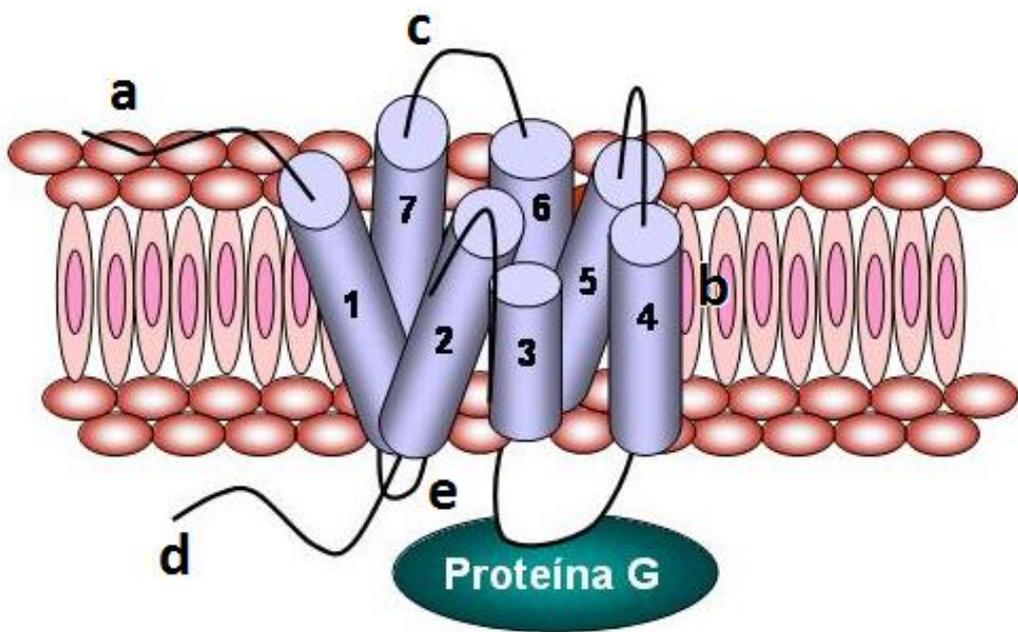
Os receptores de acetilcolina são proteínas compostas por cinco subunidades sendo duas α , uma β , uma γ e uma δ (alfa, beta, gama e delta), vide Figura 2. De acordo com sua sensibilidade e afinidade por moléculas específicas, eles podem ser classificados em nicotínicos (ionotrópicos com afinidade pela nicotina) e muscarínicos (metabotrópicos com afinidade pela muscarina). A acetilcolina ativa tanto receptores muscarínicos, quanto os nicotínicos. Os receptores muscarínicos são ativados especificamente pela muscarina, substância proveniente de um cogumelo alucinógeno *Amanita muscaria*. Os nicotínicos são ativados pela nicotina substância extraída da planta *Nicotiana tabacum*. Os receptores muscarínicos da acetilcolina fazem parte da família de receptores acoplados à proteína G e ativam os canais iônicos por acionar uma cascata de reações químicas mediadas por um segundo mensageiro. Eles se localizam em todas células alvo do sistema nervoso parassimpático, células alvos dos neurônios pós ganglionares simpáticos que são acionados pela acetilcolina (colinérgicos) ⁽⁵⁹⁾.

Figura 2 – Receptor muscarínico A – Subunidades α , β , γ e δ . B – Domínios presentes em cada subunidade: N-terminal hidrofílico (a), quatro segmentos hidrofóbicos transmembrana (b), domínio hidrofílico variável (c), C-terminal hidrofílico (d) e alças intracelulares formando sítios de fosforilação (e).

A –



B -



Fonte adaptada: Ventura, 2010.

Os subtipos de receptores M1, M3 e M5 estão acoplados à proteína $G_{q/11}$ que ativada promove a ação da fosfolipase C (PLC) causando aumento da função do órgão a que estão acoplados. Na célula muscular lisa libera para o citoplasma o cálcio sequestrado no interior da célula, induzindo a interação actina-miosina e provocando a contração muscular⁽⁷⁸⁾, enquanto a ativação dos subtipos M2 e M4 medeiam a inibição da adelinato ciclase⁽⁷⁸⁾.

Na célula muscular lisa, paradoxalmente, provoca vasodilatação (ação na parede muscular da artéria) que pode ser explicada da seguinte maneira: A ativação da proteína Gq aumenta a concentração de cálcio no citosol plasmático. O papel do cálcio na célula endotelial que não possui um mecanismo contrátil é ligar-se a calmodulina que ativa a sintetase do óxido nítrico. Esse gás difunde-se para a musculatura do vaso, induzindo a ativação da guanil-ciclase, com conseqüente aumento intracelular de Guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que é considerado um potente relaxador da musculatura lisa.

A adenil-ciclase, uma enzima situada nas proximidades da membrana pós sináptica, tem como função desfosforilar um composto de alta energia existente no citosol o Trifosfato de Adenosina (ATP), transformando-o em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). A ação normal do AMPc na célula é ativar outra enzima fosforilante chamada proteína cinase A (PKA) que está presente no citoplasma. A adrenalina presente em alguns terminais nervosos do coração atua sobre os receptores β que, também usam o AMPc como mensageiro⁽⁵⁹⁾.

Na célula cardíaca, a proteína G atua ativando a adenil-ciclase, o aumento da produção de AMP cíclico e finalmente ativação da PKA que fosforilam os canais de cálcio dependentes de voltagem e presentes em grande quantidade na membrana. Ocorre, portanto, despolarização e posteriormente contração da célula cardíaca. O resultado final é aumento da frequência cardíaca e força de contração celular.

Anticorpos antirreceptores β adrenérgicos desempenham um papel importante na patogenia da doença de Chagas crônica, conduzem à disfunção e lesão das fibras miocárdicas, pois são capazes de manter um efeito estimulante das células cardíacas

que dura mais de 24h, enquanto os efeitos produzidos pelos agonistas neuro-humorais duram em torno de 6h⁽⁴¹⁾.

O aumento da atividade da adenil-ciclase e os níveis intracelulares elevados de AMPc fazem com que esses anticorpos IgG antirreceptores β adrenérgicos sejam considerados agonistas β adrenérgicos. Tanto a cardiomiopatia dilatada de causa idiopática, quanto a chagásica, apresentam aumento da ação adrenérgica mediada por anticorpos que podem exercer efeitos cardiotoxicos, semelhantes aos produzidos pelas catecolaminas. Estudos experimentais mostram, por exemplo, que a infusão de isoproterenol em animais de laboratório produz alterações cardíacas semelhantes àquelas observadas na cardiopatia chagásica como aneurisma de ponta, lesões focais com infiltração de células mononucleares⁽⁴¹⁾.

Os receptores β adrenérgicos posicionam-se estrategicamente sobre a superfície da membrana celular e conta com três elementos básicos para o seu funcionamento, o próprio receptor de superfície, a adenil-ciclase e a proteína G que regula o sinal intracelular produzido pela ocupação dos receptores β adrenérgicos na superfície da membrana celular.⁽⁷⁸⁾ A adenil-ciclase é a enzima efetora do complexo neurotransmissor-receptor, é capaz de converter o ATP em AMPc, que tem a capacidade de ativar proteínas quinases e, assim, fosforilar estruturas alvo dentro da célula que regulam o fluxo de cálcio e sua ligação a receptores intracelulares.

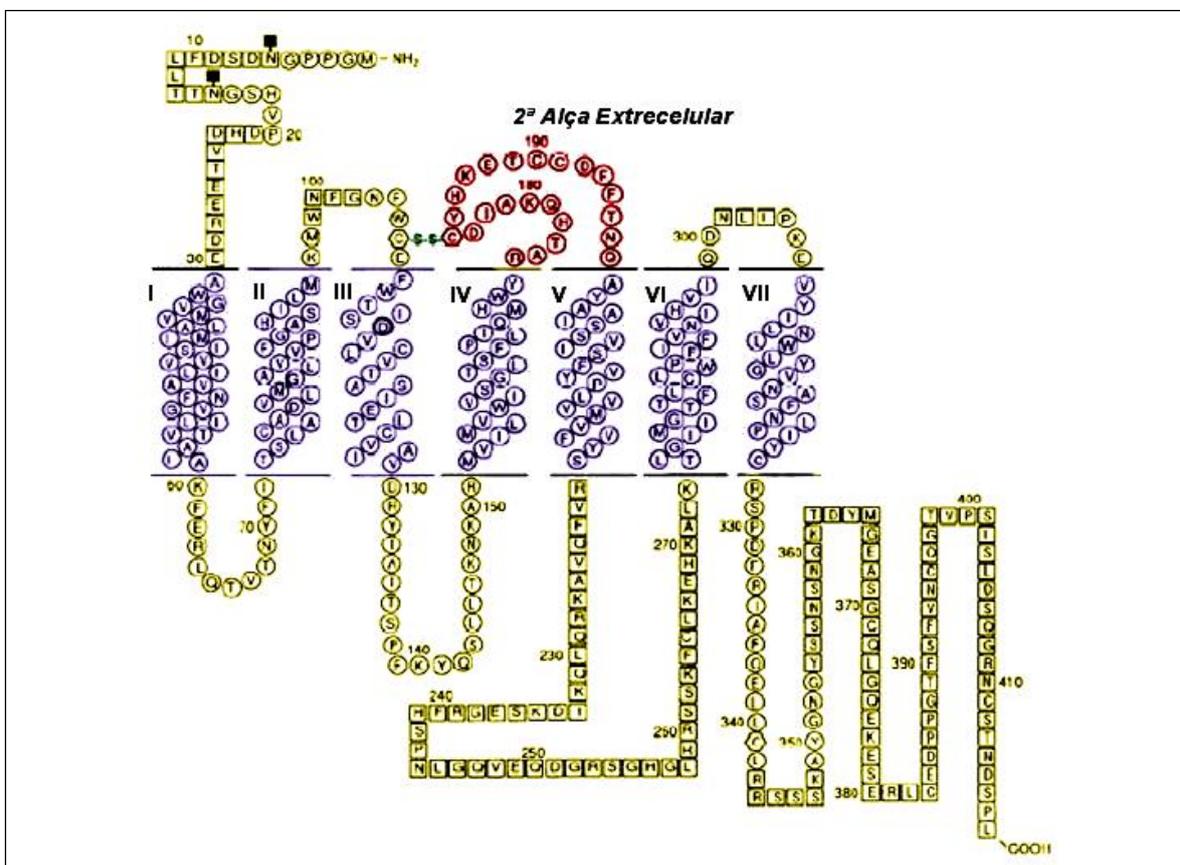
As proteínas G (GMP dependentes) ao promoverem o acoplamento dos receptores de superfície à adenil-ciclase podem provocar uma atividade estimulatória (G_s) ou inibitória (G_i) sobre a unidade catalítica, a adenil ciclase.

Os processos fisiológicos ativados pela adrenalina e noradrenalina dependem da interação desses neurotransmissores com receptores β adrenérgicos específicos localizados na membrana celular. Os receptores β adrenérgicos, de acordo com o seu sítio de ação, foram inicialmente classificados em α adrenérgicos (α -AR) e β adrenérgicos (β -AR). Posteriormente, subtipos distintos foram descritos: receptores β_1 (presentes no miocárdio e responsáveis pelo inotropismo e cronotropismo positivo do coração) e receptores β_2 (encontrados em músculos lisos e esqueléticos exercendo ação de relaxamento muscular).

A classificação desses receptores foi baseada na potência dos agonistas da adrenalina e noradrenalina, que se equivalem na ativação dos β_1 receptores. Entretanto, a adrenalina tem mais potência para ativar os receptores β_2 adrenérgicos. Outros receptores β adrenérgicos atípicos tem sido descritos β_3 e β_4 (β_1 em estado

de baixa afinidade). Suas propriedades farmacológicas caracterizam-se por apresentar baixa afinidade por antagonistas β -AR clássicos como o propranolol. Os receptores β -adrenérgicos (β -AR) ligados à proteína G(s) apresentam sete domínios transmembrana que apresentam uma homologia em torno de 60%, em relação à sua sequência de aminoácidos. Cada um destes sete resíduos hidrofóbicos de aminoácidos atravessa a membrana celular e a porção N-terminal do receptor, é exposta na porção extracelular do receptor enquanto a porção C-terminal é interna à membrana plasmática (Figura 3).

Figura 3 – Modelo de distribuição do receptor β -adrenérgico



Fonte: Dixon et al., 1987.

A expressão protéica dos receptores regula-se pela ativação ou repressão dos genes que controlam a síntese de proteínas a partir do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e por outros mecanismos pós transcricionais. Sabe-se, ainda, que os β -AR além de estarem associados às proteínas Gs que resultam na ativação da adenilciclase e produção de AMP cíclico, estão também associados com acoplamento a outras proteínas G que podem desempenhar um mecanismo cardioprotetor particularmente em pacientes com insuficiência cardíaca^(59,78,79).

Estudo utilizando cultura de cardiomiócitos mostra que os anticorpos anti- β 1 adrenérgicos tem importante papel na fisiopatologia da cardiomiopatia dilatada. Além de exercerem efeito apoptótico direto sobre os miócitos, o soro desses animais ou a IgG purificada induzem cardiomiopatia dilatada em outros animais e esse efeito pode ser revertido com a remoção específica dos anticorpos anti- β 1 receptores⁽⁸⁰⁾.

Chiale et al.⁽⁴¹⁾ para estudar a prevalência de anticorpos antirreceptores β adrenérgicos na doença de Chagas usaram como ferramenta os peptídeos sintéticos derivados das sequências de aminoácidos dos receptores. Foram considerados positivos os soros cujas densidades ópticas fossem ≥ 2 desvios padrões da promédia das densidades ópticas dos pacientes controles e postularam que o dano miocárdico crônico, que se observa na miocardiopatia chagásica poderia ser a expressão de uma “cardiomiopatia adrenérgica”, mediada por um efeito estimulante agonista dos anticorpos anti- β 1 sobre os receptores adrenérgicos. Os autores demonstraram que a

prevalência de anticorpos anti- β 1 é maior na cardiopatia chagásica crônica do que em indivíduos com cardiopatia não chagásica ou normais.

A CCC é uma cardiomiopatia infamatória grave que tem prognóstico pior, do que as de etiologia não inflamatória como a doença isquêmica e a cardiomiopatia dilatada. Pelo menos 30 % dos pacientes desenvolvem a forma crônica da doença e alguns fatores envolvidos na susceptibilidade do indivíduo infectado pelo *T. cruzi*, ainda não foram totalmente compreendidos ^(14,44).

Alguns autores ⁽⁸¹⁾ indicam que a imunização de camundongos com proteína recombinante do *T. cruzi* (TcP2 β) provocam elevada e específica produção de anticorpos contra a porção C terminal do epítipo contendo 13 resíduos (peptídeo R13: EEEDDDMGFGLFD) e que tem uma atividade estimulante β 1 adrenérgica concomitante. Outros animais submetidos à mesma imunização não tiveram resultado semelhante. Bergami ⁽⁸¹⁾ estudou 50 camundongos sendo 25 Balb/c e 25 Swiss os quais foram imunizados com TcP2 β . Destes, 31 desenvolveram uma resposta positiva contra R13 e 19 não apresentaram reação. Dos 31 anti-R-13 positivo, vinte e cinco tinham anticorpos anti-R13 que reconheciam uma sequência de resíduos descontínua ExDDxFG e havia uma relação da presença desses anticorpos com taquicardia supraventricular. Os outros seis, com apenas anticorpos anti R-13, apresentavam eletrocardiograma normal. Os autores sugerem que o reconhecimento do ácido glutâmico na posição 3 do peptídeo R-13 define a capacidade desses anticorpos de reagir com os peptídeos AESDE na segunda alça extracelular dos receptores β 1 adrenérgicos, estimulando-os e participando dos mecanismos moleculares relacionados a patogênese da cardiopatia chagásica.

Com o objetivo de estudar a estrutura básica dessa reatividade cruzada e demonstrar a capacidade desses anticorpos induzirem sintomas depois de uma imunização passiva, os autores isolaram quatro diferentes fragmentos que foram clonados, sequenciados e expressos em *Escherichia coli*. As propriedades imunoquímicas farmacológicas e fisiológicas de cada fragmento foram testadas, na tentativa de definir o modelo mais preciso possível e descrever os resíduos envolvidos na reação cruzada. Através de Ressonância plasmônica de superfície somente o fragmento scFvC5 (fragmentos de cadeias simples) tinha uma afinidade mensurável pelos receptores β 1 derivados do peptídeo H26R. Este é um documento claro que mostra que um anticorpo induzido pela proteína intracelular do *T. cruzi* tinha a capacidade de reagir com um peptídeo humano representando o domínio extracelular essencial de um receptor cardíaco.

Os resultados mostraram que o epítopo R-13 foi capaz de induzir um anticorpo que reconhece a segunda alça extracelular dos receptores $\beta 1$ e que são capazes de induzir arritmias ventriculares, quando transferidos passivamente para camundongos⁽⁸¹⁾.

Alguns autores sugerem que os autoanticorpos circulantes são expressão de um efeito *by-stander* dirigido primariamente contra estruturas do parasita, baseado no fato de que anticorpos contra a porção C-terminal da proteína P ribossomal do *T. cruzi* foram capazes de produzir reação cruzada com receptores β adrenérgicos. Esse efeito tem sido atribuído a um epítopo altamente ácido chamado R13 (EEEDDDMGFGLFD) que apresenta similaridade com AESDE, da segunda alça extracelular do receptor⁽⁴⁹⁾.

Estudo⁽⁸²⁾ desenvolvido para avaliar a participação dos anticorpos IgG, com ação agonista muscarínica e sua relação com disfunção do nódulo sinusal e função ventricular esquerda, mostrou que pacientes chagásicos crônicos com doença do nódulo sinusal e com qualquer grau de disfunção ventricular esquerda têm maior prevalência de anticorpos anti- M2, quando comparados aos pacientes sem doença sinusal e que estas alterações não dependem de idade e ou sexo . Contudo, na literatura não há dados suficientes para considerar que a presença de anticorpos anti-M2 seja responsável pelas alterações do sistema de condução, arritmias e bradiaritmias encontradas em pacientes com cardiopatia Chagásica.

A interação de anticorpos IgG, presentes no soro de pacientes chagásicos com cargas negativas da segunda alça extracelular desses receptores, pode interferir na atividade mecânica e elétrica do coração . Para testar essa hipótese, corações isolados de coelhos foram incubados com soro de pacientes chagásicos (ricos em IgG e com distúrbio da eletrogênese e da condução átrio-ventricular) e com peptídeos correspondentes a segunda alça extracelular de receptores M2 e diferentes peptídeos derivados da proteína P ribossomal do *T. cruzi*. Observou-se que o fator antigênico que induz a ativação da IgG em chagásicos, provavelmente é um antígeno intracelular do *T. cruzi*. A IgG do soro de pacientes chagásicos interage com a segunda alça extracelular dos receptores M2 do coração de coelhos. As cargas negativas presentes na proteína P ribossomal do *T. cruzi* induzem a interação entre IgG do soro de pacientes chagásicos e os receptores cardíacos⁽⁸³⁾.

Outros autores⁽⁸⁴⁾ vêm, há longa data, estudando experimentalmente o envolvimento de anticorpos anti-proteína P-ribossomal do *T. cruzi* nos distúrbios de condução cardíaca e, a possível relação dos defeitos de condução e arritmias

cardíacas, com fatores humorais e comprometimento das junções gap o que levaria a alterações nas vias de transdução de sinais, comprometidas nas células infectadas.

A presença de autoanticorpos antirreceptores acoplados à proteína G tem sido descrita em soros de pacientes com CCC e em pacientes com cardiomiopatia dilatada de causa idiopática (CDI) ⁽⁸⁵⁾.

Alguns autores tem demonstrado forte correlação entre a presença de anticorpos antirreceptores M2 e respostas disfuncionais do nó sinusal ^(86,87,88,89,90).

Os anticorpos antirreceptores M2 apresentam, também, um papel importante no desenvolvimento de Fibrilação atrial, mesmo em pacientes sem cardiopatia chagásica. Estudos experimentais mostram o efeito desses anticorpos (anti-M2) em átrios de coelhos imunizados com peptídeos sintéticos correspondentes ao receptor M2, comparados com coelhos controle. A presença de anticorpos anti M2 correlacionou-se com alterações eletrofisiológicas como tempo de ativação atrial prolongado, encurtamento do período refratário efetivo, aumento d potencial arritmogênico com indução e perpetuação da fibrilação atrial ⁽⁹¹⁾.

Levitus et al. ⁽⁹²⁾ demonstraram que peptídeos clonados do parasita (JL5) eram capazes de reagir com soros de pacientes chagásicos. O peptídeo clonado foi identificado como porção C terminal da proteína P ribossomal do parasita que desenvolve uma reatividade cruzada com a proteína P ribossomal do hospedeiro. Isso se deve a uma sequência homóloga de aminoácidos entre a proteína do parasita e a proteína do hospedeiro em torno de 90%.

Estudo mostrando a contaminação acidental em humano por *T. cruzi*, ⁽⁹³⁾ caso raro na literatura, mostrou a produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* e sua cinética. A resposta imune relaciona-se provavelmente a distorção global da produção de células B, induzindo uma autorreatividade. Esse estudo acompanhou por 93 dias, através do método ELISA, a produção de anticorpos não específicos e específicos de doença de Chagas adquirida em laboratório. Até dezessete dias não houve resposta imune. Observou-se que a IgM e a IgA aumentam antes da IgG. O aumento das três classes de anticorpos sugere uma resposta policlonal. Os níveis de IgG são os mais elevados e reagem com antígenos naturais mostrando uma polireatividade que sugere o papel do mimetismo molecular na síntese de autoanticorpos.

A ligação crônica dos autoanticorpos com os receptores da acetil-colina é capaz de induzir uma diminuição da população funcional desses receptores

explicando, assim, as alterações neuromusculares e eletrofisiológicas observadas durante o curso da doença de Chagas ⁽⁸⁸⁾.

Quando se compara a CCC com CDI pode se observar através de alguns estudos que embora os epítomos reconhecidos pelos anticorpos na CDI estejam localizados na segunda alça extracelular dos receptores β 1-adrenérgicos a taxa de afinidade dos anticorpos antirreceptores pode ser medida em nM (nano Molar), enquanto na cardiomiopatia chagásica é medida em μ M (micromolar). Isso explicaria o fato de que pacientes com CDI sempre mostram uma resposta cronotrópica positiva mesmo na presença de anticorpos antirreceptores M2. Pacientes com cardiopatia chagásica apresentam uma resposta cronotrópica positiva ou negativa dependendo da prevalência funcional de um ou outro receptor ⁽⁸⁵⁾.

Assim, farmacologicamente, tanto os anticorpos antirreceptores β 1 adrenérgicos de pacientes com cardiomiopatia chagásica, quanto daqueles com CDI podem ser classificados como agonistas parciais, pois inibem parcialmente de forma não competitiva, a ligação do antagonista do receptor e isto pode ser observado em estudos experimentais em cardiomiócitos de camundongos. Observa-se que esse efeito nunca atinge níveis semelhantes ao estímulo com Isoproterenol.

Outra observação interessante desse estudo é que, quando são gerados fragmentos monovalentes de anticorpos a atividade agonista deste anticorpo é invertida. Isso significa que estes fragmentos perdem a sua atividade intrínseca, mas são capazes de bloquear completamente a atividade agonista do Isoproterenol.

Se o domínio N-terminal da segunda alça extracelular for inibido por bloqueio estérico espacial ou alterações conformacionais da membrana, local onde os epítomos são reconhecidos pelos anticorpos antirreceptores, o sitio de ligação desses anticorpos se altera e isso explicaria uma atividade agonista inversa de fragmentos monovalentes de anticorpos.

Hipóteses para explicar a resposta autoimune na cardiopatia chagásica têm sido levantadas, como a destruição do citoesqueleto das células miocárdicas gerando autoantígenos e resposta autoimune. Porém, estas hipóteses não conseguem explicar porque a segunda alça extracelular é o alvo dos anticorpos e expõe a célula permanentemente a um estímulo imunológico, mesmo em indivíduos sem cardiopatia (silêncio do epítopo) ⁽⁹²⁾.

Para avaliar a relação entre a presença de anticorpos IgG agonistas muscarínicos e a relação destes com alterações na eletrogênese cardíaca,

particularmente na síndrome do nódulo sinusal, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos ^(85,89,91,95).

O comprometimento funcional do nódulo sinusal no paciente chagásico não é só devido à miocardite crônica, mas devido principalmente a disautonomia que ocorre independente da idade, sexo ou o estado funcional do coração. Se a gênese desse distúrbio é de causa imunológica ainda é motivo de discussão, embora alguns estudos ^(91,94) tenham mostrado que anticorpos IgG com ação agonista muscarínica possam induzir distúrbios na eletrogênese e condução do estímulo elétrico em animais de laboratório.

Os anticorpos circulantes, com efeito, agonista nos receptores de membrana do sistema autonômico, têm sido comumente encontrados em Taquiarritmias ventriculares e bradiarritmias. Os anticorpos que estimulam receptores β adrenérgicos e muscarínicos M_2 participam da patogênese das arritmias ventriculares e bradiarritmias respectivamente. Os anticorpos antirreceptores M_2 estão associados com disfunção do nó sinusal de causa chagásica ou idiopática e os anticorpos antirreceptores β adrenérgicos estão associados às arritmias ventriculares, especialmente as taquiarritmias ⁽⁹⁶⁾.

Alguns autores ⁽⁸⁴⁾ têm mostrado a relação entre anticorpos antirreceptores autonômicos, arritmias ventriculares e doença do nó sinusal (DNS) e observaram que pacientes com arritmia ventricular mostravam uma alta prevalência de anticorpos antirreceptores β adrenérgicos, quando comparados com pacientes com doença do nó sinusal e indivíduos controle (saudáveis) e baixa prevalência de anticorpos M_2 . A prevalência de anticorpos β adrenérgicos foi similar a dos pacientes com arritmia ventricular primária. Em constraste, pacientes com doença do nó sinusal tinham alta prevalência de anticorpos anti- M_2 tanto os chagásicos quanto aqueles com doença de causa idiopática ⁽⁸²⁾.

Comparando dois grupos de pacientes portadores de cardiopatia chagásica com e sem doença do nó sinusal e relacionando-os com a presença de anticorpos anti- M_2 observou-se associação direta e significativa entre DNS e a presença de anticorpos anti- M_2 e ainda entre a DNS e disfunção miocárdica. A presença de anticorpos M_2 foi independente da disfunção ventricular esquerda, dos sintomas clínicos de insuficiência cardíaca e ainda da idade e do sexo.

Anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos podem interferir na eletrogênese e atividades mecânicas do coração conforme mostram estudos

experimentais envolvendo cultura de miócitos embrionários de mamíferos. O mecanismo envolvido para explicar essas alterações, relaciona-se com as interações entre anticorpos e receptores de membrana ligados à proteína G, o que leva a ativação de receptores β adrenérgicos e muscarínicos.

Para testar essa hipótese, corações isolados de coelhos foram incubados com soro de pacientes chagásicos (ricos em IgG e com distúrbio da eletrogênese e da condução átrio-ventricular) e com peptídeos correspondentes a segunda alça extracelular de receptores M2 e diferentes peptídeos derivados da proteína P ribossomal do *T. cruzi*. Observou-se que o fator antigênico, que induz a ativação da IgG em chagásicos, provavelmente é um antígeno intracelular do *T. cruzi*. A IgG do soro de pacientes chagásicos interage com a segunda alça extracelular dos receptores M2 do coração de coelhos. As cargas negativas presentes na proteína P ribossomal do *T. cruzi* são importantes indutores da interação entre IgG do soro de pacientes chagásicos e os receptores cardíacos ⁽⁸³⁾.

Outros autores, porém, ^(97,98) têm demonstrado o mimetismo molecular entre a imunodominância da proteína ribossomal P0 do *T. cruzi* e um epítipo funcional nos receptores β 1 adrenérgicos em humanos. O soro de pacientes chagásicos possui anticorpos que reconhecem a porção carboxi-terminal da proteína P0 ribossomal do *T. cruzi* e a segunda alça extracelular de receptores β adrenérgicos em humanos. Comparando os peptídeos observou-se que eles contêm um pentapeptídeo com alta homologia (AESEE na P0 e AESDE no receptor β 1 adrenérgico). O reconhecimento do peptídeo correspondente a segunda alça extracelular (H26R) foi inibido por P0-14 (AAAESEEDDDDDDF) e P0 β (AESEE). Concomitantemente o reconhecimento do peptídeo P0- β foi inibido pelo H2CR. O reconhecimento da P0 foi inibido por P014, P0- β e H26R, mas não por peptídeo correspondente a segunda alça extracelular de receptores β 2 em humanos. A afinidade dos autoanticorpos com o peptídeo H26R mostrou que eles exercem efeito cronotrópico positivo em cardiomiócitos de ratos neonatos. Esse efeito foi bloqueado por bisoprolol e P0- β . A partir desses resultados conclui-se que o *T. cruzi* é capaz de induzir uma resposta autoimune funcional contra os receptores β adrenérgicos em humanos via mecanismos de mimetismo molecular.

Costa et al. ⁽⁹⁹⁾ testaram os efeitos do soro de 58 pacientes chagásicos na eletrogênese cardíaca, utilizando coração de coelhos e observaram que, os efeitos provocados relacionavam-se a bloqueio da condução átrio-ventricular, gravidade da cardiopatia e arritmias complexas, sugerindo a possibilidade de depressão na eletrogênese e a ação preferencialmente desses soros na ativação da via muscarínica.

Muitos estudos têm sido realizados tentando explicar a presença de autoanticorpos específicos na Doença de Chagas ^(95,97,98,100,101,102).

Alguns autores ⁽¹⁰¹⁾ mostram que um peptídeo clonado do parasita (lgt 11), chamado JL5, reagia com soros provenientes de pacientes infectados pelo *T. cruzi* e esse peptídeo foi identificado como porção C-terminal da proteína P ribossomal do *T. cruzi*. Muitos dados indicam que o JL5 possui epítomos que provocam reatividade cruzada com a proteína P ribossomal do hospedeiro. A predominância de aminoácidos desse peptídeo é homóloga à porção C-terminal da proteína P ribossomal humana.

A natureza alostérica da interação das IgGs de pacientes chagásicos, com o sítio dos receptores muscarínicos, foi confirmada observando-se que o soro desses pacientes, e não de doadores normais, aumenta a eficácia da ação agonista induzindo o início de bradiarritmias. Esse efeito desaparece quando testado na presença do antagonista alostérico galamina. O ponto alto do estudo foi exatamente caracterizar a ação dos autoanticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos com a ligação alósterica que ocorre na segunda alça extracelular dos receptores M2 da acetilcolina e a sua capacidade de exercer um efeito agonista e transdutor de sinal ^(101,102).

Estudos experimentais em camundongos infectados com cepas brasileiras de *T. cruzi* mostram que células CD8⁺ apresentam imunodominância específica para epítomos trans-sialidase do *T. cruzi* e contribuem para o controle da infecção, mas não obrigatoriamente resistência. Células T CD8⁺ reconhecem a dominância de TSKB20 (ANYKFTLV) e subdominância TSKB74(VNYDFTLV), epítomos da trans-sialidase. Pelo menos 40% desses epítomos são encontrados no total de linfócitos T CD8b⁺. Embora isto signifique a maior resposta de imunodominância descrita pelas células T para qualquer infecção, camundongos infectados evoluem para a forma crônica da doença ⁽¹⁰³⁾.

2.3.2. CITOCINAS

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune. Elas são ativadas por estímulos externos (agentes

infecciosos), tumores ou estresse. Além de produzir a indução ou regulação da resposta imune, apresentam ainda outras características como a de ser produzida por mais de um tipo celular, dependendo das condições do meio ambiente (microambiente) e apresentar diferentes efeitos; diferentes citocinas podem exercer as mesmas funções (redundância), uma citocina pode potencializar ou inibir o efeito de outra citocina (sinergismo ou antagonismo respectivamente) e ainda efeitos parácrinos (ação em células próximas as células produtoras) ou autócrinos (ação sobre a própria célula produtora) ⁽⁷³⁾.

Uma das principais funções das citocinas relaciona-se com a diferenciação de células T e ativação de subpopulações de linfócitos T, que resultam na secreção de diversas citocinas estabelecendo o perfil da resposta imune. A diferenciação de células CD4+ em linfócitos T helper tipo 1 (Th1) ocorre na presença de IL-12 e IFN γ determinando um perfil inflamatório, enquanto a diferenciação em linfócito helper tipo 2 (Th2) ocorre na presença de IL4 e determina outro perfil inflamatório. Tem sido descrito atualmente outras subpopulações de linfócitos helper (Th3), caracterizados pela produção de TGF β que associam-se a um perfil regulador da resposta imune. ^(103,104,105,106,107,108).

Diferentes moléculas de superfície do *T. cruzi* têm sido consideradas como indutoras da resposta inata glicosil-fosfadil-inositol (GPI), as GPIs ligadas covalentemente às glicoproteínas semelhantes a mucinas, as GPIs mucinas e as enzimas trans-sialidase (TS).

A supressão da imunidade mediada por células T e aumento da apoptose de linfócitos durante a infecção por *T. cruzi* pode explicar um dos mecanismos que contribuem para a persistência do parasita no hospedeiro, ou seja, um desequilíbrio entre a produção de citocinas do tipo ativadora de macrófagos capazes de destruir o parasita e as do tipo 2 capazes de promover a imunidade celular e reduzir o dano miocárdico. Sabe-se que a resposta imune celular e humoral são fundamentais no controle da parasitemia na fase aguda da doença. Estudos experimentais mostram que, em camundongos infectados, a depleção seletiva de CD4+ CD8+ induzem a morte desses animais ⁽¹⁰⁹⁾.

As citocinas e as quimiocinas estão envolvidas na diferenciação de linfócitos Th1 e Th2 conforme mostram estudos experimentais em chagásicos. As citocinas do tipo 1 ativam macrófagos e destroem os parasitas e as citocinas do tipo 2 tem função regulatória o que é necessário para promover a imunidade e reduzir a agressão cardíaca ⁽⁷²⁾.

Estudos experimentais em camundongos *Knock-out* para IL-10 mostram que quando infectados observa-se maior produção de TNF α , IL-12 e IFN- γ se comparados ao controle. A parasitemia é diminuída, mas a resposta inflamatória é acelerada o que resulta em morte do animal. O grupo controle mantém a parasitemia alta, mas consegue controlar o processo inflamatório e sobrevive ⁽¹¹⁰⁾.

O knock-out da IL-10 provoca depleção de células CD4+ ou IL-12 e quando isto acontece, ocorre retardo da morte dos camundongos infectados, logo, a depleção de CD4+ e IL-12 estão envolvidas na patogênese da infecção por *T. Cruzi* ⁽¹¹⁰⁾.

Outros autores em estudos *knock-out* da IL 10, observaram que a mortalidade dos animais, relacionava-se com níveis elevados de TNF α e ainda, *knock-out* de IL-4, provocou uma resposta elevada de Th1, com carga parasitária mais baixa, porém com miocardite intensa. ⁽¹¹¹⁾.

Talvani e cols, ⁽¹¹²⁾ observaram que na fase inicial da infecção (primeiros 15 dias) quando a miocardite ocorria, a expressão predominante é o RNA do interferon γ no coração de animais infectados. Porém, a expressão dessa citocina modifica por volta dos 60 dias após a infecção, quando o processo inflamatório já foi controlado e o que se expressa é o mRNA da IL-4 e da IL-10. Embora, estas citocinas já estejam presentes desde o início da infecção indicando sua participação no mecanismo regulatório, elas só conseguem controlar a resposta ligadas ao Th1, que inicia-se em torno de 60 dias após a infecção .

Interessante lembrar que muitos patógenos desenvolvem mecanismos capazes de controlar a resposta imunológica do hospedeiro e com isso garantem sua sobrevivência. Dessa forma, eles são capazes de provocar a evasão da imunidade humoral e celular através de alguns mecanismos como variação antigênica, alterações no processamento e apresentação de antígenos, dificultando a fagocitose ou lise pelas células do sistema inato ⁽¹¹²⁾.

Para estabelecer um perfil de citocinas na forma indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, Avelar-Vitelli et al. ⁽¹⁰⁷⁾ desenvolveram cálculos para avaliar a percentagem média do aparecimento das citocinas nos leucócitos, estabeleceram um ponto de corte que pudesse demonstrar baixo e alto grau de produção de citocinas e, a partir daí, construíram diagramas característicos para cada fase. Um gráfico em forma de polígono foi desenhado e nesse tipo de gráfico, a área central revela uma regulação para mais ou para menos de células produtoras de citocinas. Assim, com esta estratégia de análise obteve-se um padrão de citocina regulatória na forma

indetermina (células T CD4+). A baixa frequência de citocinas, na forma indeterminada, é observada pela reduzida frequência de células T CD4+ inflamatórias. A baixa produção de citocinas regulatórias, na forma cardíaca, pode ser explicada pelo aumento da quantidade de monócitos em direção a um fenótipo inflamatório e em menor quantidade um perfil de citocinas produzidas a partir de neutrófilos, NK e células B. O mais interessante nesse estudo foi o aumento na frequência de produção pelos monócitos de TNF α e a baixa frequência de IL-10 e células T CD8+.

Os níveis de IFN γ permitiram distinguir os pacientes na forma crônica cardíaca e indeterminada da doença. Os níveis de IFN γ foram significativamente mais elevados na forma crônica, assim como, IL-10, CD8+ estiveram presentes na forma cardíaca em níveis significativamente mais elevados que o grupo controle. Observou-se neste estudo que o grupo controle não apresenta um perfil específico de citocinas quando comparados aos pacientes da forma indeterminada e forma cardíaca.

Outros autores têm demonstrado em estudos experimentais, a relação entre a produção de citocinas inflamatórias e a formação de uma memória efetora central de células T. Quando camundongos infectados por *T. cruzi* eram privados de célula B madura e comparados ao grupo controle, esses camundongos exibiam uma exacerbação da infecção e baixos níveis de citocinas inflamatórias produzidas durante a infecção aguda, logo, apresentam uma baixa memória efetora central para produção de células T CD4+ e CD8+ que é gerada na fase aguda da infecção⁽¹⁰⁹⁾.

Uma nítida redução de células CD8+ também foi observada, o que está de acordo com alto grau de parasitismo celular com uma resposta inflamatória tecidual, menos intensa na fase aguda da infecção. A análise do infiltrado inflamatório do músculo esquelético pela citometria de fluxo mostrou, em camundongos com células B suficientes, baixa predominância de CD8+ e CD45Rb, enquanto naqueles com falta de células B, predominou no infiltrado inflamatório, células CD4+. As células CD8+ foram menos ativas que no grupo controle, sugerindo que células B podem estar envolvidas com a geração de células T com memória efetora⁽¹¹³⁾

Ainda nesse estudo, células do baço de camundongos infectados com *T. cruzi*, com deficiência de células B secretam mais IL-4 e IL-10 e menos IFN e IL-12 e, ainda, apresentam uma resposta prejudicada na produção de células Th1, porém, produzem quantidade igual ou aumentada de IL-18 durante a fase aguda da infecção quando comparados ao controle.

As células CD8+ são fundamentais no controle da infecção pelo *T. cruzi*⁽¹¹⁴⁾ e muitos mecanismos estão envolvidos neste processo. Considera-se o mais importante a produção de IFN γ . Em experiências de laboratório na ausência de células CD8+ os camundongos morrem rapidamente pela infecção ou desenvolvem uma doença crônica grave. Em humanos, baixos níveis de IFN γ produzidos pelas células CD8+ associam-se com a gravidade da doença. As células CD8+ em pacientes infectados por *T. cruzi*, funcionam como células de memória efetora e se multiplicam rapidamente quando ocorre uma reexposição ao antígeno, porém, a produção inicial destas células estão relativamente baixas na infecção por *T. cruzi*. A expressão de células T CD8+ efetoras está comprometida em alguns tecidos particularmente o muscular.

Pacientes infectados pelo *T. cruzi* representam um modelo ideal para a compreensão do que é o balanço entre uma resposta imuno eficiente e uma resposta imuno-patológica. O combate a uma infecção exige uma resposta imunológica eficaz capaz de controlar a infecção ou eliminá-la. Uma desregulação da resposta imune pode levar a consequências deletérias para o paciente ou culminar sua morte.

A lesão tecidual provocada *T. cruzi*, acarreta uma destruição tecidual com liberação de antígenos do hospedeiro e mediadores inflamatórios. Essa grande liberação de antígenos próprios, em um ambiente favorável, rico em citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, linfotoxinas, quebra o nível de tolerância e baixa o limiar para o aparecimento da resposta autoimune^(107,108).

2. 4. DISTÚRBIOS MICROVASCULARES

Segundo Rossi⁽¹¹⁵⁾ os primeiro relatos de alterações inflamatórias perivasculares em humanos com cardiopatia chagásica crônica ocorreram por volta de 1911.

Posteriormente, Torres usando material colhido de necrópsia, de pacientes acompanhados por Emmanuel Dias, no Centro de Estudo e Profilaxia de Moléstia de

Chagas em BambuÍ, Minas Gerais, observou que a miocitólise difusa resulta de alterações do metabolismo das células musculares cardíacas, ocasionadas por perturbações circulatórias de pouca intensidade ou de pequena duração que aparece na fase crônica, indicando que a miocitólise se processa de maneira lenta e gradativa em certas fibras miocárdicas ⁽¹¹⁶⁾.

Tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas foram observadas alterações na microcirculação coronária que participam no processo de miocitólise e fibrose miocárdica. Microespasmo, formação de microtrombos plaquetários, disfunção de células endoteliais são algumas alterações relacionadas aos distúrbios circulatórios, que levam a isquemia segmentar no tecido miocardio. Assim, o fluxo coronariano reduzido conduz ao desenvolvimento de necrose miocardica focal e edemas intersticiais. Estas alterações refletem muitos dos achados eletrocardiográficos encontrados em doença de Chagas ⁽¹¹⁷⁾.

Sabendo que o SNP tem apenas um efeito discreto sobre a circulação coronariana, o desbalanço entre o sistema nervoso simpático e parassimpático, com predomínio da ação simpática sobre os vasos coronarianos, pode contribuir com constrictões na microcirculação o que causaria possíveis eventos espásticos e aneurismas ⁽¹¹⁸⁾.

Estudos que abordam aspectos anatômicos e funcionais da circulação coronariana e microcirculação em humanos e modelos experimentais infectados com *T. cruzi*, demonstraram que não há lesões obstrutivas capazes de induzir uma isquemia miocárdica. Os distúrbios de perfusão observados estão relacionados com alterações microvasculares geralmente em pacientes chagásicos crônicos com coronárias normais ao estudo angiográfico. Isso explicaria disfunções contrácteis regionais perfusionais, semelhantes àquelas observadas em cardiopatia isquêmica (áreas de hibernação miocárdica) ⁽¹¹⁸⁾.

Estudos em camundongos isogênicos BALB/c sensibilizados com inoculações de formas epimastigotas e tripomastigotas de cepas de *T. cruzi*, desenvolveram cardiomiopatia semelhante a fase crônica da doença de Chagas em humanos. A microscopia revelou necrose miocitolítica e degeneração miocárdica associados a uma resposta inflamatória predominantemente mononuclear, além, de agregados plaquetários e trombos oclusivos em vasos epicárdicos e intramiocárdicos de camundongos infectados quando comparados ao controle ⁽¹¹⁵⁾.

As evidências mostradas por estudos em humanos na cardiopatia chagásica aguda e crônica sugerem alterações na microcirculação. Estudo com Tálvio 2001, em chagásicos crônicos com queixas de precordialgia, revelam distúrbio perfusional e anormalidades da mobilidade das paredes. Os defeitos fixos de perfusão correspondem a áreas de necrose e fibrose, enquanto que os reversíveis e de perfusão paradoxal podem ser causados por baixo fluxo regional ou desarranjo metabólico relacionado a controle parassimpático anormal da microcirculação coronariana ⁽¹¹⁹⁾.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o percentual de anticorpos antirreceptores β_1 adrenérgicos (anti- β_1) e antirreceptores muscarínicos M2 (anti-M2) em pacientes com forma crônica de doença de Chagas acompanhados no ambulatório do Instituto Nacional de Cardiologia.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de anticorpos anti- β_1 e anti-M2 no soro de pacientes chagásicos crônicos com parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) bradiarritmias, taquiarritmias e arritmias complexas ao Holter cardíaco de 24h .
- Avaliar a relação entre a presença de anticorpos anti- β_1 e anti-M2 com disautonomia ao teste ergométrico (TE)
- Relacionar os anticorpos anti- β_1 e anti-M2 com potenciais tardios de ativação ventricular ao eletrocardiograma de alta resolução (ECGAR)
- Relacionar os anticorpos anti- β_1 e anti- M2 com a função ventricular esquerda global e segmentar ao ecocardiograma.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Trata-se de um estudo transversal para análise de dados que permitam identificar pacientes portadores de infecção crônica causada pelo *T. cruzi* e investigar a associação entre a presença de anticorpos antirreceptores β_1 e M2 com o comprometimento funcional, arritmogênico e autonômico do coração.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia (INC). Todos os pacientes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A casuística inicialmente foi composta por 73 pacientes. Dois voltaram para o estado de origem e sete não conseguiram completar todas as etapas da pesquisa. Nossa amostra constituiu-se, portanto, de 64 pacientes acompanhados no ambulatório de doença de Chagas do INC, examinados sequencialmente. Todos os pacientes realizaram anamnese, exame físico, hemograma, glicemia, lipidograma, função renal, hepática e tireoidiana.

Foram considerados critérios de inclusão, a idade maior que 18 anos, não ter se submetido a tratamento específico para doença de Chagas, apresentar exame sorológico positivo para doença de Chagas por dois métodos de avaliação, reação de Hemaglutinação e Elisa ⁽¹²⁰⁾, testes realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do INC. Foram considerados critérios de exclusão, Diabetes Mellitus dependentes de insulina, hipertensão arterial maligna, nefropatia com creatinina sérica $\geq 2,5$ mg/dl, anemia (hemoglobina menor 9.0 mg/dl), tireoidopatias e doenças orovalvares com repercussão hemodinâmica.

As informações clínicas e de laboratório obtidas no período de janeiro de 2006 a julho de 2011 foram inseridas em Banco de dados em formato Excel, o que permite cálculos estatísticos, elaboração de gráficos e relatórios necessários para análise do estudo.

Todos os pacientes receberam tratamento clínico otimizado, quando necessário, de acordo com a classe funcional. Fármacos com ação β -adrenérgica, vasodilatadora, diuréticos, estatinas, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA), amiodarona, propafenona, foram utilizados de acordo com a rotina do ambulatório (Anexo I).

Sessenta e quatro pacientes realizaram a dosagem de anticorpos anti- β_1 e anti-M2, eletrocardiograma convencional e ecocardiograma bidimensional com Doppler colorido. Sessenta e dois, fizeram Holter cardíaco de 24 horas, 56, teste ergométrico e 18 pacientes, ECGAR. Doze pacientes eram portadores de marcapasso. Vide o fluxograma abaixo (Figura 4).

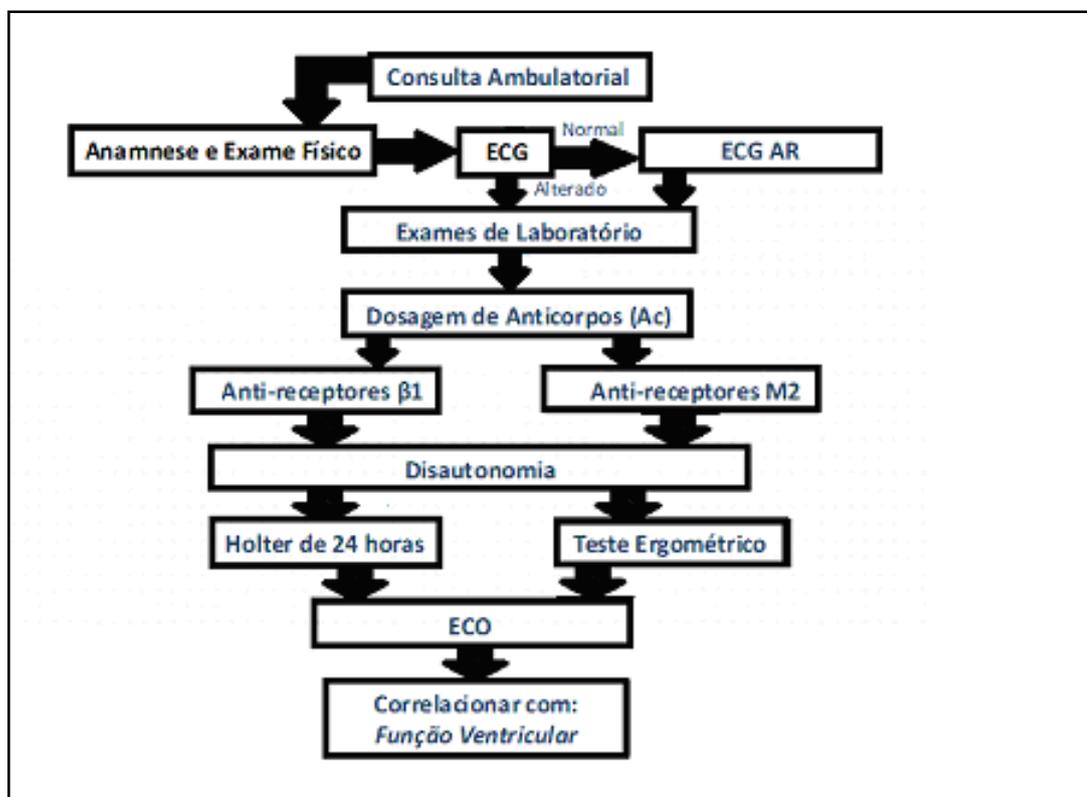


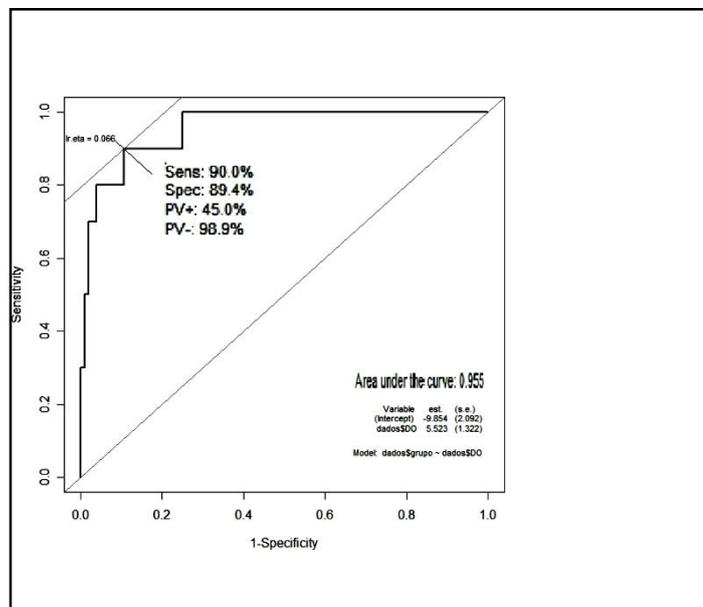
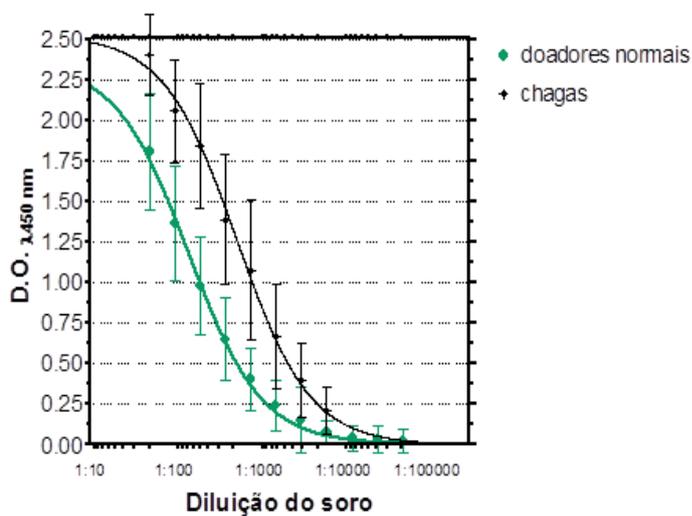
Figura 4 – Metodologia - Fluxograma

4.2. RESPOSTA DE AUTOANTICORPOS

Os anticorpos circulantes antirreceptores $\beta 1$ adrenérgicos e M2 muscarínicos foram titulados no laboratório de Biologia e Diagnóstico Molecular do INC, através do ensaio imunoenzimático ELISA. Peptídeos sintéticos correspondentes a 2ª alça celular dos receptores muscarínicos M2(1 μ g) e $\beta 1$ adrenérgico (2 μ g) foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 50 mM (pH 9.0) e adsorvidos em microplacas de 96 poços (Corning). Posteriormente foram feitas duas lavagens em solução tampão fosfato (**PBS**: NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10,1mM, KCL 2,7mM e KH₂PO₄ 1,76mM) contendo - Tween 0,05% (tampão de lavagem) seguido de bloqueios dos sítios de ligação inespecíficos com tampão PBS contendo 3% de albumina de soro bovino(Sigma) e Tween 1% (USB) por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida as amostras de soros de pacientes chagásicos diluídos em PBS contendo 5% de soro fetal bovino e 1 % de Tween (tampão de ligação) 200 vezes para a resposta muscarínica e a 100 vezes para a resposta $\beta 1$ adrenérgica foram incubados na placa durante 2h a 37 °C. Após extensiva lavagem da placa (6 vezes em tampão de lavagem), incubou-se o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugada com biotina (Zymed) diluído 1:5000 em tampão de ligação durante 1h a 37 °C. A placa foi então incubada com solução de estreptoavidina conjugada a enzima peroxidase diluída 1:5000 em tampão de ligação (Zymed). A revelação dos anticorpos e suas interações foi realizada com o substrato TMB (solução pronta para uso, tetra-metil benzidina, Life Technologies) durante 5 minutos e a reação foi parada com ácido clorídrico 1N. A leitura da resposta colorimétrica foi medida pela leitura da densidade ótica no comprimento de onda de 450 nm em leitora de microplacas Molecular Devices.

A resposta anti- $\beta 1$ e anti M2 foram consideradas reagentes quando a densidade ótica medida foi acima de 1,054 e acima de 1,297, respectivamente. Esses valores de ponto de corte foram obtidos pela análise da curva de ROC, comparando as curvas de titulação obtidas com diluições seriadas do soro de pacientes chagásicos (15) e doadores normais (102). As curvas são formadas com os dados de sensibilidade (Y) versus 1-especificidade (X) encontrados para os valores de densidade ótica obtidos no ensaio. Calcula-se a área sobre as curvas para cada diluição e escolhe-se a melhor curva (melhor diluição) encontrando a que tem maior área. O melhor ponto de separação entre os dois grupos conforme mostra a figura abaixo, o *cut-off*, é determinado matematicamente através da análise.

Figura 5 - Determinação do ponto de corte para os ensaios de ELISA. A. Curva de titulação contra a segunda alça extracelular do receptor muscarínico subtipo M2. B. Curva ROC gerada para diluição de 1:200



4.3. ARRITMIAS, VFC E DISAUTONOMIA

4.3.1. O ECG

Foi realizado com o aparelho Dixtal-Eletrô página, eletrocardiógrafo três canais (DIXTAL Biomédica Indústria e Comércio Ltda.) no Serviço de Cardiologia do INC e para sua análise utilizou-se os critérios do código de Minnesota ⁽¹²¹⁾.

4.3.2. HOLTER CARDÍACO DE 24 HORAS

Avaliou a VFC, com aparelho utilizado no setor de arritmias do Instituto Nacional de Cardiologia, o *Cardio Flash* (Cardio Sistemas Comercial e Indústria LTDA). Através de software específico os sinais gravados pelo Holter foram analisados conforme rotina do serviço. Selecionou-se os parâmetros considerados relevantes para os pacientes com cardiopatia chagásica. Inicialmente, analisou-se o ritmo cardíaco, a condução átrioventricular, o intervalo QT, a frequência cardíaca (FC) máxima, mínima, média durante as 24 horas, as bradiarritmias (bloqueios sinoatriais, atrioventriculares), taquiarritmias (flutter, fibrilação atrial e outras), assim como a presença de pausas \geq a 2,5 segundos.

Seguiu-se a análise das arritmias ventriculares considerando o valor numérico e a complexidade da arritmia. Para o conceito de complexidade da arritmia, levou-se em consideração, pares ou salvas de três ou mais complexos sucessivos de origem supraventricular e ventriculares, bigeminismo e polimorfismo. Considerou-se Taquicardia Ventricular (TV) três ou mais batimentos extrassistólicos sucessivos, sendo TV sustentada quando a duração for superior a 30 segundos e não sustentada quando for menor que 30 segundos ^(123,124).

A instabilidade elétrica manifestada pela presença de arritmias ventriculares e supraventriculares, de acordo com a frequência de aparecimento das arritmias ventriculares e supraventriculares, foi classificada da seguinte maneira: Alta incidência, quando o número de ectopias é maior que 30 /hora ou maior que 720 nas 24 h. Média incidência, quando o número de ectopias é maior que 10 e menor que 30/h, logo > 240 e < 720 nas 24 h e baixa incidência, o número de ectopias é $<$ que 10/h ou até 240 ectopias nas 24 h ⁽¹²³⁾.

A análise da modulação autonômica ⁽¹²⁴⁾ através dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi avaliada no domínio de tempo.

A VFC no domínio de tempo refere-se às variáveis medidas em relação ao tempo (milissegundos). Através de um relatório emitido pelo programa, observam-se as flutuações do ciclo cardíaco ocorridas durante o período de registro e assim obtêm-se os índices relacionados a essas flutuações. Esses índices ^(125,126,127) foram representados pela média do total da gravação (24h) e por períodos que representam

o ciclo circadiano de maior atividade simpática e parassimpática respectivamente (13:00 às 17h e 2:00 às 6:00). Analisou-se os seguintes parâmetros: NNs, NN média, SDNN, SDANN, SDNN-index, NNNs, rMSSD, pNN>50, conforme quadro abaixo :

Quadro 1 - Parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca

| |
|--|
| NNs-número de intervalos P-P considerados normais |
| NNmédia—média de todos os ciclos cardíacos avaliados (ms) |
| SDNN - Desvio padrão de todos os ciclos P-P mensurados durante o registro (ms). Valor= 141± 139 |
| SDANN- desvio padrão da média de todos os seguimentos de 5 min de registro (ms) |
| SDNN-index- média do desvio padrão de todos os seguimentos de 5 min de registro (ms). Valor = 54±15 |
| NNNs-número de intervalos normais adjacentes durante o registro |
| rMSSD-raiz quadrada da média da soma do quadrado das diferenças entre os ciclos adjacentes durante o registro (ms). Valor = 27± 12 |
| pNN50- percentual de variação > que 50ms entre os ciclos normais sucessivos durante o registro (%). Valor = 9 ± 7 |

Fonte: Bigger et al., 1995.

Os parâmetros de VFC no domínio de tempo considerados de maior risco para eventos arrítmicos graves ou morte são: SDANN < 40ms, SDNN <50 ms, rMSSD <15ms e pNN50 < 1%.

4.3.3. O TESTE ERGOMÉTRICO

Foi utilizada a esteira rolante Imbrasport modelo ATL (Comércio de Aparelhos Eletrônicos Ltda). Cinquenta e seis pacientes realizaram o teste ergométrico. Os

protocolos aplicados foram o de Rampa, Bruce, e Naughton. O exame foi realizado em uso da terapêutica vigente.

A disautonomia foi avaliada pela variação da FC no primeiro minuto de recuperação. Foi considerada resposta autonômica inadequada no pós esforço, a queda da FC ≤ 12 batimentos no primeiro minuto de recuperação ⁽¹²⁸⁾.

A variável metabólica analisada, foi o VO_2 máximo, e a capacidade aeróbica funcional foi classificada de acordo com o VO_2 em muito fraca, fraca, boa e excelente.

O VO_2 máximo é a quantidade de oxigênio utilizada pelo corpo em metabolismo aeróbico medida em ml/Kg/min. Representa a capacidade do indivíduo para sintetizar por via aeróbica o ATP (adenosina trifosfato) ⁽¹²⁹⁾. Ele é obtido pela seguinte fórmula:

$VO_2\text{max} = \text{débito sistólico} \times \text{frequência cardíaca} \times \text{diferença arterio-venosa periférica de } O_2$.

As variáveis hemodinâmicas utilizadas foram o *Duplo Produto* (*Duplo Produto* = $FC \times PAS$) usado como índice aproximado do trabalho cardíaco e do consumo de oxigênio miocárdico. Valores maiores que 40.000 refletem uma boa reserva cardíaca e a resposta tensional usada com indicador de resposta inotrópica do coração. O déficit cronotrópico foi definido como a incapacidade do paciente de atingir 85% da FC máxima prevista para idade ($220 - \text{idade}$) ⁽¹²⁹⁾: *Déficit cronotrópico* = $FC \text{ prevista} - FC \text{ atingida} \times 100 / FC$.

As variáveis clínicas foram analisadas utilizando-se a escala de Borg ⁽¹³⁰⁾. Os pacientes foram estimulados a exercitar até a sua capacidade máxima informando sobre os sintomas percebidos durante o exercício.

4.4. POTENCIAIS TARDIOS DE ATIVAÇÃO VENTRICULAR

O Eletrocardiograma de Alta Resolução (ECGAR) ^(131,132,133) foi realizado nos pacientes com eletrocardiograma normal. O aparelho utilizado foi o Cardio Flash multicardiógrafo para Holter, eventos e ECGAR, fabricado no Brasil, que suporta gravação em 3 canais, em uma taxa de 1000 amostras por segundo e resolução de 10

bits por canal. Os eletrodos foram colocados em região subclavicular média esquerda (Y+), na região de V4 (Z +), na região média clavicular direita (neutro), no dorso na altura de V4 (Z-), na região média axilar direita (X-) na região médio axilar esquerda, na altura de V3(X+) e na fossa ilíaca esquerda (Y-). Os sinais eletrocardiográficos captados através das derivações são amplificados, promediados e filtrados bidirecionalmente (40 Hz), analisando-se o final do complexo QRS filtrado (vetor-magnitude resultante de $x^2 + y^2 + z^2$). Analisou-se a duração do QRS filtrado, a duração dos sinais de baixa amplitude (low amplitude signals- LAS), voltagem média dos 40 ms terminais do QRS filtrado (root mean square voltage in the terminal 40 milliseconds of the QRS- RMS) e a duração da onda p. Foram considerados positivos para potenciais tardios os ECGAR com dois parâmetros alterados, RMS < 20 ms e LAS < que 38 ms.

4.5. FUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA

O ecocardiograma transtorácico uni e bidimensional com mapeamento de fluxos à cores e com registro simultâneo de uma derivação eletrocardiográfica foi realizado com o aparelho de ecocardiografia Vivid 7 ou 3 (General Electric, Medical Systems, Milwaukee, WI, EUA), equipados com transdutor de 3,5 MHz e 7 a 10 MHz de frequência sendo o de 3,5MHz utilizado para realização dos exames. Todos os estudos foram armazenados em mídia digital, sendo as medidas ecocardiográficas feitas pelo modo M (unidimensional) e bidimensional, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography (ASE)⁽¹³⁴⁾. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, a espessura do septo interventricular e da parede posterior foram medidos no final da diástole correspondente ao pico da onda R no eletrocardiograma simultâneo. A análise da função sistólica do ventrículo esquerdo foi feita pelo cálculo da fração de ejeção pelo método de Simpson. A avaliação subjetiva da função ventricular esquerda⁽¹³⁵⁾ foi classificada como normal, levemente comprometida, moderadamente comprometida e gravemente comprometida. As anormalidades de movimentação parietal foram pontuadas de acordo com consenso que uniformizou critérios ecocardiográficos aplicáveis à medicina nuclear e ressonância magnética cardíaca. Recomenda-se a divisão do VE em 17 segmentos, sendo 6 deles basais, 6 médios ventriculares, 4 apicais e o décimo sétimo o ápice do VE. Para os segmentos com normocinesia ou hipercinesia a pontuação foi 1, hipocinesia 2,

acinesia 3, discinesia 4 e aneurisma 5. Os valores de todos os segmentos são somados para permitir uma pontuação global da motilidade parietal do ventrículo esquerdo. A soma total é dividida pelo número de segmentos estudados para se obter o índice de escore da motilidade parietal ⁽¹³⁶⁾.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva apresentou sob forma de tabela, os dados observados, expressos pela média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo para dados numéricos e pela frequência (n) e percentual (%) para dados categóricos (qualitativos).

A análise estatística foi composta dos seguintes métodos:

Para medir a associação entre as titulações de anticorpos Anti- β 1 e Anti-M2 com variáveis numéricas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

Para a comparação das titulações de anti- β 1 e anti-M2, entre diferentes subgrupos foi aplicado o teste de Mann Whitney para variáveis com duas categorias, a ANOVA de Kruskal-Wallis para variáveis com três categorias e a Regressão Linear Múltipla (RLM) foi utilizada para identificar as variáveis independentes para explicar as titulações Anti-B1 e Anti-M2. Foram utilizados dados com transformação logarítmica para as titulações

Foram utilizados métodos não paramétricos, pois as titulações não apresentaram distribuição normal (distribuição Gaussiana), devido a rejeição da hipótese de normalidade segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%. A análise estatística foi processada pelos softwares estatísticos SAS[®] versão 6,11 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina) e SPSS versão 17.0.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE DESCRITIVA

6.1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA COORTE

Conforme mostram a Tabela 1 e a Figura 6, foram estudados 64 pacientes chagásicos crônicos. A média de idade observada foi de $62,0 \pm 11,8$ anos (33 a 87 anos) com predomínio do sexo feminino, 70,3%. Trinta e nove pacientes foram de etnia branca (60,9%), 14 negros (21,9%) e 11 (17,2%) pardos.

A população foi composta de migrantes afastados há mais de 30 anos do estado de origem (Figura 6). Predominantemente oriundos da Bahia, Minas Gerais e Pernambuco. Trata-se de trabalhadores rurais, sem história de sedentarismo. Não obesos e, quando portadores de hipertensão arterial encontravam-se geralmente no estágio pré-hipertensão ou estágio I (JNC-7) ⁽¹³⁷⁾ (Figura 7 e tabela 3)

A grande maioria dos pacientes referiu conhecer o inseto vetor por nome de barbeiro e informaram ter conhecimento da doença de Chagas em parentes em primeiro grau.

As condições precárias de habitação, geralmente na infância (casa de estuque) foram observadas em 81% desta população. A via de infecção natural ocorreu em 63 (98,4 %) dos pacientes, houve 1(1,5%) caso de contaminação por transfusão sanguínea e 1(1,5%) caso de acidente vascular embólico. Não observou-se alterações metabólicas importantes. Houve predomínio de glicemias normais e apenas 1(1,5%) paciente apresentava diabetes mellitus tipo II em uso de hipoglicemiantes. Tabagismo e alcoolismo foram dados marcantes na história social da população. O grau de escolaridade, ainda, inclui analfabetismo e uma predominância do ensino fundamental incompleto (Tabela 2).

Ao exame físico observou-se ritmo cardíaco regular em 22 pacientes (34,4%), B4 em 21 (32,8%), B3 em 15 (23,4%) e ritmo irregular por variadas arritmias em 6 pacientes (9,4%) (Figura 7).

Tabela 1 - Características gerais da Coorte

| | N | Média | DP | Mínimo | Máximo |
|-------------------------------|----------|--------------|-----------|---------------|---------------|
| Idade (anos) | 64 | 62,0 | 11,8 | 33 | 87 |
| Peso (Kg) | 64 | 67,3 | 11,0 | 49 | 94 |
| Altura (m) | 64 | 1,59 | 0,09 | 1,45 | 1,81 |
| IMC (Kg/m ²) | 64 | 26,6 | 3,8 | 19,5 | 38,6 |
| PAS (mmHg) | 64 | 130,9 | 22,7 | 90 | 210 |
| PAD (mmHg) | 64 | 81,6 | 8,4 | 60 | 110 |
| Afastado área endêmica (anos) | 64 | 30,7 | 13,3 | 10 | 64 |

DP = desvio padrão PAD=pressão arterial diastólica PAS= pressão arterial sistólica

IMC=índice de massa corporal

Figura 6 - Dados epidemiológicos

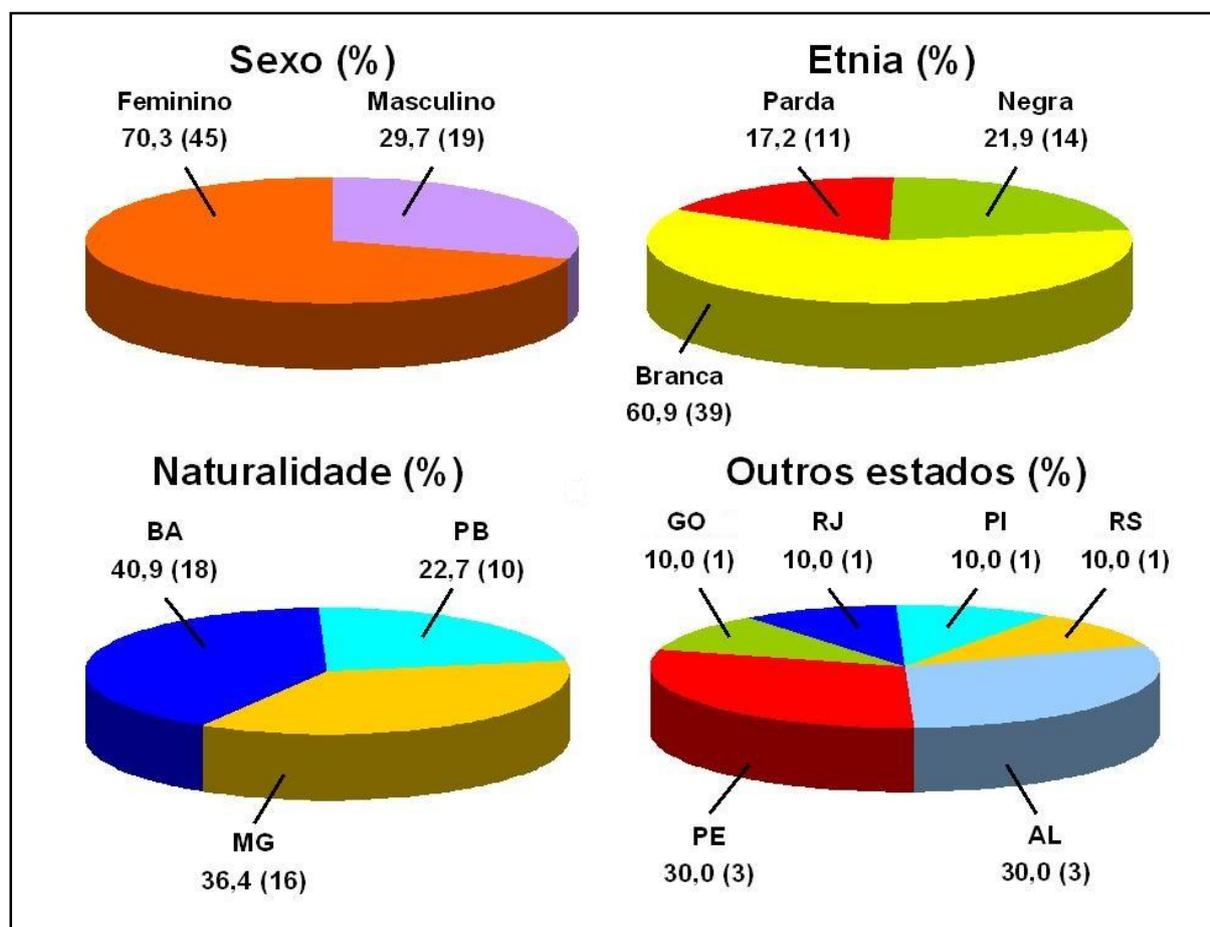
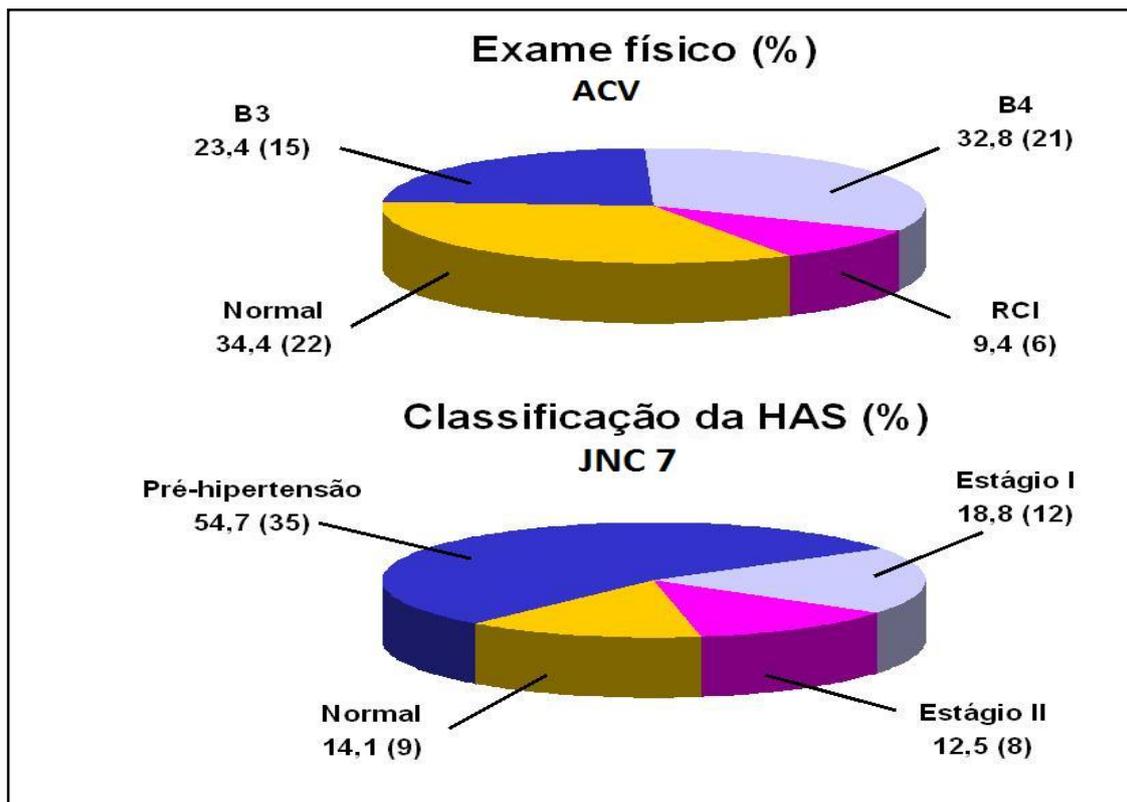


Figura 7 - Classificação da HAS e exame físico



Os sintomas clínicos mais observados foram cansaço, palpitações, síncope e lipotimia. Para a classificação da Insuficiência Cardíaca baseada em sintomas, adotou-se os critérios da NYHA ⁽¹³⁸⁾ e para a cardiopatia chagásica considerando sintomas e alterações estruturais utilizou-se a classificação de Los Andes ⁽¹³⁹⁾. O maior número de pacientes estava classe funcional I e II da NYHA e no grupo II da classificação de Los Andes. Conforme mostra a Figura 8.

Tabela 2 – História Social

| | Categoria | n | % |
|-----------------|-----------|----|------|
| Tabagismo n=38 | Sim | 20 | 52,6 |
| Alcoolismo n=61 | Sim | 33 | 53,2 |

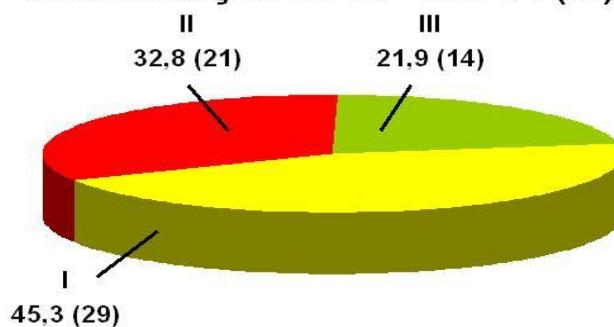
Tabela 3 – Comorbidades

| Variável | categoria | n | % |
|------------------------|------------------|----------|----------|
| Dislipidemia | Não | 40 | 63,5 |
| HAS | Sim | 36 | 56,2 |
| DM Tipo II | Não | 62 | 98,4 |
| Intolerância à glicose | Não | 51 | 79,7 |

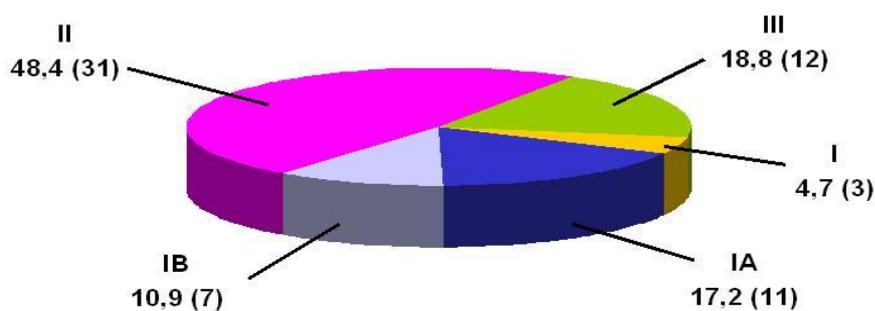
HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica; DM = Diabetes Mellitus

Figura 8 - Classificação da Insuficiência Cardíaca

Classificação de IC - NYHA (%)



Classificação de IC - Los Andes (%)



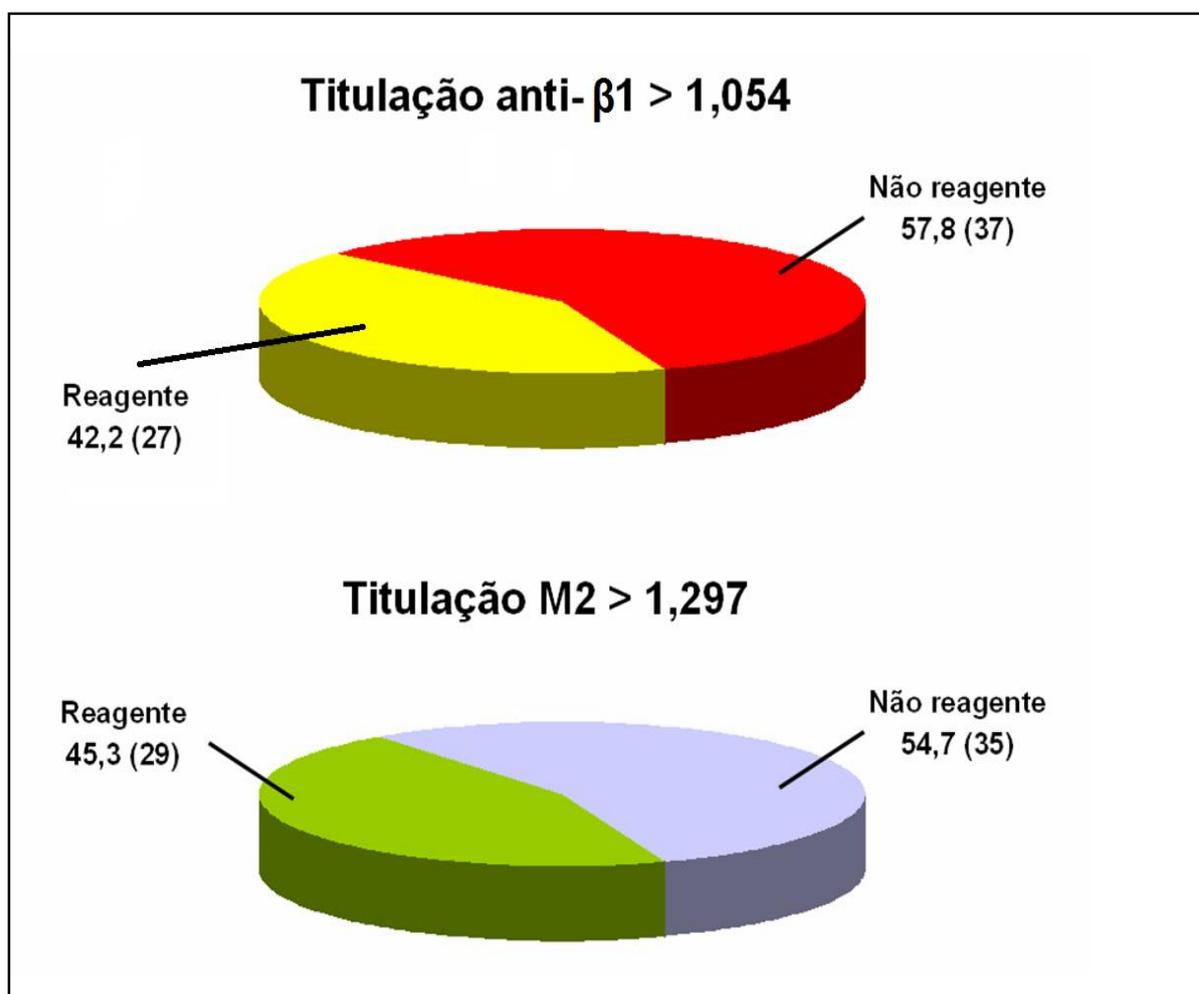
Distribuição dos pacientes com Insuficiência Cardíaca

6.1.2. ANTICORPOS ANTI- β 1 E ANTI-M2

Os anticorpos anti- β 1 reagentes ($>1,054$) foram encontrados em 42,2 % da população, enquanto os anti-M2 ($>$ que 1,297) em 45,3 %. O paciente mais jovem do grupo tem 33 anos e apresenta titulação elevada de anticorpos anti- β 1 no sangue e o mais velho tem 87 anos e também apresenta

concentrações elevadas de anticorpos anti- β 1 e anti-M2 predominando maiores concentrações de β 1 (Figura 9).

Figura 9 – Percentual de anticorpos anti- β 1 e anti-M2

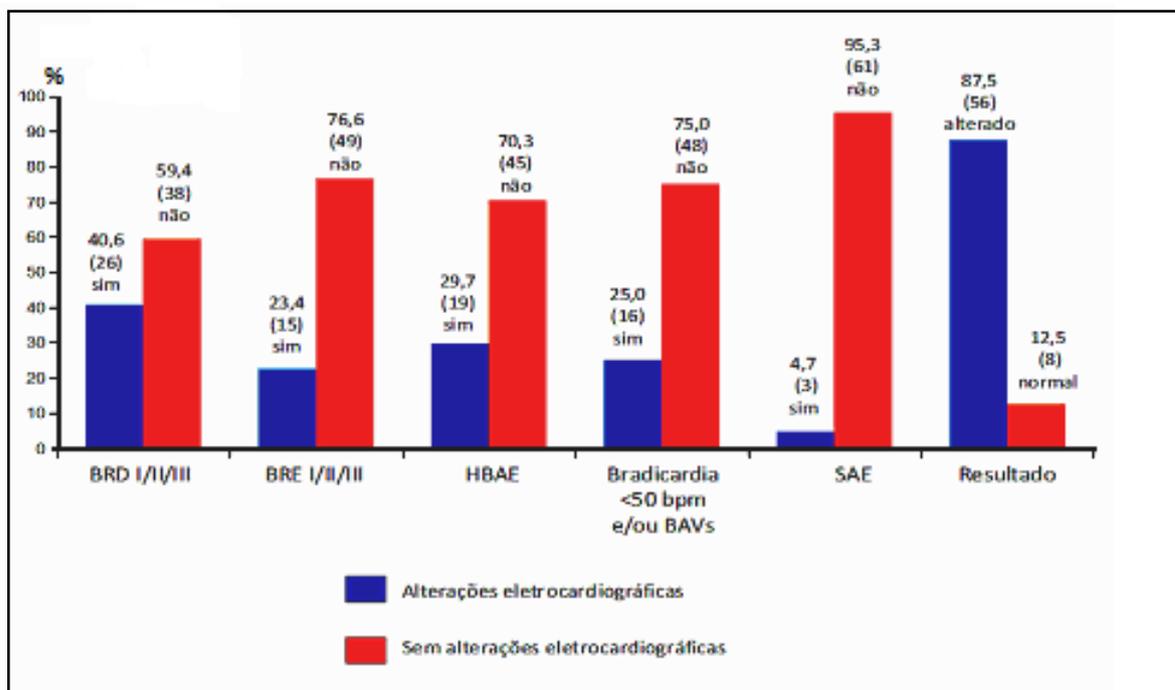


6.1.3. ELETROCARDIOGRAMA

As alterações eletrocardiográficas mais encontradas foram bloqueio de ramo direito, hemibloqueio anterior esquerdo, bloqueio de ramo esquerdo e sobrecarga atrial

esquerda respectivamente. O ECG normal foi encontrado em 8 pacientes (12,5%), conforme mostra o gráfico (Figura 10).

Figura 10 - Alterações eletrocardiográficas categóricas



6.1.4. Eletrocardiograma ambulatorial contínuo pelo sistema Holter de 24 horas (Holter cardíaco de 24 h)

Analisaram-se os ritmos cardíacos, as arritmias e a disautonomia em 62 pacientes, visto que 2, dos 64 pacientes, não realizaram o exame. Destes, 12,(19,4%) eram portadores de marcapasso, 4 (6,5%) apresentavam FA (3,2%) Logo, dos pacientes que fizeram Holter de 24h, apenas 46, apresentavam ritmo sinusal.

Bradicardia menor que 35bpm foi encontrada em 6 pacientes (13,4%) de 46 pacientes em ritmo sinusal, Três pacientes (6,5%) alternavam ritmo sinusal com ritmo de escape juncional.

Pausas maiores que 2,5 segundos foram encontradas em 10 pacientes (19,2%). Foram considerados 50 pacientes, excluindo aqueles com marcapasso.

Taquicardia ventricular polimórfica foi observada em 10 pacientes (20%) de 50 pacientes avaliados (excluídos pacientes com marcapasso).

Vinte e cinco pacientes (40,3%) e 10 (16,1%) dos 62 pacientes apresentaram arritmia ventricular e supraventricular com alta instabilidade elétrica, respectivamente.

Bloqueio atrioventricular (BAV) do tipo Mobtz I foi encontrado em 3 pacientes (6%) de 50 avaliados. BAV tipo Mobitz II em 2 pacientes (4%) e BAV total em 1 (2%) conforme mostram as tabelas abaixo: (tabelas 4, 5 e 6)

Tabela 4 - Ritmo cardíaco ao Holter de 24h

| Variável | categoria | n | % |
|---------------------------|------------------|----------|----------|
| Ritmo Cardíaco | Sinusal | 46 | 74,2 |
| | FA | 4 | 6,5 |
| | Marcapasso | 12 | 19,4 |
| Pausas \geq 2,5 s | Sim | 10 | 20,0 |
| | Não | 40 | 80,0 |
| Bradicardia < que 35 bpm | Sim | 6 | 13,4 |
| | Não | 40 | 86,6 |
| Bloqueio sinoatrial | Sim | 0 | 0,0 |
| | Não | 46 | 100,0 |
| Rítmo de escape juncional | Sim | 3 | 6,5 |

Não 43 93,5

Tabela 5 - Bradiarritmias e Taquiarritmias ao Holter de 24 h

| Variável | categoria | n | % |
|--------------------------------|------------------|----------|----------|
| Bloqueio AV | Mobitz I | 3 | 6,0 |
| | Mobitz II | 2 | 4,0 |
| | Total | 1 | 2,0 |
| | Nenhum | 40 | 88,0 |
| Fibrilação atrial e ou Flutter | Sim | 4 | 8,0 |
| | Não | 46 | 92,0 |
| Taquicardia polimórfica | Sim | 10 | 20,0 |
| | Não | 40 | 80,0 |

Tabela 6 - Arritmias cardíacas ao Holter de 24 h

| Variável | n | Média | DP | Mediana |
|--|----------|--------------|-----------|----------------|
| Extrassístoles ventriculares isoladas | 62 | 1591,2 | 2891,5 | 293,5 |
| Bigeminismo | 62 | 474,5 | 2081,1 | 0 |
| Ventriculares - pares | 62 | 64,6 | 184,9 | 1,5 |
| TV não sustentada | 62 | 6,23 | 26,02 | 0 |
| Extrassístoles supraventriculares isoladas | 62 | 490,8 | 1407,9 | 19,5 |
| Supraventriculares - em pares | 62 | 20,9 | 135,6 | 0 |
| TSV não sustentada | 62 | 33,5 | 223,8 | 0 |

DP = desvio padrão

Foram avaliados 46 pacientes com ritmo sinusal ao Holter cardíaco. Destes, a modulação autonômica esteve normal em 38 pacientes (82,7%) e baixa em 8 (17,3%)
Vide tabela 7:

Tabela 7 - Disautonomia ao Holter de 24 h

| Variável | categoria | n | % |
|----------------------|------------------|----------|----------|
| Modulação autonômica | Normal | 38 | 82,7 |
| | Baixa | 8 | 17,3 |

6.1.5. TESTE ERGOMÉTRICO

As Tabelas 8 e 9 mostram a análise descritiva das variáveis numéricas e categóricas ao TE. A média de VO_2 max encontrado neste grupo foi $23,8\text{ml}/O_2/\text{Kg}/\text{min} \pm 8,8$ e do duplo produto foi 20.242 ± 8.357 . Vinte e um pacientes apresentaram razoável tolerância ao exercício (37,5%) e 22 (39,2%) muito fraca e fraca tolerância ao esforço. A resposta cronotrópica esteve deprimida em 29 pacientes (56,9%) e a resposta inotrópica em 5 (9,3%). Treze pacientes (24,5%) apresentaram TV não sustentada e ou arritmias polimórficas durante o esforço. Vide tabelas a seguir.

Tabela 8 - Análise descritiva dos parâmetros ao Teste Ergométrico

| Variável | n | média | DP | mediana | mínimo | máximo |
|--------------------------|----|---------|--------|---------|--------|--------|
| VO_2 max (ml/kg/min) | 56 | 23,8 | 8,8 | 22,15 | 7,04 | 48,22 |
| MET Max | 46 | 7,37 | 2,27 | 6,73 | 2,57 | 13,78 |
| Déficit cronotrópico (%) | 43 | 24,9 | 21,0 | 22,1 | -31,6 | 100 |
| Reserva cronotrópica | 49 | 53,6 | 28,0 | 53 | -2 | 113 |
| Duplo Produto | 56 | 20242,0 | 8357,9 | 20200 | 1170 | 42000 |

Tabela 9 - Desempenho cardíaco e Arritmias ao Teste Ergométrico

| Variável | Categoria | n | % |
|-----------------------------|-------------------------------------|----------|----------|
| Aptidão cardio-respiratória | Muito fraca | 11 | 19,6 |
| | Fraca | 11 | 19,6 |
| | Razoável | 21 | 37,5 |
| | Boa | 8 | 14,3 |
| | Excelente | 5 | 8,9 |
| Resposta cronotrópica | Normal | 22 | 43,1 |
| | Deprimida | 29 | 56,9 |
| Resposta inotrópica | Normal | 49 | 90,7 |
| | Deprimida | 5 | 9,3 |
| Arritmias | Monomórficas | 14 | 26,4 |
| | Polimórficas / TV Não sustentada | 13 | 24,5 |
| | Sem arritmias | 26 | 49,1 |

TV=taquicardia ventricular

6.1.6 – ECGAR

Dezoito pacientes (36%) dos 50 pacientes estudados fizeram ECGAR e destes, 16 (88%) apresentaram presença de potenciais elétricos tardios preditores de arritmia cardíaca, contudo não observou-se correlação significativa entre esses potenciais e a titulação dos anticorpos anti- β 1 e M2. Vide tabela a seguir (Tabela 10).

Tabela 10 - Potenciais tardios

| Variável | Categoria | n | % |
|---------------------|------------------|----------|----------|
| LAS e RMS alterados | Positivo | 16 | 88,9 |
| | Normal | 2 | 11,1 |

LAS = low amplitude signal

RMS = root mean square voltage in the terminal 40 milliseconds of the QRS-RMS

6.1.7. ECOCARDIOGRAMA

A maioria dos pacientes apresentaram função sistólica global normal (68,7%) pela análise numérica da fração de ejeção (método de Simpson) . A análise subjetiva, mostrou grave comprometimento da função ventricular em 14,1% dos pacientes, moderado comprometimento em 9,4% e leve em 7,8 %. Quanto às alterações da contratilidade segmentar do VE observou-se que esteve alterada em 27 pacientes (42,2%). Os diâmetros cavitários estão descritos abaixo. Observe as tabelas a seguir (Tabelas 11 e 12):

Tabela 11 - Análise descritiva das variáveis ecocardiográficas

| | n | Média | DP | Máximo |
|-----------------------------|----------|--------------|-----------|---------------|
| Aorta (cm) | 64 | 3,12 | 0,42 | 4,4 |
| Àtrio esquerdo (cm) | 64 | 3,86 | 0,67 | 5,8 |
| Ventrículo direito (cm) | 64 | 2,06 | 0,62 | 5,9 |
| VE diâmetro Sistólico (cm) | 64 | 3,72 | 1,11 | 7,6 |
| VE diâmetro diastólico (cm) | 64 | 5,37 | 0,76 | 8,4 |
| SIV (cm) | 64 | 0,919 | 0,215 | 1,5 |

| | | | | |
|----------------|----|-------|-------|-----|
| PPVE (cm) | 64 | 0,897 | 0,207 | 1,6 |
| FE Simpson (%) | 62 | 53,2 | 15,5 | 8,3 |
| Escore | 64 | 1,33 | 0,45 | 2,1 |

DP: desvio padrão

Tabela 12 - Função global e segmentar do VE

| Variável | categoria | n | % |
|------------------------------------|-----------|----|------|
| Função Sistólica (comprometimento) | Normal | 44 | 68,7 |
| | Leve | 5 | 7,8 |
| | Moderado | 6 | 9,4 |
| | Grave | 9 | 14,1 |
| Alteração difusa da contratilidade | Sim | 27 | 42,2 |
| | Não | 37 | 57,8 |

6.2. GRAU DE ASSOCIAÇÃO DAS VARIÁVEIS NUMÉRICAS COM AS TITULAÇÕES DE ANTICORPOS ANTI- β 1 E ANTI-M2.

6.2.1 – Eletrocardiograma ambulatorial contínuo pelo sistema Holter de 24h (Holter cardíaco de 24 h)

Observou-se que existe uma correlação inversa significativa entre a titulação anti- β 1 com SDNN index, no período de 2 às 6 h ($r_s = -0,313$; $p = 0,041$; $n = 43$). Logo, quanto maior o valor da titulação anti- β 1, menor o valor esperado do SDNN index de 2 às 6h.

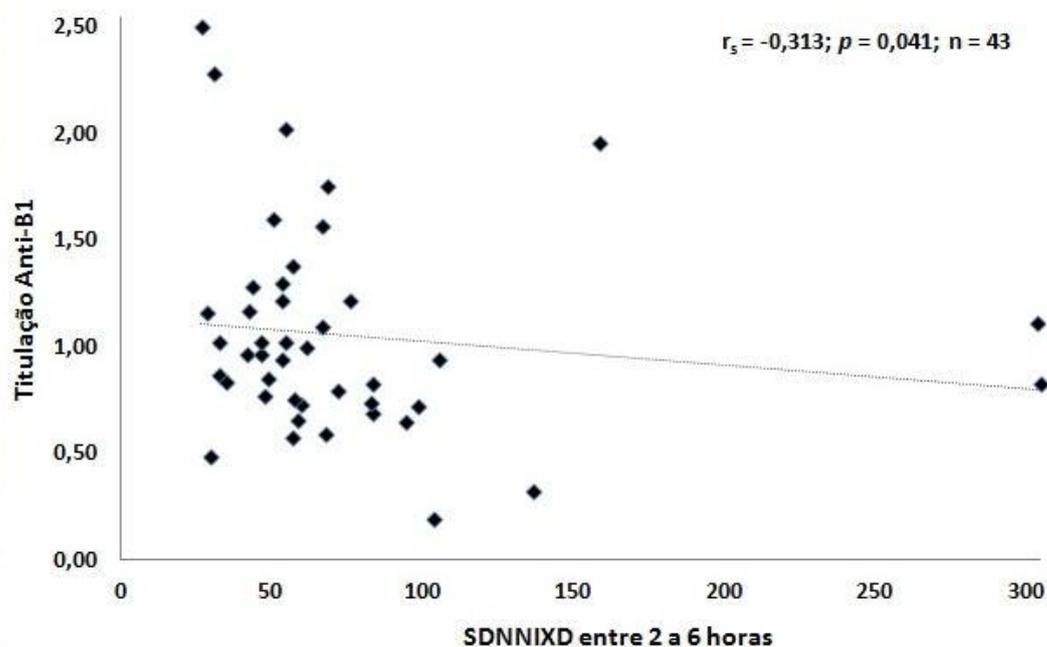
Existe também uma correlação direta significativa entre a titulação de M2 com o SDANN de 2 às 6h ($r_s = 0,317$; $p = 0,039$; $n = 43$) ou seja quanto maior o valor da titulação de anti-M2 maior o valor esperado de SDANN de 2 às 6h, conforme a Tabela 13 e Figuras 11 e 12.

Tabela 13 - Correlação das titulações Anti- β 1 e anti- M2 com variáveis numéricas ao Holter cardíaco de 24h

| Variável | Titulação Anti- β 1 | | | Titulação M2 | |
|-----------------------|---------------------------|---------------|----------------|--------------|----------------|
| | n | r_s | <i>p valor</i> | r_s | <i>p valor</i> |
| NNs – 2 - 6h | 43 | 0,067 | 0,67 | -0,177 | 0,26 |
| NN média – 2 - 6h(ms) | 43 | -0,101 | 0,52 | 0,033 | 0,83 |
| SDNN – 2 - 6h (ms) | 43 | -0,122 | 0,44 | 0,283 | 0,066 |
| SDANN – 2 - 6h (ms) | 43 | -0,052 | 0,74 | 0,317 | 0,039 |
| SDNN index – 2 - 6h | 43 | -0,313 | 0,041 | 0,072 | 0,65 |
| NNNs – 2 - 6h | 43 | 0,078 | 0,62 | -0,184 | 0,24 |
| rMS SD – 2 - 6h (ms) | 43 | -0,273 | 0,077 | -0,003 | 0,99 |
| pNN 50 – 2 - 6h (%) | 43 | -0,218 | 0,16 | 0,015 | 0,92 |

r_s : coeficiente de correlação de Spearman.

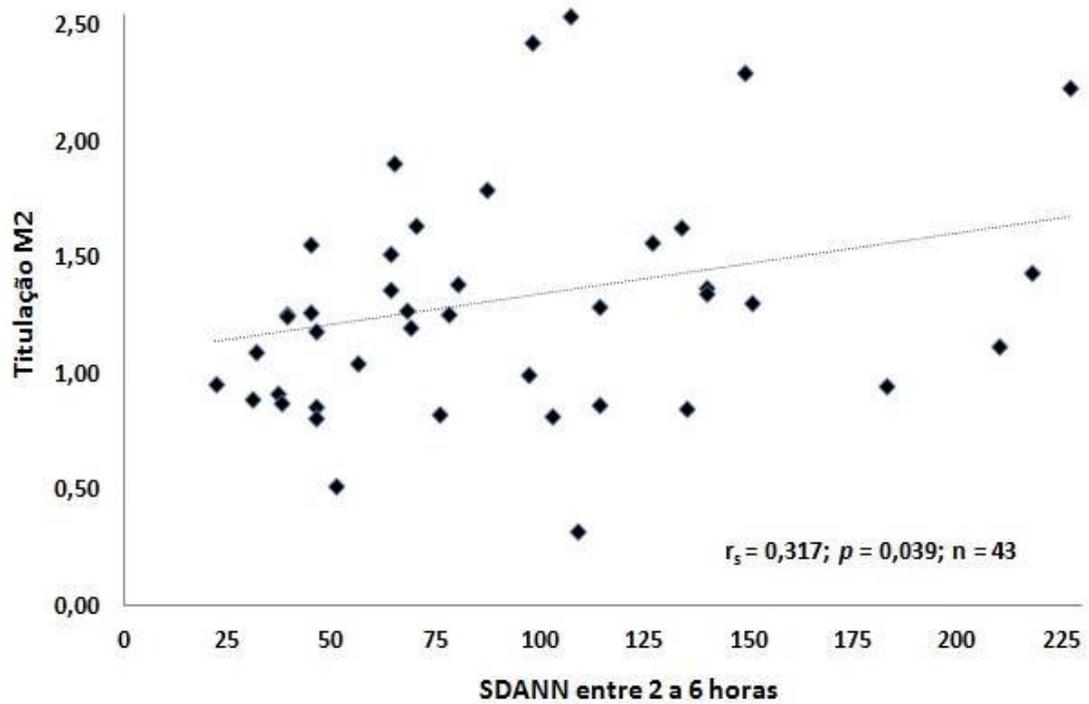
Figura 11 - Correlação Anti- β 1 com SDNN index – Holter 24 h



6.2.2. TESTE ERGOMÉTRICO (TE)

A análise do TE mostrou que existe uma correlação direta significativa entre a titulação de Anti- β 1 com o Duplo (6), ou seja, quanto maior o valor da titulação de a SDNN index – 2 às 6 h do duplo produto conforme mostra a figura 13 e a tabela 14.

Figura 12 - Correlação Anti-M2 com SDNN index – Holter 24 h



SDANN – 2 às 6 h

Figura 13 - Correlação de Anti- β 1 com duplo produto – TE

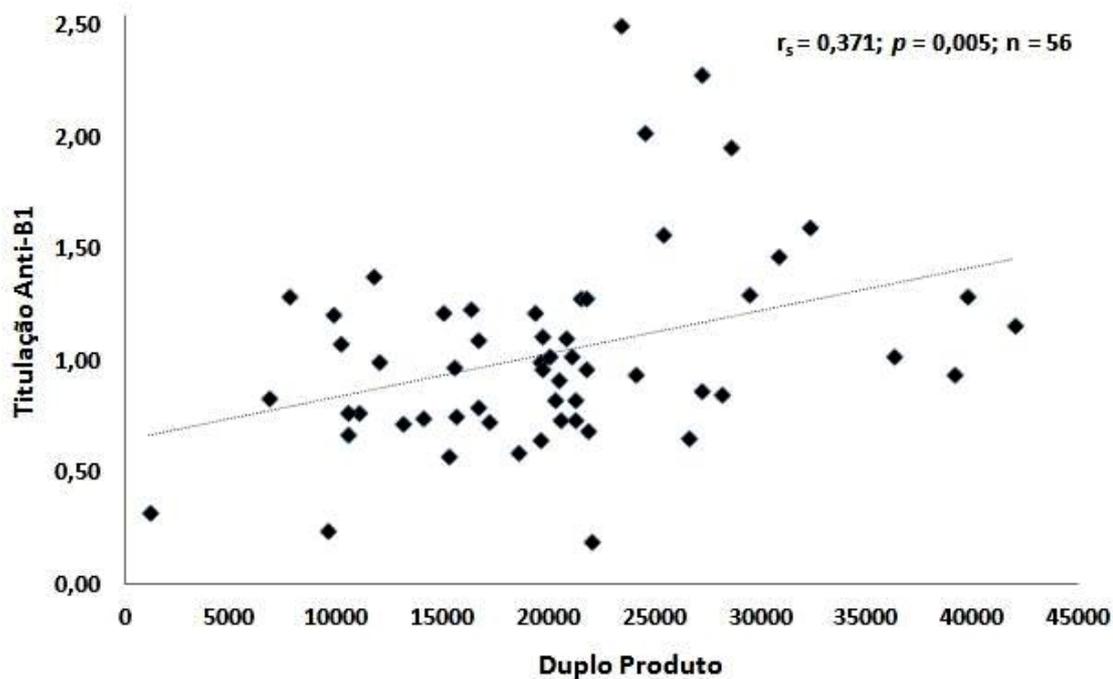


Tabela 14 - Correlação das titulações Anti- β 1 e anti-M2 com variáveis numéricas do teste ergométrico

| Variável | Titulação Anti- β 1 | | | Titulação M2 | |
|---------------------------------|---------------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| | n | r_s | <i>p valor</i> | r_s | <i>p valor</i> |
| VO ₂ max (ml/kg/min) | 56 | 0,111 | 0,41 | 0,052 | 0,70 |
| MET max | 46 | 0,063 | 0,68 | 0,017 | 0,91 |
| Déficit cronotrópico (%) | 43 | -0,272 | 0,078 | -0,101 | 0,52 |
| Reserva cronotrópica | 49 | 0,225 | 0,12 | -0,065 | 0,66 |
| Duplo Produto | 56 | 0,371 | 0,005 | 0,058 | 0,67 |

r_s : coeficiente de correlação de Spearman

Dos 56 pacientes que realizaram o TE, a variável resposta cronotrópica foi calculada em 51 pacientes e a variável resposta inotrópica em 54 deles. O subgrupo com resposta cronotrópica normal apresentou titulação anti- β 1 significativamente maior que o subgrupo com resposta cronotrópica deprimida ($p=0,023$). O subgrupo com resposta inotrópica normal apresentou titulação anti- M2 significativamente maior que o subgrupo com resposta inotrópica deprimida ($p=0,044$), vide Tabelas 15 e 16:

Tabela 15 - Correlação entre a titulação de anti- β 1 e variáveis categóricas ao teste ergométrico

| Variável | Categoria | n | média | DP | mediana | <i>p valor</i> |
|-----------------------|---------------|----|-------|-------|---------|----------------|
| Arritmias | Monomórficas | 14 | 0,987 | 0,448 | 0,957 | 0,89 |
| | TVNS. | 13 | 1,014 | 0,364 | 0,865 | |
| | Sem arritmias | 26 | 1,085 | 0,495 | 1,000 | |
| Resposta cronotrópica | Normal | 22 | 1,161 | 0,479 | 1,107 | 0,023 |
| | Deprimida | 29 | 0,908 | 0,343 | 0,836 | |
| Resposta inotrópica | Normal | 49 | 1,078 | 0,440 | 1,002 | 0,17 |
| | Deprimida | 5 | 0,848 | 0,312 | 0,758 | |

Tabela 16 - Correlação entre a titulação de anti-M2 e variáveis categóricas ao Teste Ergométrico

| Variável | categoria | n | média | DP | mediana | <i>p valor</i> |
|-----------------------|-----------|----|-------|-------|---------|----------------|
| Resposta cronotrópica | Normal | 22 | 1,385 | 0,629 | 1,270 | 0,71 |
| | Deprimida | 29 | 1,299 | 0,489 | 1,259 | |
| Resposta inotrópica | Normal | 49 | 1,426 | 0,577 | 1,288 | 0,044 |

| | | | | |
|-----------|---|-------|-------|-------|
| Deprimida | 5 | 1,002 | 0,173 | 1,075 |
|-----------|---|-------|-------|-------|

6.2.3. ECG

Cinquenta e dois pacientes apresentaram ritmo sinusal até o final do estudo. Um dos pacientes teve o marcapasso implantado após esta análise. Logo, 53 pacientes foram analisados com ritmo sinusal. Cinco pacientes estavam em ritmo de FA e um desses pacientes com FA também implantou marcapasso posteriormente. Para o critério de significância adotado (nível de 5%), e considerando os 64 pacientes estudados observou-se que o subgrupo com ritmo cardíaco de Fibrilação atrial (FA) apresentou titulação anti- β 1 significativamente maior que o grupo com ritmo sinusal ($p = 0,01$). O subgrupo com ritmo cardíaco sinusal apresentou titulação anti-M2 significativamente menor que o subgrupo sem ritmo cardíaco sinusal ($p = 0,035$). O subgrupo com ritmo cardíaco de FA apresentou titulação anti-M2 significativamente maior que o subgrupo sem FA ($p = 0,029$). Neste momento de análise onze pacientes estavam usando marcapasso, e um paciente alternava ritmo sinusal com FA. Foram considerados 5 pacientes com FA para análise. Vide tabelas abaixo (Tabelas 17 e 18):

Tabela 17 - Titulação de Anti- β 1 segundo as variáveis categóricas ao eletrocardiograma

| Variável | categoria | n | média | DP | mediana | <i>p valor</i> |
|----------|-----------|---|-------|----|---------|----------------|
|----------|-----------|---|-------|----|---------|----------------|

| | | | | | | |
|------------------------|-----|----|-------|-------|-------|--------------|
| Ritmo cardíaco sinusal | Sim | 53 | 1,021 | 0,474 | 0,945 | 0,083 |
| | Não | 11 | 1,171 | 0,287 | 1,233 | |
| Ritmo cardíaco FA | Sim | 5 | 1,398 | 0,150 | 1,379 | 0,010 |
| | Não | 59 | 1,017 | 0,454 | 0,970 | |

DP: desvio padrão

FA= fibrilação atrial

Tabela 18 - Titulação anti- M2 segundo as variáveis categóricas ao eletrocardiograma

| Variável | categoria | n | média | DP | mediana | <i>p valor</i> |
|------------------------|-----------|----|-------|-------|---------|----------------|
| Ritmo cardíaco sinusal | Sim | 53 | 1,307 | 0,537 | 1,259 | 0,035 |
| | Não | 11 | 1,718 | 0,665 | 1,487 | |
| Ritmo cardíaco FA | Sim | 5 | 1,766 | 0,416 | 1,599 | 0,029 |
| | Não | 59 | 1,345 | 0,580 | 1,259 | |

DP: desvio padrão

FA: fibrilação atrial

6.2.4. ECGAR

Não foi observada correlação significativa entre as titulações Anti- β 1 e anti- M2 e as variáveis analisadas ao ECGAR. Vide tabela 19.

| Variável | Titulação Anti-B1 | | | Titulação M2 | |
|-------------------|-------------------|--------|----------------|--------------|----------------|
| | n | r_s | <i>p valor</i> | r_s | <i>p valor</i> |
| RMS >20 | 18 | -0,268 | 0,28 | -0,121 | 0,63 |
| LAS < 38 | 18 | 0,006 | 0,98 | 0,059 | 0,82 |
| Duração QRS < 114 | 18 | 0,170 | 0,50 | 0,074 | 0,77 |

Tabela 19 - Correlação das titulações anti- β 1 e anti-M2 com ECGAR

r_s : coeficiente de correlação de Spearman.

6.2.5. ECOCARDIOGRAMA

Não observou-se correlação significativa entre função ventricular esquerda global e segmentar ao ecocardiograma (fração de ejeção pelo método de Simpson) e as titulações de anti- β 1 e anti-M2. Vide tabelas abaixo (Tabelas 20 e 21):

Tabela 20 – Titulações de anti- β 1 e anti-M2 e função ventricular – ecocardiograma

| Variável | Titulação Anti-B1 | Titulação M2 |
|----------|-------------------|--------------|
|----------|-------------------|--------------|

| | n | r_s | p valor | r_s | p valor |
|-----------------|----------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|
| FE Teicholz (%) | 64 | 0,077 | 0,55 | -0,086 | 0,50 |
| FE Simpson (%) | 62 | 0,045 | 0,73 | -0,036 | 0,78 |
| Score | 64 | -0,057 | 0,65 | 0,030 | 0,81 |

r_s: coeficiente de correlação de Spearman

Tabela 21 – Titulações de anti-β1 e anti-M2 – Escore – ecocardiograma

| Variável | ECO - Escore normal (=1) | | | | ECO - Escore alterado (>1) | | | | p valor |
|-------------------|---------------------------------|--------------|-----------|----------------|--------------------------------------|--------------|-----------|----------------|----------------|
| | n | média | DP | mediana | n | média | DP | mediana | |
| Titulação anti-β1 | 37 | 1,102 | 0,503 | 1,022 | 27 | 0,972 | 0,360 | 0,945 | 0,39 |
| Titulação anti-M2 | 37 | 1,359 | 0,562 | 1,275 | 27 | 1,402 | 0,607 | 1,275 | 0,87 |

DP: desvio padrão

Analisou-se também se existe diferença estatística das titulações dos anticorpos anti-β1 e anti-M2, das variáveis do Holter cardíaco e teste ergométrico entre os grupos com função sistólica normal e alterada ao ecocardiograma.

Observou-se que o subgrupo com função sistólica alterada apresentou duplo produto significativamente menor que o subgrupo com função sistólica normal ($p = 0,017$). Não existe diferença significativa nas demais variáveis entre os dois subgrupos, ao nível de 5% (Tabela 22).

Tabela 22 - Titulações de anti-β1, anti-M2, variáveis do HOLTER e TE - Função sistólica ao ecocardiograma

| Variável | Função sistólica normal | | | | Função sistólica alterada | | | | p valor |
|-------------------|--------------------------------|--------------|-----------|----------------|----------------------------------|--------------|-----------|----------------|----------------|
| | n | média | DP | mediana | n | média | DP | mediana | |
| Titulação Anti-β1 | 44 | 1,046 | 0,488 | 0,97 | 20 | 1,048 | 0,363 | 1,015 | 0,66 |
| Titulação Anti-M2 | 44 | 1,341 | 0,589 | 1,262 | 20 | 1,458 | 0,557 | 1,335 | 0,35 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------|----|-------|------|-------|----|-------|------|-------|--------------|
| SDNN-index - 2-6h | 34 | 74,1 | 63,2 | 56 | 9 | 75,0 | 37,8 | 62,0 | 0,42 |
| SDANN - 2-6h (ms) | 34 | 90,5 | 51,9 | 77 | 9 | 95,2 | 58,2 | 80,0 | 0,81 |
| Duplo Produto | 39 | 21790 | 8586 | 21250 | 17 | 16689 | 6766 | 16660 | 0,017 |

DP: desvio padrão

6.3. ANÁLISE MULTIVARIADA: REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

A análise multivariada foi composta pela Regressão Linear Múltipla (RLM) para avaliar a influência simultânea das variáveis explicativas sobre a titulação dos anticorpos anti- β 1 e anti-M2, na amostra em estudo.

Conforme mostra a tabela abaixo, o Duplo Produto ($p=0,016$) foi variável independente, ao nível de 5%, para explicar a titulação anti- β 1, ou seja, quanto maior o duplo produto, maior o valor esperado da titulação anti- β 1.

O SDANN de 2 às 6h ($p= 0,13$) foi variável independente ao nível de 15% para explicar a titulação de M2, logo, quanto maior o SDANN de 2 às 6 h maior o valor esperado da titulação de M2, vide Tabelas 23 e 24.

Tabela 23 - Análise de Regressão Múltipla para a titulação Anti- β 1.

| Variável | coeficiente | erro padrão | p valor | R ² modelo |
|----------------------|-------------|-------------|---------|-----------------------|
| Duplo Produto | 0,0000224 | 0,0000089 | 0,016 | 0,142 |

Processo de seleção foi o *stepwise forward*, ao nível de 5%.

Tabela 24 - Análise de Regressão Múltipla para a titulação M2.

| Variável | coeficiente | erro padrão | <i>p</i> valor | R ² modelo |
|-------------------------|-------------|-------------|----------------|-----------------------|
| SDANN de 2 a 6hs | 0,001821 | 0,001191 | 0,13 | 0,054 |

Processo de seleção foi o *stepwise forward*, ao nível de 15%.

7. DISCUSSÃO

O perfil da população estudada compõe-se de pacientes provenientes de vários estados brasileiros, geralmente a procura de trabalho e melhores condições de vida. Afastados da região endêmica há longa data, enfrentam problemas diversos para sobrevivência na metrópole que vão desde moradia, transportes, emprego até acesso a hospitais terciários para atendimento médico.

Muitos serviços no Brasil desconhecem a abordagem terapêutica ⁽¹⁴⁰⁾ e suas particularidades em relação à doença de Chagas, principalmente na fase crônica, quando arritmias graves, bloqueios átrioventriculares, insuficiência cardíaca descompensada, com necessidade de implante de marcapasso e cardiodesfibriladores, obrigatoriamente os direcionam para serviços terciários que disponham de equipes especializadas para tais procedimentos.

A relação desse paciente com a Previdência Social é complexa, uma vez que exames sorológicos positivos dificultam sua admissão no mercado de trabalho. A aposentadoria precoce desfaz um sonho e a perspectiva de uma qualidade de vida melhor, motivo que os impulsionaram a deixar seus estados de origem.

Fica evidente nesse trabalho o índice elevado de alcoolismo, tabagismo, desemprego, e baixo grau de instrução escolar o que os colocam de volta na base da pirâmide social prejudicando o avanço de uma sociedade mais justa e igualitária.

Nosso estudo relacionou a titulação de anti- β 1 e anti-M2 com disautonomia avaliada através do Holter de 24h e teste ergométrico. Além da VFC avaliou-se ao Holter as taquiarritmias e bradiarritmias. Comparou-se os anticorpos anti- β 1 e anti-M2, com a presença de potenciais tardios ao ECGAR. O ecocardiograma avaliou a função ventricular nesses pacientes correlacionando-a com a titulação dos anticorpos anti β 1 e anti-M2.

Alguns autores ⁽¹⁴¹⁾ demonstraram que a etiologia chagásica é um preditor independente da mortalidade por todas as causas ao estudar uma população formada por pacientes com miocardiopatia dilatada de causa idiopática (MDI) e miocardiopatia chagásica. A probabilidade de sobrevida foi menor nos pacientes chagásicos.

Um outro estudo ⁽¹⁴²⁾, com 1053 pacientes chagásicos crônicos acompanhados durante 13 anos para avaliar mecanismo de morte e função ventricular esquerda nesses pacientes, observou que ocorreram 93 óbitos. Setenta e oito (83%) por morte cardíaca sendo que em 53 pacientes morte súbita foi o mecanismo de morte mais frequente em qualquer faixa de fração de ejeção, morte por insuficiência cardíaca ocorreu em pacientes com fração de ejeção $\leq 35\%$ e em classe funcional III ou IV com tratamento clínico otimizado.

Percebe-se assim a importância de adquirir conhecimentos que possam contribuir para o esclarecimento da etiopatogenia da doença de Chagas uma vez que pacientes jovens e em fases produtivas de suas vidas estão todo o tempo ameaçados pelo risco da morte súbita.

Considerando os mecanismos propostos atualmente que discutem a patogênese da doença de Chagas, acredita-se que a interação entre tais mecanismos possa explicar o comprometimento cardíaco grave observado nesses pacientes.

As alterações celulares observadas em biópsia de paciente chagásicos tais como infiltrados de células mononucleares confluentes com fibrose, espasmos de microcirculação e comprometimento da matriz intersticial agravam a isquemia e contribuem para o remodelamento miocárdico ^(51,116,143).

Os achados inflamatórios que resultam na secreção de diferentes citocinas estabelecem um perfil de resposta imunológica característica dos pacientes chagásicos. A diferenciação de células CD4+ em linfócitos T helper tipo I (Th1) controlam a parasitemia, mas não a infecção durante a evolução da doença ^(106,107,111)

Tem sido observado níveis plasmáticos elevados de TGF β em pacientes com cardiopatia chagásica crônica e também níveis mais elevados naqueles com descompensação cardíaca, quando comparados com pacientes não infectados ⁽⁵³⁾. Outros autores ⁽¹⁴⁴⁾ encontraram marcadores de desfechos desfavoráveis particularmente na doença de Chagas, o TNF e a IL-6.

Nesse contexto, repleto de possibilidades inflamatórias e autoimunes relacionados à etiopatogenia da doença de Chagas compreender o mecanismo exato que exacerba as alterações miocárdicas, abre espaço para novas perspectivas terapêuticas voltadas para uma população demasiadamente sofrida e negligenciada.

O envolvimento do sistema imunológico com produção de anticorpos antirreceptores adrenérgicos $\beta 1$ (anti- $\beta 1$) e antirreceptores muscarínicos (anti-M2) são

discutidos intensamente e foram descritos há mais de três décadas. O envolvimento do sistema nervoso autônomo na cardiopatia chagásica acompanha a história natural da doença^(60,61,77,79-85).

Os anticorpos antirreceptores $\beta 1$ são capazes de estimular receptores $\beta 1$ adrenérgicos cardíacos causando uma resposta semelhante à dos agonistas adrenérgicos, assim níveis elevados desses anticorpos têm sido associados à disfunção ventricular esquerda e arritmias complexas. Os anticorpos antirreceptores M2 parecem exercer efeitos na eletrogênese cardíaca através de uma ação agonista semelhante à da acetilcolina nos receptores M2 do coração, conforme mostram estudos experimentais^(82,84, 86, 87,101,102).

Para estabelecer o papel dos anticorpos na cardiopatia chagásica é preciso compreender os mecanismos que controlam a fisiologia do aparelho circulatório tanto em indivíduos normais quanto em cardiopatas.

A função cardíaca é regulada por diversas cascatas sinalizadoras unidas por autorregulação e ainda sofre ação de mecanismos reguladores sistêmicos que exercem efeito direto sobre o músculo cardíaco. Portanto o coração dispõe de uma verdadeira “engenharia” capaz de integrar essas vias em uma única unidade funcional. Logo, o coração funciona como um órgão endócrino e parácrino, regulando os vários mecanismos de sinalização por *cross-talk* através de receptores^(145, 146).

Entende-se como *cross-talk* a habilidade dos componentes de uma determinada via de transdução na circulação influenciar componentes de outra via. Existem pelo menos três cascatas sinalizadoras que controlam a função circulatória cardíaca, os receptores $\beta 1$ adrenérgicos responsáveis pelo aparato contrátil do coração, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, que controla a pressão arterial sanguínea e os peptídeos natriuréticos que contribuem com fatores que regulam a pressão sanguínea.

Dados na literatura⁽¹⁴⁶⁾ mostram que além da resposta cruzada entre os receptores adrenérgicos, quando estimulados, eles são capazes de ativar alterações no sinal de transdução de outros sistemas cardiovasculares como receptores da angiotensina, endotelina, receptores muscarínicos da acetilcolina, receptores dos peptídeos natriuréticos. O estímulo dessas vias pode aumentar ou diminuir a liberação de catecolaminas endógenas dependentes de uma infrarregulação ou dessensibilização dos receptores adrenérgicos.

A disautonomia ou disfunção autonômica e a denervação do nódulo sinusal causam importantes transtornos arrítmicos e risco de morte súbita para esses pacientes ^(65,66).

A contribuição do presente estudo traduz-se na possibilidade de mostrar o papel dos anticorpos anti- β 1 e anti-M2 na VFC ao Holter de 24 h. A diminuição da VFC é considerada um fator de risco independente para eventos arrítmicos e mortalidade global ^(127,128). Alguns autores mostram que uma menor VFC implica em perda da atividade cardioprotetora do sistema parassimpático ^(147,148).

São escassos os trabalhos na literatura que avaliam a VFC em pacientes com doença de Chagas. Alguns estudiosos ⁽¹⁴⁸⁾ têm observado que nesses pacientes ocorre redução dos índices que representam o sistema vagal, rMSSD e pNN50, quando comparados a um grupo controle sem doença de Chagas. Estas alterações na VFC ocorrem tanto em pacientes sem alterações funcionais do VE, quanto naqueles pacientes com alterações da contratilidade segmentar do VE e fração de ejeção menor que 50%.

Mostrou-se que titulações aumentadas de anticorpos antirreceptores β 1 adrenérgicos e antirreceptores M2 podem alterar índices de VFC no período noturno em pacientes chagásicos.

O SDNN índice parâmetro da VFC avaliado ao Holter de 24h que reflete o sistema simpático apresenta relação com a titulação de anti- β 1. Existe uma correlação inversa significativa entre a titulação de anti- β 1 com SDNNíndice de 2 às 6h ($r_s = -0,0313$; e $p = 0,041$; $n = 43$) ou seja quanto maior o valor da titulação de anti- β 1 menor o valor esperado de SDNN índice de 2 às 6 h.

Se os anticorpos anti- β 1 adrenérgicos estão aumentados na corrente sanguínea e são capazes de acionar efeitos adrenérgicos sobre o coração, esperaríamos uma maior e mais persistente atividade simpática; no entanto, observamos uma queda da atividade simpática no período de sono, o que faz supor que os anticorpos anti- β 1 possam também exercer efeitos moduladores inibitórios no sistema simpático de pacientes chagásicos.

Algumas proteínas possuem propriedades alostéricas e moduladoras e se ligam ao substrato de forma não competitiva, sendo capaz de produzir alteração conformacional da proteína. As proteínas são estruturas dinâmicas e apresentam discretos mas múltiplos estados funcionais ou conformacionais ⁽¹⁴⁹⁾.

Um ligante alostérico é aquele que regula ou modula a proteína, através de sítios distintos daqueles do agonista tradicional na proteína dos receptores, ou seja são ligantes moduladores que influenciam a função do receptor.

Seriam os anticorpos anti- β 1 ligantes moduladores que alteram a resposta esperada quando esses se ligam ao receptor de membrana, e estaria esta resposta associada a outras vias de sinalização específicas do sistema cardiovascular? No paciente com doença de Chagas essa resposta é protetora? Os anticorpos anti- β 1 aumentados no nosso estudo parecem capazes de modificar vias sinalizadoras do sistema nervoso autônomo com predomínio de ação parassimpática no período noturno o que parece demonstrar um ajuste do balanço autonômico.

Outro achado desse estudo foi que o parâmetro SDANN, índice de VFC que também reflete o sistema simpático, apresenta uma correlação direta significativa com a titulação de anti M2 de 2 às 6h ($r_s = 0,317$; $p = 0,039$; $n = 43$). Logo quanto maior a titulação de anti-M2 maior o SDANN.

Se os anticorpos anti-M2 quando aumentados na circulação são capazes de induzir efeitos bradicardizantes semelhantes ao do neurotransmissor acetilcolina sobre o coração, esperaríamos encontrar efeitos parassimpáticos predominantes durante as 24h. Logo, os parâmetros do Holter no período noturno deveriam refletir o parassimpático. Contudo esse estudo mostrou que quanto mais altas as titulações de anti-M2, maiores são os índices que refletem o simpático (SDANN) neste período.

Diante desse achado seria possível supor que os anticorpos anti-M2 comportem como moduladores alostéricos e que, em situações que a atividade parassimpática está exacerbada atuariam ativando via simpática (conforme refletido pelo aumento significativo do SDANN). Esses achados nos faz pensar que anticorpos anti-M2 apresentam efeito tanto inibitório, quanto estimulante sobre o receptor muscarínico ou ainda apenas uma ação agonista parcial.

Estas observações aparentemente paradoxais poderiam se aplicar também para os anticorpos anti- β 1. As alterações funcionais provocadas pela titulação elevada de anticorpos anti-M2 ou anti- β 1 parecem ser protetoras, impedindo a diminuição importante da frequência cardíaca no período noturno quando o parassimpático está muito estimulado ou diminuindo a resposta simpática quando esta se encontra exacerbada. Logo, teriam os anticorpos anti- β 1 e anti-M2 ação semelhante a moduladores alostéricos capazes de provocar um ajustamento cíclico e constante de um sinal?

Estudo recente,⁽¹⁵⁰⁾ avaliando a relação dos anticorpos anti-M2 com a VFC analisada ao Holter de 24h observou que o índice SDNN encontra-se aumentado no paciente chagásico, não nas 24h, mas em período selecionado, onde observa-se o predomínio de ação vagal . Nesse estudo, a VFC foi analisada no domínio da frequência. Embora em nosso estudo a VFC tenha sido estudada no domínio de tempo, encontramos algumas semelhanças pois, os índices que refletem o sistema simpático, SDNN index e SDANN estavam significativamente aumentados, especificamente no período de 2 às 6h horário em que se observa um predomínio da atividade vagal na presença de titulações aumentadas de anticorpos anti-M2.

Classicamente, a estimulação dos receptores adrenérgicos consiste de uma cascata de sinalização envolvendo a proteína G_s (estimulatória) e ativação da Adenilciclase, acompanhada de aumento do AMPc e da PKA ⁽¹⁵¹⁾.

Microdomínios caveolares têm sido propostos como sítios que concentram receptores acoplados à proteína G, proteínas G heterotriméricas e receptores de membrana acoplados à proteína G regulados por moléculas efetoras, confinados em uma região e conduzindo à geração de segundo mensageiros.

A estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos regula a corrente de Ca^{2+} (ICA) , por um mecanismo dependente da PKA e ainda regula a PKA por vias independentes como a via calmodulina dependente de PKA II . A importância desse fato tem sido que a estimulação constante desses receptores β_1 adrenérgicos altera a via sinalizadora da PKA dependente de Ca^{2+} , conduzindo à apoptose do miócito com alterações nos mecanismos de adaptação cardíacos levando ao remodelamento ventricular. Alguns autores têm mostrado que a sinalização do AMPc /PKA é bifásica, com um pico proeminente e precoce enquanto as vias dependentes de calmodulina/PKAI é lenta e mais persistente ⁽¹⁵²⁾.

Estudos atuais ^(149,151,152,153) sobre receptores têm mostrado a necessidade de uma melhor compreensão e nova classificação para os receptores β adrenérgicos. Tem sido descrito que esses receptores possuem dois sítios de ligação, um de alta afinidade e outro de baixa afinidade. Os receptores β_1 em estado de alta afinidade são ativados pelas catecolaminas, tais como a noradrenalina e adrenalina e bloqueados pelos β -bloqueadores clássicos como carvedilol, metoprolol, bisoprolol e atenolol, respectivamente.

Efeitos mediados pelos receptores β_1 adrenérgicos de baixa afinidade, têm sido estudados in vitro e está claro, até o momento, que a ativação de receptores β_1

adrenérgicos de baixa afinidade aumenta a frequência de batimentos sino-atriais, exerce efeito inotrópico positivo sobre o coração e induz arritmias atriais e ventriculares. Os estudos *in vivo* não são muitos, contudo alguns autores têm estudado agonistas que se ligam aos sítios de receptores β_1 de baixa afinidade, demonstrando que esses agonistas induzem efeito inotrópico e lusinotrópico positivo.

Outra explicação possível, baseia-se na regulação cruzada entre os receptores adrenérgicos. Esses receptores, uma vez estimulados, ativam alterações no sinal de transdução de outros sistemas cardiovasculares. Vias relacionadas aos receptores da angiotensina, endotelina, receptores muscarínicos ligados à acetil-colina, quando estimuladas podem, frequentemente, aumentar ou inibir a liberação de catecolaminas endógenas associadas a infra-regulação ou dessensibilização dos receptores adrenérgicos ⁽¹⁴⁶⁾.

Cunha e et al ⁽¹⁵⁴⁾ ao analisar o perfil do chagásico crônico em hospital terciário, ao Holter de 24 h, encontraram índices de SDANN, SDNN index que refletem o sistema simpático, diminuídos no período dia refletindo uma diminuição da VFC. Paradoxalmente o SDNNindex à noite foi maior que no período dia. Embora na presença de ativação simpática espera-se uma inibição vagal, esse estudo mostrou um aumento do rMSSD (índice que reflete o parassimpático) tanto no período diurno quanto noturno. Apesar desse estudo não ter avaliado a relação dos índices de VFC com anticorpos anti- β_1 e anti-M2, os dados que parecem inicialmente contraditórios, talvez reflitam efeitos de moduladores endógenos que atuem em receptores β_1 e M2 modulando a resposta do SNA.

Levy ⁽¹⁵⁵⁾ apresentou fortes argumentos a respeito da interação simpático-parassimpático no coração. Antagonismo acentuado é o nome dado a uma excessiva resposta à estimulação vagal na presença de uma maior ativação simpática. Estimulando os nervos simpáticos e vagais do coração de cães a diversas combinações de frequência observou que durante a estimulação combinada (simpática e vagal) o efeito vagal predominou, constatando-se que a resposta vagal à estimulação combinada difere da resposta vagal isoladamente.

As Arritmias complexas e os bloqueios átrioventriculares ao Holter foram analisados e relacionados com os anticorpos anti- β_1 e anti-M2 e não foi observado significância estatística entre eles. Vinte e um pacientes (32,8%) apresentaram pelo menos um ou mais episódios de TVNS, contudo observou-se que não houve correlação significativa com a titulação anti- β_1 ($p=0,75$) nem com a titulação anti-M2 ($p =0,75$).

Morte súbita em pacientes chagásicos é uma complicação frequente ^(156,157) e está associada à TVS e fibrilação ventricular. Os substratos arritmogênicos ocorrem em função de um desarranjo estrutural da fibra miocárdica. Fibrose, alterações de contratilidade segmentar do VE e aneurisma apical funcionam como substratos arritmogênicos facilitando mecanismos de reentrada.

Segundo Cruz e Maia, ⁽¹⁵⁸⁾ precedendo a morte súbita taquiarrítmica, observa-se uma nítida redução da VFC. Isto se explica por uma diminuição da atividade vagal com conseqüente aumento da atividade simpática. A redução da VFC é um elemento importante na precipitação do efeito cascata que desencadeia os surtos de TVS.

Estudo recente ⁽¹⁵⁹⁾ experimental realizado para avaliar a atividade funcional dos anticorpos anti- $\beta 1$ (IgGs com atividade $\beta 1$) modulando a repolarização ventricular mostrou que anticorpos anti- $\beta 1$ presentes em soros de pacientes chagásicos, encurtam o intervalo QT, a duração do potencial de ação das células M provavelmente por mecanismos iônicos relacionados às correntes dependentes de cálcio (I_{CaL}) e potássio (IKs). Isto explicaria possíveis mecanismos relacionados às arritmias na cardiopatia chagásica, visto que, o final da onda T do ECG, está relacionado à repolarização das células M. Alterações modulatórias na repolarização dessas células justificam mecanismos arritmogênicos na cardiopatia chagásica.

Uma explicação para os resultados encontrados, em relação às arritmias, é o uso de terapêutica antiarrítmica otimizada e a outra é que os anticorpos anti- $\beta 1$ não sejam os únicos moduladores dos mecanismos arrítmicos.

A proteína G, em algumas situações, pode atuar não sobre um canal iônico vizinho, mas sobre uma enzima que flutua na membrana pós sináptica, cuja função é produzir um mensageiro químico (segundo mensageiro) que atue em outro ponto da membrana ou no interior da célula pós sináptica. Uma cascata de sinalizações é ativada cada vez que um modulador ativa um receptor de membrana ou sítios de microdomínios caveolares ⁽¹⁵²⁾. Uma cascata enzimática, uma vez disparada, pode produzir alterações metabólicas intracelulares que não chegue a provocar sinais sinápticos, mas alterações funcionais em longo prazo ⁽⁵⁹⁾.

Ao ECG, observou-se uma associação entre anticorpos anti- $\beta 1$ e fibrilação atrial (FA). Pacientes com FA apresentaram a titulação de anti- $\beta 1$ significativamente maior que no subgrupo sem FA ($p = 0,01$). A ação agonista de anti- $\beta 1$ poderia explicar tais alterações. Ainda ao ECG, esse estudo mostrou que o subgrupo com ritmo cardíaco sinusal apresentou titulação anti-M2 significativamente menor que o

subgrupo sem ritmo sinusal ($p=0,035$) e que o subgrupo com ritmo cardíaco em FA apresentou titulação anti-M2 significativamente maior que o subgrupo sem FA ($p=0,029$), ou seja, tanto titulações aumentadas de anti-M2, quanto titulações aumentadas de anti- β 1 se relacionam com FA. Possivelmente, isto ocorre porque a via simpática uma vez estimulada excessivamente pode estimular a via parassimpática ao mesmo tempo.

Em relação às bradiarritmias ao Holter, observou-se que a bradicardia menor que 35 bpm não se correlacionou com a titulação de anti-M2 ($p = 0,34$). Encontrou-se sete pacientes (10,9%) com FC \leq a 35 bpm e dez (15,64%) com pausas \geq a 2,5s. Desses dez pacientes com pausas, cinco pacientes tiveram também FC menor que 35 bpm. Esses dados mostram que pelo menos dez pacientes estavam aguardando marcapasso. A doença do nódulo sinusal é comum na CCC e pode ser explicada pela fibrose, acompanhada de atrofia e fragmentação de fibras específicas e tem aspecto cicatricial ⁽⁴⁷⁾.

A disautonomia ao Teste ergométrico não mostrou correlação significativa com a titulação de anticorpos anti- β 1 e anti-M2. Contudo, em relação aos anticorpos anti- β 1, observou-se uma correlação significativa entre a titulação desses anticorpos com o duplo-produto, parâmetro obtido durante o teste ergométrico que representa o resultado do aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial durante o exercício ($r_s = 0,371$; $p = 0,005$, $n=56$). Como o aumento do duplo produto ao teste ergométrico é um marcador de bom desempenho cardíaco frente ao esforço, essa correlação pode representar uma função sinalizadora benéfica dos anticorpos anti- β 1 sobre o coração.

Vale ressaltar que nesses pacientes o déficit cronotrópico frente ao esforço é uma característica comum, pois Carlos Chagas em 1922, ⁽¹⁶⁰⁾ já se referia a pouca ação cronotrópica da atropina em pacientes chagásicos, bem como Brasil ⁽¹⁶¹⁾, refere-se a estranha fisiopatologia da insuficiência cardíaca em que o ritmo sinusal normal não se acelera e mostra a incapacidade da atropina em aumentar a FC na cardiopatia chagásica crônica.

Trabalhos na literatura ⁽¹²⁸⁾ mostram que algumas variáveis no TE são marcadores de gravidade, entre eles a redução da FC no primeiro minuto de recuperação e a pressão arterial reduzida durante o exercício ⁽¹⁶²⁾. Contudo, esses dados não foram correlacionados com a presença de anticorpos anti- β 1 e anti-M2. Nosso estudo mostrou ao teste ergométrico (TE), que o subgrupo com resposta cronotrópica normal apresentou titulação anti- β 1 significativamente maior que o

subgrupo com resposta cronotrópica deprimida ($p = 0,023$). Seriam os anticorpos anti- β_1 capazes de exercer efeito modulador da resposta adrenérgica frente ao esforço através de outras vias de sinalização em pacientes chagásicos?

Rocha et al.⁽¹⁶²⁾ demonstraram que pacientes com doença de Chagas submetidos ao TE máximo apresentaram resposta cronotrópica deprimida, considerando aqueles com ou sem insuficiência cardíaca. Outros trabalhos mostram que a insuficiência cronotrópica é previsível quando se trata de pacientes com aumento da cavidade ventricular esquerda e fração de ejeção baixa^(163,164). O déficit cronotrópico tem sido atribuído à disfunção autonômica predominantemente vagal ou disfunção do nó sinusal em chagásicos⁽⁸⁹⁾.

A taquicardia inicial induzida pelo esforço depende da supressão da atividade vagal, enquanto aumentos adicionais dependem de incrementos do SNA

(simpático) de acordo com a intensidade do exercício^(165,166,167).

No presente estudo atribuiu o aumento do duplo produto à uma possível ação moduladora agonista de anticorpos anti- β_1 adrenérgicos durante o exercício contribuindo de forma adicional com a resposta simpática do SNA no início do esforço.

Outra observação referente ao TE foi a de que o subgrupo com resposta inotrópica normal apresentou titulação anti-M2 significativamente maior que o subgrupo com resposta inotrópica deprimida ($p = 0,044$).

Uma resposta inotrópica normal é o resultado de uma curva normal da pressão arterial frente ao esforço. Na regulação do inotropismo positivo, a via β_1 - G_s é a responsável pela resposta contrátil do coração. Isto representa estimulação simpática e melhor desempenho cardíaco. Contudo, a função cardíaca é regulada por diversas cascatas sinalizadoras. Alguns mecanismos que controlam essas cascatas têm origem no sistema nervoso central, entre eles o da regulação da pressão arterial sanguínea nos centros cardiovasculares do cérebro e a regulação dos receptores muscarínicos por um sistema α adrenérgico que controla a liberação de hormônio do tipo peptídeo atrial natriurético^(145,149).

Pode-se supor que as maiores titulações de anti-M2 refletem ação ou interação moduladora com outras vias sinalizadoras (transdução de sinais), que estimulam a ação simpática no coração e outros sistemas que participam da cascata de sinalização do SNA^(145,149).

Foi realizada uma análise multivariada composta pela Regressão Linear Múltipla (RLM) para avaliar a influência simultânea das variáveis explicativas sobre a titulação anti- β 1 e M2.

Segundo a RLM, observou-se que o duplo produto ($p=0,016$) foi variável independente ao nível de 5% para explicar a titulação anti- β 1, ou seja, quanto maior o duplo produto maior o valor esperado da titulação anti- β 1.

Observou-se também que o SDANN de 2 às 6h ($p= 0,13$) foi variável independente ao nível de 15% para explicar a titulação de anti- M2, ou seja, quanto maior o SDANN de 2 às 6 h, maior o valor esperado da titulação anti-M2. Esse dado reforça a possibilidade dos anticorpos anti-M2 também modularem uma resposta simpática no período que a atividade vaga é predominante.

O ECGAR foi realizado em dezoito pacientes e destes, dezesseis (88%) apresentaram presença de potenciais elétricos tardios preditores de arritmia cardíaca, contudo, não foi observada correlação significativa entre esses potenciais e a titulação dos anticorpos anti- β 1 e anti-M2. Considerando que a presença de pós potenciais ao ECGAR é preditora de arritmias malignas como a TVS, esperava-se uma relação com anti- β 1 que não foi encontrada.

Os trabalhos na literatura sobre ECGAR em pacientes com miocardiopatia chagásica e insuficiência cardíaca são escassos. Pacientes portadores de bloqueios de ramo ou retardo na condução intraventricular apresentam prolongamento do QRS obscurecendo os potenciais tardios no final do ECG. Não sabemos se pacientes com ECGAR normal em doença de Chagas têm um melhor prognóstico ao longo do tempo. A hipótese que titulações aumentadas de anticorpos anti- β 1 pudesse representar dano miocárdico precoce capaz de gerar substratos arritmogênicos detectados pelo ECGAR não foi confirmada. Importante lembrar que um número maior de casos é necessário para uma melhor análise.

A análise da função ventricular esquerda ao ecocardiograma mostrou que não houve correlação entre titulações de anticorpos anti- β 1 e anti-M2 com a fração de ejeção (variável numérica) obtida pelo método de Simpson. A análise subjetiva da função ventricular esquerda esteve gravemente comprometida em 14,1% dos pacientes, moderadamente comprometida em 9,4% e levemente comprometida em 7,8%. Logo, 21,3 % dessa população apresentou algum grau de comprometimento funcional do VE. Não observou-se também correlação significativa entre titulações de

anti- β 1 e anti M2 com diâmetros sistólico e diastólico do VE. Observou-se presença de aneurisma de ponta em três pacientes (4,68%) .

Análises de sobrevida em pacientes com cardiopatia chagásica mostram que função sistólica prejudicada e aumento dos diâmetros ventriculares relacionam significativamente com morbimortalidade cardíaca ^(168,169) .

Embora esse estudo não tenha correlacionado função diastólica com anticorpos anti- β 1 e anti-M2, sabe-se que anormalidades precoces ocorrem ao Doppler e Doppler tecidual, relacionadas ao tempo de contração isovolumétrica e relaxamento do VE. Mesmo nas situações com função sistólica normal, testes de estresse podem provocar alterações da função ventricular não observadas em repouso. Se os anticorpos anti- β 1 e anti-M2 estão relacionados às alterações precoces de comprometimento do VE, novos estudos são necessários para esta avaliação.

Dados clínicos referentes à função ventricular esquerda analisados de acordo com a classificação da NYHA não mostraram associação significativa com níveis de anticorpos anti- β 1 ($p=0,67$) assim como aqueles classificados segundo Los Andes ($p=0,97$). Para os anticorpos anti-M2, os resultados também não foram significativos. Encontrou-se segundo a NYHA $p=0,60$ e para classificação de Los Andes $p=0,55$.

Estudo mais recente ⁽⁹⁹⁾ mostrou que soro de pacientes chagásicos portadores de arritmias cardíacas e comprometimento funcional do coração (classificados segundo Los Andes) quando infundidos em coração isolado de coelho foram capazes de deprimir a eletrogênese, marcada pela queda da frequência cardíaca e presença de bloqueios átrioventriculares. Esses resultados diferem também de outros resultados de Sterin-Borda que mostram resposta cronotrópica e inotrópica positiva. Os primeiros estudos de Sterin-Borda em 1976 ⁽²⁷⁾ associaram a presença de anticorpos anti- EVI presentes no soro de pacientes chagásicos com aumento da frequência cardíaca e contração atrial em animais de laboratório.

Ribeiro et al.⁽¹⁴⁸⁾ demonstraram que titulações aumentadas de anti-M2 não correlacionaram significativamente com função ventricular esquerda e Talvani e cols⁽¹⁷⁰⁾ também compararam as titulações de anticorpos anti- β 1 e anti-M2 (valores demonstrados por densidade óptica) e não observaram correlação significativa em chagásicos, fato que também foi registrado em nosso trabalho.

Trabalhos que mostrem a relação de anticorpos circulantes funcionais tanto com atividade “ β -adrenérgica e muscarínica like” com citocinas tal como acontece no

paciente chagásico podem contribuir para análises de possíveis biomarcadores precoces na doença de Chagas .

Vitelli-Avelar et al. ⁽¹⁰⁷⁾ estudaram o perfil das citocinas na forma indeterminada e cardíaca in vivo e in vitro e avaliaram a importância do balanço entre as citocinas inflamatórias e regulatórias que caracterizam as respectivas formas evolutivas da doença de Chagas.

Na fase indeterminada observaram citocinas *regulatórias* derivadas de células T CD4+. Na forma com comprometimento cardíaco observaram predominância de citocinas *inflamatórias*, monócitos e células CD4. In vitro, o estímulo de células sanguíneas com formas tripomastigotas, inverte esse padrão e o que se observa é interleucina10, células TCD4+ e monócitos conduzindo a forma indeterminada (padrão inflamatório) e citocinas regulatórias no controle da forma cardíaca. In vivo e in vitro os padrões se assemelham quando os pacientes são tratados com benzonidazol.

Apesar de não ter-se observado correlação de titulações de anticorpos anti- β 1 e anti-M2 com função ventricular avaliada pelo ecocardiograma, não se sabe qual a relação funcional desses anticorpos com formas evolutivas da doença de Chagas. Assim como algumas citocinas (Interleucina 6) parecem ser marcadoras de desfecho desfavorável na CCC, teriam os anticorpos alguma relação com desfecho clínico no paciente chagásico?

Na miocardiopatia chagásica descompensada, alguns estudos têm mostrado que há uma maior instabilidade hemodinâmica, explicada por uma ativação aumentada do sistema renina-angiotensina aldosterona e uma produção elevada de citocinas, que confere ao chagásico nessa condição um pior prognóstico ⁽¹⁷¹⁾.

Complexidade pode ser a palavra que expressa os mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas. Fatores étnicos, biológicos, psicossociais e culturais ligados ao hospedeiro e tantos outros ligados à biogeografia do parasito, participam do cenário da doença ao longo do século e dificultam, devido às suas variâncias, o esclarecimento exato do mecanismo que leva ao dano miocárdico irreversível.

O paradigma cartesiano que atendeu às necessidades da industrialização no início do século XIX e fragmentou o conhecimento, hoje não responde ao incremento do desenvolvimento científico e tecnológico de pesquisas em saúde.

Havia na Grécia um programa de ensino “*enckúklios paidea*”⁽¹⁷²⁾ que valorizava o saber na sua totalidade em detrimento do saber enciclopédico. As disciplinas articulavam entre si formando uma unidade. Dessa forma, vejo a possibilidade de encontrar os mecanismos que expliquem a patogênese da doença de Chagas através da multidisciplinaridade envolvendo pesquisas que abordem desde a vulnerabilidade dos que adoecem até os mecanismos moleculares mais complexos, que possam conduzir a uma terapêutica eficaz.

Levantou-se alguns questionamentos abordando áreas específicas do conhecimento, observou-se correlações e obteve-se dados que nos levaram a refletir de forma instigante sobre conhecimentos consolidados. Segundo Bateson⁽¹⁷³⁾, o padrão da quebra de uma superfície de vidro provocado pelo lançamento manual de uma pedra não pode ser previsto a priori, assim como numa corrente de metal com elos homogêneos, submetida à tensão, não se consegue identificar antecipadamente o local de ruptura.

A possibilidade de uma confluência de variáveis começarem a estabelecer um padrão, em doença de Chagas, pode contribuir para a compreensão de mecanismos ligados a sua patogênese.

8. CONCLUSÕES

- O percentual de anticorpos antirreceptores β_1 adrenérgicos (anti- β_1) e antirreceptores muscarínicos M2 (anti-M2) em pacientes com forma crônica de doença de Chagas, em nosso estudo, foi de : anti- β_1 reagentes ($>1,054$) 42,2 % e os anti-M2 ($>$ que 1,297) 45,3 %.

Ao Holter cardíaco de 24 horas:

- Existe correlação inversa significativa entre a titulação de anti- β_1 com SDNN index de 2 às 6h ($r_s = -0,313$; $p = 0,041$; $n = 43$).

- Existe correlação direta significativa entre a titulação de anti-M2 com SDANN de 2 às 6h ($r_s = 0,317$; $p = 0,039$; $n = 43$).

- Não observou-se correlação significativa entre as taquiarritmias, bradiarritmias e disautonomia com titulações de anticorpos anti- β_1 e anti-M2.

Ao teste ergométrico:

- Não há correlação de disautonomia com titulações de anticorpos anti- β_1 e anti-M2.

- Existe correlação direta significativa entre a titulação Anti- β_1 com Duplo Produto ($r_s = 0,371$; $p = 0,005$, $n = 56$).

- A titulação Anti- β_1 foi significativamente maior no subgrupo com resposta cronotrópica normal do que no subgrupo com resposta cronotrópica deprimida ($p = 0,023$).

- A titulação anti-M2 foi significativamente maior no subgrupo com resposta inotrópica normal do que no subgrupo com resposta inotrópica deprimida ($p = 0,044$).

Ao ECG convencional:

- O subgrupo com FA apresentou titulação anti- β 1 significativamente maior que o subgrupo sem FA ($p = 0,001$).

- O subgrupo com FA apresentou titulação anti-M2 significativamente maior que o subgrupo sem FA ($p = 0,029$).

Ao ECGAR:

- Não há correlação significativa entre $RMS > 20$ e $LAS < 38$ com as titulações de anti- β 1 e anti-M2.

Ao ecocardiograma

- Não há correlação significativa dos anticorpos anti- β 1 e anti-M2 com a função ventricular esquerda global e segmentar.

Análise multivariada:

- O duplo produto é variável independente (5%) para anti- β 1 e o SDANN(15%) é variável independente para anti-M2.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

9.1. APLICABILIDADE CLÍNICA

As alterações funcionais provocadas por ligantes endógenos associadas a um cooperatismo positivo ou negativo dos anticorpos anti- β 1 adrenérgicos e anti-M2 muscarínicos em pacientes com doença de Chagas podem explicar algumas alterações frequentemente encontradas nesses pacientes. Isto sugere que possíveis intervenções farmacológicas que atuem na ligação alostérica desses receptores possam ser efetivas como coadjuvantes no tratamento da cardiopatia chagásica crônica.

Realizar novos estudos para definir se anticorpos anti- β 1 e anti-M2, em soro de pacientes chagásicos podem ser considerados marcadores de modulação autonômica.

Se os anticorpos anti- β 1 e anti-M2 funcionam como moduladores compensatórios do SNA comprometido na cardiopatia chagásica crônica, a imunoadsorção como forma terapêutica na doença de Chagas precisa ser reavaliada.

Se novos estudos mostrarem que os anticorpos anti- β 1 e anti-M2 são biomarcadores de comprometimento do SNA em pacientes chagásicos, isso permitirá uma melhor estratificação de risco desses pacientes e intervenção terapêutica.

9.2 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- O uso otimizado de fármacos antiarrítmicos pode ter contribuído para a falta de correlação observada entre a titulação aumentada de anti- β 1 e as taquiarritmias.

- Nos pacientes com marcapasso a análise das bradiarritmias ficou prejudicada, logo, a correlação de anti-M2 e bradiarritmias pode ter sido subestimada.

- Não houve uma análise ecocardiográfica inter-observador. Foi considerada a análise da chefia do serviço de Ecocardiografia e seus assistentes. Além disso, não foi realizado em nosso estudo a associação de titulações de anticorpos com a função diastólica.

- Trata-se de um estudo transversal, portanto não utilizou grupo controle, nem comparou as titulações de anticorpos com miocardiopatias de outras etiologias.

- A caracterização dos autoanticorpos se baseou na interação destes com peptídeos correspondentes à segunda alça extracelular dos receptores, ao contrário de estudos onde a caracterização dos anticorpos ocorreu através da ativação funcional dos mesmos.

10. REFERENCIAS

1. Kropf SP. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962). *Tempo*. 2005; (19):107-124.
2. Azambuja P, Garcia ES. O ciclo do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor [Internet]. 2010. [Acesso em 11 maio 2011]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/CGI/.../start.htm?sid,24>
3. Barbosa LGN. Doenças de Chagas. *Revista Logos*. 2009;17:20-36.
4. Lisboa CV, Xavier SCC. Doença de Chagas. Biogeografia [Homepage na Internet]. [Acesso em 11 maio 2011]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=107>
5. Silva LJ. A re-reading and a homage to Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2006; 40(6):999-1000.
6. Forattini OP. Biogeografia: origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1980; 14:265-99.
7. Neto VA. Centenário da doença de Chagas. *Rev Saúde Pública*. 2009; 43(2): 381-382.
8. Lopez PAR. La vida y obra de Carlos Chagas a cien años de la descripción de la enfermedad de Chagas-Mazza. *Arch Cardiol Mex*. 2009; 79(4):237-239.

9. Fundação Nacional de Saúde. 100 anos de saúde pública: a visão da Funasa [livro na internet]. Brasília, DF: Funasa; 2004. Cap. 1: Uma visão histórica da saúde brasileira cronologia histórica [Acesso em 11 maio 2011]. Disponível em: www.funasa.gov.br/internet/arquivos/biblioteca/livro_100-anos.pdf.
10. Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JCP, Romanha AJ, Chiari E. Interrelações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Cad Saúde Pública [revista na Internet]. 1994 [Acesso em 20 jun 2010]; 10(4): 473-480. Disponível em: www.scielo.br/pdf/csp/v10n4/v10n4a07.pdf
11. Rezende JM. Emmanuel Dias: sua contribuição aos estudos da doença de Chagas: 1908-1962. [Internet]. Goiânia, 2008 [Acesso em 20 jun 2010]. Disponível em: <http://usuarios.cultura.com.br/jmrezende/Emmanueldias.htm>.
12. Moncayo A, Yanine MIO. Centennial review. An update on Chagas disease (human american trypanosomiasis). Annals of Medical Medicine and Parasitology. 2006; 100:(8):663-677.
13. Stimpert KK, Montgomery SP. Physician awareness of Chagas disease, USA [carta]. Emerg Infect Dis [revista na Internet]. 2010 [Acesso em 10 jun 2010]; 16(5): 871-872. Disponível em: <http://www.cdc.gov/EID/content/16/5/871>.
14. Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AVL. Cardiopatia Chagásica. Arq. Bras Cardiol. 1999; 72(3):247-280.
15. Laranja FS, Dias E, Nóbrega G, Miranda A. Chagas Disease. Circulation 1956; 14:1035-1060.
16. Dias, JCP. Doença de Chagas, ambiente, participação do Estado. Cad.Saúde Pública. 2001; 17(supl):165-169.
17. Santo AH. Tendência da mortalidade realacionada à Doença de Chagas, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2006: estudo usando causas múltiplas de morte. Rev Panam Salud Pública. 2009; 26(4):299-309.
18. World Health Organization. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. 1991; 811:1-95.
19. Torres CM. Miocitólise e fibrose do miocárdio na doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1960, 58(2):161-182.
20. Lanes-Vieira J. Cardiopatia chagásica. Rio de Janeiro: IOC; sd.
21. Kozma C, Jaffé R, Jaffé W. Estudo experimental sobre a patogenia das miocardites. Arq Bras Cardiol. 1960;13:155-160.
22. Okomura M, França LC, Neto AO. Contribuição para o estudo da patogenia das lesões vasculares na doença de Chagas em camundongos brancos. Revista

- Paulista de Medicina de São Paulo. 1962; 61:265-266.
23. Thales B. Miocardite Alergica do cobaio e sua possível relação com a Cardite Chagastica Experimental, São Paulo; 1962. Tese [Doutorado] - Universidade de São Paulo, Ciências da Saúde.
 24. Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Aranã BM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor wich endocardium and vasculares structures. *Circulation*. 1974; 49:13-21.
 25. Teixeira ARL, Teixeira ML, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas Disease IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas Disease in man. *The American Journal Pathology*. 1975; 80:163-171.
 26. Teixeira ARL, Santos-Buch CA. The Immunology of Experimental Chagas' disease. *Immunology*. 1975; 28:401-410.
 27. Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MP. Effectt of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immnological, morphological and functional aspects. *Cardiovascular Research*. 1976; 10:613-622.
 28. Ramos C. T cruzi: Immunosupressed response to different antigens induced in the infected mouse. *The Experimental of Parasitology*. 1978; 45:190-199.
 29. Ruiz AM, Esteva M, Meckert PC, Laguens RP, Segura EL. Protective Immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcelular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *The Acta Tropical*. 1985; 42:299-312.
 30. Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MB, Torres HN, Segura EL. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determination in Chronic Chagas Heart Disease. *The American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 1989; 41:530-538.
 31. Schijman AC, Dusetti NJ, Vasquez MP, Lafon S, Levy -Yeyati P, Levin MJ. Nucleotide cDNA and complete deduced amino acid sequence of a *trypanosoma cruzi* P ribosomal protein (P-JL%). *Nucleic Acids Research*. 1990; 18(11):3399.
 32. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic Medicine. *N England J Med*. 2002; 347(19):1512- 20.
 33. Santos MR, Cano MI, Schijman A, Lorenzi H, Vasquez M, Levin MJ. et al. The Trypanossoma cruzi Genoma Project : Nuclear Santos MR Karyotype and Gene Mapping of clone CL. Brener. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(6):821-828.
 34. Pérez H, Flores-Obando RE, Ghedin E, Caffrey CR. Genomic and proteomic approaches for Chagas' disease: critical analysis of diagnostic methods. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005; 5(4):521-30.

35. Luchtan M, Warade C, Wearth DB, Degraeve WM, Talerton RL. *T. cruzi* DB: an integrated *Trypanosoma cruzi* genome resource. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(database issue):D344-6
36. Sodré CL. Proteoma. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz; sd.
37. Cunha-Neto EM, Duranti A, Gruber B, Zingales, Messias N, Stolf G, et al. Autoimmunity in Chagas Disease Cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Nat. Acad Sc. USA.* 1995; 92:3541-3545.
38. Molina HA, Milei J, Storino R. Chronic Chagas miocardiopathy: demonstration of in vivo bound immunoglobulins in heart structures by the immunoperoxidase technique. *Cardiology.* 1984; 71:297-303.
39. Higuchi ML, Brito T, Reis MM, Barbosa A. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy immunohistochemical findings. *Cardiovascular Pathology.* 1993; (2):101-16.
40. Higuchi MI. Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. *São Paulo Medical Journal.* 1995; 113(2): 821-835.
41. Chiale PA, Feigelson EA, Levin M, Elizari MV, Hoekebe J, Rosenbaum MB. Anticuerpos antireceptores B-adrenérgicos em La enfermedad de Chagas crônica. *Revista Argentina de Cardiologia.* 1994; 62(1).
42. Reis MM, Higuchi ML, Aiello VD, Benvenuti LA. Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33(6).
43. Campos de Carvalho AC, Masuda MO, Tanowitz HB, Wittner M, Goldenberg RCS, Spray DC. Gap junctions and humoral factors in Chagas' disease. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology.* 1994; 5(8):687-697.
44. Manoel-Caetano F da S, Siva AE. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *CadSaude Publica.* 2007; 23 (10):2263-74.
45. Campbell DA, Westernberg SJ, Sturn NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Medicine.* 2004; 4(6):549-62.
46. Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med.* 2002; 4(5):1-16.
47. Waghabi MC, Silva-Coutinho R, Jean JJ, Higuchi MI, Becker D, Geoffrey B, Araújo-Jorge TC. Gap Junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor- β treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem*

- Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(8): 1083-1090.
48. Marin Neto JÁ, Cunha Neto E, Maciel BC, Simões MW. Pathogenesis of Chronic Chagas Disease. *Circulation*. 2007; 115:1109-1123.
 49. Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Current Molecular Medicine*. 2008; 8:510-516.
 50. Nunes VL, Ramires RJA, Pimentel WS, Fernandes F, Ianni BM, Mady C. O papel de acúmulo de colágeno no Interstício Miocárdico na Sobrevida dos Pacientes com Cardiomiopatia Dilatada Idiopática e Chagásica. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 87(6):757-762.
 51. Mady C. Remodelagem, Remodelação, Remodelamento. *Arq Bras Cardiol*. 1996;66:(2).
 52. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11 ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2008.
 53. Waghbi MC, Sousa EM, Oliveira GM, keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, et al. Pharmacological Inhibition of Transforming Growth Factor β Signaling Decreases Infection and Prevents Heart Damage in Acute Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(11):4694-4701.
 54. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher- Moreno AM, Sanguenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2010; 10:337.
 55. Storino R, Auger S, Caravello O, Urrutia MI, Sanmartino M, Jörg M. Chagasic cardiopathy in endemic area versus sporadically infected patients. *Rev Saude Pública*. 2002; 36(6):755, 2002.
 56. Junqueira Jr LF. Disfunção Autonômica Cardíaca. In: Porto CC, editor. *Doenças do Coração: tratamento e reabilitação*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
 57. Junqueira Jr LF. A summary perspective on the clinical–functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas’ disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006; 39 (Supl III): 64-69.
 58. Robert Lent. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais da neurociência*. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2010. Cap 14: O sistema nervoso autônomo e o controle das funções orgânicas. p 501-531.
 59. Robert Lent. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais da neurociência*. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2010. Cap 4: Os chips neurais: processamento de informação e transmissão de mensagens através das sinapses . p. 13-145.
 60. Rezende JM. Fritz Köeberle e seus estudos sobre a doença de chagas. In:

- XVIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas; 2002; Uberaba.
61. Köeberle F. Pathogenesis of Chagas' disease. In: Ciba Foundation Symposium. Amsterdam: Associated Scientific; 1974. p.137-158.
 62. Tafuri WL, Brener Z. Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na Trypanossomíase experimental na fase aguda. *O Hospital*. 1996; 69:371-383.
 63. Andrade SG, Andrade ZA. Doença de Chagas e alterações neuronais o plexo de Auenbach (Estudo experimental em camundongos). *Rev Inst Med Trop*. 1966; 8:219-224.
 64. Junqueira LF, Jr. A summary perspective on the clinical-functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39 Suppl 3:64-9.
 65. Amorim DS, Marin-Neto JA. Funcional alterations of the autonomic nervous system in Chagas' heart Chagas disease. *São Paulo Med J*. 1995;113(2).
 66. Ribeiro AL, Moraes RS, Ribeiro JP, Ferlin EL, Torres RM, Oliveira E, Rocha MO. Parasympathetic dysautonomia preceds left ventricular systolic dysfunction in Chagas' disease. *American Heart Journal*. 2001; 141(2):260-265.
 67. Dávila-Spinetti DF, Donis JH, Torres A, Ferrer JA. A modified and unifying neurogenic hypothesis can explain the natural history of chronic Chags' disease. *International Journal of Cardiology*. 2004; 96 (2);191-195.
 68. Zhangy, Kanter EM, Laing JG, Aprhys C, Johns DC, Kardami E, Yamada KA. Connexin43 expression levels influence intercellular coupling and cell proliferation of native murine cardiac fibroblasts. *Cell Commun Adhes*. 2008;15 (3):289-303.
 69. Lara A, Damasceno DD, Pires R, Gros R, Gomes ER, Gaviolo M et al. Dysautonomia Due to Reduce Cholinergic Neurotransmission Causes Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Molecular and cellular Biology*. 2010 Apr;30(7):1746-56.
 70. Salameh A, Dhein S. Adrenergic control of cardiac gap junction function and expression. *Nauyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2011;38 (4):331-346.
 71. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, Kalil J. Aspectos Imunológicos Na Cardiopataia Chagásica Crônica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2009; 19 (1):16-24.
 72. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. São Paulo: Elsevier; 2007. p.3-46.
 73. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. São Paulo: Elsevier; 2007. p.47-71.

74. Martin DL, Tarleton RL. Antigen-Specific T cells maintain an Effector Memory Phenotype during Persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*. 2005;104(3):1594-1601.
75. Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Review*. 2004; 201:304-317.
76. Dutra WO, Rocha MOC, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*. 2005; 21(12):581-587.
77. Costa PCS. Desempenho Cardíaco na Cardiopatia Chagásica Crônica: Modulação das funções mecânica e elétrica cardíacas por autoanticorpos contra receptores acoplados a proteína G. Rio de Janeiro; 2006. Tese [Doutorado] – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ciências Biológicas.
78. Carvalho WA, Carvalho RDS, Medrado VC, Vianna PTG. Biologia Molecular dos Receptores Farmacológicos e seus Sistemas Efetores de Interesse em Anestesiologia. *Rev Bras Anesthesiol*. 1997; 47(2):152-157.
79. Neto MA, Rascado RR, Bendhack LM. Receptores β adrenérgicos no Sistema Cardiovascular. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2006; 39(1):3-12.
80. Liang CS, Mao W, Liu J. Pro apoptotic effects of anti- β 1 adrenergic receptor antibodies in cultured rat cardiomyocytes: Actions on endoplasmic reticulum and the prosurvival P13K-Akt pathway. *Autoimmunity*. 2008; 41(6):434-441.
81. Bergami PL, Gomes KA, Levy GV, Grippo V, Baldi A, Levin MJ. The β 1 adrenergic effects of antibodies against the C terminal end of the ribosomal P2 β protein of *Trypanosoma cruzi* associate with a specific pattern of epitope recognition. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005; 142:140-147.
82. Altschuller de Mello MBC, Pedrosa RC, Pereira BB, Filho WBC, Medeiros AS, Costa PCS, Carvalho ACC. Chronic Chagas disease patients with sinus node dysfunction: is the presence of IgG antibodies with muscarinic agonist action independent of ventricular dysfunction? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007; 40(6):665-671.
83. Massuda MO, Levin M, Oliveira SF, Costa PCS, Bergami PL, Almeida NAS, Pedrosa RC, Ferrari I, Hoebeke J, Campos de Carvalho AC. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi*. *The FASEB Journal*. 1998; 12:1551-1558.
84. Campos de Carvalho AC, Masuda MO, Tanowitz HB, Wittner M, Goldenberg RCS, Spray DC. Conduction defects and arrhythmias in Chagas Disease: Possible role of gap junctions and humoral mechanism. *Journal of cardiovascular Electrophysiology*. 1994; 5:686-698.
85. Levin MJ, Hoebeke J. Cross-talk between anti β 1 adrenoceptor antibodies in

- dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *Autoimmunity*. 2008; 41(6):429-433.
86. Hernandez CC, Barcellos LC, Gimenez LE, Cabarcas RA, Garcia S, Pedrosa RC, Nascimento JH, Kurtenbach E, Masuda MO, Carvalho ACC. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca^{2+} currents. *Cardiovascular Research*. 2003; 58:55-65.
87. Leiros CP, Sterin-Borda L, Goin JC, M, Marlene Hosey. Desensitization and Sequestration of Human m2 Muscarinic Acetylcholinic Receptors by Autoantibodies from Patients with Chagas' Disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 262(20):12989-12993.
88. Goin JC, Venera G, Jiménez Boninho MB, Sterin-Borda L. Circulating Antibodies against acetylcolina receptors in chagasic patients. *Clin Exp Immunol*. 1997; 110:219-225.
89. Chiale PA, Ferrari I, Mahler EMS, Vallaza MA, Elizari MV, Rosenbaum MB, Levin M J. Differential Profile and Biochemical Effects of Antiautonomic Membrana Receptor Antibodies in Ventricular Arrhythmias and Sinus Node Dysfunction. *Circulation*. 2001; (3):1765-1768.
90. Pedrosa RC. Contribuição ao estudo da etiopatogenia do distúrbio de condução e da eletrogênese na cardiopatia chagásica crônica: efeitos de anticorpos IgG de pacientes chagásicos crônicos na eletrogênese e no sistema de condução do coração isolado de mamíferos. Rio de Janeiro; 1998. Tese [Doutorado] - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
91. Hong CM, Zheng QS, Liu XT, Shang FJ, Wang HT, Jiang Wr. Effects of Autoantibodies against M2 Muscarinic Acetylcholine Receptors on Rabbit Atria in vivo. *Cardiology*. 2009; 112:180-187.
92. Levitus G, JosKowicz MH, Van regenmortel MHV, Levin MJ. Humoral autoimmune response to ribossomal P proteins in Chronic Chagas Heart Disease. *The clinical Experimental Immunology*. 1991; 85:413-418.
93. Grauert MR, Houdayer M, Joskowctz MH. Trypanossoma cruzi infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas disease. *Clin Exp Immunol*. 1993. 93:85-92.
94. Farias de Oliveira S, Pedrosa RC, Nascimento JHMS, Carvalho ACC, Masuda MO. Depression of cardiac automaticity and A-V conduction by IgG fraction of chronic chagásic patients with arrhythmia is mediated by muscarinic receptors. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1995; 90(supl I):151.
95. Medei EH, Nascimento M JA, Pedrosa RC, Campos de Carvalho AC. Envolvimento dos Auto-Anticorpos na fisiopatologia da Doença de Chagas.

- Artigo de Revisão Arq. Bras. Cardiol. 2008;9(14):281-286.
96. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy: characterization of antibodies against the β_1 adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation*. 1994; 89:2760-2767.
 97. Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J. Molecular mimicry between the immunodominant Ribosomal Protein PO of *Trypanosoma cruzi* and a Functional Epitope on the human β_1 Adrenergic Receptor. *J Exp Med*. 1995; 182:59-65.
 98. Smulski C, Labovsky V, Levy G, Hontebeyrie M, Hoebeke J, Levin MJ. Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein and the human β_1 adrenergic receptor. *The FASEB Journal*. 2006; (20):1396-1406.
 99. Costa PCS, Fortes FAS, Machado AB, Almeida NAC, Olivares EL, Cabral PR, Pedrosa RC, Goldenberg RC, Campos de Carvalho AC. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33(4):439-446.
 100. Mersi EA, Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dighiero G, Van Regenmortel MH, Levin MJ. Major *Trypanosoma cruzi* Antigenic Determinant in Chagas Heart Disease Shares Homology with the Systemic Lupus Erythematosus Ribosomal P Protein Epitope. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28(6):1219-1224.
 101. Hernandez CC, Barcellos LC, Gimenez LE, Cabarcas RA, Garcia S, Pedrosa RC, Nascimento JH, Kurtenbach E, Masuda MO, Carvalho ACC. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca^{2+} currents. *Cardiovascular Research*. 2003;58: 55-65.
 102. Hernandez CC, Nascimento JH, Chaves HA, Costa PC, Masuda MO, Kurtenbach E, et al. Autoantibodies Enhance Agonist Action and Binding to Cardiac Muscarinic Receptors in Chronic Chagas Disease. *J Recept Signal Transduct Res*. 2008; 28(4):375-40.
 103. Rosenberg CS, Martin DI, Tarleton RL. CD8⁺ T Cells Specific for Immunodominant Trans-Sialidase Epitopes Contribute to Control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not Required for Resistance. *J. Immunol*. 2010;185(1)560-68.
 104. Rossi D, Zlotnik A. The Biology of the Chemokines and their Receptors. *Annual Review of Immunology*. 2000; 18:217-242.
 105. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root

- of interleucina 17- producing cells. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:329-33.
106. Ansel KM, Lee Du, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Net Immunol*. 2003; 4(7):616-23.
107. Vitelli-Avelar DM, Satheler-Avelar R, Teixeira Carvalho A, Pinto Dias JC Gontijo ED, Farias AM, Elói- Santos SM, Martins-Filho OA. Strategy to Assess the Overall Cytokine Profile of Circulating Leukocytes and its Association with Distinct Clinical Forms of Human Chagas disease. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008; 68:516-25.
108. Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grünig G, Fort M, Rennick, Araújo FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1997; 158(7):3311-6.
109. Lopes MF, da Veiga VF, Santos Ar, Fonseca Me, Dos Reis GA. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. *J Immunol*. 1995;154(2):744-752
110. Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Bromacher F. Tumor Necrosis Factor Alpha- mediated Toxic Shock in *Trypanosoma cruzi*-Infected Interleukin 10- Deficient Mice. *Infect Immun*. 2000; 68(7): 4075-83.
111. Soares MB, Silva-Mot1a KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de Carvalho L, Ribeiro dos Santos R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin 4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol*. 2001; 159(2):703-709.
112. Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes infect*. 2000; 2(8):851-866.
113. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Immunology*. 2002; 3:1041-47.
114. Padilla AM, Simpson LJ, Tarleton RL. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8 + T cell response in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2009;183(2):1245-52.
115. Rossi MA, Ramos SG. Alterações Microvasculares Coronarianas na Doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 66(3):169-172.
116. Torres CM. Miocitólise e fibrose do miocárdio na doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1960; 58(2):161-182.
117. Pons AH, Oliveira Pinto LM. Doença de Chagas. Citotoxicidade.

- [Homepage na Internet]. [Acesso em 11 maio 2011]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=107>.
118. Marin-Neto JA, Simões MV, Ayes-Neto EM, Attab-Santos JL, Gallo Junior L, Amorim DS, Maciel BC. A circulação coronária na cardiopatia chagásica crônica. *Rev Soc Cardiol*. 1994; 4(2):156-62.
 119. Marin-Neto JA, Marzullo P, Marcassa C, Gallo L, Maciel BC, Bellina R, et al. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas disease as detected by thallium-201 scintigraphy. *The American Journal of Cardiology*. 1992; 69(8):780-784.
 120. Fuchs AP, Fioratti VL, Mello VA, Boainain E. Diagnóstico sorológico na doença de Chagas: estudo comparativo de diferentes técnicas. *Rev. Inst Med trop S Paulo*. 1980; 22: 242-245.
 121. Prineas R, Crow R, Blackburn H. *The Minnesota Code manual of Electrocardiographic Findings*. Littleton: J Wrigt-PSG; 1982.
 122. Gruppi CJ, Brito FS, Uchida AH. Eletrocardiograma de longa duração: o sistema Holter, parte II. *Reblampa*. 1999;12(3):134-46.
 123. Souza OF, Pereira LSM, Maia IG. O sistema Holter e os outros métodos nas arritmias cardíacas. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. Cap 8, p.11-123.
 124. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurements, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*. 1996; 93:1043-1065.
 125. Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Correlations among time and frequency domain measures of heart period variability two weeks after acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*. 1992; (-a)69:891-898.
 126. Bigger JT, Fleiss JL, Steinmam RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation*. 1992; (-b)85:164-171.
 127. Bigger Jt, FleissJL, Steinmam RC, Rolnitzky LM, Schneider WJ, Stein PK. RR variability in healthy, middle age persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995;91:1936-43.
 128. Cole CR, Blackstone EH, Pashkow FJ, Snader CE, Lauer MS. Heart rate recovery immediately after exercise as a predictor of mortality. *N England J Med*. 1999. 341(18):1351-7.
 129. Consenso Nacional de Ergometria. *Arq.Bras.Cardiol*. 1995; 65(20):189-

- 211.
130. Borg GA. Perceived exercion: a note on history and methods. *Med Sci Sports*. 1977; 5:90.
131. Maia IG, Cruz Filho FES. *Eletrocardiografia Atual*. Rio de Janeiro: Revinter; 1999. Cap.2.
132. Simson MB. Use of Signals in the Terminal QRS Complex to Identify Patients with Ventricular Tachycardia After Myocardial Infarction. *Circulation*. 1981; 64(2).
133. Grell ES, Silva de Paula R, Tobias NMMO, Moffa PJ, Grupi CJ, Mansur. Time Domain Analysis of the Signal Averaged Eletrocardiogram to Detect Late Potentials in Heart Falilure Patients with different Etiologies. *Arq Bras Cardiol*. 2006: 87(3).
134. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al.; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 20005; 18:1440-63.
135. Amico AF, Lichtenberg GS, Reisner SA, et al. Superiority of visual versus computerized echocardiography estimation of radionuclide left ventricular ejection fraction. *The American Heart Journal*. 1989;118:1259-1265.
136. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK et al. Standardized Myocardial Segmentation and Nomenclature for Tomographic Imaging of the Heart. *Circulation*. 2002; 105:539-42
137. The Seventh Report of the Joint National Commitee on Prevention, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *The JNC 7report*. *JAMA*. 2003; 289:2560-72.
138. Krum H. The task force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: full text (update 2005). *Eur Heart J*. [revista na Internet]. 2005 [Acesso em 20 nov. 2011]; 26 (22): 2472. Disponível em: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/26/22/2472.1.full.pdf+html>
139. Medina M, Carrasco H, Fuenmayor A, Medina AN, Muller MRG. Diagnostico por métodos no invasivos de dano ventricular izquierdo incipiente

- en pacientes chagasicos. Utilidad de la ecocardiografía y la fonomecanocardiografía. Archivos del Instituto de Cardiología de México. 1980; 50:663-669.
140. Bestetti RB, Theodoropoulos TA, Cardinali Neto A, Cury PM. Predictors of all cause mortality in chronic Chagas' heart disease in the current era of heart failure therapy. *Am Heart J.* 2008;156(3):422-30.
 141. Barbosa AP, Cardinali Neto A, Otaviano AP, Rocha BF, Bestetti RB. Comparison of Outcome between Chagas Cardiomyopathy and Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2011; 97(6):517-520.
 142. Xavier SS, Silvestre de Souza A, Carvalho Filho EH, Teixeira de Holanda M, Hasslocher-Moreno A. Death Mechanisms and Ventricular Function in the Chronic Stage of Chagas Disease. *Revista da SOCERJ.* 2006; 1:239-245.
 143. Rossi MA, Ramos SG, Bestetti RB. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. *Front Biosci.* 2003;(8):e94-109.
 144. Mocelin AO, Issa VS, Bacal F, Guimarães GV, Cunha E, Bocchi EA. The influence of etiology on inflammatory and neuro-humoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail,* 2005; 7(5):869-73.
 145. Calil I, Tinelli RA, Andrade Vicente WV, Rodrigues AJ, Barbosa Evora PR. The Concept of Crosstalk and its Implication for Cardiovascular Function and Disease. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 88(1):e26-e31.
 146. Dzimir N. Receptor cross-talk: implications for cardiovascular function disease and therapy. *Eur J Biochem.* 2002; 269:4713-30, 2002.
 147. Karemaker JM. Heart rate variability: Why do spectral analysis? *Heart.* 1997;77:99-101.
 148. Ribeiro ALP, Lombardi F, Souza MR, Lins Barros MV, Porta A, Val Barros VC, Gomes MED, Machado FS, Costa Rocha MN. Power - low behavior of heart rate variability in Chagas' disease. *The American Journal of Cardiology.* 2002; 89:414-418.
 149. Williams DK, Wang Jingyi, Papke RL. Positive allosteric modulators as

- an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: Advantages and limitations. *Biochemical Pharmacology*. 2011; 82:915-930.
150. Ribeiro APL, Gimenez LED, Quintero Hernandez CC, Campos de Carvalho AC, Teixeira MM, Guedes VC, et al. Early occurrence of anti-muscarinic auto-antibodies and anormal vagal modulation in Chagas disease. *International Journal of Cardiology*. 2007; 117:59-63.
 151. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H. Subtypespecific B adrenergic receptor signaling pathways in the heart and their potencial clinical implications. *Tips*. 2004; 25:358-65.
 152. Taira CA, Carranza A, Mayer M, Di Verniero C, Opezzo JAW. Therapeutic implications of beta-adrenergic receptor pharmacodynamic properties. *Curr Clin Pharmacol*. 2008;3:174-184.
 153. Marian AJ. B-adrenergic receptors signaling and heart failure in mice, rabbits and human [editorial]. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41:11-3.
 154. Cunha AB. Chagas' Disease and the involvement of the autonomic nervous Sistem. *Rev Port Cardiol*. 2003; 22(6):813-824.
 155. Levy MN. Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. In: Kulbertus, HE Franck G, editores. *Neurocardiology*. Mount Risco, NY: Futura; 1988.
 156. Espinosa R, Carrasco HA, Belandria F, Fuenmayor AM, Molina C, González R, et al. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Int J Cardiol*. 1985; 8(1):45-56.
 157. Martinelli Filho M, Siqueira SF, Moreira H, Fagundes A, Pedrosa A, Nishioka SD, et al. Probability of Occurrence of Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Chagas' Disease versus Non-Chagas' Disease. *Pace*. 2000;23(Pt2): 23:1944-1946.
 158. Maia IG, Cruz Filho FES. Eletrocardiografia atual: uso da eletrocardiografia dinâmica pelo sistema Holter no estudo da morte súbita

- cardíaca arritmogênica. Rio de Janeiro: Revinter; 1999. Cap. 6, p.61-72.
159. Medei EH, Nascimento JH, Pedrosa RC, Barcellos L, Masuda MO, Sicouri Set al, Campos de Carvalho AC. Antibodies with beta-adrenergic activity from chronic chagasic patients modulate the QT interval and M cell action potential duration. *Europace*. 2008; 10(7):868-76.
 160. Chagas C, Villela E. Forma cardíaca da Trypanosomiase Americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1922; 14:5-61.
 161. Brasil A. Autonomical sino-atrial block: a new disturbance of heart mechanism. *Arq Bras Cardiol*. 1955; 8:159-212.
 162. Rocha ALL, Rocha MO, Teixeira ROT, Lombardi F, Abreu CDG, Bittencourt RJ, et al. Chronotropic-metabolic index in Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(5).
 163. Gallo Jr L, Morelo Filho J, Maciel BC, Marin-Neto JA, Martins LE, Lima Filho EC. Functional evaluation of sympathetic and parasympathetic system in Chagas' disease using dynamic exercise. *Cardiovascular Research*. 1987; 21:922-927.
 164. Alonso DO, Forjaz CLM, Resende LO, Braga AM, Barreto ACP, Negrão CE, et al. Comportamento da frequência cardíaca e da sua variabilidade durante as diferentes fases do exercício físico progressivo máximo. *Arq Bras Cardiol*. 1998; 71(6):787-92.
 165. Amon Kw, Richards KL, Crawford MH. Usefulness of the postexercise response of the blood pressure in the diagnosis of coronary artery disease. *Circulation*. 1984; 70:951-956.
 166. Gobel FL, Nordstron LA, Nelson RR, Jorgensen CR, Wang Y. The rate-pressure product as an index of myocardial oxygen consumption during exercise in patients with angina pectoris. *Circulation*. 1978; 57:549-56.
 167. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Petti M, Berthocchi G, De Cecco F, Alvarez MG, Laucella S, Armenti A. Exercise stress testing as predictor of

- progression of early chronic Chagas heart disease. *Heart*. 2006; 92(3):403-404.
168. Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*. 2007; 115(9):1124-1131.
169. Rassi Jr A, Rassi A, Rassi SG. Preditores de mortalidade na doença de Chagas crônica: uma revisão sistemática de estudos observacionais. *Circulation*. 2007; 115(9):1101-1108.
170. Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AI, Borda E, Sterin-Borda L, Teixeira MM. Levels anti-M2 e anti-beta1 autoantibodies do not correlate with degree of heart dysfunction in Chagas. *Microbes Infects*. 2006; 8(9-10):2459-2464.
171. Silva CP, Del Carlo CH, Oliveira Junior MT, Scipioni A, Strunz-Cassaro C, Ramirez JA, et al. Why do patients with chagasic cardiomyopathy have worse outcomes than those with non-chagasic cardiomyopathy? *Arq Bras Cardiol*. 2008;91:358-62.
172. Nunes ED. A questão da interdisciplinaridade no estudo da saúde coletiva e o papel das ciências sociais. In: Canesqui AM. *Dilemas e desafios das ciências sociais na saúde coletiva*. São Paulo: Hucitec; 1995. p.95-113.
173. Bateson G. *Mente e natureza*. Rio de Janeiro: F. Alves; 1986.

ANEXO I

TESTE ERGOMÉTRICO – MEDICAÇÃO EM USO

| Nome | | Medicamentos |
|------|-------------|--|
| 1 | A.C. B. | Maleato de enalapril |
| 2 | A. R. L. H. | Atenolol, hidroclorotiazida, α metil-dopa, hidralazina, losartana potássica |
| 3 | A. S. C. | Candesartan, clopidogrel, AAS, amiodarona, espirolactona, furosemida |
| 4 | A. B. C. | Maleato de enalapril, besilato de anlodipino, hidroclorotiazida |
| 5 | B. M. J. | Losartana potássica, besilato de anlodipino, hidralazina |
| 6 | C. D. M. S. | Losartana potássica |
| 7 | C. L. T. | Clortalidona, nifedipino retard, AAS |
| 8 | C. S. | Digoxina, carvedilol, furosemida, maleato de enalapril |
| 9 | C. C. | Carvedilol, espirolactona, furosemida, losartana potássica, amiodarona |
| 10 | C. R. D. | Maleato de enalapril, hidroclorotiazida, amiodarona, sinvastatina |
| 11 | D. M. O. | Propranolol, hidroclorotiazida |
| 12 | D. I. J. | Sem medicação |
| 13 | D. F. G. | Losartana potássica, furosemida, aldactone, sotacor, digoxina |
| 14 | D. A. | Amiodarona, hidroclorotiazida, captopril, AAS |
| 15 | E. S. R. | Amiodarona, maleato de enalapril, furosemida |
| 16 | E. T.S. | Maleato de enalapril, AAS, aldactone, amiodarona |
| 17 | E. C. S. | Sem medicação no dia do exame |
| 18 | E. G. C. | Estatina |
| 19 | E. A. C. | Sem medicação |
| 20 | F. R. S. | Maleato de enalapril, hidroclorotiazida, sinvastatina, carvedilol |
| 21 | F. A. S. | Captopril, furosemida |

| | | |
|----|-------------|---|
| 22 | F. A. P. F. | Losartana potássica, hidroclorotiazida |
| 23 | G. F. L. | Amiodarona, maleato de enalapril, besilato de anlodipino, hidroclorotiazida |
| 24 | H. S. V. | Furosemida, losartana potássica |
| 26 | I. B. S. | Maleato de enalapril |
| 27 | J. C. A. | Losartana potássica, furosemida, amiodarona, espironolactona |
| 28 | J. B. P. S. | Carvedilol , espironolactona , candesartan, hidroclorotiazida, amiodarona |
| 29 | J. A. C. | Losartana potássica, furosemida, espironolactona, hidralazina |
| 30 | J. A. S. | Sem medicação |
| 31 | J. P. M. | Captopril, amiodarona |
| 32 | J. G. O. | Sem medicação |
| 33 | J.M. S. | Captopril, sinvastatina, furosemida |
| 34 | L. F. | Maleato de enalapril, Indapamida |
| 35 | L. G. S. | Captopril, hidralazina, hidroclorotiazida, sinvastatina |
| 36 | M. A. S. | Não informado |
| 37 | M. A. S. S. | Candersatan, furosemida, espironolactona, hidroclorotiazida, amiodarona |
| 38 | M. A. A. L. | Digoxona, carvedilol, furosemida, candesartan, amiodarona |
| 39 | M. P. A. L. | Sem medicação |
| 40 | M. N. F. S | Maleato de enalapril, ancoron, hidroclorotiazida, carvedilol |
| 41 | M.S. S. P. | Atenolol, maleato de enalapril, ametil dopa, hidroclorotiazida |
| 42 | M. E. G. | Sem medicação |
| 43 | M.J A O. | Carvedilol, losartana potássica, hidroclorotiazida |
| 44 | M. J. B. | Digoxina, carvedilol, hidralazina, candesartan |
| 45 | M. J. S. | Sem medicação |

| | | |
|----|-------------|--|
| 46 | M. J. F. S. | Losartana, hidralazina, hidroclorotiazida |
| 47 | M. J. J. S. | Captopril 25, hidroclorotiazida |
| 48 | M. J. R. P. | Losartana potássica, anlodipino, α metil-dopa |
| 49 | M. L. S. R. | Amiodarona, losartana potássica, furosemida, espironolactona |
| 50 | M. M. S. | Maleato de enalapril, hidroclorotiazida |
| 51 | M. N. C. | Marcapasso |
| 52 | M. O. C. | Captopril, α Metil dopa, captopril, hidroclorotiazida |
| 53 | M. G. R. | Sem medicação |
| 54 | M. C. S. | Losartana potássica, indapamida, hidralazina |
| 55 | M. M. S. | Maleato de enalapril, hidroclorotiazida |
| 56 | N. B. P. | Maleato de enalapril, hidroclorotiazida, hidralazina |
| 57 | R. N. F. | Sem medicação |
| 58 | R. C. S. | Captopril, hidroclortiazida, amiodarona |
| 59 | R. F. C. | Sem medicação |
| 60 | S. P. S. | Amiodarona, hidroclorotiazida, captopril, AAS |
| 61 | S. B. R. | Maleato de enalapril, hidroclorotiazida |
| 62 | V.X. G.P.C. | Carvedilol, captopril, furosemida |
| 63 | V.S. F. | Sem medicação |
| 64 | V. G. S. R. | Carvedilol, losartana potássica, hidralazina |

ANEXO II

Classificação da Insuficiência Cardíaca, segundo NYHA

| | |
|------------|---|
| Classe I | Pacientes com cardiopatia, mas sem limitações resultantes da atividade física. A atividade física comum não causa fadiga anormal, palpitações ou dor anginosa. |
| Classe II | Pacientes com cardiopatia levando a leve limitação da atividade física. Assintomáticos em repouso. A atividade física comum resulta em fadiga, palpitação, dispnéia ou dor anginosa. |
| Classe III | Pacientes com cardiopatia resultando em marcada limitação de atividade física. Assintomáticos em repouso. Mínimo esforço físico, menos que a atividade física comum, causa fadiga, palpitação, dispnéia ou dor anginosa. |
| Classe IV | Pacientes com cardiopatia incapazes de executar qualquer atividade física sem desconforto. Os sintomas de Insuficiência Cardíaca ou de Síndrome Anginosa podem estar presentes mesmo em repouso. A qualquer esforço físico empreendido o desconforto aumenta. |

The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure: (update 2005); doi:10.1093/eurheartj/ehi205.

Classificação de Los Andes Modificada

| Sorologia positiva para Doença de Chagas | |
|--|--|
| IA | ECG normal, Ecocardiograma normal |
| IB | ECG normal, Ecocardiograma com função ventricular esquerda normal e alteração segmentar da contratilidade. |
| II | ECG anormal, Ecocardiograma com alteração segmentar da contratilidade e ou disfunção ventricular esquerda. |
| III | ECG anormal, Ecocardiograma com disfunção ventricular esquerda e sinais clínicos de congestão pulmonar. |

Medina M, Carrasco H, Fuenmayor A, Medina AN, & Muller MRG. Diagnostico por métodos no invasivos de dano ventricular izquierdo incipiente en pacientes chagasicos. Utilidad de la ecocardiografía y la fonomecanocardiografía . *Archivos del Instituto de Cardiologia de México*, 50:663-669, 1980.

ANEXO III

Instituto Nacional de Cardiologia

Programa Cardio-Chagas

Estudo dos auto-anticorpos circulantes na cardiopatia chagásica crônica

I- Identificação:

Data da avaliação ___/___/___/___

Nome: _____

No do prontuário: _____

Data de nascimento: _____

Tel para contato: _____

Etnia: _____

Naturalidade: _____

Afastado da zona endêmica: _____

II - Mediadas antropométricas

Peso _____ Alt _____ IMC _____

Peso normal () sobrepeso () obesidade ()

III - Exame físico:

1- RCR 2 t BNF () RCR 3t b4 () RCR 3t b3 ()

2- RCI () Extrassístoles () _____

3- Desdobramento B2

4- Turgência jugular: sim () não ()

5- Sopros: _____

6- Pressão arterial: _____

IV - Avaliação radiológica:

normal () ICT ≥ 5 () congestão pulmonar () sem congestão pulmonar ()

V- Sinais e sintomas físicos:

A- Classe funcional (NYHA): Grupo I () II () III () IV ()

- B- *Los Andes*: Grupo I () IA () IB () Grupo II () grupo III ()
 C- Insuficiência cardíaca (IC) direita - sim () não ()
 D- IC biventricular: sim () não ()
 E- Morte súbita na família: sim () não ()
 F-História de embolia pulmonar: sim () não () Sistêmica: sim () não ()
 G- Comprometimento digestivo: sim () não ()
-

VI- História clínica previa

- ICC: sim () não () Síncope: sim () não ()
 HAS: sim () não () – Estágio: _____
 Comorbidades: Diabetes - sim () Tipo: _____
 Tireoideopatias: sim () não ()
 Nefropatias: sim () não () Neoplasias: sim () não ()
 Câncer: sim () não ()
 Outras: _____

VII - História Social:

Moradia: casa de estuque - sim () não ()

Grau de escolaridade:

- Analfabeto: sim () não () Primeiro grau incompleto: sim () não () completo
 sim () não ()
 Segundo grau incompleto: sim () não () Completo sim () não () Curso
 Superior sim () não ()
 História de doença na família: sim () não () _____
 Transfusão sanguínea: sim () não () _____

VIII- Fatores de risco e hábitos:

- Tabagismo: sim () não () Ex tabagista _____
 Alcoolismo: sim () não ()
 Está trabalhando: sim () não ()

Desempregado: sim () não () em benefício sim () não ()

Ativo: sim () não ()

VIII – Exames complementares:

A – Sorologia para Chagas:

Elisa: _____ Hemaglutinação _____

B - Autoanticorpos:

| Autoanticorpos | Titul. B1 Titul | Titul. M2 |
|-----------------------|-----------------|-----------|
| Anti-B1 reagente | | |
| Anti- B1 não reagente | | |
| Anti-M2 reagente | | |
| Anti-M2 não reagente | | |

C - ECG basal:

Diagnóstico:

Ritmo: FC: QRS: PR :

D - ECGAR:

| Parâmetros | Resultados | Normalidade | Com BRE | Com BRD |
|-------------------|------------|-------------|---------|---------|
| RMS | | | | |
| LAS | | | | |
| Duração QRS | | | | |
| Duração da onda P | | | | |

Positivo para () negativo para ()

E - Ecocardiograma bidimensional com Doppler:

Diâmetros: AE _____ AO _____ Vd _____
 VEd _____ VEs _____ SIV _____ PP _____

Massa: VE _____ Ind de massa _____

Fração de ejeção Simpson: _____ %

Função sistólica global: Normal () levemente compr. () mod. Comprometida ()
 gravemente compr. ()

Função sistólica segmentar escore de pontos:

| Segmentos | Anterior | S.anterior | S.inferior | Inferior. | Infero-Lateral | Antero-lateral |
|-----------|----------|------------|------------|-----------|----------------|----------------|
| Basal | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Médio | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Apical | 1 | | 1 | 1 | 1 | |
| | | | Apex 1 | | | |

Total: 17 segmentos / 17 score =1

Função diastólica: N () I () II () III () IV ()

Observações _____

F- Holter cardíaco de 24 h:

VFC (variabilidade da FC) Parâmetros analisados

1-VFC normal () Anormal ()

- 2 - SDANN \leq 50 () SDANN \geq 50 () SDANN entre 50 e 100 ()ms
SDANN > 100 ms ()
- 3 - SDNN \leq 50 () SDNN \geq 50 () SDNN entre 50 e 100 () ms
SDNN > 100
- 4 - pNN50% \leq 5 ()
- 5 - rMMSSD \leq 30 ms ()

G - Teste ergométrico:

Variáveis:

- 1 - Protocolo _____ Tempo _____
- 2 - Medicações em uso _____

- 3 - PA basal _____ mmHg PA max esforço _____ mmHg
Var./met _____
- 4 - FC basal _____ bpm FC max esforço _____ bpm Res. Cronot. _____
- 5 - VO2 max _____ MVO2 max _____ METS _____
- 7 - Classe funcional: I() II() III() IV()
- 8 - Aptidão cardio-respiratória: muito fraca() Fraca() Boa() Excelente ()
- 9 - Arritmias: _____
- 10 - Alterações do seg ST: _____
- 11 - Distúrbios da condução ventricular: _____
- Conclusão: _____
-

| | | | | | | | | |
|----|-------|------|-----|-----|-----|-------|-----|-------|
| 25 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 26 | 15895 | 897 | 164 | 109 | 104 | 15839 | 95 | 41,16 |
| 27 | 8678 | 1472 | 174 | 135 | 99 | 8214 | 136 | 60,38 |
| 28 | 8773 | 1414 | 283 | 227 | 137 | 8325 | 133 | 21,57 |
| 29 | 15733 | 806 | 78 | 56 | 47 | 15027 | 46 | 8,42 |
| 30 | 17088 | 813 | 171 | 149 | 69 | 16758 | 59 | 24,27 |
| 31 | 9812 | 1130 | 196 | 140 | 84 | 9300 | 40 | 8,61 |
| 32 | 15622 | 904 | 127 | 114 | 43 | 15495 | 34 | 1,87 |
| 33 | 16001 | 771 | 267 | 218 | 159 | 15712 | 163 | 18,22 |
| 34 | 21801 | 633 | 75 | 68 | 29 | 21309 | 27 | 3,53 |
| 35 | 19233 | 734 | 49 | 37 | 30 | 19049 | 12 | 0,16 |
| 36 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 37 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 38 | 15124 | 771 | 51 | 32 | 35 | 13761 | 52 | 4,08 |
| 39 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 40 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 41 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 42 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 43 | 13764 | 1008 | 112 | 78 | 72 | 13521 | 73 | 30,19 |
| 44 | 11748 | 1167 | 102 | 69 | 57 | 11377 | 38 | 9,76 |
| 45 | 10298 | 1378 | 312 | 64 | 304 | 10244 | 385 | 71,63 |
| 46 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 47 | 11099 | 1183 | 85 | 46 | 67 | 10829 | 61 | 20,02 |
| 48 | 13516 | 1003 | 140 | 127 | 54 | 12682 | 38 | 6,37 |
| 49 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 50 | 12201 | 1111 | 64 | 38 | 48 | 11940 | 52 | 0,96 |
| 51 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 52 | 16880 | 844 | 67 | 45 | 49 | 16818 | 30 | 5,18 |
| 53 | 10275 | 1192 | 356 | 210 | 305 | 9981 | 385 | 57,19 |
| 54 | 21619 | 661 | 74 | 65 | 27 | 21530 | 23 | 1,88 |
| 55 | 12097 | 1155 | 74 | 45 | 51 | 11928 | 36 | 7,83 |

| | | | | | | | | |
|----|-------|------|-----|-----|----|-------|-----|-------|
| 56 | 14522 | 948 | 207 | 183 | 84 | 14154 | 92 | 28,21 |
| 57 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 58 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 59 | 18630 | 963 | 101 | 46 | 83 | 16940 | 65 | 14,63 |
| 60 | 15017 | 956 | 85 | 64 | 33 | 14985 | 12 | 0,24 |
| 61 | 13492 | 1052 | 73 | 39 | 44 | 13427 | 52 | 6,78 |
| 62 | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 63 | 17880 | 802 | 115 | 107 | 31 | 17831 | 9 | 0,05 |
| 64 | 15207 | 779 | 141 | 87 | 95 | 13956 | 154 | 11,93 |

ANEXO V

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Identificação:

Título do Projeto: O Estudo dos Anticorpos Antirreceptores β 1 e Anti-M2 na Cardiopatia Chagásica Crônica

Pesquisador Responsável: Delma Maria Cunha

Instituição: Instituto Nacional de Cardiologia

Telefone para contato _____ / _____

Nome do voluntário: _____

Idade (anos): _____

Número do RG: _____

O Sr. está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa "O Estudo dos Anticorpos Antirreceptores β 1 e Anti-M2 na Cardiopatia Chagásica Crônica " de responsabilidade do pesquisador Delma Maria Cunha.

Eu, _____, abaixo assinado estou sendo informado pela equipe do ambulatório de Doença de Chagas do INC, que me assiste, que sou portador de uma doença denominada " Doença de Chagas", para a qual não existe um tratamento definido. Com esse estudo queremos fazer alguns exames que possam ajudar a compreender melhor a doença e assim poder tratá-la.

Fui informado que para participar da pesquisa, preciso comparecer regularmente as consultas marcadas no ambulatório para realizar os seguintes exames:

Entrevista: Você tem que responder perguntas sobre sua vida pessoal ,tais como onde nasceu, onde morou ou mora atualmente, hábitos, história familiar, a sua saúde atual, outras doenças que você tenha, informações sobre uso de medicamentos . Esses dados serão inseridos em um banco de dados e dessa forma, toda vez que você vier em consultas de ambulatório os médicos do serviço terão informações sobre você, sua saúde e o diagnóstico da sua doença.

Sangue: Semelhante aos exames que você faz de rotina. Pesquisamos uma substância no sangue chamada anticorpo, que pode estar presente ou não. Vamos estudar se este anticorpo é benéfico ou se está relacionado com a evolução da doença. Os resultados serão importantes para o seu acompanhamento ao longo do tempo.

Eletrocardiograma: Você provavelmente já fez este exame mais de uma vez. Ele avalia o ritmo do seu coração e informa se você já apresenta alguma alteração que precise ser tratada de forma diferente do tratamento atual. Faz parte de exames de rotina na cardiologia e não há nenhum risco em fazê-lo.

Holter cardíaco de 24h: Exame semelhante ao Eletrocardiograma, porém, monitora o ritmo do seu coração durante 24h. Não causa dor, nem desconforto e nenhum risco para você.

Teste Ergométrico: Neste exame, você caminha em uma esteira rolante, recebe informações e acompanhamento do médico que realiza o exame. O objetivo é avaliar a sua capacidade para o exercício. Este exame será feito em uso da medicação que você utiliza de rotina. Caso durante o exame você sinta desconforto e queira interromper o exame, relate os sintomas ao médico e o teste será interrompido. A sala de exame dispõe de equipamentos para atendê-lo caso haja alguma intercorrência como arritmia cardíaca, queda da pressão arterial ou algum grau de sofrimento do músculo cardíaco (isquemia do coração). Por ser um exame no qual você faz um esforço físico e tem uma cardiopatia, existe um risco mínimo de complicações durante o exame.

Ecocardiograma: É um exame de imagem que mostra o seu coração em tempo real, isto é, podemos vê-lo naquele momento e, analisar o tamanho do coração, a sua capacidade de contrair e relaxar. Este exame pode mostrar alterações que são típicas da doença que você tem e isso pode ajudar na escolha do tratamento adequado. Este exame não tem nenhum risco para você.

Todas as suas dúvidas poderão ser sanadas nas consultas de ambulatório com os médicos responsáveis pela pesquisa que você está participando de **forma voluntária**. Você poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento e isto não vai interferir com as suas consultas de rotina nesta instituição. Todas as informações obtidas sobre você, sua saúde são individuais e confidenciais.

Direitos do paciente:

A sua participação é inteiramente voluntária. Durante o estudo voce deve se sentir livre para questionar o que desejar, e caso não se considere suficientemente esclarecido pelo profissional que o (a) estiver atendendo, poderá solicitar o contato direto com o investigador responsável por este estudo, a *Dra Delma Maria Cunha*, telefone (21) 9977-4494. Uma vez aceitando participar desta pesquisa, voce deverá se sentir livre para abandonar o estudo a qualquer momento do curso deste, sem que isto afete o seu cuidado ou tratamento futuro neste hospital. Caso surja alguma dúvida quanto à ética do estudo, voce deverá se reportar ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos – subordinado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde, através de solicitação ao pesquisador responsável, que estará sob contacto permanente, ou contactando diretamente o coordenador do referido comitê deste hospital, que lhe será informado pelo pesquisador responsável.

Você tem direito ao completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação dos resultados deste estudo em congressos médicos e jornais científicos. Este termo será assinado em duas vias, ficando uma com o pesquisador e a outra com o Sr.(a).

Diante do exposto nos parágrafos anteriores eu, firmado abaixo, (primeiro nome e sobrenome) _____, residente à (endereço) _____.

Concordo em participar da pesquisa: “O Estudo dos anticorpos Antireceptores β 1 e anti-M2 na Cardiopatia Chagásica Crônica”. Eu fui completamente orientado pelo Dr. (nome do médico)_____.

Eu pude questioná-lo sobre todos os aspectos do estudo. Além disto, ele/ela me entregou uma cópia da folha de informações para os participantes, a qual li compreendi e me deu plena liberdade para decidir acerca da minha espontânea participação nesta pesquisa.

Depois de tal consideração, concordo em cooperar com o Dr. _____, informá-lo imediatamente sobre qualquer anormalidade observada.

Estou ciente que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar. Minha identidade jamais será publicada e os dados colhidos permanecerão confidenciais.

Concordo que estes poderão ser examinados por pessoas envolvidas no estudo com autorização delegada do investigador.

Eu concordo que não procurarei restringir o uso que se fará sobre os resultados do estudo.

Data e assinatura procede que este tenha sido "Lido e Aprovado".

Investigador: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Testemunha: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Participante: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Eu, _____,

RG n° _____, declaro ter sido informado e concordo em participar como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Testemunha 1: _____

RG n° _____

Testemunha 2 _____

RG N° _____

Rio de Janeiro, ____/____/____