



Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF
Instituto do Coração Edson Saad - ICES

Clarissa Antunes Thiers

**DISFUNÇÃO AUTONÔMICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM ANTICORPOS
FUNCIONALMENTE ATIVOS CONTRA RECEPTORES ACOPLADOS
A PROTEÍNA-G EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS
CRÔNICA E FUNÇÃO SISTÓLICA PRESERVADA**

Tese submetida ao Corpo Docente do programa de Pós-graduação em Medicina (Cardiologia) do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Cardiologia.

***Orientadores:** Prof. Roberto Coury Pedrosa*

Prof. Basílio de Bragança Pereira

Rio de Janeiro

Junho/2012

Thiers, Clarissa Antunes.

Disfunção autonômica e sua associação com anticorpos funcionalmente ativos contra receptores acoplados a proteína-G em pacientes com doença de Chagas crônica e função sistólica preservada / **Clarissa Antunes Thiers. Rio de Janeiro: UFRJ / ICES Faculdade de Medicina, 2012.**

xi, 106f. ; 31 cm.

Orientadores: Roberto Coury Pedrosa e Basílio de Bragança Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro,

Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cardiologia / ICES, 2012.

Referências bibliográficas: f.71 – 79.

1. Doença de Chagas. 2. Sistema Nervoso Autônomo. 3. Anticorpos. 4. Mimetismo Molecular. 5. Disautonomias Primárias. 6. Receptores Muscarínicos. 7. Cardiopatias. 8. Estudos Transversais. 9. Epidemiologia Descritiva. 10. Cardiologia - Tese. I. Pedrosa, Roberto Coury. II. Pereira, Basílio de Bragança. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, ICES, Pós-Graduação em Cardiologia. IV. Título.

Clarissa Antunes Thiers

**DISFUNÇÃO AUTONÔMICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM ANTICORPOS
FUNCIONALMENTE ATIVOS CONTRA RECEPTORES ACOPLADOS
A PROTEÍNA-G EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS
CRÔNICA E FUNÇÃO SISTÓLICA PRESERVADA**

Orientadores: Prof. Roberto Coury Pedrosa

Prof. Basílio de Bragança Pereira

Tese submetida ao Corpo Docente do programa de Pós-graduação em Medicina (Cardiologia) do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Cardiologia.

Aprovada por:

Profª. Andrea Silvestre de Souza

Prof. Bernardo Rangel Tura

Prof. Edison Ramos Migowski Carvalho

Rio de Janeiro

Junho/2012

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu avô **Julio José Antunes** (1916-2007), um homem de origem humilde, porém refinado pelo seu amor e dedicação à arte e ao conhecimento. Sua sensibilidade e sabedoria me orientaram ao longo de 30 anos de uma convivência extremamente feliz e produtiva e reiteraram a importância do estudo como requisito essencial para uma vida plena. Não poderia deixar de dedicar este trabalho à minha adorável e inspiradora filha **Giovanna Thiers Barbosa**, que se manteve firme ao meu lado durante as longas noites de estudo, me motivando quando as forças pareciam se esgotar. A essas pessoas, que tanto amo, muito obrigada por fazerem parte da minha história.

AGRADECIMENTOS

Para que esse trabalho se tornasse realidade, um grande número de pessoas voluntárias contribuiu generosamente, doando boa parte de seu tempo, cedendo informações pessoais, superando inseguranças em relação a um exame que pouco conheciam, compreendendo as inúmeras dificuldades que surgiam ao longo desses anos. À essas pessoas, voluntários e pacientes – em especial ao **paciente José Messias**, minha eterna gratidão e a esperança de que esses dados possam algum dia auxiliar na compreensão da fisiopatologia da disfunção autonômica na Doença de Chagas.

Agradeço à **Dra. Gláucia Maria Moraes de Oliveira**, que me influenciou desde o início de minha formação, permitiu o feliz encontro com o **Dr. Roberto Coury Pedrosa** e a oportunidade de dar o primeiro passo em direção a uma vida acadêmica.

Agradeço ao **Professor Basílio de Bragança Pereira e à Professora Emília Matos do Nascimento**, pela disponibilidade e assistência ao longo de todo esse período, por me orientarem e tornarem claro o que parecia tão nebuloso em meio a uma quantidade enorme de informações.

Muito obrigada a toda equipe do **Instituto de Biofísica**, representado pelos **Professores Emiliano Horácio Medei e José Hamilton do Nascimento**, que permitiram a feliz integração da pesquisa clínica com a pesquisa de bancada, agregando muito valor ao presente trabalho.

Esse trabalho começou a tomar forma nas mãos das **Dras. Flávia Vernin** – ao realizar todos os exames ecocardiográficos na coorte do presente estudo, e **Marcella Agostini Iso**, que pacientemente ensinou-me a realização do teste tilt e como decifrar o enigma do programa de análise de variabilidade baseado no MS-DOS. À elas, muito obrigada.

Dr. Felipe José Monassa Pitella, com uma generosidade ímpar, tolerou pacientemente meus atrasos e a minha ausência, permitindo que eu me sentisse confiante para seguir adiante. À ele e aos meus queridos **residentes e pós-graduandos do INC**, muito obrigada pela compreensão e pelo incentivo.

Ao **Dr. Bernardo Rangel Tura**, que aceitou o convite de participar da banca incondicionalmente, minha eterna gratidão por efetivamente promover este momento.

Agradeço ao **Dr. João Luis Barbosa**, meu grande amor, companheiro e incentivador, que participou diretamente de todo o processo de elaboração da tese, compartilhando pacientemente sua experiência e conhecimentos. Seu apoio não apenas técnico, mas também

emocional, permitiram que eu pudesse chegar até aqui.

Tenho profunda gratidão e admiração pelos mestres que compuseram a banca de qualificação desta tese - **Dr. Sérgio Salles Xavier, Dra. Andrea Silvestre e Dr. Edison Migowski**, fundamentais na adequação de minhas idéias sobre a doença de Chagas no mundo atual.

Muito obrigada ao **Dr. Nelson Albuquerque de Souza e Silva** e à **Prof. Lúcia Helena Salis**, que me ofertaram uma segunda chance quando todo o trabalho parecia escapar-me pelos dedos... Hoje os alicerces da formação pessoal estão mais sólidos.

Finalmente, agradeço ao **Dr. Roberto Coury Pedrosa**, admirável pela sua ética, integridade e profunda dedicação à produção científica e à assistência nessa Universidade. Há pouco mais de 2 anos me acolheu carinhosamente desde o início do projeto, corrigiu minhas falhas sem desqualificar meus esforços, inspirou-me como professor e como médico, e hoje é alguém cuja opinião norteia boa parte de minhas decisões.

RESUMO

Fundamento: A morte súbita é o principal modo de óbito na doença de Chagas, acometendo pacientes mesmo em fases precoces da doença, podendo surgir como a primeira manifestação da doença ou seu evento terminal. A busca por preditores que permitam melhor estratificar pacientes com cardiopatia chagásica é alvo incessante de pesquisas tanto nas áreas clínica quanto básica. É reconhecido o comprometimento do sistema nervoso autônomo nessa patologia e seu potencial como deflagrador de arritmias malignas quando associado a alterações estruturais ou metabólicas. O entendimento de parte desse mecanismo através do qual a autoimunidade possa estar associada à disfunção autonômica e, possivelmente, favorecer o desenvolvimento de arritmias malignas que culminem na morte súbita é o escopo do presente trabalho.

Objetivo: Buscamos identificar, em pacientes com doença de Chagas crônica e função sistólica preservada ($FE > 50\%$), o comprometimento do sistema nervoso autônomo e, posteriormente, sua associação com anticorpos funcionalmente ativos contra receptores anti-m2 e anti- $\beta 1$.

Métodos: Através da análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) durante teste de inclinação passiva, pacientes com função sistólica preservada ($FE > 50\%$), foram submetidos a manobras evocadoras do sistema parassimpático (arritmia sinusal respiratória), simpático (inclinação a 70°) e comparados com controles saudáveis. Posteriormente, os pacientes tiveram seus soros caracterizados para a presença de anticorpos funcionalmente ativos com ação anti-m2 e anti- $\beta 1$ através do método de Langendorf. Utilizando-se teste de Mann-Whitney, as variáveis alta frequência e relação baixa/alta durante as 3 etapas do teste de inclinação passiva (arritmia sinusal respiratória, repouso e inclinação) foram comparadas em ambos os grupos. Em seguida, pacientes com doença de Chagas foram subdivididos de acordo com os anticorpos encontrados em seu soro (sem anticorpos anti-m2 e anti- $\beta 1$, apenas anti-m2, apenas anti- $\beta 1$ e com positividade para ambos) e analisados através da confecção de boxplot.

Resultados: Foram incluídos 39 pacientes. Observamos que pacientes com doença de Chagas e função sistólica preservada ($FE > 50\%$) expressam atividade parassimpática frente a um estímulo vagal, porém com menor intensidade em relação aos controles. Pacientes com doença de Chagas e anticorpos anti-m2 ou anti- $\beta 1$ apresentaram uma redução ainda mais

expressiva da resposta vagal durante a arritmia sinusal respiratória, independente da presença de alterações eletrocardiográficas. Entretanto, a associação de ambos promoveu resposta ao estímulo vagal similar aos pacientes sem a presença dos mesmos.

Conclusão: A menor reserva vagal em pacientes com doença de Chagas e função ventricular preservada (FEVE > 50%) esteve associada à presença de anticorpos anti-m2 ou anti- β 1 funcionalmente ativos.

Palavras-chave: doença de Chagas / anticorpos / função ventricular preservada / receptores cardíacos acoplados a proteína G / disfunção autonômica / eletrocardiograma

ABSTRACT

Background: Sudden death is the leading cause of death in Chagas' disease, affecting patients in early stages of the disease, which may arise as the first manifestation of disease or its terminal event. The search for predictors that allow better stratification of patients with Chagas' heart disease is the subject of constant research in both basic and clinical areas. It is noteworthy the impairment of the autonomic nervous system in this pathology and its potential as a trigger for malignant arrhythmias when associated with structural or metabolic changes. The understanding of the mechanism by which autoimmunity might be associated with autonomic dysfunction and possibly promote the development of malignant arrhythmias that culminate in sudden death is the scope of this work.

Objective: We sought to identify in patients with chronic Chagas' disease and preserved systolic function ($EF > 50\%$), the involvement of the autonomic nervous system and, subsequently, its association with functionally active antibodies against receptors anti-m2 and anti- β 1.

Methods: Through the spectral analysis of heart rate variability during passive tilt test, patients without dysfunction underwent provocative maneuvers of the parasympathetic system (respiratory sinus arrhythmia), sympathetic system (tilt 70°) and were compared with healthy controls. Subsequently, patients had their sera characterized for the presence of functionally active antibodies against anti-m2 and anti- β 1 receptors by the Langendorf method. Using Mann-Whitney test, the variables high frequency and low frequency/ high frequency ratio, from the analysis of RR variability during the three stages of the passive tilt test (respiratory sinus arrhythmia, resting and tilt), were compared in both groups. Then, patients with Chagas' disease were subdivided according to the antibodies found in their serum (without anti-m2 and anti- β 1, with only anti-m2, only anti- β 1 and positive for both) and analyzed by making boxplot.

Results: Thirty-nine patients were included in the study. We observed that patients with Chagas' disease and preserved systolic function ($EF > 50\%$) were able to express parasympathetic activity against a vagal stimulus, but with less intensity compared to controls. Patients with Chagas' disease and anti-m2 or anti- β 1 antibodies showed a further significant reduction of the vagal response during respiratory sinus arrhythmia, despite the presence of electrocardiographic changes. However, the association of both promoted

response to vagal stimulation similar to those patients without the presence of these antibodies.

Conclusion: The lower vagal reserve in patients with chronic Chagas' disease and preserved systolic function was associated with functionally active anti-m2 or anti- β 1 antibodies .

Key words: Chagas' disease / antibodies / preserved systolic function / G protein-coupled receptors / autonomic dysfunction / electrocardiogram.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Inervação autonômica do coração.....	p.34
Figura 2 - Representação do tacograma de intervalos RR no domínio da frequência.....	p. 37
Figura 3 – Deslocamento fisiológico do volume sanguíneo durante a inclinação.....	p.52
Figura 4 – Sequência de manobras utilizadas durante análise da VRR.....	p.53
Figura 5 – Representação da análise espectral da VRR durante repouso.....	p.54
Figura 6 – Representação da análise espectral da VRR durante inclinação.....	p.54
Figura 7 – Representação da análise espectral da VRR durante ASR.....	p.55
Figura 8 – Arritmias observadas durante a ação de anticorpos anti-m2 e anti-β1 no coração isolado de coelho.....	p.56
Figura 9 - Mediana, intervalos interquartis e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e controles: AF durante repouso e ASR.....	p.62
Figura 10 - Mediana, intervalos interquartis e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e controles: relação B/A durante repouso e inclinação.....	p.62
Figura 11 – Mediana, intervalos interquartis e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas de acordo com o tipo de anticorpo: AF durante ASR	p.63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas dos pacientes com doença de Chagas.....**p.60**
- Tabela 2** - Dados da variabilidade da FC no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e controles, durante arritmia sinusal respiratória, repouso e inclinação (medianas e intervalos interquartis).....**p.61**
- Tabela 3** - Dados da variabilidade da FC no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e ECG normal ou alterado, durante arritmia sinusal respiratória, repouso e inclinação (medianas e intervalos interquartis).....**p.64**

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	p.80
Anexo 2 – Técnica de avaliação da presença de anticorpos contra receptores acoplados a proteína G no soro de pacientes com doença de Chagas.....	p.87
Anexo 3 – Parecer do CEP – folha de aprovação.....	p.90
Anexo 4 – Artigo aprovado para publicação no ABC.....	p.91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	alta frequência
ASR	arritmia sinusal respiratória
BF	baixa frequência
ECG	eletrocardiograma
ECO	ecocardiograma
FC	frequência cardíaca
HR	hazard ratio
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IMC	índice de massa corporal
MS	morte súbita
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PA	pressão arterial
Relação B/A	relação baixa/alta
Rep	repouso
SNA	sistema nervoso autônomo
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VE	ventrículo esquerdo
VFC	variabilidade da frequência cardíaca
WHA	World Health Assembly
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 Introdução	p.15
1.1 Fundamentação	p.21
1.2 Fisiopatologia da doença de Chagas - considerações gerais	p.21
1.2.1 Teoria neurogênica	p.23
1.2.2 Papel eletrofisiológico dos auto-anticorpos funcionalmente ativos com reatividade contra receptores cardíacos envolvidos na gênese das arritmias cardíaca	p.25
1.2.2.1 Relação entre disfunção autonômica e auto-anticorpos funcionalmente ativos com reatividade contra receptores cardíacos	p.27
1.2.3 Morte súbita na doença de Chagas	p.28
1.2.3.1 Disfunção autonômica e morte súbita na doença de Chagas crônica	p.32
1.3 Avaliação do controle autonômico cardiovascular	p.34
1.3.1 Considerações acerca da metodologia de avaliação do controle autonômico cardiovascular	p.38
1.3.1.1 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)	p.38
1.3.1.2 Teste da arritmia sinusal respiratória	p.40
1.3.1.3 Teste de Inclinação (teste TILT)	p.42
2 Objetivo	p.46
3 Pacientes e Métodos	p.46
3.1 Delineamento do Estudo	p.46
3.1.1 Critérios de Inclusão	p.47
3.1.2 Critérios de Exclusão	p.47
3.1.3 Grupo Controle	p.48
3.2 Aspectos bioéticos	p.48
3.3 Protocolos de avaliação utilizados na seleção	p.49
3.3.1 Diagnóstico sorológico da doença de Chagas	p.49
3.3.2 Exame clínico	p.50
3.3.3 Eletrocardiograma	p.51
3.3.4 Ecocardiograma uni e bidimensional com Doppler	p.51
3.3.5 Protocolo para análise de variabilidade da frequência cardíaca através do teste TILT	p.51

3.3.5.1 Protocolo para análise de variabilidade da frequência cardíaca através do teste da Arritmia Sinusal Respiratória (ASR).....	p.55
3.3.6 Pesquisa da presença de anticorpos contra receptores acoplados a proteína-G.....	p.56
3.4 Definições.....	p.57
4 Análise Estatística.....	p.58
5 Conflito de interesse.....	p.59
6 Controle de qualidade da coleta dos dados.....	p.59
7 Resultados.....	p.59
8 Discussão	p.64
9 Relevância Clínica.....	p.68
10 Conclusão.....	p.68
11 Limitações do estudo.....	p.69

1 INTRODUÇÃO

Reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 13 maiores doenças tropicais negligenciadas (HOTEZ, 2007), a doença de Chagas tem assolado a humanidade desde a antiguidade, e continua sendo um problema social e econômico relevante em países da América Latina (MATHERS e cols, 2007; MONCAYO & SILVEIRA, 2009). A estratégia de controle para eliminação da doença de Chagas no período de 1996 a 2010, pela resolução da Assembléia Mundial de Saúde (WHA, 1998), foi baseada em interrupção da transmissão pelo vetor e controle da transfusão sanguínea em todos os países endêmicos para a doença (WHO, 2002). Sendo assim, a incidência da doença de Chagas caiu de 700 mil novos casos por ano para 40 mil novos casos; e o número de mortos foi reduzido de 45 mil casos para 12.500 casos anuais (MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Ainda segundo a OMS, 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo - principalmente na América Latina, onde a doença ainda é considerada endêmica. Cerca de 25 milhões de pessoas vivem em áreas consideradas zonas de risco e é estimado que, somente no ano de 2008, 10 mil pessoas tenham morrido por conta da doença (RASSI e cols, 2010). Soma-se a isso o fato de que 1/3 dos pacientes infectados com a doença nas últimas décadas irá desenvolver a forma crônica, apresentando os sintomas da cardiopatia chagásica crônica e estando sujeitos à morte súbita.

Desde 1940, programas de controle pelos ministérios da saúde de países endêmicos têm sido centrados na eliminação do vetor. Em 1975, a OMS (Organização Mundial de Saúde) implantou o TDR - Tropical Disease Research, apoiado pelo UNDP - Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas e pelo Banco Mundial, juntamente com os órgãos nacionais e as universidades, somaram importante ajuda financeira e, principalmente, promoveram maior coordenação à pesquisa básica e aplicada, com uma metodologia melhor. Organizações tais como a European Community e agências bilaterais - como International Development Research Center (Canada) e a Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC), também têm sido muito ativas nas pesquisas básicas na doença de Chagas. Intercâmbios entre instituições nas áreas endêmicas e não endêmicas têm sido desenvolvidos e reforçados através de projetos colaborativos. Uma das prioridades identificadas nos anos 70 foi a necessidade de uma acurada informação na prevalência da doença e infecção por *Trypanosoma cruzi* uma vez que, na maioria dos países endêmicos, tais informações eram incompletas ou inexistentes. O governo brasileiro, no início da década de 80, prioriza o combate à doença de Chagas através da aplicação maciça de inseticidas nos

domicílios. Em 1982 foram iniciados extensos testes de campo para investigar inseticidas e formulações alternativas para o controle dos vetores, levando à substituição do BHC (e outros organoclorados) por piretróides - menos tóxicos para mamíferos e com efeito residual maior. Uma reunião de cúpula em 1991 denominada “Iniciativa do Cone Sul”, reuniu ministros da saúde de 6 países em Brasília, que destinaram US\$ 90 milhões para combate ao inseto. Também nos anos 80, prioridade foi dada para as pesquisas aplicadas referente a evolução da doença, à incidência do comprometimento cardíaco e a mortalidade da cardiopatia chagásica crônica.

Por se tratar de uma doença debilitante e incurável, a doença de Chagas constitui ainda hoje, em um Brasil praticamente livre de transmissão pelo vetor, um grave problema de saúde pública, especialmente pelo tratamento dos pacientes já infectados no passado. Estima-se que, especificamente no Brasil, cerca de 3 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *T. Cruzi* (DIAS, 2007). Estatística disponível no banco de dados do Ministério da Saúde ainda revela número elevado de mortes pela doença, 5000 mortes / ano, quando se analisa o período 2001-2007 (DATASUS, 2007). É provável que esse número esteja subestimado, devido à precariedade do sistema de notificação da doença de Chagas no Brasil.

Pesquisas básicas e aplicadas na doença de Chagas tem sido a prioridade dos órgãos fomentadores de pesquisa, nacionais e outros, desde a primeira descrição da doença por Carlos Chagas. Estas pesquisas inicialmente apresentavam erros metodológicos. A maioria dos estudos sobre a doença de Chagas têm sido descritivos, relatando somente prevalência da infecção, distribuição das formas clínicas da doença e prevalência do vetor. Poucos estudos epidemiológicos analíticos foram conduzidos. Mesmo os poucos estudos prospectivos populacionais ou hospitalares foram feitos sem uma hipótese prévia a ser testada.

Na doença de Chagas, pacientes na forma cardíaca estão sob maior risco de morte súbita elétrica. A mutabilidade eletrocardiográfica é uma importante característica deste grupo (PEDROSA, 1993). Xavier e cols (2007), em um estudo de coorte de 1167 pacientes em diferentes graus de comprometimento cardíaco com seguimento de 67 ± 43 meses tiveram 106 óbitos no grupo de pacientes com o ECG alterado - sendo 82 por causa cardíaca; destes, 54 apresentaram morte súbita. Morte súbita foi o modo mais freqüente de óbito se considerados todos os estágios, e o mecanismo de óbito variou de acordo com o estágio clínico da cardiopatia e com o grau de disfunção ventricular. Variáveis como pré-síncope e síncope, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares complexas,

não-sustentadas e sustentadas, bradiarritmias severas (disfunção do nó sinusal e bloqueios atrioventriculares avançados) e parada cardíaca prévia foram identificadas como preditores de risco de morte súbita em pacientes na forma cardíaca da doença de Chagas e podem ser classificadas em preditores maiores e menores, conforme artigo de revisão descritiva de Rassi e cols (RASSI, 2001).

Infelizmente, esse evento acomete também pacientes com função ventricular sistólica pouco alterada (pouca agressão miocárdica) e ECG alterado ou limitrofe (LOPES, 1975; BESTETTI e cols, 1993; XAVIER e cols, 2005; STERNICK e cols, 2006) e, em números absolutos, supera a mortalidade encontrada nos pacientes com disfunção miocárdica, na medida em que os pacientes sem disfunção e ECG alterado constituem a grande maioria da população com doença de Chagas crônica (DIAS, 2000). Da mesma forma, são escassos na literatura estudos sistematizados orientados a determinar a real prevalência da morte súbita nesta população, particularmente naqueles com o ECG normal. Xavier e cols (2005) avaliaram a incidência de morte súbita em uma coorte de 1053 pacientes com doença de Chagas e função sistólica preservada ($FE > 45\%$) acompanhados por 64 ± 43 meses. Nos pacientes com ECG alterado, ocorreram 13 casos de morte súbita, determinando uma incidência cumulativa de 3,4% e incidência – densidade de 0,56/100 pacientes/ano. Manzullo e cols (1999) realizaram estudo longitudinal em área não endêmica, no qual 5710 pacientes foram selecionados e 4593 acompanhados por um média de 5,3 anos. Das 89 mortes súbitas observadas, apenas um paciente apresentava ECG normal, e os demais tiveram o ECG alterado, com mortalidade estimada em 4/1.000 pacientes-ano.

A relação entre arritmias cardíacas e morte súbita foi prevista no modelo biológico de Myerburg para a ocorrência de taquicardia ventricular sustentada e/ou fibrilação ventricular (1989). No paciente com doença de Chagas, é possível identificar claramente os três fatores: substrato arritmogênico (alterações segmentares contráteis), eventos deflagadores (arritmias ventriculares) e alterações funcionais (disfunção simpática e parassimpática).

No que se refere ao substrato arritmogênico e eventos deflagadores, temos na literatura alguns indícios que corroboram o modelo biológico de Myerburg na doença de Chagas. A existência de arritmia ventricular na forma indeterminada da doença de Chagas tem sido extensivamente demonstrada, sugerindo que sua presença esteja relacionada ao gatilho no modelo biológico de Myerburg. Embora a característica principal destes pacientes seja a ausência de anormalidades clínicas, eletrocardiográficas e radiológicas significativas,

tem-se observado alterações morfofuncionais cardíacas quando se utilizam métodos complementares mais sofisticados (RIBEIRO & ROCHA, 1998; BARRETO e cols, 1986). Então, estudos iniciais demonstraram que pacientes com alteração segmentar e FEVE preservada possuem um pior prognóstico comparativamente a pacientes que não apresentaram dissinergia ventricular (PAZIN-FILHO e cols, 2006). Também, Rassi e cols (2006) demonstraram, após análise multivariada, a relevância prognóstica dos achados de anormalidade contrátil segmentar pela ecocardiografia, como preditores de risco de morte por causas cardiovasculares e morte súbita (hazard ratio de 2,46; $p = 0,008$). Barros e cols (2011) demonstraram a existência de associação entre anormalidade contrátil e arritmia ventricular na “forma indeterminada” da doença de Chagas, indicando que estes pacientes possam representar subgrupo na “forma indeterminada” com maior envolvimento cardíaco, e sendo a presença de anormalidade contrátil segmentar um substrato anatômico para o surgimento de um foco arritmico, mesmo em um coração com função global preservada. Pedrosa & Campos (2004) estudaram 71 pacientes divididos em quatro grupos de acordo com o comprometimento miocárdico. Os autores mostraram a presença de arritmias ventriculares complexas mesmo no grupo de menor grau de comprometimento cardíaco (ECG alterado e ECO normal - Grupo IB de Los Andes). Taquicardia ventricular não sustentada foi encontrada apenas nos grupos de comprometimento miocárdico mais avançado. Recentemente, este mesmo grupo de pesquisadores demonstrou, em pacientes pertencentes ao subgrupo de maior risco na “forma indeterminada” ($45\% < FEVE < 55\%$ e eletrocardiograma normal ou *borderline*), que as alterações segmentares contráteis apresentaram relação com arritmias ventriculares complexas condicionadas à presença de disfunção global leve ($45\% < FEVE < 50\%$), com possível implicação no mecanismo de morte súbita elétrica na doença de Chagas (TERZI, 2010).

Quanto ao terceiro elemento que sustenta o modelo biológico de Myerburg na doença de Chagas temos alguns trabalhos já reportados na literatura através de estudos de variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Estudos estes que têm sido estabelecidos como real e reproduzível marcador de função autonômica cardiovascular (BAINBRIDGE, 1920). Dentre as manobras para avaliação da resposta parassimpática, a arritmia sinusal respiratória (ASR) tem demonstrado ser o estímulo mais potente para evocar a ação do nervo vago (VILLAR e cols, 2004; JUNQUEIRA, 2006). Na doença de Chagas, no grupo sem disfunção ventricular com ECG alterado, a avaliação do sistema nervoso autônomo através da VFC por diferentes métodos, tem evidenciado comprometimento variável da modulação

parassimpática e simpática (COSTA e cols, 2000; CORREIA e cols, 2007; RIBEIRO e cols, 2009; VASCONCELOS E JUNQUEIRA, 2009).

Rassi e cols em 2001, numa revisão descritiva da literatura sobre morte súbita na doença de Chagas, já apontava a importância da análise da VFC como uma das variáveis a serem investigadas (2001). Também, recentemente, Xavier e cols (2005), analisaram uma coorte de 377 pacientes com doença de chagas, função sistólica preservada ($FE > 45\%$) e ECG alterado, com objetivo de avaliar a incidência e preditores de morte súbita. No modelo multivariado de Cox, os autores mostraram que a dispersão do QT foi o único preditor independente de morte súbita nesse grupo de pacientes. Dispersão de QT é um tradutor de recuperação não uniforme da excitabilidade ventricular e é considerado um método de avaliação para disautonomia (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996)

Da mesma forma, inúmeros trabalhos com abordagem molecular têm elucidado uma relação entre o sistema nervoso autônomo (SNA) e a função imunológica, e têm contribuído para desvendar alguns mecanismos envolvidos nesta interação. Experimentalmente, observa-se o surgimento de evidências que reforçam a hipótese fisiopatológica de que a perda da modulação parassimpática cardíaca esteja implicada em mecanismos de morte súbita elétrica na doença de Chagas. Oliveira e cols (1997) e Pedrosa (1998) mostraram que anticorpos provenientes de pacientes chagásicos crônicos que possuíam arritmias ventriculares complexas eram capazes de diminuir a frequência cardíaca e provocar bloqueio atrioventricular no coração isolado de coelho. Posteriormente, esse mesmo grupo descreveu que alguns destes pacientes possuíam anticorpos com efeito beta adrenérgico promovendo bloqueio da condução elétrica através de junções comunicantes na cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos, sugerindo mais um mecanismo pelo qual esses anticorpos poderiam contribuir para a ocorrência de arritmias cardíacas (COSTA e cols, 2000).

Medei e cols, dentro da linha de pesquisa do presente estudo, demonstraram, pela primeira vez, que pacientes com doença de Chagas na forma cardíaca, possuidores de anticorpos muscarínicos, apresentavam maior dispersão do intervalo QT quando comparados a pacientes com doença de Chagas sem esse tipo de anticorpo (2007). Esses mesmos anticorpos, com efeito muscarínico, quando perfundidos no coração isolado de coelho, sob frequência controlada, incrementavam o intervalo QT. Desta forma, foi possível inferir que o comprometimento da repolarização ventricular neste grupo de pacientes poderia ser mediado

por estes anticorpos, estar associado à instabilidade elétrica ventricular e, conseqüentemente, à morte súbita - um dos principais modos de óbito nos pacientes com doença de Chagas na forma cardíaca, conforme demonstrado por Salles (2003).

Porto (1964) realizou um estudo prospectivo de 503 pacientes portadores de doença de Chagas, atendidos em área urbana. Dezesete pacientes com eletrocardiograma inicial normal faleceram durante o acompanhamento, sendo 14 deles por causa cardíaca, 3 dos quais por morte súbita. Um dos pacientes, com 20 anos de idade, faleceu subitamente apenas 20 dias após a realização do eletrocardiograma (normal). Esta mortalidade cardíaca de 5% entre pacientes com eletrocardiograma normal não tem sido descrita em outras séries, sendo atribuída, por Porto, ao “aparecimento de alguma arritmia grave - a qual, por sua vez, estaria intimamente ligada a perturbações da inervação neurovegetativa do coração”. Em corroboração à hipótese de Porto, recentemente Landesmann e cols (pesquisadores desta linha de pesquisa) mostraram uma significativa prevalência de alterações da inervação simpática cardíaca, particularmente nos pacientes com eletrocardiograma *bordeline* e $45\% < FEVE < 55\%$ (2011). Este mesmo grupo, mais recentemente, demonstrou uma alta prevalência de anticorpos β -adrenérgicos em pacientes com doença de Chagas, $FEVE > 45\%$ e ECG alterado, levando a uma alta incidência de arritmias ventriculares complexas (MACIEL e cols, 2012).

Acredita-se que a compreensão dos mecanismos que antecedem a instalação da instabilidade elétrica ventricular no paciente com doença de Chagas na forma cardíaca e função sistólica preservada poderá contribuir para o desenvolvimento de novos alvos no manuseio do paciente de risco elevado para morte súbita e, ao mesmo tempo, servirá como ferramenta para estabelecer possível marcador precoce para arritmias ventriculares complexas (MEDEI e cols, 2008)

O presente estudo pretende verificar a associação entre disfunção autonômica e a frequência de anticorpos contra receptores acoplados a proteína-G funcionalmente ativos, na ausência de disfunção contrátil ventricular (entenda-se como disfunção $FE < 50\%$) em pacientes com doença de Chagas na forma cardíaca.

Os dados que serão utilizados nesse projeto são oriundos do banco de dados do ambulatório de cardiopatia chagásica do HUCFF/ICES/UFRJ. A linha de pesquisa foi aprovada em 1997 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O responsável pela linha de pesquisa é o Dr

Roberto Coury Pedrosa.

1.1 FUNDAMENTAÇÃO

Esta revisão teve como objetivo principal buscar na literatura evidências científicas envolvendo anticorpos contra receptores acoplados a proteína-G e disfunção autonômica na ausência de disfunção contrátil ventricular. Também foi buscado em livros textos e em artigos científicos indícios de similaridade entre neurocardiomiopatia da doença de Chagas e morte súbita.

A revisão de literatura foi realizada no MEDLINE e no LILACS, através da BIREME e do PUBMED, nos últimos 15 anos, utilizando as seguintes palavras chave:

Em português: doença de Chagas / anticorpos / mimetismo molecular / função ventricular preservada / receptores muscarínicos / disfunção autonômica / eletrocardiograma normal ou alterado / estudo longitudinal

Em inglês (key words): Chagas' disease / antibodies / molecular mimicry / preserved systolic function / muscarinic receptors / autonomic dysfunction /longitudinal study

Foram selecionados os artigos escritos em português, espanhol e inglês. Será apresentado a seguir, de modo sucinto, os achados mais significativos dessa revisão.

1.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A forma indeterminada faz parte da fase crônica da doença de Chagas e é a forma da doença mais encontrada em estudos populacionais em zona endêmica (DIAS, 2007). Após quatro a dez semanas da infecção, inicia-se a forma indeterminada da fase crônica, caracterizada pela positividade sorológica e/ou parasitológica, ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas significativas. Enquanto alguns pacientes permanecem nessa forma indefinidamente, outros, geralmente após intervalo de 20 a 30 anos, evoluem para alguma das formas crônicas determinadas da doença, com surgimento de evidências de comprometimento cardíaco, digestivo ou neurológico (DIAS, 1982).

O conhecimento sobre a forma indeterminada da fase crônica evoluiu com o próprio progresso dos métodos de investigação em cardiologia. Em protocolos de estudo, independente do método usado, seja invasivo ou não-invasivo, anormalidades, na maioria das vezes discretas, são encontradas em um número considerável desses pacientes.

Em relação ao comprometimento anatomopatológico na forma indeterminada da fase crônica, as alterações encontradas podem ser observadas em outras fases da doença, porém em percentuais diferentes. A hipertrofia, a degeneração de fibras, a fibrose e o infiltrado inflamatório são menos freqüentes nos pacientes com a forma indeterminada (CARRASCO, 1983).

A história natural da cardiopatia chagásica começa quando a destruição de fibras miocárdicas pelo processo inflamatório e a sua substituição por tecido fibroso atinge um limite crítico, obrigando os ventrículos a remodelarem-se frente à perda gradativa dos elementos contráteis. Uma inflamação crônica ativa, progressiva e fibrosante é o substrato morfológico fundamental dos mecanismos patogênicos responsáveis pela miocardite (MARIN-NETO e cols, 2007).

Os três folhetos cardíacos e o sistema de condução ficam comprometidos na doença de Chagas, e inúmeros achados experimentais e “in vivo” sugerem o envolvimento de linfócitos T na formação da lesão chagásica, associado à presença do parasita e/ou seus antígenos.

O remodelamento ventricular ocorre de duas maneiras: inicialmente, ocorre hipertrofia das fibras íntegras e, posteriormente, dilatação da cavidade ventricular. Essa hipertrofia extrínseca restaura temporariamente o volume sistólico já comprometido, mas a dinâmica do processo leva à dilatação cardíaca crescente, com perda progressiva da capacidade de ejeção ventricular em virtude da evolução da miocardite e da sobrecarga mecânica. Nos estágios mais avançados, além do componente sistólico, também se intensifica um componente de restrição diastólica, devido à grande dilatação e enrijecimento cardíacos pela fibrose. Contribuem ainda para o agravamento da cardiopatia, as arritmias ventriculares complexas, o tromboembolismo pulmonar repetido e a insuficiência das válvulas mitral e tricúspide (MARIN-NETO e cols, 2007).

Assim, na forma indeterminada da fase crônica podem-se detectar anormalidades

contráteis discretas e, no que tange à função, as alterações diastólicas acabam precedendo as sistólicas (COMBELLAS e cols, 1985).

Para explicar a destruição de cardiomiócitos e a fibrose progressiva, quatro teorias principais encontraram suporte anátomo-patológico em pacientes e em modelos experimentais (MARIN-NETO e cols, 2007):

- (1) destruição direta pelo *T.cruzi*;
- (2) teoria neurogênica, com destruição de células ganglionares e lesões do sistema de condução;
- (3) reações auto-ímmunes cardíacas (humorais e/ou celulares);
- (4) comprometimento microvascular (microespasmos, microtrombos, disfunção de células endoteliais e aumento de atividade plaquetária).

Desta forma, o desenvolvimento da miocardite dependeria de processos focais de necrose celular, sucessivos e progressivos, levando a uma fibrose miocárdica reativa e reparativa, com hipertrofia de cardiomiócitos adjacentes. Essa necrose poderia ser iniciada e perpetuada por fatores imunes e/ou alterações isquêmicas da microcirculação (MARIN-NETO e cols, 2007).

1.2.1 TEORIA NEUROGÊNICA

Os adeptos desta idéia se baseiam em vários fatores:

- 1) escassez de parasitas nas lesões cardíacas da doença de Chagas, ou sua desproporção com o grau de inflamação tecidual, mesmo utilizando-se técnicas mais sensíveis, como o PCR ou a imunohistoquímica;
- 2) período latente prolongado, entre o fim da fase aguda até o surgimento da forma crônica cardíaca;
- 3) evidências da existência de uma quebra da tolerância imunológica;
- 4) o fato de que, embora o *T. cruzi* seja capaz de invadir vários órgãos (como células

adrenais, uterinas, da bexiga, esôfago e outras) causando uma infiltração mononuclear focal ou nenhuma reação, no coração ele leva a uma grave e destrutiva miocardite;

5) quadro clínico-patológico diferente entre os pacientes;

6) existência de anticorpos circulantes e ligados ao miocárdio e infiltração miocárdica por células linfomononucleares, além de anormalidades nas subpopulações de linfócitos na doença de Chagas;

7) associação entre a presença de anticorpos que reconhecem estruturas do hospedeiro, a ocorrência de disfunção autonômica e uma possível pior evolução clínica da doença de Chagas. Deste modo, a reação auto-imune é postulada como um dos fatores principais na patogênese da forma cardíaca da doença de Chagas.

Estudos patológicos em humanos e experimentais em modelos animais de infecção chagásica evidenciam depopulação neuronal marcante nos vários estágios evolutivos da doença (JUNQUEIRA, 2006).

Dentre os aspectos histopatológicos mais marcantes encontra-se a destruição neuronal difusa e irregularmente distribuída nos vários tecidos. Observa-se parasitismo ganglionar direto, assim como periganglionite e lesões degenerativas das fibras nervosas e das células de Schwann. Embora mais estudadas no que se refere ao sistema parassimpático intramural cardíaco, essas anormalidades também envolvem o sistema ganglionar simpático paravertebral (ALCÂNTARA, 1970).

Em correspondência a esses estudos histopatológicos, extensa gama de investigações clínicas documentou, em humanos, graus intensos de depressão do controle autonômico cardíaco predominantemente, mas não exclusivamente, parassimpático (AMORIM e MARIN-NETO, 1995).

Na forma indeterminada, observações usando diferentes testes, incluindo testes com análise de variabilidade de frequência cardíaca, mostraram comprometimento variável da modulação parassimpática e simpática. Alguns autores mostraram disfunção autonômica vagal variável, enquanto outros mostram menor distúrbio vagal (VASCONCELOS e cols, 2009).

Investigações mais recentes, utilizando a cintilografia com ^{123}I -MIBG, possibilitaram

a avaliação direta do sistema simpático do miocárdio. Denervação simpática regional foi verificada em áreas sem anormalidades contráteis em elevado percentual de pacientes, e constituiu a primeira evidência de distúrbio do sistema simpático ventricular na doença de Chagas na forma cardíaca (SIMÕES e cols, 2000).

Segundo Landesman, em recente tese de doutorado, a cintilografia com ^{123}I -MIBG foi utilizada em 40 pacientes com doença de Chagas e função sistólica preservada ($45\% < \text{FEVE} < 55\%$), tendo mostrado que 95% desses pacientes tiveram a relação coração/mediastino (C/M) de 3h $< 2,19$. Dentre os pacientes com índice C/M de 3 h $< 2,19$, 65,7% tiveram ECG *bordeline* (limítrofe) e 56% destes tiveram C/M 3h $< 1,8$. Os dados deste estudo sugerem uma significativa prevalência de alterações da inervação simpática cardíaca neste grupo de pacientes (2011).

Ambos os estudos observaram altas taxas de dissipação da impregnação miocárdica com ^{123}I -MIBG em regiões ventriculares, exibindo mobilidade normal. Tal alteração poderia ser decorrente de aumento precoce da atividade simpática miocárdica, e interpretada como elemento compatível com os postulados da teoria neurogênica. Entretanto, explicação alternativa consiste na possibilidade de ocorrência de competição pelos receptores neurais simpáticos, entre o radiotraçador utilizado e as substâncias endógenas antagonistas (MACIEL e cols, 2012).

O depósito de anticorpos em estruturas de receptores neurotransmissores poderia causar sua dessensibilização, acarretando denervação progressiva. Mecanismos como estes, se comprovados em investigações adicionais, poderiam conciliar alterações neurogênicas e agressão imunológica como fatores fisiopatológicos interativos e relevantes envolvidos em mecanismos de arritmias cardíacas complexas na doença de Chagas (MEDEI e cols, 2008).

1.2.2 PAPEL ELETROFISIOLÓGICO DE ANTICORPOS FUNCIONALMENTE ATIVOS COM REATIVIDADE CONTRA RECEPTORES CARDÍACOS ENVOLVIDOS NA GÊNESE DAS ARRITMIAS CARDÍACAS

Um dos primeiros trabalhos a propor que um componente humoral poderia estar envolvido na gênese das arritmias na cardiomiopatia chagásica foi publicado por De Carvalho e cols. (1994). Nessa oportunidade, descreveram que soros provenientes de coelhos

infectados com *T cruzi* geravam distúrbios eletrocardiográficos no coração isolado de coelho. Três anos após, confirmou-se essa hipótese mostrando que anticorpos provenientes de pacientes com doença de Chagas crônica que possuíam arritmias complexas diminuía a frequência cardíaca e provocavam bloqueio atrioventricular no coração isolado de coelho (OLIVEIRA e cols, 1997; PEDROSA, 1998). Em seguida, com número maior de pacientes, esse mesmo grupo descreveu que alguns deles apresentavam efeito beta adrenérgico bloqueando a condução através de junções comunicantes em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos sugerindo, assim, mais um mecanismo pelo qual estes anticorpos poderiam contribuir para a ocorrência de arritmias ventriculares (COSTA e cols, 2000).

Outro trabalho que sustenta o papel arritmogênico dos anticorpos foi publicado por Kaplan e cols. (1997), no qual foram imunizados coelhos com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta-adrenérgico, mostrando pós-potenciais precoces e uma diminuição na densidade das correntes de potássio das células M desses animais.

Já o grupo de Mauricio Rosenbaum (1994) mostrou a presença dos anticorpos em pacientes com doença de Chagas na forma cardíaca e o possível envolvimento dos mesmos nas arritmias desses pacientes. Este grupo demonstrou uma correlação entre determinados distúrbios de condução e a resposta das IgGs presentes no soro dos pacientes chagásicos. De fato, as IgGs dos pacientes que possuíam arritmias ventriculares incrementaram a frequência de batimentos e a produção de AMPc (75%), enquanto que as IgGs dos pacientes portadores de disfunção do nodo sinusal diminuíram a frequência de batimentos e incrementaram a síntese de fosfatidilinositol (76.9%), em cultura de cardiomiócitos de ratos (CHIALE, 1995).

Até 2007, todos os trabalhos relacionaram o papel dos anticorpos com distúrbios de condução, focalizando principalmente na disfunção da condução atrioventricular sem considerar o comprometimento da repolarização ventricular que poderia ser mediado por estes anticorpos e estar relacionado a indução de morte súbita, que é um dos principais modos de morte nos pacientes com doença de Chagas na forma cardíaca. Conforme mencionado anteriormente, anticorpos com efeito muscarínico também se mostraram envolvidos na promoção de maior dispersão do intervalo QT, possível evento deflagrador de arritmia (MEDEI, 2007).

Mais recentemente, em pacientes com função ventricular preservada (FEVE > 45%) e ECG alterado, uma alta prevalência de anticorpos β -1 adrenérgicos funcionalmente ativos

estiveram associados a uma grande incidência de arritmias ventriculares complexas (MACIEL e cols, 2012).

1.2.2.1 RELAÇÃO ENTRE DISFUNÇÃO AUTÔNOMICA E ANTICORPOS FUNCIONALMENTE ATIVOS COM REATIVIDADE CONTRA RECEPTORES CARDÍACOS

A este respeito, vários pontos permanecem sem resposta, como:

1) o papel exato destes anticorpos na lesão do sistema nervoso autônomo da doença de Chagas;

2) se os seus efeitos se repetem em tecido humano;

3) o motivo do contraste entre o curto tempo (desde a infecção aguda) até o surgimento dos anticorpos e o longo tempo até o aparecimento das lesões patológicas;

4) a explicação para o fato destes anticorpos serem encontrados também em pacientes assintomáticos;

5) o porque destes anticorpos serem capazes de produzir efeitos tão deletérios *in vitro*, mas não causar os mesmos danos em muitos dos pacientes dos quais foram obtidos;

6) a explicação de porque estes anticorpos provocariam o típico infiltrado mononuclear - visto na doença de Chagas, ao invés do infiltrado predominantemente granulocítico, que se segue à deposição de imunoglobulinas (KIERSZENBAUM, 2003).

Entretanto, se é difícil provar que a autoimunidade, vinculada ao mimetismo antigênico e à reatividade cruzada, é a causa definitiva da disfunção autonômica na doença de Chagas, ainda mais difícil, se não impossível, é provar que ela não está envolvida neste processo, gerando controvérsias na literatura até os dias de hoje.

Embora o mecanismo da disfunção autonômica na fase crônica da doença de Chagas ainda não tenha sido esclarecido, relatos recentes sobre a existência de anticorpos circulantes, com capacidade de ligação a receptores tanto colinérgicos (Ac-M) como adrenérgicos (Ac- β), poderiam conciliar as alterações neurogênicas e a agressão imunológica como fatores

fisiopatológicos interativos e relevantes.

Assim, Goin e cols. (1997) mostraram associação entre anticorpos circulantes (IgG), com capacidade de ligação a receptores tanto colinérgicos como adrenérgicos, e alterações autonômicas. A presença de anticorpos funcionalmente ativos com reatividade contra receptores muscarínicos colinérgicos em pacientes com doença de Chagas e diferentes graus de comprometimento cardíaco foi relatada pela primeira vez por Oliveira e cols. (1997) e Pedrosa e cols. (1998). Ambos mostraram que a presença dos anticorpos funcionantes independe do grau de comprometimento cardíaco. Desta forma, esse grupo de pacientes demanda maiores estudos, particularmente no que se refere à relação entre disfunção autonômica e anticorpos funcionantes circulantes (IgG), com capacidade de ligação a receptores tanto colinérgicos como adrenérgicos. Mais recentemente, Talvani e cols. (2006) mostraram essa mesma associação de forma independente da disfunção ventricular, porém com limitação maior no que tange à funcionalidade dos anticorpos.

1.2.3 MORTE SÚBITA NA DOENÇA DE CHAGAS

Em relação à morte súbita nos pacientes com doença de Chagas, os estudos são escassos. Os poucos estudos existentes são relatos de casos (PORTO, 1964), série de casos (LOPES, 1975; BESTESTTI e cols, 1993; PRADO e cols, 1999; STERNICK e cols, 2006). Os únicos dois estudos longitudinais relatados na literatura sobre morte súbita são de pacientes pertencentes a uma única coorte dinâmica de pacientes com doença de Chagas residentes na região metropolitana do Rio de Janeiro, acompanhados no Hospital Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz. Esta é uma coorte com perfil de morbidade semelhante ao descrito nos estudos de campo, com um grande percentual de pacientes assintomáticos (XAVIER e cols, 2005, 2007).

São relativamente recentes os trabalhos que avaliaram a morte súbita na doença de Chagas. Em 2001, Rassi e cols, fizeram uma revisão atualizada sobre morte súbita em doença de Chagas chamando atenção que a morte súbita constitui um dos fenômenos mais expressivos da história natural da doença de Chagas, acometendo indivíduos nas etapas mais produtivas de suas vidas.

Ocorre, geralmente, durante as atividades físicas rotineiras, esforço físico ou estresse

emocional e, em cerca de metade dos casos, espontaneamente. A outra metade é precedida por sintomas durante alguns segundos ou, raramente, minutos. Ela ocorre nos pacientes aparentemente saudáveis sem nenhum conhecimento ou indício sintomático de doença cardíaca.

Este trágico desfecho chamou a atenção do pesquisador Carlos Chagas já no início de suas descobertas clínicas quando ele relatou: “... Em regiões onde a doença é comum, o número de indivíduos adultos com desordens cardíacas profundas é expressivo... a consequência imediata deste fato é o grande número de mortes rápidas causadas pela doença, e é realmente expressivo na estatística de letalidade o grande número de pessoas que morrem subitamente devido à síncope cardíaca”. Posteriormente, o pesquisador ainda comenta que muitas famílias foram surpreendidas com a morte súbita de um ou mais membros, que morreram jovens e com saúde aparentemente boa (CHAGAS e VILLELA, 1922).

Assim, anormalidades estruturais miocárdicas, como focos de inflamação, áreas de fibrose, dilatação ventricular e zonas acinéticas ou discinéticas geram bloqueio unidirecional e condução lenta em regiões circunscritas dos ventrículos, indispensáveis para o aparecimento de arritmias ventriculares por reentrada, seguramente o principal deflagrador da morte súbita na cardiopatia chagásica crônica – conforme modelo proposto por Myerburg (MYERBURG, 1989).

Entretanto, como nem todo paciente com cardiopatia chagásica e arritmia ventricular falece subitamente, o modelo provavelmente só se completa quando alguns fatores funcionais entram em cena, tornando o miocárdio instável e favorecendo a instalação de arritmias fatais como a fibrilação ventricular. A deterioração hemodinâmica aguda, a hipoxemia, os distúrbios eletrolíticos, o uso de medicamentos com potencial pró-arrítmico e, principalmente, as alterações do sistema nervoso autônomo, são exemplos de fatores que podem instabilizar o substrato arritmogênico. Daí o porquê de não se encontrar diferenças morfológicas significativas, do ponto de vista qualitativo (macro e microscópico), entre os corações de chagásicos falecidos subitamente e aqueles falecidos durante a evolução de quadro de insuficiência cardíaca (LOPES e cols, 1975).

Lopes e cols (1975), em um estudo de autópsia de pacientes com doença de Chagas que morreram de modo súbito, demonstraram diferenças estruturais nos corações dos mesmos de acordo com o modo de morte: morte súbita (MS) ou por insuficiência cardíaca (IC). Os

pacientes que sofreram MS geralmente apresentavam o coração estruturalmente normal ou ligeiramente alongado - com cavidades normais ou apenas discretamente dilatado (geralmente o ventrículo esquerdo). Já os pacientes com IC apresentavam, na autópsia, o coração com acentuada dilatação de todas as cavidades, especialmente as ventriculares, resultando em formato globoso. Os autores descreveram que a alteração apical aparecia em 56% dos pacientes que faleceram de morte súbita e em 60% dos pacientes com IC prévia. Entretanto, neste trabalho não havia informação sobre o eletrocardiograma dos pacientes.

Prado e cols (1999) em estudo de série de casos com seis pacientes com ECG alterado, sem disfunção ventricular e com arritmias ventriculares documentadas (morte súbita e síncope – taquicardia ventricular mono e polimórfica, espontânea e induzida por estudo eletrofisiológico), ao analisar a resposta terapêutica clínica, demonstraram, apesar do uso de amiodarona e cardiodesfibrilador implantável, uma resposta pobre nos mesmos.

Sternick e cols (2006) realizaram estudo descritivo semelhante em 5 pacientes com função cardíaca preservada e síncope, recuperados de parada cardíaca. Como mecanismo da parada cardíaca, quatro desses pacientes tiveram taquicardia ventricular monomórfica rápida, e 1 apresentou fibrilação ventricular. As informações sobre o ECG basal desses pacientes não foram descritas. Os autores concluíram que síncope em pacientes com doença de Chagas, mesmo com função ventricular preservada, tem prognóstico reservado e esses doentes devem ser avaliados em ambiente hospitalar.

Xavier e col (2005), de forma inédita, analisaram uma coorte de 1053 pacientes com doença de Chagas recrutados no período de 03/1990 a 03/2002 portadores de doença de Chagas na forma cardíaca com função sistólica preservada ($FE > 45\%$) demonstrada por ecocardiograma, para avaliar a incidência e os preditores de morte súbita. Verificou-se que, em pacientes com eletrocardiograma normal, nenhum caso de morte súbita ocorreu. No entanto, nos 539 pacientes com ECG alterado, 377 apresentavam função sistólica preservada e destes, que constituem a coorte de interesse, ocorreram 13 casos de morte súbita, determinando uma incidência cumulativa de 3,4% e incidência – densidade de 0,56/100 pacientes/ano. O tempo médio para ocorrência de morte súbita após a avaliação inicial foi de 64 ± 35 meses. Dentre os preditores de morte súbita, foram encontrados na análise univariada maior exta-sístolia e maior dispersão QT no eletrocardiograma inicial. No modelo multivariado de Cox, apenas a dispersão do QT permaneceu como preditor independente de morte súbita nesse grupo de pacientes.

Este foi o primeiro estudo que procurou determinar a incidência de morte súbita e seus preditores em pacientes com doença de Chagas na forma cardíaca sem disfunção ventricular, avaliados pela ecocardiografia. Seus resultados confirmam a presença de morte súbita em pacientes que, a princípio, seriam considerados de bom prognóstico.

Posteriormente, Xavier e cols (2007) publicaram um estudo para avaliação dos mecanismos de morte da cardiopatia chagásica crônica. Foi um estudo longitudinal de coorte constituída por 1167 pacientes consecutivos com diagnóstico de doença de Chagas recrutados no período de 03/1990 a 12/2004. Todos foram submetidos no momento da admissão na coorte a um protocolo de avaliação que incluía exame clínico, eletrocardiograma de 12 derivações, RX tórax e ecocardiograma com doppler. Os pacientes foram classificados de acordo com o Consenso Brasileiro de Chagas de 2005 em: sem cardiopatia chagásica aparente (avaliação clínica, ECG e RX tórax normais), estágio A (ECG alterado e ECO normal), estágio B1 (ECG e ECO alterados com FE $\geq 45\%$) estágio B2 (ECG e ECO alterados com FE $< 45\%$), estágio C (insuficiência cardíaca compensada) e estágio D (insuficiência cardíaca refratária). Para avaliar os mecanismos de morte de acordo com a função ventricular, os paciente com doença de Chagas na forma cardíaca foram estratificados em 5 grupos de acordo com a fração de ejeção: $\geq 55\%$, 45-54%, 53-44%, 25-34%, $< 25\%$. A média de idade da coorte foi de 46 anos. O tempo médio de acompanhamento foi de 67 ± 43 meses, com taxa de seguimento completo de 88%. Ocorreram 106 óbitos, 82 de causa cardíaca, a maioria por morte súbita (n=54). Nos pacientes com ECG normal, a mortalidade foi bastante baixa (1,7%) e todos os 9 óbitos foram de causa não cardíaca. Nos pacientes com ECG alterado o mecanismo de óbito variou de acordo com o estágio da cardiopatia e com o grau de acometimento ventricular, morte súbita foi o mecanismo mais frequente de óbito. Dos 54 casos de morte súbita, 50% ocorreram em pacientes sem ICC na avaliação inicial e 35% (19 pacientes) ocorreram em pacientes sem ICC durante todo o acompanhamento. Em relação a fração de ejeção, morte súbita foi o mecanismo mais frequente de óbito em todas as frações de ejeção examinadas. Dos 54 casos de morte súbita, 15 (28%) ocorreram em pacientes com função sistólica normal ou levemente deprimida (FE $\geq 45\%$). Neste estudo a morte súbita foi o principal mecanismo de óbito e um número expressivo de mortes súbitas ocorreram em pacientes sem o diagnóstico clínico de insuficiência cardíaca, mostrando a possibilidade da morte súbita como manifestação inicial da doença de Chagas. Destaca-se, mais uma vez, a ocorrência de morte súbita em pacientes com menor grau de acometimento miocárdico.

1.2.3.1 DISFUNÇÃO AUTONÔMICA E MORTE SÚBITA NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

O estudo do acometimento autonômico cardíaco na doença de Chagas poderia ser uma questão meramente acadêmica, caso não fossem importantes suas implicações fisiopatológicas. Postula-se que a disfunção autonômica possa participar de diversos processos importantes na doença de Chagas, como a morte súbita e as arritmias cardíacas (RASSI JR e cols, 2001; JUNQUEIRA Jr, 2006). A relação entre a disfunção autonômica e a morte súbita cardíaca tem sido estudada principalmente em pacientes pós-infarto agudo do miocárdio, nos quais se detectam alterações pronunciadas do controle autonômico, que se manifestam geralmente por redução do controle cardíaco parassimpático e predominância simpática (MALIK, 1990).

Na doença de Chagas, postula-se um possível papel da disfunção autonômica vagal na gênese da morte súbita. Figueiredo e cols (1996) mostraram a ação protetora vagal nos pacientes com cardiopatia chagásica crônica e arritmias ventriculares complexas bem toleradas hemodinamicamente.

Segundo alguns autores, ainda que não constitua mecanismo lesivo primário e independente, a intensa redução da população neuronal cardíaca nos vários estágios evolutivos da doença pode contribuir como mecanismo secundário e amplificador da lesão produzida pelo parasita no sistema nervoso autônomo (MARIN-NETO e cols, 2007).

A relação entre disfunção autonômica e morte súbita foi prevista no modelo biológico de Myerburg para a ocorrência de fibrilação ventricular (MYERBURG e cols, 1989). Neste trabalho, o autor ressalta a necessidade de três fatores para a instalação da arritmia: o substrato arritmogênico, os eventos deflagadores e as alterações funcionais; é neste último item que se contextualiza a relevância do desequilíbrio vago-simpático.

No paciente chagásico, é possível identificar claramente os três fatores de Myerburg: o substrato arritmogênico seria representado pelas zonas fibróticas e inflamatórias do miocárdio, os eventos deflagadores pelas extassístoles ventriculares tão presentes, e as alterações funcionais pela presença de disfunção simpática e parassimpática. Porém, nem todos os portadores de arritmias ventriculares complexas apresentam morte súbita e desse fato conclui-se que as alterações funcionais existentes na doença de Chagas – tais como alterações

autonômicas, distúrbios eletrolíticos, alterações hemodinâmicas, hipoxemia, acidose, drogas anti-arrítmicas e tônus simpático basalmente aumentado, podem ser fatores desestabilizadores do miocárdio representando, assim, a chave para a compreensão da morte súbita na cardiopatia chagásica crônica.

Sabe-se que a disfunção parassimpática é um dos fatores chave na morte súbita cardíaca, através da perda de sua proteção miocárdica estabilizadora e anti-arritmogênica. Baroldi e cols (1997), estudando o coração de 34 pacientes com doença de Chagas que faleceram subitamente, observaram dano miocárdico típico da cardiotoxicidade catecolaminérgica. Nestes sítios, encontraram ainda alterações histológicas compatíveis com depopulação neuronal simpática que seria, à primeira vista, um achado paradoxal. A hipótese postulada por estes pesquisadores para explicar tal paradoxo seria que a destruição dos neurônios simpáticos regionais levaria a um aumento da secreção de neurotransmissores adrenérgicos que, por sua vez, causaria a toxicidade miocárdica encontrada.

A severidade da denervação simpática e parassimpática foi observada por Machado e cols. (2000) comparando, por técnicas de imunohistoquímica, o coração de pacientes com doença de Chagas com cardiopatas de outras etiologias. Neste trabalho, concluiu-se que o coração do paciente com doença de Chagas distingue-se dos demais pacientes pela maior quantidade de inflamação e pela severidade e precocidade de denervação autonômica, principalmente parassimpática.

O grupo de pesquisadores do HUCFF/UFRJ constatou que pacientes com doença de Chagas crônica e disfunção miocárdica severa possuem excreção urinária de noradrenalina muito inferior ($p < 0,0001$) a pacientes cardiopatas de outras etiologias com níveis semelhantes de dano miocárdico, o que corrobora a tese de significativa disfunção simpática pelo menos em fases avançadas da doença. Neste mesmo trabalho, observou-se a redução dos índices parassimpático no domínio de tempo, através do Holter de 24 horas, em estágios iniciais da doença, caracterizando dano parassimpático precoce (CUNHA, 2003).

Esse mesmo grupo estabeleceu, posteriormente, em pacientes com doença de Chagas crônica, a relação entre a presença de anticorpos agonistas contra receptores muscarínicos e a disfunção do nódulo sinusal independente do comprometimento cardíaco, idade e clínica de insuficiência cardíaca. Sabe-se, também, que a disfunção do nódulo sinusal é um preditor de morte súbita na doença de Chagas (ALTSCHULLER e cols, 2007).

Há evidências de que o comprometimento do equilíbrio simpático-parassimpático possa ter implicações nos mecanismos de morte súbita elétrica na doença de Chagas. Entretanto, para que os resultados dos trabalhos que analisaram disautonomia sejam melhor compreendidos, serão feitas algumas considerações nas seções subseqüentes sobre a metodologia para avaliação do controle autonômico cardiovascular.

1.3 AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR

O sistema nervoso autônomo, representado por seus componentes simpático e parassimpático (Figura 1), pode ser representado através de oscilações do ritmo cardíaco graças às diferenças eletrofisiológicas desses dois componentes, no que diz respeito à ativação e duração do estímulo cardíaco. Assim sendo, o componente parassimpático tem ativação mais rápida (dezenas de milissegundos) e duração mais curta (fração de segundos) do que o simpático, cuja ativação demora centenas a milhares de milissegundos e a duração chega a alguns segundos (HAINSWORTH, 1995; TALMAN E KELKAR, 1993). Por isso, observando-se o comportamento das oscilações do ritmo cardíaco, é possível inferir qual a modulação predominante no trecho analisado.

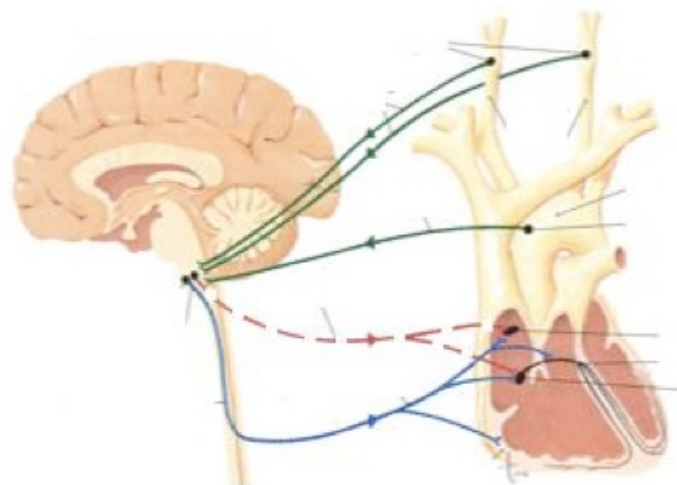


Figura 1 - Inervação autonômica do coração. A inervação eferente é representada com a linha cheia (simpático) e pontilhada (parassimpático). Modificado de Bio-Medical discussion list, 2008.

A descarga do marcapasso nodal sinusal, a condução atrioventricular, a excitabilidade do sistema de condução ventricular His-Purkinje e a contratilidade do miocárdio atrial e ventricular são diminuídas pela atividade parassimpática cardíaca, enquanto a atividade simpática cardíaca as estimula. Embora as ações das duas divisões do sistema nervoso autônomo (SNA) sejam geralmente antagônicas, estas se relacionam de forma complexa, de modo que a resposta cardíaca à atividade neural de uma das divisões depende do nível de atividade da outra: podem ser recíprocas, independentes ou não recíprocas. Adicionalmente, neuropeptídeos atuam na junção neuroefetora, modulando a ação da norepinefrina e da acetilcolina (KAUTZNER, 1995).

Na última década, a grande quantidade de trabalhos desenvolvidos sobre a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) incentivou a Sociedade Européia de Cardiologia e a Sociedade Americana de Estimulação Cardíaca e Eletrofisiologia (MALIK e cols., 1996) a constituírem um grupo de trabalho com o objetivo de desenvolver padrões adequados de VFC, de padronizar a nomenclatura utilizada, de definir termos e especificar métodos de medidas. Com a homogeneização dos parâmetros de VFC ou VRR e o estabelecimento de critérios padronizados de interpretação definidos pela força tarefa, os estudos de VFC passaram a ser utilizados para o diagnóstico de alterações do controle autonômico vagal cardíaco e utilizadas suas implicações prognósticas em diversas condições clínicas, principalmente na doença arterial coronária (BIGGER e cols, 1992), no diabetes mellitus (NOLAN e cols, 1996) e nas cardiomiopatias (STEIN e cols, 1995).

A variabilidade da frequência cardíaca fundamenta-se nas variações instantâneas e a curto prazo dos intervalos RR. Os fundamentos para a interpretação da variabilidade da frequência cardíaca residem na modulação do sistema nervoso autônomo sobre o coração e são mais bem explicitados nos parágrafos seguintes.

Sabe-se que a frequência cardíaca de indivíduos hígidos apresenta flutuações instantâneas e de baixa, média e alta frequência, que inferem integridade do controle autonômico sobre o coração. Essas variações e sua correlação fisiológica estão ligadas ao tempo de transmissão e *washout* das duas divisões do SNA: simpático (adrenalina) e parassimpático (acetilcolina).

A VFC consiste na quantificação das flutuações do ritmo cardíaco, a partir da detecção dos complexos QRS de registros de ECG e na montagem da série temporal constituída de

intervalos R-R ou tacogramas. Esta metodologia pressupõe a existência de flutuações rítmicas, estacionariedade, reprodutibilidade e estabilidade na série temporal de intervalos cardíacos do período em estudo. A mensuração da VFC pode ser feita principalmente no domínio de tempo e no domínio de frequência (análise espectral).

A análise no *domínio de tempo* é realizada através de métodos estatísticos que fornecem índices de cálculo simples, que avaliam a dispersão dos intervalos entre os batimentos cardíacos em torno de uma média ou comparam a duração de ciclos adjacentes. Em traçados de curta duração, os principais índices utilizados, segundo a Sociedade Européia de Cardiologia e a Sociedade Americana de Estimulação Cardíaca e Eletrofisiologia, são:

desvio padrão dos intervalos RR normais (DPRR) – desvio padrão de todos os ciclos selecionados, medido em milissegundos.

pNN50 – percentual de batimentos consecutivos que apresentam entre si diferença igual ou superior a 50 milissegundos.

rMSSD – raiz quadrada média da soma do quadrado das diferenças entre ciclos consecutivos no período avaliado. Medida em milissegundos.

Todos esses índices de curta duração acima mencionados (*DPRR*, *pNN50* e *rMSSD*) refletem principalmente a modulação parassimpática cardíaca.

A análise da variabilidade da frequência cardíaca no *domínio da frequência* na maioria das vezes é feita por transformada rápida de Fourier, que parte do princípio que todo sinal pode ser representado através de seus componentes senoidais, considerando suas diferentes frequências, fases e harmônicos. Considerando, como já foi apresentado nos parágrafos anteriores, que os sistemas simpático e parassimpático diferem entre si por suas propriedades eletrofisiológicas, a interação entre ambos, modulando o ritmo cardíaco, poderia ser representada através da transformada rápida de Fourier conforme a Figura 2.

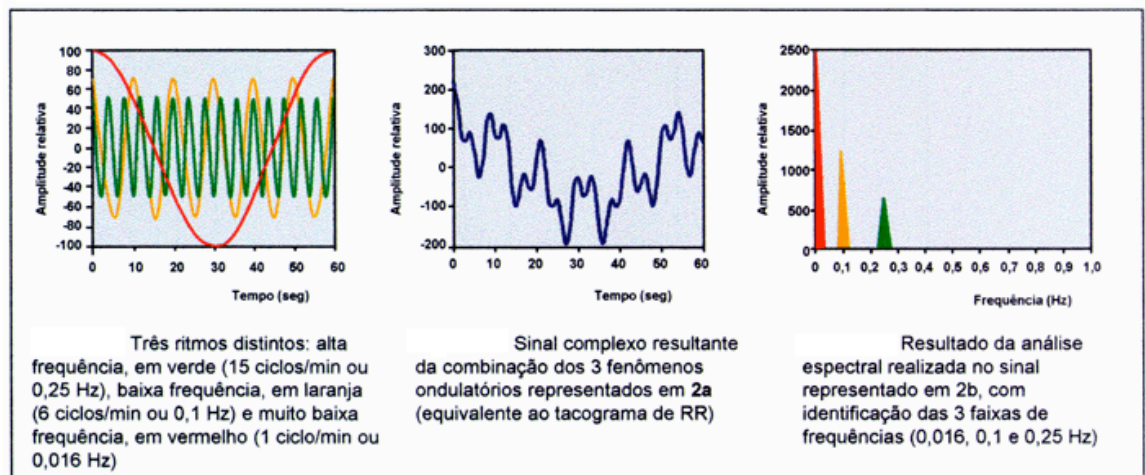


Figura 2 – Representação do tacograma de intervalos RR no domínio da frequência (adaptado de Rassi, 2004)

Assim, após a obtenção do tacograma dos intervalos RR, procede-se a transformada rápida de Fourier deste tacograma. É necessário assumir que o sinal eletrocardiográfico é estacionário e periódico (com período tendendo ao infinito). A função densidade espectral mostra, em um gráfico, a importância relativa de cada banda de frequência do sinal.

A seqüência de intervalos RR obtida (tacograma) foi re-analisada para eliminação de batimentos prematuros, artefatos e armazenada para posterior processamento. Ao ser armazenada, foi construída uma base temporal a fim de que se pudesse processar a interpolação dos trechos de sinal excluídos sem que houvesse perda da informação de tempo.

Para a análise da variabilidade da frequência cardíaca, a série temporal de intervalos RR normais (NN) é submetida à análise estatística descritiva no domínio do tempo. A análise da relação 30:15 também pode ser feita a partir da série original de intervalos RR.

Para a análise no domínio da frequência, o sinal armazenado é submetido a interpolação por *spline* cúbica (BOOR, 1978) no software Matlab (The Mathworks, EUA), em que partes excluídas do sinal original foram substituídas pelo sinal interpolado, mantendo as relações de tempo através da coluna contendo a base temporal anteriormente especificada. O sinal interpolado é re-amostrado a 2 Hz e novamente armazenado. A função densidade espectral é estimada através de periodogramas de Welch, utilizando janela hanning, com 8 segmentos de 256 amostras e superposição de 50% obtidos via transformada rápida de Fourier.

Segundo a Sociedade Européia de Cardiologia e a Sociedade Americana de Estimulação Cardíaca e Eletrofisiologia, em traçados de curta duração as bandas de frequência que podem ser estudadas através da transformada do registro do sinal eletrocardiográfico são as seguintes:

- a) Componentes de frequência ultra baixa e muito baixa (ULF e VLF, respectivamente) – são as frequências inferiores a 0,04 Hz, disponíveis apenas em registros de 24h ou mais e que, por esse motivo, não serão analisados neste trabalho.
- b) Componente de baixa frequência (LF ou BF) – compreende a faixa de 0,05 a 0,15 Hz. Segundo alguns autores, é representativa da atividade simpática sobre o nó sinusal, mas outros defendem que existe também influência parassimpática nessa banda de frequência.
- c) Componente de alta frequência – representativa da influência parassimpática sobre o coração, compreende a banda entre 0,15 e 0,40 Hz.

No presente estudo, apenas dois parâmetros do domínio da frequência serão analisados: a relação baixa/alta, que é a razão entre os componentes de baixa frequência e alta frequência e que representa a medida do balanço simpático/parassimpático, e o componente de alta frequência. Tais parâmetros foram analisados na posição de decúbito em repouso, inclinado e na manobra de arritmia sinusal respiratória.

1.3.1 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTÔNOMICO CARDIOVASCULAR

1.3.1.1 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC)

A utilização da análise da VFC no domínio da frequência é atraente pela possibilidade de se dividir a variância em componentes relacionados a mecanismos fisiológicos específicos. Entretanto, existem controvérsias sobre o significado de vários fenômenos e limitações técnicas significativas. Em condições ideais, a análise espectral só poderia ser realizada em séries temporais estacionárias, na presença de simetria das flutuações e total ausência de artefatos, condições quase nunca encontradas no ser humano. Segundo alguns autores, a

ausência de uma série temporal estacionária (MALIK - TASK FORCE, 1996) e a presença de artefatos e de extra-sístoles, mesmo que isoladas, podem comprometer de forma importante a análise da VFC. Ainda que alguns indiquem maior sensibilidade da análise espectral na detecção do dano autonômico vagal cardíaco, não existem evidências concretas da superioridade desta técnica em relação aos índices mais simples e estabelecidos, obtidos no domínio do tempo.

Da mesma forma, o reconhecido valor prognóstico, a fácil aplicabilidade clínica e a grande simplicidade falam a favor da utilização da avaliação da VFC no domínio do tempo. A possibilidade dessa avaliação em traçados rotineiros do eletrocardiograma constitui vantagem atraente. Entretanto, existem limitações significativas. Embora a sensibilidade aos artefatos e a ausência de uma série estacionária no domínio do tempo, mesmo em registros curtos, seja menor do que a registrada quando se emprega a análise espectral, quando se utiliza a análise automática dos equipamentos de eletrocardiografia atualmente disponíveis, os índices estatísticos da VFC no domínio do tempo não são confiáveis. Adicionalmente, o significado real dos mecanismos subjacentes presentes em cada um destes índices não é claro. No domínio do tempo, todos os ritmos de variação da frequência cardíaca, no período de registro, ficam restritos a números únicos, que resumem todas as oscilações ocorridas no dia, independentemente dos mecanismos envolvidos (MALIK, 1998).

Para amenizar os erros sistemáticos acima mencionados e com intuito de obter índices próximos do fidedigno, foi utilizado neste trabalho um equipamento com algoritmos de análise semi-automática, no qual o operador interage com o sistema após a identificação e a classificação dos complexos QRS em normais ou anormais seguido de uma revisão manual cuidadosa de todo o traçado para corrigir os erros do sistema.

Junqueira e cols (2002), ao analisarem respostas da frequência cardíaca à manobra de Valsalva em pacientes com doença de Chagas sem cardiopatia manifesta e voluntários normais, observaram que os doentes apresentavam, principalmente, diminuição da resposta à manobra, mas alguns a mantinham ou mesmo a apresentavam exacerbada. Esta diversidade de apresentações, segundo os autores, estaria relacionada tanto aos diversos graus de disfunção autonômica cardiovascular quanto à complexidade patogenética da doença.

Medeiros (2002) propôs a análise da variabilidade da frequência cardíaca no repouso e sob respiração controlada como método para avaliar a reserva vagal do sistema nervoso

autônomo cardiovascular em diferentes grupos de pacientes chagásicos crônicos, utilizando os domínios do tempo e da frequência. Para tal, foram coletados 20 minutos de sinal eletrocardiográfico em 92 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica, que foram analisados no Sistema de Captação de Biopotenciais desenvolvido por Benchimol-Barbosa (1997). Foram observadas variáveis nos domínios do tempo (RMSNN, pNN50 e DPNN) e da frequência (relação baixa/alta). Os pacientes foram divididos em estágios de comprometimento cardíaco, de acordo com a classificação de Los Andes modificada (CARRASCO, 1983): grupos 1A, 1B, 2 e 3. A autora propôs como mecanismo para justificar os seus resultados uma inicial destruição da inervação parassimpática, seguida de disfunção simpática e, num estágio final da doença, o coração estaria praticamente “desconectado” do sistema nervoso autônomo, o que levaria a índices autonômicos completamente alterados em pacientes na fase final da doença.

Em 2004 foram avaliados 653 brasileiros saudáveis com Holter 24h para análise da VFC no domínio do tempo e da frequência. Concluiu-se que, com o avançar da idade, a VFC diminui (exceto a relação baixa frequência/ alta frequência), há algumas diferenças entre os sexos (índices de modulação parassimpática são maiores nas mulheres) e o IMC não exerce influência sobre os parâmetros (ANTELMÍ e cols, 2004).

1.3.1.2 TESTE DA ARRITMIA SINUSAL RESPIRATÓRIA

No homem, a relação entre a variação da frequência cardíaca durante a inspiração profunda e o controle vagal do coração foi reconhecida como independente das influências simpáticas. Por isso, o teste da arritmia sinusal respiratória (ASR) foi considerado um método sensível, não invasivo, de curta duração, qualitativo e reprodutível de avaliação da atividade nervosa parassimpática (ECKBERG, 1983). Nos últimos anos, este teste vem sendo largamente utilizado na prática clínica para a avaliação do controle parassimpático cardíaco, geralmente associado a outras manobras autonômicas (KAUTZNER, 1995). Uma importante questão metodológica na realização do teste da ASR refere-se à necessidade ou não de se padronizar ou controlar os parâmetros respiratórios. Reconhece-se que os seguintes fatores podem influenciar a magnitude da variação da frequência cardíaca ao teste, alterando sua capacidade de refletir o controle vagal sobre o coração:

(a) frequência respiratória (GROSSMAN e cols, 1991) – a ASR diminui seu valor à medida que a frequência respiratória aumenta (acima de 12 ciclos por minuto);

(b) volume corrente (ECKBERG, 1980) – a ASR é diretamente proporcional ao volume corrente (mas se o volume corrente for superior a 40% da capacidade vital, a influência do mesmo não é significativa);

(c) idade – a ASR reduz progressivamente com o aumento da idade.

Para alguns autores, quando se analisa a função densidade espectral da frequência cardíaca, o controle da frequência respiratória impõe perturbações significativas no balanço simpático-parassimpático, aumentando o componente vagal, o que distorce a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca. Por outro lado, os demais autores preconizam a necessidade de controle e padronização da frequência respiratória quando se utiliza o teste da ASR para avaliar o controle vagal cardíaco, tanto no domínio do tempo como no domínio da frequência (APPEL e cols, 1989).

A influência do volume corrente tem sido menosprezada. Na verdade, em quase todos os estudos clínicos sobre ASR não houve nenhuma forma de controle do volume corrente. Em revisão de 147 artigos relacionados à variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência, Malliani e colaboradores (1994) encontraram que apenas 11% dos artigos mais citados na literatura incluíam o controle ou padronização do volume corrente. Entretanto, existem evidências de que as variações no volume corrente podem potencialmente interferir na reprodutibilidade da ASR e na capacidade do teste de medir diferenças do controle vagal, entre diferentes indivíduos (KAUTZNER, 1995). Estas variações no volume corrente são amenizadas quando o mesmo permanece acima de 40% do volume corrente do paciente.

Apesar do controle do volume corrente não ter sido diretamente medido no presente trabalho, procuramos realizar as manobras respiratórias de forma que o paciente permanecesse na faixa acima de 40% do seu volume corrente e a frequência respiratória ficasse em torno de 12 ciclos por minuto.

Ribeiro e cols (2004), através da análise da variabilidade da frequência cardíaca no Holter de 24 horas, em que utilizaram variáveis do teste da arritmia sinusal respiratória, mostraram que a presença de disautonomia parassimpática pode preceder a disfunção ventricular na história natural da cardiopatia chagásica crônica, pois não havia correlação

entre os índices de VRR e a presença de disfunção ventricular. Estas conclusões estão em concordância com os achados de outros autores.

1.3.1.3 TESTE DE INCLINAÇÃO (TESTE TILT)

O teste de inclinação passivo baseia-se na avaliação da sensibilidade ao barorreflexo. Consiste na observação da resposta da frequência cardíaca e da pressão arterial quando se assume passivamente a posição ortostática (WIELING e cols, 1983).

A fisiologia do teste de inclinação baseia-se no reflexo de Bezold-Jarish, embora alguns conceitos clássicos possam ser questionados à luz de novos conhecimentos. Poucos segundos após assumir o ortostatismo, durante o teste de inclinação, ocorre um recrutamento de sangue nos membros inferiores por ação da gravidade, com conseqüente queda transitória da pressão arterial sistólica. Esta hipotensão sistólica, associada à diminuição do retorno venoso, excitará barorreceptores, o que, por sua vez, levará à uma descarga de catecolaminas, além de importante queda no volume de sangue dentro do coração. A ação desses hormônios, aumentando o inotropismo cardíaco, associada à diminuição de seu volume sangüíneo, faz com que, dentro de 1 a 3 minutos de inclinação, haja ativação de mecanorreceptores miocárdicos e aortopulmonares que, posteriormente, no indivíduo normal, irão gerar resposta vagal compensatória com conseqüente recuperação da pressão arterial.

Outros estudos questionam a necessidade do coração “vazio” no mecanismo fisiológico induzido pelo ortostatismo. Mecanismo ativo para a vasodilatação, dependente da liberação de óxido nítrico das células endoteliais, foi recentemente demonstrado. A hipoperfusão cerebral pode estar envolvida no mecanismo fisiológico do ortostatismo. Corroborando com esta hipótese, trabalhos utilizando ultra-sonografia com Doppler transcranial demonstraram hipoperfusão cerebral no início da resposta vasovagal, assim como anormalidades no eletroencefalograma. Outras substâncias endógenas parecem participar dos mecanismos desencadeados pelo ortostatismo. A adenosina é uma delas, provocando bradicardia, distúrbios na condução atrioventricular - mais especificamente no nóculo, e hipotensão por vasodilatação. A serotonina é outra que, embora ainda pouco estudada, parece provocar estimulação vagal e bradicardia.

Observa-se, até este ponto, que o sistema nervoso parassimpático pode ser avaliado

com certa facilidade através de medidas basais da variabilidade da frequência cardíaca, pois diversos índices do domínio do tempo são capazes de mensurar a resposta vagal. Porém, a análise do sistema nervoso simpático traz um grau maior de dificuldade, pois os parâmetros habitualmente medidos durante o repouso não traduzem de forma precisa o tônus simpático do indivíduo, à exceção da relação baixa/alta. Ressalve-se, porém, que ao se analisar a variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência, a baixa frequência é “contaminada” pelo parassimpático também em condições basais e, por esse motivo, não traduz de forma quantitativamente precisa o sistema nervoso simpático. Para resolver esta questão, foram propostas algumas formas de estimulação do sistema nervoso simpático, algumas diretas e outras indiretas. Entre as técnicas diretas, citam-se a biópsia endocárdica com análise imunohistoquímica para terminações nervosas adrenérgicas e a cintilografia miocárdica com metaiodobenzilguanidina.

A resposta ao estímulo adrenérgico fisiológico, esperada nos 5 minutos iniciais de exposição ao ortostatismo, é a base conceitual para a utilização do teste da mesa de inclinação com variabilidade da frequência cardíaca para avaliação funcional não-invasiva do balanço simpático-vagal do sistema nervoso autônomo cardiovascular. Essa avaliação é feita comparando, no domínio de frequência, a relação baixa/alta dos 5 primeiros minutos da inclinação e a relação baixa/alta obtida com o paciente em repouso durante 20 minutos em ritmo sinusal regular, juntamente com o comportamento do componente de alta frequência. Nesse estudo, esta foi a metodologia utilizada (WIELING e cols, 1983).

O papel do teste da mesa de inclinação na avaliação do sistema nervoso autônomo já havia sido destacado por Pagani (2000), em um artigo de revisão sobre diagnóstico não-invasivo da disfunção autonômica na neuropatia diabética. Ressalta a facilidade da técnica, seu baixo custo e, principalmente, a sensibilidade do método: além de permitir o diagnóstico de disfunção autonômica com acurácia, possibilita ainda a discriminação em grupos segundo a gravidade da patologia.

Vybral e cols (1989) estudaram o teste da mesa de inclinação com análise da variabilidade da frequência cardíaca em voluntários sadios e observaram que existe, no domínio da frequência, aumento do componente de baixa frequência e diminuição daquele de alta frequência após a inclinação, e que ambas as observações tinham significância estatística. Por outro lado, nenhuma variável do domínio do tempo exibiu alteração significativa. Esses resultados sugerem que o domínio da frequência seria mais apropriado para a análise da

variabilidade da frequência cardíaca durante o teste da mesa de inclinação. Tal resultado já seria esperado: uma vez que o estresse ortostático representa um estímulo simpático e que no domínio do tempo predominam parâmetros que representam o parassimpático, a VFC seria melhor representada durante o teste de inclinação ao se avaliar o domínio da frequência.

Quanto à sensibilidade de cada parâmetro da VFC (domínios do tempo e da frequência) para avaliação do sistema nervoso autônomo, Hirayanagie e cols. (1999) pesquisaram em indivíduos normais quais seriam as variáveis mais relevantes através do teste da mesa de inclinação. Avaliaram parâmetros dos domínios do tempo (média dos RR, desvio padrão e variância) e da frequência (baixa frequência, alta frequência, relação baixa/alta e percentagem do espectro correspondente a cada banda) e concluíram que todas as variáveis do domínio da frequência se correlacionam ao grau de inclinação, ao passo que nenhuma do domínio do tempo parecia exibir tal correlação.

Alehan e cols (2002) almejavam quantificar a relação baixa/alta logo após a inclinação passiva, a fim de estabelecer um ponto de corte para o exame positivo ou negativo. Analisando crianças, chegaram à conclusão que este ponto de corte seria 2,7 e, similarmente ao que os trabalhos citados anteriormente mostraram, existe um aumento do tônus simpático basal que é estatisticamente significativo quando comparado aos controles normais.

Alguns autores já haviam atentado, desde a década de 60, para as alterações da frequência cardíaca observadas em pacientes chagásicos durante exposição ao ortostatismo e, comparando-as aos voluntários normais, observou-se que, mesmo em fases iniciais da doença já existiam diferenças notáveis (DIAS, 1956). Em tais trabalhos, que serão apresentados nos parágrafos seguintes, ainda não se havia utilizado a variabilidade da frequência cardíaca no teste de inclinação.

Marin-Neto e cols (1975) observaram que as alterações da frequência cardíaca durante o ortostatismo em pacientes chagásicos eram muito menos intensas do que as observadas em voluntários normais. Neste trabalho, em que foram realizados testes de inclinação positiva (70°) e negativa (30°) em controles normais e pacientes com cardiopatia chagásica crônica manifesta, os chagasicos apresentaram apenas hipotensão, sem bradicardia. O mesmo grupo, 5 anos depois, estudou o comportamento da frequência cardíaca durante o teste de inclinação em pacientes chagásicos e controles normais (MARIN-NETO, 1980). Observou-se atenuação do incremento esperado da frequência cardíaca nos 10 segundos imediatamente após a

inclinação positiva a 70°, denotando disfunção parassimpática nestes pacientes – ressaltando-se que eram pacientes sem insuficiência cardíaca. Observou-se, ainda, que o incremento sustentado da frequência cardíaca entre 1 e 5 minutos após a inclinação, que é mediado pelo sistema nervoso simpático, estava abolido tanto nos pacientes chagásicos (sem disfunção severa) quanto em normais sob bloqueio beta-adrenérgico, o que fez com que os autores concluíssem que a disfunção autonômica destes pacientes tinha tanto componentes simpáticos quanto parassimpáticos.

Guzzetti e cols (1990) observaram, em pacientes com cardiopatia chagásica sem evidência de insuficiência cardíaca, que existe atenuação da retirada vagal e do aumento do simpático neste grupo de pacientes durante o teste de inclinação quando comparados a controles normais.

Tundo e colaboradores (2005) destacam a alta incidência de extrassístoles nos traçados eletrocardiográficos de pacientes chagásicos crônicos - sobretudo naqueles em estágios mais avançados de sua doença, o que seria um fator limitante da utilização de variabilidade da frequência cardíaca para a detecção de disfunção autonômica nesse grupo de pacientes. A média de extrassístoles nesses pacientes foi de 1781/24h. Esse grupo propõe e estuda a análise da turbulência da frequência cardíaca como método de detecção de disfunção autonômica nesses pacientes, e a compara com a variabilidade da frequência cardíaca - concluindo que o primeiro método se correlaciona melhor com a fração de ejeção do que a VFC.

Molina e cols (2006) utilizaram a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo para relacionar o grau de disautonomia à presença de disfunção ventricular no paciente portador de cardiopatia chagásica crônica na fase indeterminada. Concluem que, mesmo nessa fase, a disautonomia e a disfunção diastólica esquerda já estão presentes, mas são fenômenos independentes, pois não foi possível estabelecer correlação entre esses dois parâmetros. Foi observado também que não há alteração na função ventricular direita nesse grupo de pacientes.

De Resende e cols. (2007), utilizaram a VFC nos domínios do tempo e da frequência cardíaca para caracterizar a presença de disfunção autonômica numa população de pacientes idosos com doença de Chagas, comparando-os a idosos sem cardiopatia chagásica e a controles jovens. Para tanto, utilizaram a VFC no repouso, durante o teste de inclinação e

durante o teste de água gelada na face - que é um potente estimulador vagal. Nesse trabalho foi utilizado um algoritmo autorregressivo para a comparação dos grupos. Algumas diferenças foram observadas, como: redução da VFC total do grupo idoso com doença de Chagas em relação aos jovens normais, ausência de modificação de parâmetros parassimpáticos durante o teste da água gelada nos pacientes com doença de Chagas, ausência de modificação de todos os parâmetros do teste de inclinação no grupo com doença de Chagas – o que não aconteceu no grupo dos controles jovens. A conclusão do trabalho é que as diferenças de controle autonômico observadas podem estar relacionadas à idade e não à presença de cardiopatia chagásica, uma vez que os grupos de idosos com doença de Chagas e de controles idosos se comportaram de forma semelhante nesta avaliação.

2 OBJETIVO

Verificar a associação entre disfunção autonômica e a presença de anticorpos anti-m2 e anti- β 1 funcionalmente ativos, em pacientes com doença de Chagas e fração de ejeção maior que 50%.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, descritivo, em um centro terciário no qual foi realizada uma análise das variáveis da VFC durante repouso, teste da arritmia sinusal respiratória e teste de inclinação, associando-as com os dados da caracterização do soro. O estudo foi realizado entre outubro de 2009 e agosto de 2010 em pacientes com diagnóstico sorológico de doença de Chagas, assintomáticos, com função sistólica preservada (FE > 50%), do ambulatório de cardiopatia chagásica do Serviço de Cardiologia do ICES/HUCFF-UFRJ.

Este estudo faz parte da linha de pesquisa em doença de Chagas (Mecanismos envolvidos na progressão do dano miocárdio na doença de Chagas com perspectivas prognósticas e terapêuticas: disfunção autonômica - marcadores precoces) cadastrada no CNPq e coordenada pelo Dr. Roberto Coury Pedrosa do Serviço de Cardiologia do

HUCFF/ICES-UFRJ.

3.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes com idade entre 20 e 80 anos acompanhados no ambulatório de cardiopatia chagásica do Serviço de Cardiologia do ICES/HUCFF-UFRJ com diagnóstico de doença de Chagas. O diagnóstico da doença de Chagas foi confirmado no laboratório do HUCFF-UFRJ (setor de sorologia) no caso de pacientes encaminhados de fora do HUCFF. Somente foram incluídos pacientes que tiveram os soros caracterizados para a presença de anticorpos funcionalmente ativos contra receptores acoplados à proteína G capazes de interferir com receptores de ambos os sistemas, parassimpático e simpático, assintomáticos afastados da zona endêmica há mais de 10 anos, que tiveram função sistólica preservada ($FE > 50\%$), e que optaram por manter seguimento clínico ativo e regular.

3.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os pacientes foram excluídos do presente estudo caso apresentassem algumas das seguintes características:

- Protocolo inicial de admissão incompleto;
- Tratamento prévio especificamente para a infecção chagásica;
- Dados clínicos ou laboratoriais sugestivos de doença renal aguda ou crônica, doença hepática ou disfunção tireoideana em qualquer estágio ;
- História prévia de doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes mellitus tipo 2 em uso de hipoglicemiante e/ou insulina;
- Anemia crônica, tabagismo, alcoolismo crônico de acordo com critérios do questionário CAGE (1984);
- Sinais, sintomas ou história clínica de cardiopatia isquêmica confirmada após investigação;

- Quaisquer outras miocardiopatias diagnosticadas;
- Doença de Parkinson e neuropatias;
- Gravidez ou amamentação;
- Uso de simpaticomiméticos, bloqueadores de canais de cálcio, antidepressivos tricíclicos, agentes bloqueadores adrenérgicos e outras substâncias com possível interferência no sistema nervoso autonômico no intervalo de 15 dias anterior ao estudo.

3.1.2.3 GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi composto, em sua grande maioria, de funcionários do HUCFF - trabalhadores de serviço gerais, segurança e tarefas administrativas, médicos, enfermeiros e técnicos que trabalhavam na assistência dentro do HUCFF/UFRJ, que mostraram interesse em participar da pesquisa e não apresentavam quaisquer comorbidades, tabagismo, etilismo ou uso de medicações habituais. Muitos haviam sido submetidos recentemente a exames admissionais, os demais os fizeram eletivamente, apresentando ótimas condições física e mental, em atividades regulares diárias, sem uso de qualquer fármaco. Todos foram submetidos à realização de exame clínico, hemograma, bioquímica (escórias nitrogenadas, prova de função hepática, TSH e T4 livre), ECG basal e teste TILT com análise da variabilidade da frequência cardíaca, constituindo o grupo controle. Todos apresentaram ECG normal. Não foi feita a caracterização do soro nesses pacientes.

Foram utilizados os mesmos critérios de exclusão do grupo com doença de Chagas.

3.2 ASPECTOS BIOÉTICOS

É um estudo transversal onde todas as intervenções diagnósticas e terapêuticas seguem as recomendações das diretrizes específicas para acompanhamento e tratamento da doença de Chagas, atualizadas pelo Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2005).

O projeto do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUCFF-UFRJ atendendo às diretrizes nacionais e internacionais para pesquisa em seres humanos (Resolução

nº 1996 do Conselho Nacional de Saúde), que regulamentam experimentos envolvendo pessoas (parecer CEP nº: 233/09). O Dr Roberto Coury Pedrosa foi o responsável pelo esclarecimento dos pacientes, referente a inclusão dos mesmos no estudo.

Todos os pacientes incluídos no presente projeto tiveram à sua disposição, de forma absolutamente gratuita, os testes diagnósticos e algumas medicações recomendadas pelas diretrizes para tratamento da cardiopatia chagásica crônica e suas complicações. O projeto conta ainda com a participação do Serviço Social do HUCFF-UFRJ que presta assistência aos pacientes orientando no que se refere aos seus direitos previdenciários e obtenção de passe livre nos transportes urbanos.

3.3 PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO UTILIZADOS NA SELEÇÃO

3.3.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

O diagnóstico sorológico foi realizado em todos os pacientes encaminhados ao ambulatório, mesmo se trouxessem resultados anteriores externos, através da pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, utilizando dois métodos. A diluição considerada reação sorológica positiva foi estabelecida pelo laboratório centro de referência de Manguinhos-FIOCRUZ/RJ. Os exames foram realizados pelo laboratório de Imunologia do HUCFF-UFRJ. O sangue foi coletado sempre pela mesma pessoa, no mesmo dia da semana, na parte da manhã, e submetido às seguintes técnicas:

- *Imunofluorescência indireta* realizada pela técnica padronizada por Camargo (1966) e relatada por Luquetti (1999). Inicialmente a diluição testada foi 1:20 e, quando positiva, foi diluída seriadamente até 1:80. Foi considerada reação sorológica positiva aquela superior ou igual a 1:80;
- *Reação de hemaglutinação indireta* realizada pela técnica padronizada por Camargo (1971) e relatado por Luquetti e Rassi (2000). A reação foi considerada positiva quando a diluição era igual ou superior a 1:64 e
- *Teste imunoenzimático (ELISA, “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”)*: positivo quando superior a 1,2 (razão entre a densidade ótica e o valor limiar de reatividade).

O paciente considerado soropositivo teve dois testes sorológicos positivos, em duas coletas diferentes. Não necessariamente os pacientes realizaram os 3 testes. Em caso de resultados incongruentes ou limítrofes, novas amostras foram colhidas e testadas. Na persistência de resultados incongruentes, a prioridade foi dada ao resultado do teste de imunofluorescência indireta.

3.3.2 EXAME CLÍNICO:

A avaliação clínica foi realizada para verificar a presença de sinais e sintomas cardiovasculares e digestivos, compatíveis com a doença de Chagas, assim como para fazer o diagnóstico diferencial com outras cardiopatias ou doenças não cardíacas que afetassem o sistema cardiovascular. Os pacientes foram examinados por uma única pessoa durante as consultas ambulatoriais.

Após confirmação sorológica, todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica inicial padronizada, composta de: anamnese, história epidemiológica e exame físico. Na semana de admissão, todos os pacientes fizeram telerradiografia de tórax pósterio-anterior e perfil, o ECG convencional de repouso com 12 derivações, ecocardiograma uni e bidimensional com Doppler, teste TILT com análise de variabilidade da frequência cardíaca e uma avaliação laboratorial incluindo: hemograma completo, glicemia, uréia e creatinina, ácido úrico, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídios, sódio, cálcio, potássio, proteínas totais e frações, provas de função hepática e tireoidiana, exame parasitológico de fezes e análise de urina para elementos anormais e sedimentos. O uso de medicamentos foi interrompido 48 horas antes das avaliações clínicas e laboratoriais.

Neste período, os pacientes que concordavam em participar do estudo, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1), tinham seu soro coletado para avaliação da presença de anticorpos funcionalmente ativos contra receptores acoplados a proteína-G, pela técnica de Langendorff, realizado pela equipe do Laboratório de Eletrofisiologia Celular Cardíaca do IBCCF-UFRJ.

3.3.3 ELETROCARDIOGRAMA

O eletrocardiograma foi realizado com 12 derivações, em repouso, segundo os critérios do Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2005).

3.3.4 ECOCARDIOGRAMA UNI E BIDIMENSIONAL COM DOPPLER

Todos os exames foram feitos pelo mesmo ecocardiografista. O exame incluiu os cortes para-esternal longitudinal e transverso, apical duas, quatro e cinco câmaras, subcostal e supra-esternal. A avaliação foi feita de acordo com os critérios preconizados pela *American Society of Echocardiography* (SAHN e cols, 1978) utilizando-se os modos M (obtenção dos diâmetros sistólico e diastólico final do VE), bidimensional e Dopplerfluxometria, além da análise qualitativa da contratilidade segmentar e da função global de VE. A função sistólica global do VE foi quantificada através do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo método de Teicholz e Kreulen (1976). A função diastólica foi avaliada através da análise do enchimento ventricular esquerdo pelo fluxo mitral e Doppler tecidual do anel mitral lateral.

3.3.5 PROTOCOLO PARA ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA ATRAVÉS DO TESTE TILT

Todos os pacientes da pesquisa foram examinados após 6 horas de jejum, entre 9 e 12 horas da manhã. Eles foram orientados a evitar ingerir bebidas sabidamente estimulantes do sistema nervoso autônomo - tais como: café, chá, bebidas com qualquer teor alcoólico, e também a evitar exercícios, fumar e ingerir qualquer droga - pelo menos 24 horas antes do exame.

Os pacientes foram encaminhados à sala climatizada (temperatura ambiente de 22° a 25° C) e o ECG convencional com 12 derivações foi registrado na posição supina. Em seguida, os pacientes foram monitorados com eletrodos de prata/cloreto de prata descartáveis em uma derivação (D₁ modificada), com o eletrodo negativo na linha axilar anterior direita e o positivo na linha axilar anterior esquerda. O eletrodo terra foi posicionado no 5° espaço intercostal, linha hemiclavicular à direita.

Os sinais foram coletados e armazenados num microcomputador com processador K6-II, 500 MHz, memória RAM de 64 Mb e disco rígido com capacidade para 20 Gb. O software utilizado para coletar e analisar os sinais foi o Sistema de Captação de Biopotenciais desenvolvido por Benchimol-Barbosa (1997).

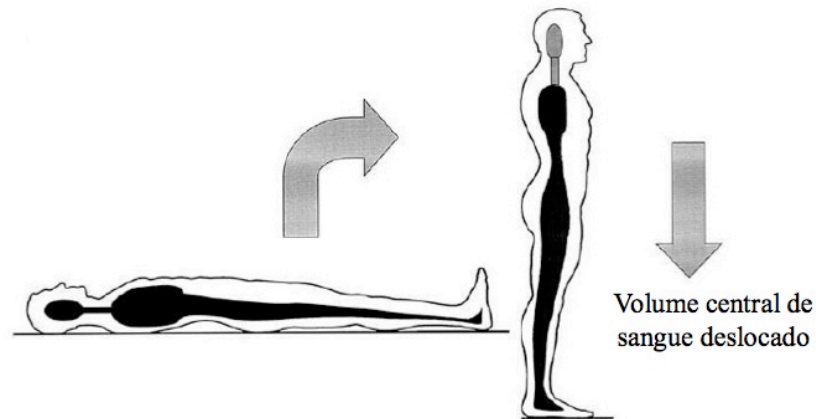


Figura 3 – Deslocamento fisiológico do volume sanguíneo durante a inclinação (modificado de Miller & Kruse, 2005).

A pressão arterial era monitorada com equipamento não-invasivo (PNI-TEB, Brasil), com manguito de tamanho padrão para adulto, posicionado a 3 cm da fossa cubital esquerda. No monitor do equipamento, era possível observar: pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca.

O Sistema de Captação de Biopotenciais (BENCHIMOL-BARBOSA, 1997) é um software escrito em linguagem Turbo Basic (Borland, EUA), o qual foi gentilmente cedido pelo autor para ser utilizado no presente estudo. Registra os sinais em formato binário (*.dat) e, além da variabilidade da frequência cardíaca e eletrocardiograma de alta resolução do complexo QRS, fornece o vetorcardiograma, um diagrama tempo-frequência, o eletrocardiograma convencional e o eletrocardiograma de alta resolução da onda P. Destes quatro, apenas o eletrocardiograma convencional foi analisado para que o observador tivesse parâmetro para concordar ou não com a seleção de batimentos executada pelo programa, conforme detalhado abaixo.

Os sinais, inicialmente filtrados em um filtro passa-banda Butterworth com frequências de corte em 0,05 e 300 Hz, foram amostrados a 1000 Hz e resolução de 14 bits.

Para a detecção dos complexos QRS, efetuou-se uma nova filtragem passa-baixas, com filtro Butterworth e frequência de corte em 30 Hz. Um primeiro batimento normal foi escolhido nos primeiros segundos do sinal, sendo manualmente determinados o início e fim do complexo QRS e da onda T. A partir daí, os batimentos eram correlacionados com aquele de referência e aqueles com correlação inferior a 0,8 ou que sucedessem uma contração prematura eram excluídos. Cada batimento da série era então analisado e mostrado ao analisador, classificado como “Evento Aceito” ou “Evento Rejeitado”. Essa característica do programa permitiu ao observador detectar visualmente eventuais falhas de classificação dos batimentos e interferir no processo que, por esse motivo, é denominado semi-automático.

No presente estudo, o exame foi realizado ao longo de 3 etapas – arritmia sinusal respiratória (ASR), repouso e inclinação passiva a 70°.

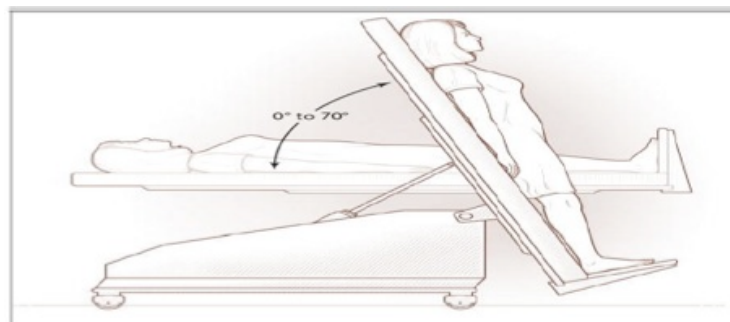


Figura 4 – Sequência de manobras utilizadas durante análise da VFC (ASR, repouso e inclinação)

A primeira etapa (ASR) será descrita adiante, a segunda etapa foi realizada em repouso – no qual os componentes de alta frequência e relação baixa/alta foram analisados sem qualquer estímulo, entre o 15° e 20° minuto.

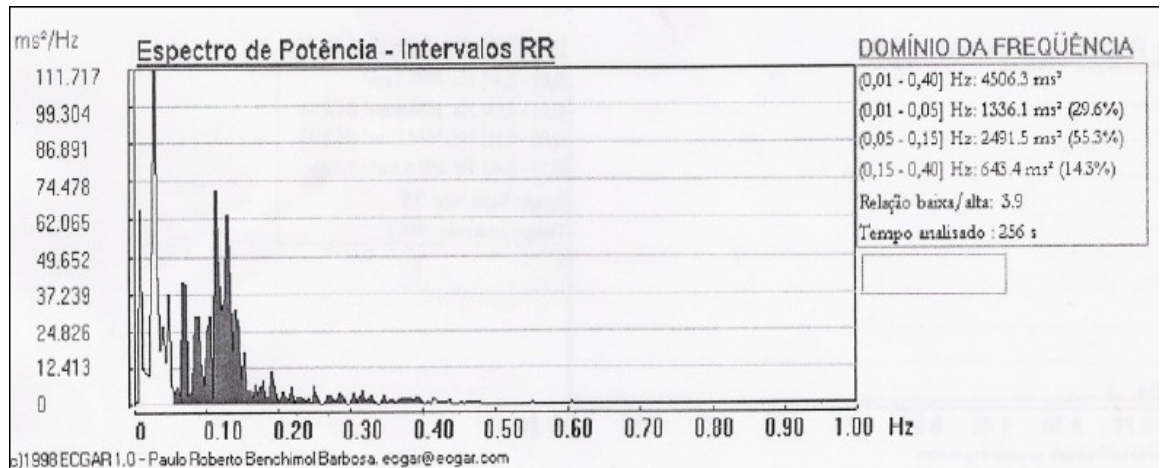


Figura 5 – Representação da análise espectral da VFC durante repouso

A terceira e última etapa iniciou-se após 20 minutos de repouso em decúbito dorsal, quando os pacientes foram submetidos à inclinação passiva, em um ângulo de 70° , de modo a causar uma alteração hemodinâmica pelo deslocamento fisiológico do volume sanguíneo (Figura 3). Os pacientes permaneceram nesta posição por 5 minutos. Caso ocorressem sintomas, a mesa era colocada em posição de trendelenburg até que houvesse remissão dos mesmos. Nos 5 primeiros minutos de inclinação, a relação baixa/alta foi observada nos seguintes tempos: 15, 45 e 60 segundos e 2, 3 e 5 minutos. O valor considerado para comparação foi o maior obtido. Na ausência de sintomas ou após a sua cessação, os pacientes eram novamente colocados em posição supina.

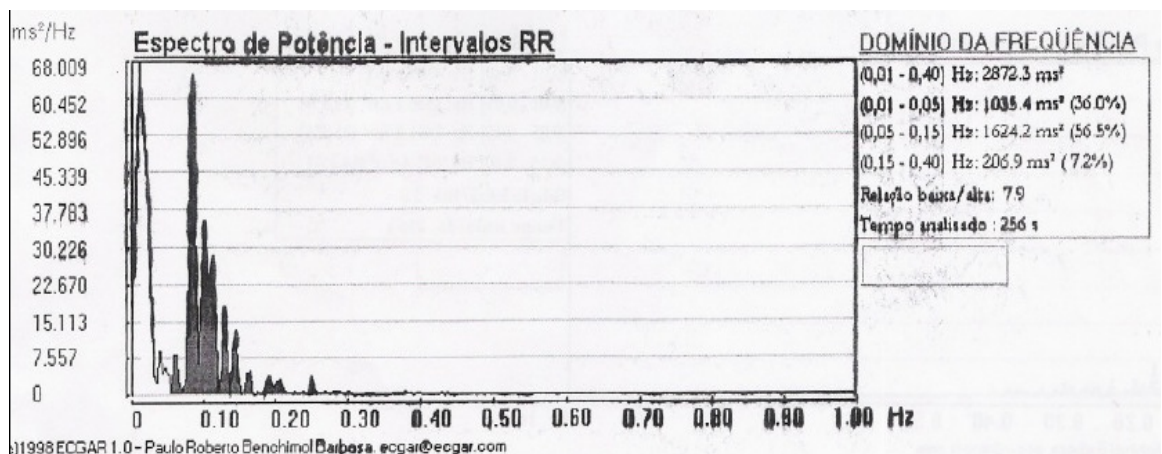


Figura 6 – Representação da análise espectral da VFC durante inclinação

3.3.5.1 PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA ATRAVÉS DO TESTE DA ARRITMIA SINUSAL RESPIRATÓRIA

O teste da ASR era realizado entre o 10^o e o 12^o minutos de decúbito dorsal e consistia em manter o paciente por pelo menos dois minutos de respiração profunda controlada a doze incursões por minuto. Cada paciente foi instigado a realizar movimentos respiratórios máximos, com comando verbal e gestual do investigador para iniciar a inspiração e a expiração, lenta e pausadamente o suficiente para que cada ciclo respiratório durasse 10 segundos. Durante a inspiração, o investigador orientava o paciente a “encher lentamente os pulmões”, contando de um a cinco, movimentando a mão aberta para cima e na expiração, o paciente era solicitado a “soltar lentamente todo o ar dos pulmões” enquanto o investigador contava de um a cinco e realizava um movimento lento de cima para baixo com a mão aberta.

A VFC foi determinada por domínio de frequência nos tempos entre o 10^o e o 12^o minuto e entre o 15^o e o 20^o minuto para comparação. Após a edição manual das gravações, eliminando-se os ruídos aleatórios, no domínio de frequência foram extraídos dois índices aceitáveis como expressão da atividade parassimpática para cada período citado.

Neste estudo, dois parâmetros do domínio da frequência (análise espectral) foram analisados nos dois períodos estabelecidos: a relação baixa/alta, que é a razão entre os componentes de baixa frequência e alta frequência (medida do balanço simpático/parassimpático), e o componente de alta frequência.

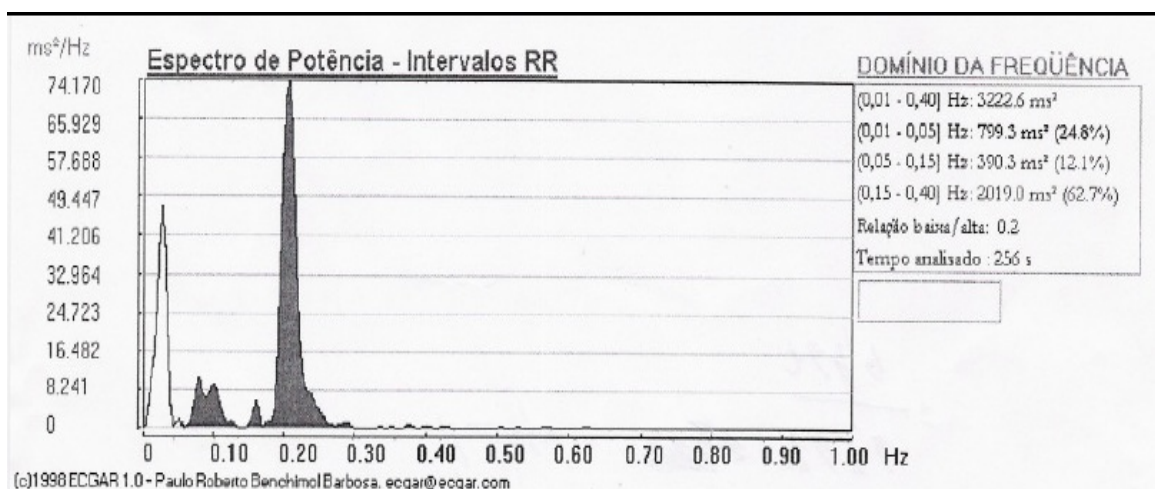
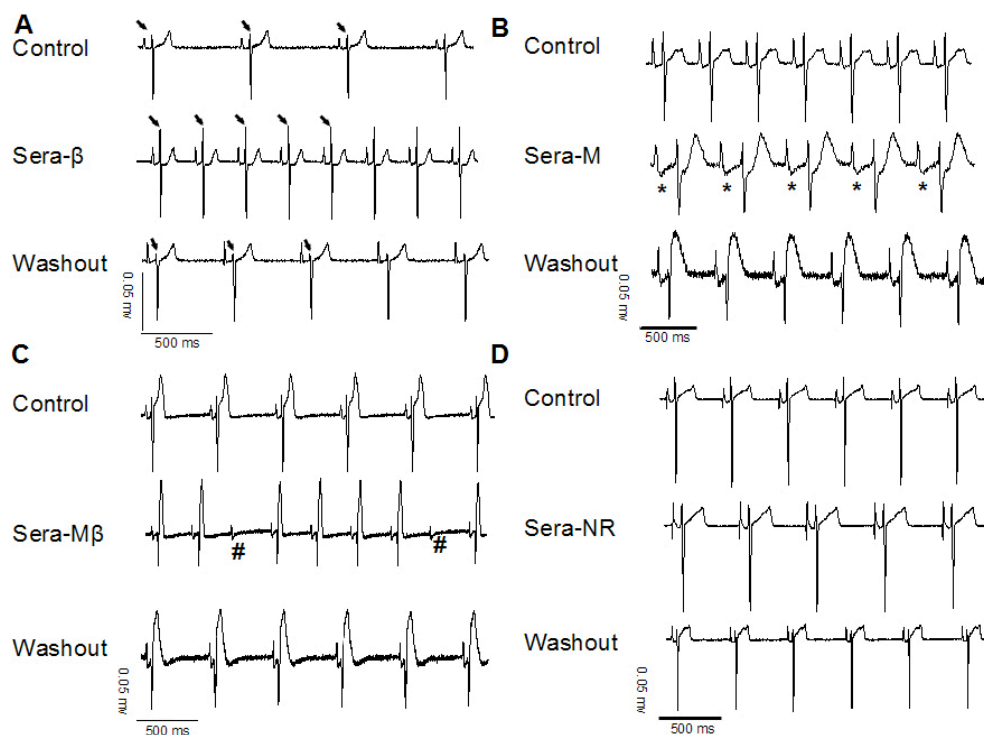


Figura 7 – Representação da análise espectral da VFC durante ASR

3.3.6 PESQUISA DA PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G

Este procedimento foi realizado pelo Laboratório de Eletrofisiologia Celular Cardíaca, do IBCCF-CCS da UFRJ. Após o consentimento dos pacientes era realizada venopunção para obtenção de amostras de sangue, as quais eram encaminhadas ao laboratório. O protocolo experimental teve o objetivo de identificar os soros que causavam alterações eletrofisiológicas nos corações de coelhos adultos, perfundidos pela técnica de Langendorff – conforme exemplificado pela figura 8. Numa segunda etapa, foi realizado o fracionamento do soro total e os testes foram repetidos, para identificar em qual fração se encontrava o fator arritmogênico e determinar a concentração de proteína nas frações. A técnica utilizada foi relatada em detalhes por Oliveira e cols (1997) e encontra-se no anexo 2.

Figura 8 – Arritmias observadas durante ação dos anticorpos anti-m2 e anti-beta1 no coração isolado de coelho



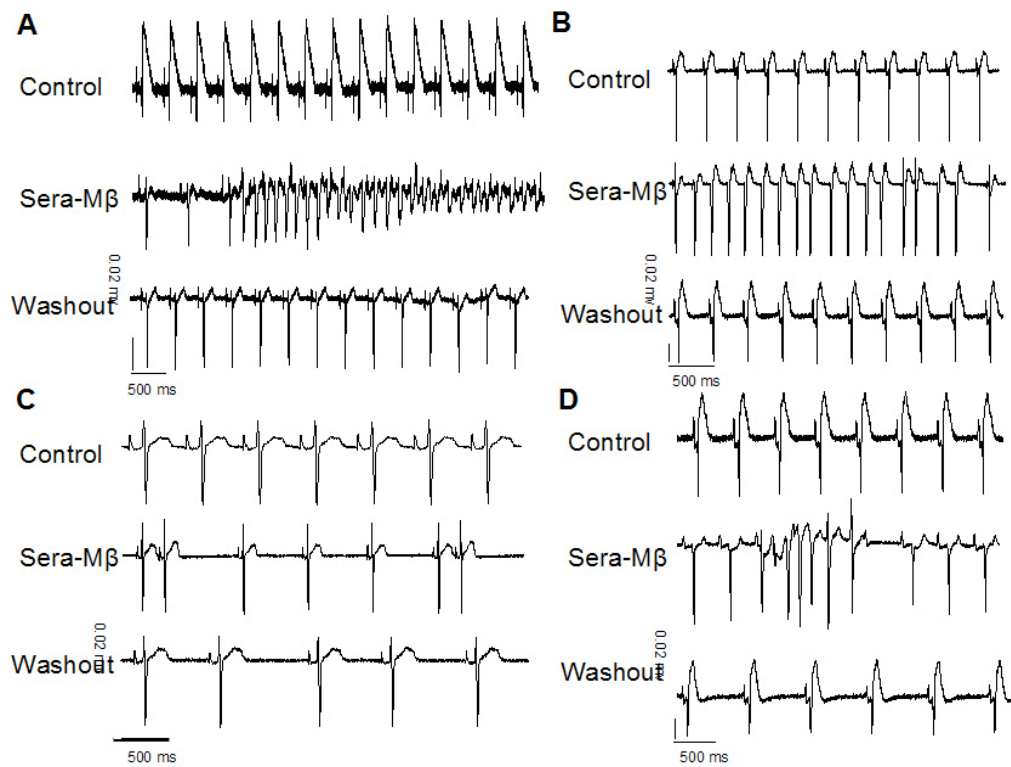


Figura 8 (continuação) – Arritmias observadas durante ação dos anticorpos anti-m2 e anti-beta1 no coração isolado de coelho

3.4 DEFINIÇÕES

-Eletrocardiograma alterado: De acordo com o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005), o exame foi considerado alterado caso apresente as seguintes situações: bloqueio completo do ramo direito, ou bloqueio incompleto se associado ao hemibloqueio anterior esquerdo; bloqueio do ramo esquerdo; bloqueio AV 2º ou 3º grau; batimentos ventriculares ectópicos prematuros freqüentes (>1 pelo ECG) monomórficos, polimórficos ou repetitivos; taquicardia ventricular não sustentada; bradicardia sinusal < 40 bpm ou pausas sinusais; disfunção do nódulo sinusal; alterações primárias da onda T; ondas Q anormais (área eletricamente inativa); fibrilação atrial.

-Disfunção ventricular: presença de disfunção sistólica (FE <50%) e/ou diastólica do ventrículo esquerdo no ecocardiograma.

-Disfunção autonômica:

Definida pela ausência de aumento do componente de alta frequência na manobra de Arritmia Sinusal Respiratória.

-Presença de anticorpos IgG com ação m2 muscarínica :

A presença de anticorpos contra receptores muscarínicos-m2 foi definida quando ocorria, no experimento *in vitro*, uma diminuição de 10% na frequência cardíaca sinusal, em relação ao controle, ou algum grau de bloqueio intra-atrial ou atrioventricular, revertidos após a adição de atropina (COSTA e cols, 2000).

-Presença de anticorpos IgG com ação β 1–adrenérgica :

A presença de anticorpos contra receptores β 1-adrenérgicos foi definida quando ocorria, no experimento *in vitro*, um aumento de 5% na frequência cardíaca sinusal, em relação ao controle, revertidos após a adição de propranolol (COSTA e cols, 2000).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Este estudo foi realizado sob a consultoria estatística da Comissão de Investigação Científica (CIC) da Divisão de Pesquisa (DPq) do HUCFF/UFRJ.

As variáveis obtidas foram armazenadas num banco de dados do programa Microsoft Office Excell 2003, de onde foram coletados dados para a criação de um banco de dados do Sistema R. Para análise estatística foi usado o Stata software (versão 8.0, 2003) e CIA software. Os valores da mediana com seus respectivos interquartis foram reportados devido à distribuição assimétrica dos dados. Variáveis foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Nós também apresentamos o intervalo de confiança 95% para as diferentes medianas. O valor de $p < 0,05$ foi aceito como significativo para toda análise no estudo.

5 CONFLITO DE INTERESSES

O pesquisador responsável pela coleta dos dados, coordenador e autor desta linha de pesquisa não foi subvencionado, assim como a autora do presente trabalho. Não há nenhum interesse, particular ou financeiro, por parte do mesmo ou dos seus orientados na avaliação diagnóstica ou na terapia estabelecida nos pacientes chagásicos.

6 CONTROLE DE QUALIDADE DA COLETA DOS DADOS

O coordenador e autor da linha de pesquisa Dr. Roberto Coury Pedrosa e a aluna responsável pelo presente estudo foram os responsáveis pela inclusão dos pacientes, preenchimento da ficha de dados, coleta dos dados, interpretação do eletrocardiograma e execução da maioria dos exames complementares.

A aluna responsável pelo presente estudo, autora desta tese, foi a responsável pela execução do teste TILT com análise de variabilidade R-R e acompanhamento da caracterização dos soros dos pacientes. A aluna se reunia periodicamente com o seu orientador para discutir dúvidas. Nessas reuniões as fichas eram revisadas pelos mesmos. Quando detectadas discordâncias no preenchimento das mesmas em relação às definições ou em relação à coleta de dados, estas eram discutidas e reavaliadas para evitar que as mesmas discordâncias voltassem a ocorrer.

7 RESULTADOS

De uma coorte de 300 pacientes acompanhados regularmente no ambulatório de cardiopatia chagásica do HUCFF/UFRJ desde Janeiro/1990, 243 foram inicialmente selecionados por aceitarem participação na pesquisa e apresentarem função de VE preservada. Entretanto, obedecendo os critérios estabelecidos de inclusão e exclusão, restaram 39 pacientes com doença de Chagas (17 homens e 22 mulheres) e 44 controles (9 homens e 35 mulheres). No primeiro grupo, a idade oscilou entre 26 e 75 anos, mediana de 57 anos e entre 15 e 75 anos no grupo controle, com mediana de 38 anos. O nível de atividade física foi similar entre os grupos. Todos apresentavam TSH dentro da faixa da normalidade, com valor médio de 2,92 mUI/L.

Os achados mais freqüentes encontrados no eletrocardiograma e ecocardiograma transtorácico dos pacientes chagásicos estão discriminados na tabela 1. Todos os pacientes do grupo controle apresentavam ECG normal. Não foi realizado ecocardiograma no grupo controle.

Tabela 1. Alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas de pacientes com doença de Chagas

Variáveis	Grupo com doença de Chagas (n = 39)	
ECG	Normal	23 (58,9%)
	HBAE	6 (15,3%)
	BRD completo	4 (10,2%)
	BRD completo + HBAE	5 (12,8%)
	BAV 1o. grau + BRD completo + HBAE	1 (2,5%)
ECOTT	Normal	19 (48,7%)
	Déficit de relaxamento	18 (46,1%)
	Alteração segmentar	11 (28,2%)

ECG - eletrocardiograma / ECOTT – ecocardiograma transtorácico / BAV – bloqueio atrioventricular / HBAE – hemibloqueio anterior esquerdo / BRD – bloqueio de ramo direito

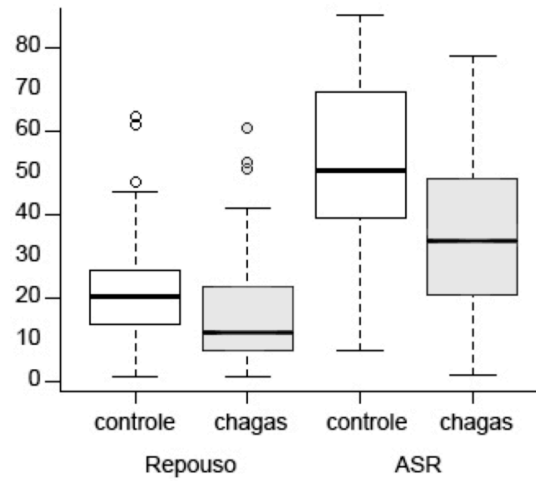
A avaliação da atividade parassimpática através do componente de AF durante ASR demonstrou que os pacientes chagásicos com função de VE preservada (FE>50%) são capazes de expressar atividade parassimpática durante a manobra da ASR, tendo-se o repouso como estado basal (tabela 2). Entretanto, comparando os pacientes chagásicos aos controles, os primeiros manifestaram atividade parassimpática significativamente menor em relação aos últimos, expressando uma reduzida reserva vagal (p=0,00006, figura 9).

Tabela 2. Dados da variabilidade FC no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e controles, durante arritmia sinusal respiratória, repouso e inclinação (mediana e intervalo interquartil)

Variáveis	Com doença de Chagas (IQ) (n = 39)	Controles (IQ) (n = 44)	p
FC média	69 bpm	72 bpm	0,64132
AF – ASR (IQ)	33,9% (IQ 20,8 - 48,4%)	50,4% (IQ 38,8 - 69,2%)	0,00006
AF – repouso (IQ)	11,9% (IQ 7,6 - 22,6%)	20,5% (IQ 13,7 - 26,5%)	0,02966
AF – inclinação (IQ)	4,5% (IQ 1,8 - 16,5%)	9,7% (IQ 3,6 - 19,4%)	0,16917
Relação B/A - ASR (IQ)	0,3 (IQ 0,2 - 0,7)	0,2 (IQ 0,1 - 0,3)	0,00553
Relação B/A - repouso (IQ)	1,8 (IQ 0,9 - 2,9)	2,0 (IQ 1,1 - 2,8)	0,89335
Relação B/A - inclinação (IQ)	5,2 (IQ 2,5 - 15,0)	4,1 (IQ 2,1 - 8,2)	0,42376

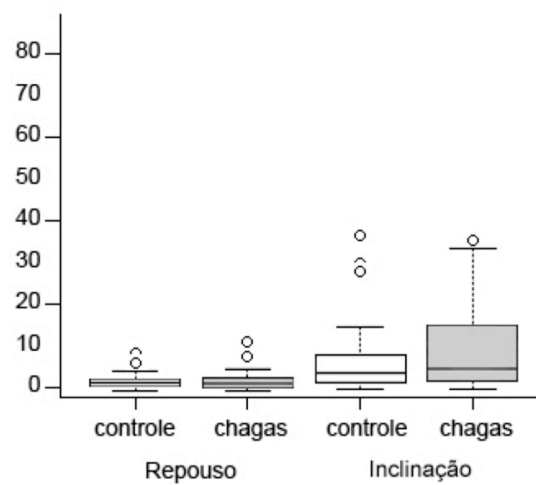
FC– frequência cardíaca / AF – alta frequência / ASR – arritmia sinusal respiratória

Figura 9. Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VFC no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e controles – AF durante repouso e ASR



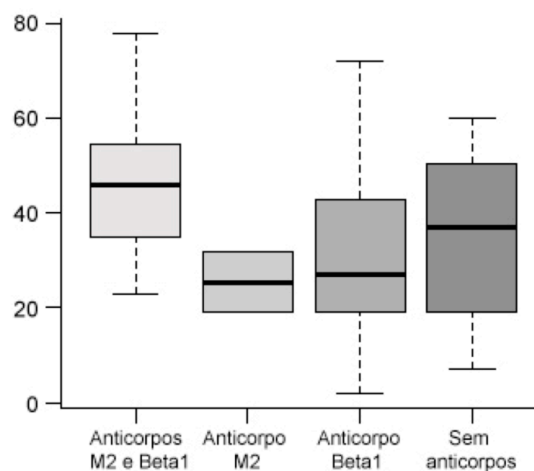
ASR – arritmia sinusal respiratória

Figura 10. Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VFC no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e controles – relação B/A durante repouso e inclinação



Conforme a figura 11, os pacientes com doença de Chagas foram analisados de acordo com a presença de anticorpos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti- β 1) e subdivididos em 4 grupos: ausência de anticorpos (n=11), presença de anti-m2 puro (n=2), presença de anti-m2 associado a anti- β 1 (n=8) e, finalmente, presença de anti- β 1 puro (n=18). Observa-se que pacientes que apresentaram apenas anticorpos anti-m2 ou anti- β 1 puros, expressaram menor modulação vagal durante ASR. Entretanto, quando associados, os mesmos promoveram um aumento da resposta vagal, comparados ao grupo de pacientes sem anticorpos.

Figura 11. Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VFC no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas, de acordo com o tipo de anticorpo: AF na ASR



Independente da presença de alterações eletrocardiográficas (BAV de 1º grau foi analisado no grupo de ECG normal), nota-se resposta similar quanto aos parâmetros de variabilidade de frequência cardíaca medidos (tabela 3). Do mesmo modo, o coeficiente de contingência entre ECG alterado e a identificação de anticorpos com ação anti-m2 foi de 0,1388, mostrando que não há associação entre estas variáveis.

Tabela 3 - Dados da variabilidade FC no domínio da frequência em pacientes com doença de Chagas e ECG normal ou alterado, durante arritmia sinusal respiratória, repouso e inclinação (mediana e intervalo interquartil)

	Chagas ECG normal (n=19)	Chagas ECG alterado (n=20)	P
AF - ASR	40,5% (IQ 21,2 - 49,8)	33,0% (IQ 21,6 - 37,4)	0,58516
AF - repouso	13,3%(IQ 7,9 - 22,8)	11,45%(IQ 7,3 - 21,9)	0,79374
AF - inclinação	3,9% (IQ 1,5 - 8,7)	10,8% (IQ 3,1 - 22,9)	0,08434
Relação B/A - ASR	0,3 (IQ 0,1 - 0,5)	0,5 (IQ 0,2 - 1,2)	0,13241
Relação B/A - repouso	1,6 (IQ 1,3 - 3,3)	1,95 (IQ 0,8 - 2,8)	0,72393
Relação B/A - inclinação	5,3 (IQ 4,3 - 19,9)	3,2 (IQ 1,4 - 7,5)	0,04140

AF – alta frequência / ASR – arritmia sinusal respiratória / IQ – intervalo interquartil /

Relação B/A – relação baixa/alta

8 DISCUSSÃO

Em sintonia com estudos prévios que abordaram pacientes com doença de Chagas crônica e função ventricular preservada, o presente trabalho mostra que, ainda que persista uma atividade parassimpática evocada pela arritmia sinusal respiratória neste grupo de pacientes, eles apresentam menor reserva vagal em relação aos controles. Esta redução da reserva vagal não foi acompanhada de alteração na frequência cardíaca basal do paciente. O mais relevante e original resultado foi a observação de que esta redução esteve associada à presença de anticorpos funcionalmente ativos acoplados à proteína G – particularmente anticorpos com ação anti- β 1. Este achado foi independente da ausência de disfunção sistólica, sugerindo que a modulação vagal possa estar condicionada a presença de anticorpos.

Embora sujeito a extensa investigação, a causa da disfunção autonômica presente na miocardite chagásica crônica não tem sido ainda claramente estabelecida. Vários estudos demonstram que o processo inflamatório está diretamente relacionado com a intensidade da

resposta imunológica tecidual (HAENSEL, 2008; OWEN, 2003). Entretanto, a ligação entre sistema nervoso autônomo parassimpático e o processo de regulação imunológica foi sugerida há mais de 30 anos, quando foi notada atenuação da citotoxicidade do linfócito T pela estimulação colinérgica muscarínica (STROM, 1972). Foram descritas vias de sinalização aferentes e eferentes que integram um arco reflexo, o reflexo “neuroimunológico” ou reflexo “inflamatório”. Dessa forma, os dois sistemas (nervoso e imunológico) podem se comunicar de forma bidirecional, utilizando como mediadores das informações citocinas e neurotransmissores comuns aos dois sistemas. A via eferente do sistema nervoso central (SNC) atua sobre o Sistema Imunológico (SI) por meio do sistema nervoso parassimpático, a denominada via antiinflamatória colinérgica. O SN parassimpático inerva órgãos do SI, e seu mediador acetilcolina age em células do sistema imune, em especial nos macrófagos, via ativação do receptor da acetilcolina (BLALOCK, 2005; CHAGAS E VILLELA, 1922). De fato, a contribuição da regulação imunológica na disautonomia foi hipotetizada mesmo em estudos iniciais desta doença devido à bradicardia inapropriada presente nos pacientes com doença de Chagas (GOIN, 1994; STERIN-BORDA, 2000; RIBEIRO, 2009). Um dos prováveis mecanismos é a reatividade cruzada pelo mimetismo molecular (OLIVEIRA, 1997; PEDROSA, 1998).

No presente estudo, foi possível observar que anticorpos circulantes funcionalmente ativos contra receptores cardíacos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti-β1) quando associados, atuam de modo positivo na modulação parassimpática, fato manifestado pelo aumento do componente de alta frequência na análise de VFC supostamente por uma interação. Entretanto, a ação isolada de ambos promove menor modulação vagal, particularmente nos pacientes com anti-m2 puro. Esses dados permitem inferir uma relação entre esses anticorpos e a modulação vagal. Em trabalhos prévios do grupo, demonstrou-se que o soro de pacientes com doença de Chagas que apresentavam ação muscarínica foi capaz de reduzir a FC e/ou gerar distúrbios de condução atrioventricular no coração isolado de coelho (OLIVEIRA, 1997; MASUDA, 1998; PEDROSA, 1998; MEDEI, 2007 e 2008). Recentemente, Ribeiro e cols (2009) mostraram correlação entre altos níveis de anti-m2 detectados pelo método ELISA e redução no componente de alta frequência na análise de VRR ($r=-0.32$, $p=0.023$). Os autores sugerem que esta disfunção vagal seja pelo efeito inibitório do anti-m2, embasado no fenômeno de dessensibilização.

Outro achado no presente estudo é a manutenção da frequência cardíaca basal dos

pacientes com doença de Chagas apesar da redução na reserva vagal. Diferentemente de Ribeiro e cols, esta manutenção da FC poderia ser justificada pela não dessensibilização dos receptores muscarínicos m2. Em outras palavras, os anticorpos agonistas contra receptores cardíacos muscarínicos alteram a modulação vagal (índices de VFC) mas não o tônus vagal. Em trabalhos prévios de nosso grupo (Oliveira e cols, 1997; Masuda e cols, 1998; Costa e cols, 2000), demonstramos que anticorpos contra receptores muscarínicos m2, presentes no soro de pacientes com doença de Chagas, não induziram uma dessensibilização dos receptores no coração isolado de coelho. A falta de dessensibilização dos receptores muscarínicos m2 não é particularmente surpreendente, já que ambos os ligantes (acetilcolina e IgG) possivelmente interagem em diferentes locais nos receptores situados na superfície das células do nódulo sinusal. De fato, Magnusson e cols (1994) relataram ausência de dessensibilização na interação entre o receptor β_1 adrenérgico e anticorpos (IgG) de pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática. Estes autores identificaram que os agonistas adrenérgicos clássicos e os anticorpos ligam-se em diferentes locais no receptor. Não obstante, a confirmação desta hipótese in vivo aguarda estudos posteriores.

O grupo controle do presente estudo apresentou idade média inferior à encontrada nos pacientes com doença de Chagas. Este efeito da idade na disfunção autonômica na doença de Chagas ainda não está bem claro. De Resende e cols (2007) comparando idosos saudáveis, adultos jovens e idosos chagásicos, demonstraram não haver diferenças na VFC entre os idosos frente aos estímulos simpático e parassimpático. Uma justificativa aventada pelos autores seria a de que as alterações da senescência já promoveriam resposta autonômica distinta, mascarando as alterações induzidas pela doença de Chagas.

Outra questão a discutir seria o fato de que, nesta presente casuística, a idade média dos pacientes foi em torno de 60 anos, teoricamente pacientes de baixo risco cardíaco. No entanto, em idosos, sabemos que: a doença de Chagas apresenta o predomínio da forma neurogênica, as alterações da forma cardíaca não são acentuadas, e a insuficiência cardíaca congestiva ocorre devido à associação das alterações cardíacas decorrentes da idade e outras cardiopatias freqüentes com o envelhecimento (DE CARVALHO FILHO, 1985). A cardiopatia chagásica no idoso parece apresentar uma seleção natural, com os quadros mais graves se manifestando em indivíduos jovens. Dessa forma, esses pacientes idosos apresentam menos alterações morfo-funcionais no coração - o que pode ter promovido melhor resposta às arritmias e, conseqüentemente, maior sobrevida. O maior comprometimento funcional do coração no

idoso, quando comparado aos jovens, se deve à associação das alterações próprias do envelhecimento com as alterações secundárias à doença de Chagas (ROCHA e cols, 2003). Em idosos autopsiados, foram observadas alterações macroscópicas na cardiopatia chagásica menos intensas ao descrito na literatura em indivíduos não idosos (OLIVEIRA e cols, 2007). Portanto, o presente estudo pode contribuir para o entendimento do mecanismo arritmogênico de pacientes idosos com doença de Chagas e função ventricular preservada (FEVE > 50%) pois, como citado anteriormente, esses indivíduos provavelmente apresentam alterações do sistema nervoso autônomo semelhantes aos pacientes adultos, porém, de forma menos intensa (BESTETTI e cols, 1987)

A maioria dos estudos disponíveis, realizada em vários centros independentes, mostra que são praticamente constantes as lesões do sistema nervoso intracardíaco, principalmente a agressão ao sistema parassimpático (DE RESENDE, 2007; TALVANI, 2006). Somado a este achado, alguns autores identificaram uma relação direta entre a disfunção autonômica e o grau de comprometimento miocárdio. De fato, é reconhecido o papel do ECG alterado como expressão do comprometimento miocárdio; então, seria plausível supor que a disfunção autonômica (índices de VFC) poderia ser secundária a lesão cardíaca estrutural. Neste estudo, foi mostrado que o ECG alterado não esteve associado ao comprometimento da VFC, tornando esta hipótese menos provável. Villar e colaboradores (2004) igualmente não encontraram, dentre os pacientes com ECG alterado, diferenças no componente de AF em repouso. Também, Rocha e colaboradores (2006) mostram que a modulação autonômica (índices de VFC) é independente da disfunção ventricular cardíaca.

A presença de anticorpos circulantes funcionalmente ativos contra receptores cardíacos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti- β 1) em pacientes com doença de Chagas é um achado já estabelecido. Estudos prévios reportaram que estes anticorpos são independentes de disfunção ventricular (OLIVEIRA e cols, 1997; TALVANI e cols, 2006; ALTSCHULLER e cols, 2007). A busca por eventual correlação entre a presença de anticorpos circulantes funcionalmente ativos contra receptores cardíacos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti- β 1) e alterações eletrocardiográficas, foi realizada através do coeficiente de contingência. O valor encontrado de 0,1388 nesta casuística torna pouco provável que o primeiro evento justifique o segundo.

A avaliação da relação baixa/alta durante a inclinação permite observar a modulação do sistema simpático sobre o vago. Embora em termos absolutos haja menor ação

parassimpática durante o estímulo ortostático, como existe frequentemente um comprometimento concomitante do componente simpático do SNA na doença de Chagas, a relação entre eles pode não sofrer alteração - na medida em que ambos estão reduzidos (TALVANI e cols, 2006). No presente trabalho, ela foi ligeiramente maior nos pacientes com doença de Chagas em relação aos controles, fato possivelmente justificado pela menor reserva vagal (representada pela AF que compõe o denominador da relação).

9 RELEVÂNCIA CLÍNICA

A disfunção autonômica na doença de Chagas é um evento precoce e pode estar envolvida no mecanismo de lesão-reparação do coração em diferentes situações clínicas. Os resultados do presente estudo poderão trazer importantes informações a respeito da interação do sistema nervoso autônomo e sua relação com o sistema imunológico através da via antiinflamatória colinérgica, auxiliando na compreensão dos mecanismos que possam levar ao desenvolvimento de morte súbita em pacientes sem disfunção, com ou sem alterações eletrocardiográficas, considerados de bom prognóstico. Pouco se conhece sobre os efeitos da estimulação da via antiinflamatória colinérgica sobre a modulação das arritmias cardíacas e morte súbita na doença de Chagas. Esta modulação, como alvo terapêutico, ainda requer estudos que auxiliem na compreensão de que forma esta ação possa evitar arritmias malignas e em qual subpopulação de pacientes com doença de Chagas poderia se demonstrar benefício pois, até o presente momento, isto ainda tem sido muito mais uma hipótese teórica do que propriamente um fenômeno clínico. Estudos longitudinais em pacientes com doença de Chagas na fase crônica, sem disfunção, particularmente no idoso, nos quais se pudesse determinar a prevalência de disfunção autonômica e associá-la ao surgimento de eventos – como arritmias malignas e morte súbita, talvez pudessem estabelecer o real valor prognóstico deste achado.

10 CONCLUSÃO

A menor reserva vagal em pacientes com doença de Chagas e função ventricular preservada esteve associada à presença de anticorpos acoplados à proteína G funcionalmente ativos.

11 LIMITAÇÕES

Dentre as limitações encontradas, destacam-se a não paridade entre pacientes com doença de Chagas crônica e o grupo controle – tendo este último apresentado idade média inferior. Esta limitação, segundo Resende e cols, provavelmente é amenizada pelo fato das alterações no sistema nervoso autônomo promovidas pela senescência mascararem as alterações induzidas pela doença de Chagas. Idealmente, a existência de um grupo controle com pacientes apresentando ECG alterado e FE>50%, pareados pela idade e sexo, auxiliaria na pesquisa do papel desta etiologia na produção dos anticorpos-IgG funcionalmente ativos contra receptores acoplados a proteína-G e na compreensão do desenvolvimento da disfunção autonômica cardíaca.

A segunda limitação é referente aos pacientes saudáveis que não foram submetidos a pesquisa de anticorpos funcionalmente ativos. Entretanto, já é conhecida a prevalência desses anticorpos funcionalmente ativos numa população normal – que gira em torno de 1%. Diante desse fato, necessitaríamos de um número superior ao dobro de voluntários sendo submetidos a análise sorológica pelo método de Langendorff para obtermos o resultado positivo em 1 paciente (Liu, 1999).

Apenas dois pacientes com doença de Chagas apresentaram anti-m2 isoladamente, limitando a compreensão da ação isolada desse anticorpo sobre a VFC. Igualmente, não é possível afastar a possibilidade de que uma ação antagonista entre anticorpos com ação anti-m2 e anti- β 1 possa mascarar a resposta moduladora do sistema nervoso autônomo nos pacientes com ambos anticorpos.

Como se tratou de um estudo transversal, o estabelecimento de uma relação de causa e efeito entre a presença de anticorpos-IgG funcionalmente ativos contra receptores acoplados a proteína-G e a disfunção autonômica detectada pela análise de variabilidade da frequência cardíaca não pôde ser estabelecida. Desse modo, não foi possível definir se os anticorpos têm um papel etiológico, se aparecem como um fator concomitante (epifenômeno) ou são secundários às lesões encontradas no nódulo sinusal e miocárdio. A repetição dos testes TILT com análise de VFC e também a investigação da presença de anticorpos nestes pacientes iria permitir uma avaliação temporal desta relação.

Por fim, existem as dificuldades inerentes à tentativa de inferir mecanismos

fisiopatológicos a partir de um modelo *in vitro* (a testagem do efeito dos anticorpos em animais) na ausência de um dado que o ligue diretamente ao modelo *in vivo*. Em função dessas dificuldades, a confirmação definitiva dos mecanismos de base da disautonomia na doença de Chagas e de sua relevância clínica ainda carece de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, F. G. [Cytological differences between the neurons of the sympathetic and parasympathetic nervous system]. **Hospital (Rio J)**, v. 78, n. 4, p. 1157-61, Oct 1970.
- ALEHAN, D.; AYABAKAN, C.; OZER, S. Heart rate variability and autonomic nervous system changes in children with vasovagal syncope. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 25, n. 9, p. 1331-8, Sep 2002.
- ALTSCHULLER, M. B. e cols. [Chronic Chagas disease patients with sinus node dysfunction: is the presence of IgG antibodies with muscarinic agonist action independent of left ventricular dysfunction?]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 6, p. 665-71, 2007 Nov-Dec 2007.
- AMORIM, D. D.; MARIN NETO, J. A. Functional alterations of the autonomic nervous system in Chagas' heart disease. **São Paulo Med J**, v. 113, n. 2, p. 772-84, 1995 Mar-Apr 1995.
- ANTELMÍ, I. e cols. Influence of age, gender, body mass index, and functional capacity on heart rate variability in a cohort of subjects without heart disease. **Am J Cardiol**, v. 93, n. 3, p. 381-5, Feb 2004.
- APPEL, M. L. e cols. Beat to beat variability in cardiovascular variables: noise or music? **J Am Coll Cardiol**, v. 14, n. 5, p. 1139-48, Nov 1989.
- BAINBRIDGE, F. A. The relation between respiration and the pulse-rate. **J Physiol**, v. 54, n. 3, p. 192-202, Aug 1920.
- BAROLDI, G.; OLIVEIRA, S. J.; SILVER, M. D. Sudden and unexpected death in clinically 'silent' Chagas' disease. A hypothesis. **Int J Cardiol**, v. 58, n. 3, p. 263-8, Feb 1997.
- BARRETO, A. C. e cols. Arritmias e a forma indeterminada da doença de Chagas. **Arq Bras Cardiol** n. 47, p. 197-19, 1986.
- BARROS, M. L. e cols. [Association between left ventricular wall motion abnormalities and ventricular arrhythmia in the indeterminate form of Chagas disease]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 2, p. 213-6, 2011 Mar-Apr 2011.
- BENCHIMOL-BARBOSA, P. R.; NADAL, J.P. Analysis of the ventricular late potentials based on the rr-interval histogram. **Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 13, n. 2, p. 2, 1997.
- BESTETTI, R. B. e cols. Clinical and morphological characteristics associated with sudden cardiac death in patients with Chagas' disease. **Eur Heart J**, v. 14, n. 12, p. 1610-4, Dec 1993.
- BESTETTI, R. B. e cols. Chronic Chagas' heart disease in the elderly: a clinicopathologic study. **Cardiology**, v. 74, p. 344-51, 1987.

BIGGER, J. T. e cols. Stability over time of heart period variability in patients with previous myocardial infarction and ventricular arrhythmias. The CAPS and ESVEM investigators. **Am J Cardiol**, v. 69, n. 8, p. 718-23, Mar 1992.

BIO-MEDICAL discussion list. Disponível em:
<http://biomedical.com/images/stresser/works3.gif>. Acessado em 3 de maio de 2008.

BLALOCK, J. E. The immune system as the sixth sense. **J Intern Med**, v. 257, n. 2, p. 126-38, Feb 2005.

BOOR, C. **A Practical Guide to Splines**, 1 ed, New York, Springer-Verlag Press, 1978.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 8, n. 5, p. 227- 234, 1966.

CAMARGO, M.E. e cols. Haemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 13, n. 1, p. 45-50, 1971.

CARRASCO-GUERRA, H. A. Diagnostico de dano miocardico en la Enfermedad de Chagas. Mérida: **Consejo de Publicaciones de la Universidad de Los Andes**, 1983.

CHAGAS, C. e VILLELA, E. Forma Cardíaca da Typanosomiase Americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.14, p. 5-61, 1922.

CHIALE, P. A. e cols. High prevalence of antibodies against beta 1- and beta 2-adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. **J Am Coll Cardiol**, v. 26, n. 4, p. 864-9, Oct 1995.

COMBELLAS, I. e cols. Echocardiographic features of impaired left ventricular diastolic function in Chagas's heart disease. **Br Heart J**, v. 53, n. 3, p. 298-309, Mar 1985.

CONSENSO Brasileiro de Doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, suppl. III, p. 1-29, 2005.

CORREIA, D. e cols. Cardiac autonomic modulation evaluated by heart interval variability is unaltered but subtly widespread in the indeterminate Chagas' disease. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 30, n. 6, p. 772-80, Jun 2007.

COSTA, P. C. e cols. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 4, p. 439-46, Apr 2000.

CUNHA, A. B. e cols. Norepinephrine and heart rate variability: a marker of dysautonomia in chronic Chagas cardiopathy. **Rev Port Cardiol**, v. 22, n. 1, p. 29-52, Jan 2003.

DATASUS. - Histórico da Doença de Chagas. – Disponível em:
<http://w3.datasus.gov.br/datasus>

DE CARVALHO FILHO, E. T. et al. [Chagas disease in the elderly]. **Arq Bras Cardiol**, v. 45, n. 2, p. 103-7, Aug 1985.

- DE CARVALHO, A. C. e cols. Conduction defects and arrhythmias in Chagas' disease: possible role of gap junctions and humoral mechanisms. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 5, n. 8, p. 686-98, Aug 1994.
- DE RESENDE, L. A. e cols. Cardiac autonomic function in chagasic elderly patients in an endemic area: A time and frequency domain analysis approach. **Auton Neurosci**, v. 131, n. 1-2, p. 94-101, Jan 2007.
- DIAS, E. e cols. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v. 14, n. 6, p. 1035-60, Dec 1956.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas em Bambuí MG Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda entre 1940 e 1982. Tese de doutorado, Faculdade de medicina, UFMG, Belo Horizonte, 1982.
- DIAS, J. C. P. Vigilancia epidemiológica em doença de Chagas. **Cad Saúde Publica**, v. 16, p. 43-59, 2000.
- DIAS, J. C. [Globalization, inequity and Chagas disease]. **Cad Saude Publica**, v. 23 Suppl 1, p. S13-22, 2007a.
- ECKBERG, D. L. Parasympathetic cardiovascular control in human disease: a critical review of methods and results. **Am J Physiol**, v. 239, n. 5, p. H581-93, Nov 1980.
- ECKBERG, D. L. Human sinus arrhythmia as an index of vagal cardiac outflow. **J Appl Physiol**, v. 54, n. 4, p. 961-6, Apr 1983.
- FIGUEIREDO, E. e cols. Variabilidade da frequência cardíaca como preditor de taquicardia ventricular sustentada e morte súbita na cardiopatia chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 67:150, 1996.
- GOIN, J. C. e cols. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. **J Auton Nerv Syst**, v. 47, n. 1-2, p. 45-52, Apr 1994a.
- GOIN, J. C. e cols. Circulating antibodies against nicotinic acetylcholine receptors in chagasic patients. **Clin Exp Immunol**, v. 110, n. 2, p. 219-25, Nov 1997.
- GROSSMAN, P.; KAREMAKER, J.; WIELING, W. Prediction of tonic parasympathetic cardiac control using respiratory sinus arrhythmia: the need for respiratory control. **Psychophysiology**, v. 28, n. 2, p. 201-16, Mar 1991
- GUZZETTI, S. e cols. Effects of sympathetic activation on heart rate variability in Chagas' patients. **J Auton Nerv Syst**, v. 30 Suppl, p. S79-81, Jul 1990.
- HAENSEL, A. e cols. The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 10, p. 1305-12, Nov 2008.
- HAINSWORTH, R. Cardiovascular reflexes from ventricular and coronary receptors. **Adv Exp Med Biol**, v. 381, p. 157-74, 1995.

- HIRAYANAGI, K., IWASAKI, K., SASAKI, T. e cols. Sensitivity analyses of heart rate variability variables by an incremental, passive head-up tilt. **Uchu Koku Kankyo Igaku**, v. 36, n. 2, p. 67-74, 1999.
- HOTEZ, P. J. Neglected diseases and poverty in "The Other America": the greatest health disparity in the United States? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 3, p. e149, 2007.
- JUNQUEIRA, L. F.; SOARES, J. D. Impaired autonomic control of heart interval changes to Valsalva manoeuvre in Chagas' disease without overt manifestation. **Auton Neurosci**, v. 97, n. 1, p. 59-67, Apr 2002.
- JUNQUEIRA, L. F. A summary perspective on the clinical-functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas' disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39 Suppl 3, p. 64-9, 2006.
- KAPLAN, D. e cols. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 19, p. 10301-6, Sep 1997.
- KAUTZNER, J. e cols. Day-to-day reproducibility of time-domain measures of heart rate variability in survivors of acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**, v. 76, n. 4, p. 309-12, Aug 1995.
- KIERSZENBAUM, F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 1-11, Jun 2003.
- LANDESMANN, M. C. e cols. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine cardiac imaging as a method to detect early sympathetic neuronal dysfunction in chagasic patients with normal or borderline electrocardiogram and preserved ventricular function. **Clin Nucl Med**, v. 36, n. 9, p. 757-61, Sep 2011.
- LIU, H. R. e cols. Screening of serum autoantibodies to cardiac beta1-adrenoceptors and M2-muscarinic acetylcholine receptors in 408 healthy subjects of varying ages. **Autoimmunity**, v. 29, n. 1, p. 43-51, 1999.
- LOPES, M. G. e cols. Comparison of 24 versus 12 hours of ambulatory ECG monitoring. **Chest**, v. 67, n. 3, p. 269-73, Mar 1975.
- LUQUETTI, A. O. Evolution of knowledge on the etiological diagnosis of chagasic infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 283-4, 1999.
- LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.. In: Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. (Org.). **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p- 344-378.
- MACHADO, C. R. e cols. Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. **Hum Pathol**, v. 31, n. 1, p. 3-10, Jan 2000.

MACIEL, L e cols. Ventricular Arrhythmias are Related to the Presence of Autoantibodies With Adrenergic Activity in Chronic Chagasic Patients With Preserved Left Ventricular Function. **Journal of Cardiac Failure**, v. 18, n. 5, p. 423-31, 2012.

MAGNUSSON, Y. e cols. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. **Circulation**, v. 89, n. 6, p. 2760-7, Jun 1994a.

MALIK, M.; FARRELL, T.; CAMM, A. J. Circadian rhythm of heart rate variability after acute myocardial infarction and its influence on the prognostic value of heart rate variability. **Am J Cardiol**, v. 66, n. 15, p. 1049-54, Nov 1990.

MALIK, M e cols. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. **European Heart Journal**, v. 17, p. 354–381, 1996.

MALIK, M. Heart rate variability. **Curr Opin Cardiol**, v. 13, n. 1, p. 36-44, Jan 1998.

MALLIANI, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M. Power spectrum analysis of heart rate variability: a tool to explore neural regulatory mechanisms. **Br Heart J**, v. 71, n. 1, p. 1-2, Jan 1994.

MANZULLO, E. C.; CHUIT, R. Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 317-20, 1999.

MARIN-NETO, J. A., GALLO JR, L., MANÇO, J. C., e cols. Postural reflexes in chronic Chagas's heart disease. **Cardiology**, v. 60, p. 343-357, 1975.

MARIN NETO, J. A. e cols. Mechanisms of tachycardia on standing: studies in normal individuals and in chronic Chagas' heart patients. **Cardiovasc Res**, v. 14, n. 9, p. 541-50, Sep 1980.

MARIN-NETO, J. A. e cols. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 2007.

MASUDA, M. O. e cols. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by Trypanosoma cruzi antigens. **FASEB J**, v. 12, n. 14, p. 1551-8, Nov 1998a.

MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 2, p. e114, 2007.

MEDEI, E. e cols. Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. **Int J Cardiol**, v. 115, n. 3, p. 373-80, Feb 2007.

MEDEI, E. H. et al. Antibodies with beta-adrenergic activity from chronic chagasic patients modulate the QT interval and M cell action potential duration. **Europace**, v. 10, n. 7, p. 868-76, Jul 2008.

- MEDEI, E. H. e cols. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 91, n. 4, p. 257-62, 281-6, Oct 2008.
- MEDEIROS, A.S. Eletrocardiografia de alta resolução e variabilidade da frequência cardíaca em diferentes estágios evolutivos da cardiopatia chagásica crônica. 2002. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Coordenação dos Programas de pós-graduação em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- MILLER, T.H., KRUSE, J. E. Evaluation of Syncope. **American Family Physician**, v. 72, n. 8, p. 1492-1500, 2005.
- MOLINA, R. B. e cols. Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease. **Int J Cardiol**, v. 113, n. 2, p. 188-93, Nov 2006.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009.
- MYERBURG, R. J. e cols. A biological approach to sudden cardiac death: structure, function and cause. **Am J Cardiol**, v. 63, n. 20, p. 1512-6, Jun 1989.
- NOLAN, J. e cols. Measurement of parasympathetic activity from 24-hour ambulatory electrocardiograms and its reproducibility and sensitivity in normal subjects, patients with symptomatic myocardial ischemia, and patients with diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v. 77, n. 2, p. 154-8, Jan 1996.
- OLIVEIRA, S. F. e cols. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. **Circulation**, v. 96, n. 6, p. 2031-7, Sep 1997.
- OLIVEIRA, F. A. E cols. Macroscopic aspects of chronic Chagas heart disease in aging. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, p. 486-90, 2007.
- ORGANIZATION PANAMERICANA DE LA SALUD. Estimacion cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. Montevideo, Uruguay. Organization Panamericana de la Salud, 2006.
- OWEN, N.; STEPTOE, A. Natural killer cell and proinflammatory cytokine responses to mental stress: associations with heart rate and heart rate variability. **Biol Psychol**, v. 63, n. 2, p. 101-15, May 2003.
- PAGANI, M.; MALLIANI, A. Interpreting oscillations of muscle sympathetic nerve activity and heart rate variability. **J Hypertens**, v. 18, n. 12, p. 1709-19, Dec 2000.
- PAZIN-FILHO, A. e cols. Minor segmental wall motion abnormalities detected in patients with Chagas' disease have adverse prognostic implications. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 4, p. 483-7, Apr 2006.
- PEDROSA, R. C.; CANÇADO, J. R.; DECACHE, W. [A longitudinal electrocardiogram study of Chagas' disease from the acute phase]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 26, n. 3, p. 163-74, 1993 Jul-Sep 1993.

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. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

PEDROSA, R. C.; CAMPOS, M. C. [Exercise testing and 24 hours Holter monitoring in the detection of complex ventricular arrhythmias in different stages of chronic Chagas' heart disease]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 5, p. 376-83, 2004 Sep-Oct 2004.

PORTO, C. C. The electrocardiogram in the prognosis and evolution of Chagas' disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 17, p. 313-46, Oct 1964.

PRADO, A. e cols. Arritmias ventriculares malignas en pacientes com serología positiva para la enfermedad de Chagas sin disfuncion ventricular. Primeiro Congresso Virtual de Cardiologia. San Miguel de Tucumán, 1999

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

RASSI, A.; RASSI, S. G. Sudden death in Chagas' disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 76, n. 1, p. 75-96, Jan 2001.

RASSI JR, A. "Compreendendo melhor as medidas de análise da variabilidade da frequência cardíaca". *Cardios, Seção Diagnósticos em Cardiologia*, 2004. Disponível em: <<http://www.cardios.com.br/Jornais/jornal-20/metodos%20diagnosticos.htm>>

RASSI, A. e cols. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med**, v. 355, n. 8, p. 799-808, Aug 2006.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Rev Soc Bras Med Trop**, n. 31, p. 301-314, 1998.

RIBEIRO, A. L. e cols. Active orthostatic stress and respiratory sinus arrhythmia in patients with Chagas' disease with preserved left ventricular global systolic function. **Arq Bras Cardiol**, v. 83, n. 1, p. 40-4; 35-9, Jul 2004.

RIBEIRO, A. L. e cols. Enhanced parasympathetic activity in Chagas disease still stands in need of proof. **Int J Cardiol**, v. 135, n. 3, p. 406-8, Jul 2009.

ROCHA, M.O.C. e cols. Cardiovascular function in elderly patients with chronic chagasic cardiopathy. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, p. 545-50, 2003.

ROCHA, A. L. e cols. Chronotropic incompetence and abnormal autonomic modulation in ambulatory Chagas disease patients. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, v. 11, n. 1, p. 3-11, Jan 2006.

- ROSENBAUM, M. B. e cols. Antibodies to beta-adrenergic receptors disclosing agonist-like properties in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 5, n. 4, p. 367-75, Apr 1994.
- SAHN, D. J. e cols. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, p. 1072-83, 1978.
- SALLES, G. e cols. Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-up study. **Circulation**, v. 108, n. 3, p. 305-12, Jul 2003.
- STEIN, P. K. e cols. Stability of index of heart rate variability in patients with congestive heart failure. **Am Heart J**, v. 129, n. 5, p. 975-81, May 1995.
- STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 273-80, 2000.
- STERNICK, E. B. e cols. Sudden cardiac death in patients with chagas heart disease and preserved left ventricular function. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 17, n. 1, p. 113-6, Jan 2006.
- STROM, T. B. e cols. Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 10, p. 2995-9, Oct 1972.
- TALMAN, W. T.; KELKAR, P. Neural control of the heart. Central and peripheral. **Neurol Clin**, v. 11, n. 2, p. 239-56, May 1993. ISSN 0733-8619.
- TALVANI, A. e cols. Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. **Microbes Infect**, v. 8, n. 9-10, p. 2459-64, Aug 2006.
- TEICHHOLZ, L. E. e cols. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. **American Journal of Cardiology**, v. 37, n. 1, p. 7-11, 1976
- TERZI, F. V. e cols. [Regional left ventricular dysfunction and its association with complex ventricular arrhythmia, in chagasic patients with normal or borderline electrocardiogram]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 557-61, 2010 Sep-Oct 2010.
- TUNDO, F. e cols. Heart rate turbulence and left ventricular ejection fraction in Chagas disease. **Europace**, v. 7, n. 3, p. 197-203, May 2005.
- VASCONCELOS, D. F.; JUNQUEIRA, L. F. Distinctive impaired cardiac autonomic modulation of heart rate variability in chronic Chagas' indeterminate and heart diseases. **J Electrocardiol**, v. 42, n. 3, p. 281-9, 2009 May-Jun 2009.
- VILLAR, J. C.; LEON, H.; MORILLO, C. A. Cardiovascular autonomic function testing in asymptomatic *T. cruzi* carriers: a sensitive method to identify subclinical Chagas' disease. **Int J Cardiol**, v. 93, n. 2-3, p. 189-95, Feb 2004a.

VYBRAL, T. e cols. Effect of passive tilt on sympathetic and parasympathetic components of heart rate variability in normal subjects. **American Journal of Physiology**, v. 63, pp. 1117-1120, 1989

WHA 51.14. Elimination de la transmission de la enfermedad de Chagas. 51^a. Asamblea Mundial de la Salud. Mayo, 1998.

WIELING, W. e cols. Testing for autonomic neuropathy: heart rate changes after orthostatic manoeuvres and static muscle contractions. **Clin Sci (Lond)**, v. 64, n. 6, p. 581-6, Jun 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease: Central American initiative launched. **TDR News**, v.55, p. 6, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease: Second Report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series. Geneva, Switzerland World Health Organization; 2002

XAVIER, S. S. e cols. Incidência e preditores de morte súbita na cardiopatia chagásica crônica com função sistólica preservada. **Revista da SOCERJ**. v. set/out, p. 457- 463, 2005.

XAVIER, S. S. e cols. Mecanismo de morte e grau de acometimento miocárdico na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da SOCERJ**. v. 20 mar/abril, f. 2, p. 133-139, 2007.

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do estudo: Disfunção autonômica e sua associação com anticorpos funcionalmente ativos contra receptores acoplados a proteína-G em pacientes chagásicos crônicos com função sistólica preservada.

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado para participar voluntariamente de uma pesquisa clínica. Antes de decidir a respeito de sua participação nesse estudo, é importante que você leia e entenda esse documento e o que está envolvido nessa pesquisa clínica (também chamada de estudo clínico). Esse documento, chamado de “termo de consentimento livre e esclarecido” descreve os objetivos, os procedimentos, os riscos, os benefícios, os pagamentos e os desconfortos do estudo. Esse documento também descreve o seu direito de deixar o estudo a qualquer momento. Nenhuma promessa ou garantia sobre resultados dessa pesquisa pode ser feita. Por favor, pergunte quantas vezes você achar necessário para decidir se você quer participar deste estudo. Se estiver de acordo com as informações desse documento, você deverá assiná-lo e receber uma das cópias assinadas para que possa guardá-la com você.

DESCRIÇÃO/OBJETIVOS DO ESTUDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico porque você tem uma doença chamada doença de Chagas com grau de comprometimento variável nos diferentes órgãos, principalmente o coração. O objetivo deste estudo é avaliar *se você que for submetido ao teste de inclinação (ou tilt-test, um exame em que você ficará deitado em uma maca por 20 minutos e depois será inclinado a 90 graus por 5 minutos, com eletrodos medindo a frequência cardíaca) e apresentar alterações do sistema nervoso autônomo nesse exame, também apresentará no sangue anticorpos que possam contribuir para o desenvolvimento de arritmias.*

DESENHO DO ESTUDO/DURAÇÃO/NÚMERO DE PACIENTES

Esse estudo caracteriza-se por ser um estudo clínico, prospectivo, aberto (tanto seu médico quanto você terão conhecimento sobre o resultado dos exames). É importante que você faça o teste de inclinação de acordo com as instruções dadas pelo médico do estudo (Dra. Clarissa Antunes Thiers). A duração do teste será de vinte minutos, podendo ser

interrompido em caso de qualquer desconforto que você possa apresentar. A coleta de sangue para pesquisa de anticorpos será realizada em dias e horários a serem combinados antecipadamente com você. Podemos adiantar que aproximadamente 50 pacientes irão participar deste estudo.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

PROCEDIMENTOS NA AVALIAÇÃO INICIAL

Se você decidir participar do estudo, você realizará determinados testes e procedimentos para ajudar a descobrir se você é elegível para entrar nesse estudo. Esses testes e procedimentos são chamados “procedimentos da avaliação inicial.” Os procedimentos da avaliação inicial poderão ocorrer até uma semana antes que você inicie os testes. Você será solicitado a assinar esse termo de consentimento antes que qualquer teste específico do estudo possa ser realizado. O seu médico precisará obter uma amostra de sangue após a realização do teste de inclinação (tilt-test). O seu médico perguntará sobre a sua história médica. Isto pode incluir doenças que você teve no passado, doenças diferentes da doença de Chagas que você tem atualmente (por exemplo, diabetes, hipertensão, asma) e todos os medicamentos que você tomou nas últimas semanas. A história de tratamento anteriores que você utilizou para o tratamento da sua doença de Chagas bem como quaisquer efeitos colaterais em andamento desses tratamentos anteriores serão registrados. Serão também realizados: exame físico (incluindo a medida do seu peso, altura, pressão arterial sanguínea, frequência cardíaca e temperatura corporal), um eletrocardiograma (ECG- um teste que produz um quadro gráfico da atividade elétrica de seu coração), ecocardiograma (um teste que mede a função de bombeamento de sangue do seu coração). Radiografias de torax serão realizados caso não tenham sido realizadas recentemente. Ao longo do curso do estudo, serão obtidas e enviadas para o seu prontuário cópias dessas avaliações.

Durante o acompanhamento ambulatorial, será marcada uma data para realização do teste de inclinação, preferencialmente no mesmo dia em que você tenha uma consulta agendada. É aconselhável que você esteja em jejum. O Teste avalia o comportamento do ritmo cardíaco e da pressão arterial em resposta à uma variação da postura corporal. O sistema que controla essas duas variáveis é o sistema nervoso autônomo. Por isso, ele também é chamado de estudo autonômico. Ele tem cerca de 25 minutos. Ele começa com você sendo monitorizado – o que significa a colocação de eletrodos no tórax, que captarão os batimentos cardíacos, e preso à

maca através de 3 cintos de segurança. Entre o 10º e 12º minuto do teste será solicitado que você respire profundamente, cada inspiração e expiração durando 5 segundos. No 20º minuto você passará da posição deitada na maca para a posição de inclinação (90 graus) – ainda contido na maca através de cintos de segurança. No 25º minuto você retornará à posição deitada e, finalmente, sentindo-se bem, os cintos de segurança serão soltos e os eletrodos serão retirados, permitindo que você volte às suas atividades habituais normalmente. Alguns exames de sangue serão realizados com os propósitos da pesquisa e não seriam realizados caso você não faça o teste de inclinação. O seu sangue, após processado, será armazenado e usado apenas para realização dos exames propostos, sendo posteriormente desprezados. Serão observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do seu sangue até a análise laboratorial final.

É possível que, após todos os testes terem sido revisados, você não possa fazer parte desse estudo. Da mesma forma, pode haver outras razões, pelas quais você não pode participar e, nesse caso, o seu médico discutirá todas essas razões com você.

Alguns exames de sangue ou mesmo o teste de inclinação, podem precisar ser repetidos, mas apenas caso o seu médico avalie que esses exames são necessários. Também será solicitado que você responda uma série de perguntas relacionadas à sua saúde e ao seu bem-estar global.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Enquanto estiver participando do estudo, você será solicitado a seguir a programação de visitas clínicas do estudo para monitorar sua segurança.

Durante cada visita você irá realizar as seguintes avaliações:

-Exame físico que inclui a medida do seu peso, pressão arterial sangüínea, frequência cardíaca e temperatura corporal e uma avaliação de sua progressão no estudo

-Você deve informar quaisquer sintomas que você desenvolver desde o início do estudo ou qualquer mudança nos sintomas que você relatou durante as visitas prévias

-Você também deve informar sobre quaisquer medicamentos que você tomou desde o início do estudo ou sobre qualquer mudança no medicamento que você tenha relatado nas visitas anteriores

-Depois que você interromper sua participação no estudo, o seu médico assistente (Dr Roberto Coury Pedrosa) continuará seu acompanhamento clínico.

Se, em qualquer momento, você desenvolver efeitos colaterais (efeitos não desejáveis), você deve deixar que o seu médico do estudo saiba o mais cedo possível para que a assistência médica possa ser fornecida, caso necessária

RISCOS ASSOCIADOS COM O ESTUDO

O teste de inclinação (tilt-test) é o exame específico para o diagnóstico de síncope neuromediada (vaso-vagal e neurocardiogênica), que é a principal causa de desmaio em pessoas sem doença cardíaca. O principal risco para você nesse estudo é o surgimento de sintomas decorrentes de variações posturais, como mal estar, palpitações, tonturas e desmaio. Você também deve notificar qualquer outro profissional da área de saúde que o examine, que você está participando deste estudo, especialmente caso você esteja a ponto de realizar um procedimento cirúrgico, um procedimento dental ou qualquer outro tratamento medicamentoso.

RISCOS ASSOCIADOS COM PROCEDIMENTOS

Alguns dos testes que serão realizados em você (radiografias) irão lhe expor a quantidades controladas de radiação. A coleta de sangue pode causar dor, edema, trauma local, irritação ou vermelhidão local; você pode se sentir mal ou desenvolver infecção no local da punção da agulha. É importante que você informe qualquer efeito colateral o mais cedo possível ao seu médico do estudo. Você não deve esperar até a sua próxima visita agendada

Não será solicitado que você deixe de tomar qualquer medicamento de que você necessite. Você deve relatar qualquer uso de medicamentos (que não necessite de prescrição, que necessite de prescrição) ou uso de drogas ilícitas, que você esteja tomando em qualquer momento durante este estudo.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS ASSOCIADOS COM O ESTUDO

Não há nenhuma garantia de que você se beneficiará ao fazer parte neste estudo. Um possível benefício para você em participar neste estudo pode incluir o diagnóstico precoce de disautonomias (alterações do sistema nervoso autônomo, como uma frequência cardíaca que não se eleva ou não se reduz quando deveria) e orientações quanto às medidas que possam reduzir seus sintomas – caso surjam. Nenhum benefício adicional será fornecido a você como

resultado dos testes de pesquisa realizados em suas amostras de sangue. Entretanto, caso você não seja beneficiado pessoalmente, o conhecimento acumulado com a sua participação neste estudo pode beneficiar outros pacientes no futuro.

CONFIABILIDADE

As informações de seu histórico médico são confidenciais e serão tomadas todas as precauções para preservá-las. A menos que requerido judicialmente, apenas o investigador, e auditores terão acesso a dados confidenciais de seu prontuário médico e dados que o identifiquem pelo nome. Os resultados dos exames realizados e os demais dados da pesquisa serão de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

Assinando este consentimento você estará autorizando para estas pessoas o acesso ao seu prontuário médico e aos seus dados.

Todo o material biológico coletado será utilizado apenas neste estudo para realização dos exames laboratoriais específicos no próprio protocolo. Este material não será utilizado em outros estudos ou para outros fins.

NOVOS ACHADOS

Durante o estudo você será informado de qualquer nova descoberta significativa sobre os resultados de exames, que possa alterar sua vontade de continuar participante deste estudo.

RESPOSTAS ÀS PERGUNTAS SOBRE ESTE ESTUDO

Se durante o estudo clínico você tiver problemas ou queira esclarecer alguma dúvida sobre a conduta deste estudo, entre em contato com o: Dra. Clarissa Antunes Thiers (pelos telefones: 76288857 ou 34642112) ou Dr. Roberto Coury Pedrosa (pelos telefones: 2562-2618 ou 2562-2436). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ - Sala 01D-46/1º andar; telefone 2562-2480 – Email: cep@.hucff.ufrj.br

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar bem como desistir do mesmo a qualquer momento, antes ou durante o período do estudo sem qualquer prejuízo ao seu tratamento. Caso você decida descontinuar do estudo após seu início, para sua própria segurança você deverá retornar ao hospital para conversar com o médico do estudo para que ele possa orientá-lo sobre as possíveis opções.

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO

*Li, ou alguém leu para mim, as informações contidas neste documento antes de eu assinar este termo de consentimento. Minha participação neste estudo é voluntária. Poderei retirar-me deste estudo a qualquer momento sem causar mal-estar ou comprometer meu atendimento médico neste hospital, e nem violar meus direitos. **Estou ciente de que minha participação implica na minha renúncia ao direito de indenização ou ressarcimento.** Minha participação neste estudo pode também ser encerrada pelos médicos envolvidos, por razões que serão explicadas. Tive chance de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram plenamente. Entendo também que posso contatar os indivíduos abaixo mencionados no caso de qualquer preocupação relativa a este estudo.*

Por meio deste, decido voluntariamente participar deste estudo.

Afirmo que recebi uma cópia assinada deste acordo de consentimento livre e esclarecido e que a minha assinatura neste consentimento, como participante, não significa que estou renunciando aos meus direitos legais, de acordo com as leis vigentes no Brasil.

Nome do participante (letra de forma)

Assinatura

Data

Atestado da pessoa que obteve o consentimento

Uma das pessoas listadas abaixo, ou ambos, explicou cuidadosamente ao participante a natureza do estudo de pesquisa acima. Atesto por meio deste que, segundo meu melhor entendimento, a pessoa que assinou este termo de consentimento entende a natureza, os requisitos, os benefícios e os riscos de participar e que sua assinatura é válida. Nenhum problema médico ou de linguagem prejudicou seu entendimento.

Nome do investigador (letra de forma) e assinatura

Assinatura

Data

Informação para contato com os membros da equipe da pesquisa:

Título: _____ Nome: _____ Telefone: _____

Assinatura do coordenador da pesquisa-Médico investigador

Data

ANEXO 2 - TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA-G NO SORO DOS PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

1- Avaliação do efeito dos soros dos pacientes em coração isolado do coelho

Coelhos jovens, pesando 1,5 a 2,0 kg, foram sacrificados por deslocamento cervical e seus corações rapidamente removidos. A aorta foi canulada, permitindo a perfusão da circulação coronariana com solução de Tyrode (NaCl= 127 mmol/L; KCl= 2,7 mmol/L; NaHCO₃= 12 mmol/L; MgCl₂= 0,5 mmol/L; glicose= 10 mmol/L e CaCl₂= 2,7 mmol/L, pH= 7,2) a 36°C ± 0,2. O coração foi mantido na posição vertical, átrios para cima, e imerso em solução de Tyrode aquecida, contida em um frasco de vidro. Três eletrodos de vidro, cheios com solução a 1mol/L de NaCl, foram posicionados no interior do frasco de vidro, para obter o registro eletrocardiográfico. Dois dos eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial de alto ganho (3A9, TEKTRONIX Inc, Beaverton, OR) e o terceiro foi conectado a terra (eletrodo de referência).

O protocolo experimental consistiu de um registro controle de 30 minutos na solução de Tyrode, pelo menos 30 minutos em perfusão na solução contendo Tyrode e soro humano total (diluído 1:100) ou fração IgG+ (0,02 a 0,06 mg proteína/ml) ou fração IgG- (0,2 a 0,6 mg proteína/ml) e, finalmente, lavagem por 30 minutos com a solução de Tyrode. Os efeitos das frações IgG+ e IgG-, obtidas do mesmo paciente, foram testados na mesma preparação de coração, com uma lavagem de 30 minutos entre a aplicação de cada uma das frações.

O ECG foi continuamente monitorado em um osciloscópio (561 TEKTRONIX, Inc, Beaverton, OR) e registrado em um polígrafo (2200, GOULD Inc, Glen Burnie, MD). Os registros foram feitos a cada 5 minutos, ou quando se observou alteração no ritmo ou na frequência cardíaca. Os experimentos foram feitos somente se nenhuma alteração significativa no ECG basal foi observada por 30 minutos durante o controle.

A análise do ECG incluiu a frequência da onda P (frequência sinusal), a presença de bloqueio na condução atrial e atrioventricular e outras arritmias. O método de registro do ECG do coração isolado de coelho foi previamente descrito em detalhes por Perez e cols (1984).

2- Fracionamento do soro

Uma vez identificados os soros de pacientes com doença de Chagas que induziam alterações eletrofisiológicas em corações isolados de coelhos adultos, perfundidos pela técnica de Langendorff, foi realizado um fracionamento do soro total e os testes foram repetidos, permitindo identificar em que fração se encontrava o fator arritmogênico.

O fracionamento do soro foi feito através da precipitação do mesmo pelo sulfato de amônio, seguido pela cromatografia de troca iônica em coluna de sefarose-DEAE-SL6B. A precipitação dos anticorpos no soro foi feita com solução de sulfato de amônio a 50%, seguido de diálise durante toda a noite (12 horas), com solução de tampão fosfato (pH 8,0). A seguir, a separação da IgG foi realizada através da cromatografia de troca iônica em coluna de sefarose-DEAE. A solução dialisada foi passada através da coluna matrix-DEAE e frações de 1,5 ml são coletadas, durante adição contínua de tampão fosfato à coluna. A fração IgG estava usualmente presente nas frações coletadas entre a quarta e a décima quinta amostragem, detectadas por espectrofotometria a 280nm. Após toda IgG ser coletada, a proteína restante foi eluída da coluna, por solução de 500mM de NaCl, obtendo assim a fração depletada de IgG (IgG-). Ambas as frações IgG+ e IgG- foram dialisadas durante toda a noite (12 horas) na solução de tampão fosfato. Após a diálise, a concentração de proteína nas frações foi determinada pelo método de Bradford (1976).

O grau de purificação do método, usado no fracionamento do soro, foi avaliado pela imunodifusão das frações de IgG+ e IgG- contra anticorpos anti-Imunoglobulina humana total e anti-Imunoglobulina G humana.

O efeito muscarínico, na resposta a fração IgG do paciente chagásico crônico, foi testado pela adição de atropina ao perfusato na preparação do sangue. O efeito β -adrenérgico pela adição de propranolol.

A técnica utilizada é descrita em detalhes por Farias de Oliveira e cols (1997).


REFERÊNCIAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72: 248-54.

FARIAS DE OLIVEIRA, S. e cols. Sera from chronic Chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. **Circulation** 1997; 96: 2031-7.

PEREZ, M.A. e cols. Effect of salicylate on normal and digoxin-intoxicated isolated rabbit heart. **Braz J Med Biol Res.** 1984; 17: 189-96.

ANEXO 3 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) - FOLHA DE APROVAÇÃO


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
 Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
 Faculdade de Medicina
 Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador: Alice Helena Dutra Violante
 Médico - Prof. Associado
 membros Titulares:
 Elizabeth Maria Adisa de Fereida
 Antropólogo - Prof. Associado
 Eliza Regina Ambrosio
 Assistente Social - Mestre
 Helena Wazyosky
 Representante dos Usuários
 Lúcia da Conceição de Araújo Marques
 Enfermeiro - Mestre
 Mariana Zornith
 Psicóloga
 Mário Teixeira Antonio
 Farmacêutico - Especialista
 Nilmair Conceição Fernandes
 Médico - Prof. Adjunto
 Paulo Araújo Barros
 Médico - Prof. Assistente
 Roberto Coury Pedrosa
 Médico - Doutor
 Roberto Nakashi Sudo
 Médico - Prof. Titular
 membros Suplentes:
 Anna Paula Trindade Rocha Pierucci
 Nutricionista - Professor Auxiliar
 Elizabeth Maria Trupe
 Médico - Doutor
 Carlos Alberto Guimarães
 Médico - Prof. Associado
 Ana Tereza Rocco Suassuna
 Assistente Social
 Lúcia Helena Luzia Vieira Arrim
 Biólogo - Mestre
 Gilvan Renato Mury de Souza
 Médico - Prof. Associado
 Maria Bernadete Tavares Soares
 Representante dos Usuários
 Mariana da Conceição Lopes Buarque
 Assistente Social
 Marangela Oliveira da Silva
 Enfermeiro
 Michel Jean Marie Thiolent
 Sociólogo - Prof. Adjunto
 Nathalia Henrique Silva Carado
 Médico - Professor Adjunto
 Renan Maria Varier Rodrigues Almeida
 Engenheiro - Professor Adjunto
 Rui Hestrad
 Médico - Prof. Adjunto

Rio de Janeiro, 08 de junho de 2010.

CEP - MEMO – n.º 395/10

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Clarissa Antunes Thiers

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 040 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 233/09 - CEP

Título: “Prevalência da resposta vagal cardiovascular alterada e de anticorpos (IgG) funcionantes contra receptores neurotransmissores cardíacos em pacientes chagásicos crônicos sem disfunção ventricular”

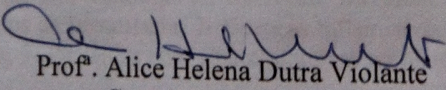
Pesquisador (a) responsável: Dra. Clarissa Antunes Thiers

Data de apreciação do parecer: 27/05/2010

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 27/11/2010, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,


 Prof.ª. Alice Helena Dutra Violante
 Coordenadora do CEP

**ANEXO 4 – ARTIGO APROVADO PARA PUBLICAÇÃO NO “ARQUIVOS
BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA**

TÍTULO: Disfunção autonômica e anticorpos contra receptores anti-m2 e anti-β1 em pacientes chagásicos

TÍTULO REDUZIDO: Disfunção autonômica na doença de Chagas

TITLE: Autonomic dysfunction and antibodies against anti-m2 and anti-β1 receptors in chagasic patients

RESUMO:

Fundamento: A morte súbita é a principal causa de óbito na doença de Chagas, acometendo pacientes mesmo em fases precoces da doença. É reconhecido o comprometimento do sistema nervoso autônomo nessa patologia e seu potencial como deflagrador de arritmias malignas quando associado a alterações estruturais ou metabólicas.

Objetivo: Buscamos identificar, em pacientes chagásicos com função sistólica preservada, o comprometimento do sistema nervoso autônomo e sua associação com anticorpos funcionalmente ativos contra receptores anti-m2 e anti-β1 .

Métodos: Através da análise espectral da variabilidade RR durante teste de inclinação passiva, pacientes chagásicos crônicos foram comparados com controles saudáveis pareados por idade. Posteriormente, a associação de disfunção autonômica com anticorpos funcionalmente ativos com ação anti-m2 e anti-β1 foi pesquisada pelo método de Langendorf.

Resultados: Observamos que pacientes chagásicos sem disfunção ventricular expressam atividade parassimpática frente a um estímulo vagal, porém com menor intensidade em relação aos controles. Pacientes chagásicos com anticorpos anti-m2 ou anti-β1 apresentaram uma redução ainda mais expressiva da resposta vagal durante a arritmia sinusal respiratória, independente da presença de lesão estrutural. Entretanto, a associação de ambos promoveu resposta ao estímulo vagal similar aos chagásicos sem a presença dos mesmos.

Conclusão: A menor reserva vagal em pacientes chagásicos com função preservada esteve associada à presença de anticorpos anti-m2 ou anti-β1 funcionalmente ativos, e não à presença de lesão cardíaca estrutural.

ABSTRACT

Background: Sudden death is the leading cause of death in Chagas' disease, affecting patients even in early stages of the disease. It is noteworthy the commitment of the autonomic nervous system in this pathology and its potential as a trigger of malignant arrhythmias when associated with structural or metabolic changes.

Objective: We sought to identify, in chagasic patients with preserved systolic function, the impairment of the autonomic nervous system and its association with functionally active antibodies against receptors anti-m2 and anti- β 1.

Methods: We performed spectral analysis of RR variability during passive tilt testing, during which chronic chagasic patients were compared with age-matched healthy controls. Later, the association of autonomic dysfunction with functionally active antibodies with an anti-m2 and anti- β 1 was investigated by the Langendorf method.

Results: We observed that chagasic patients with no ventricular dysfunction are able to express parasympathetic vagal stimulation, but with less intensity compared to controls. Chagasic patients with anti-M2 or anti- β 1 showed a further significant reduction of the vagal response during respiratory sinus arrhythmia, despite the presence of structural damage. However, the association of both promoted response to vagal stimulation similar to chagasic patients without their presence.

Conclusion: The lower vagal reserve in Chagas patients with preserved function was associated with anti-M2 antibody or anti- β 1 functionally active, and not the presence of structural heart damage.

INTRODUÇÃO

Cem anos após a sua descrição por Carlos Chagas em 1909, a doença de Chagas (DC) ainda representa um desafio às Organizações de Saúde. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, ainda que a transmissão vetorial tenha sido interrompida em países como o Brasil, Chile e Uruguai, a prevalência de doentes com cardiopatia chagásica crônica foi estimada em 18 a 20 milhões de indivíduos na América Latina, com 300.000 novos casos a cada ano e 50.000 mortes anuais associadas a doença ¹. No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos da doença, com aproximadamente 3 milhões de indivíduos infectados ².

Não há evidências suficientes para suportar a necessidade de tratamento imediato em todo paciente chagásico crônico que apresenta função preservada, embora haja estudos sugerindo um aumento na morbi-mortalidade neste grupo de pacientes³⁻¹¹. Uma recente revisão tem sugerido que em pacientes nesta forma de apresentação cardíaca (ECG alterado e alteração regional ao ecocardiograma, porém com função ventricular preservada), a necessidade de futura avaliação deve ser julgada em bases individuais¹¹. A I Diretriz Latino Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica, recentemente publicada, igualmente reconhece a existência desse grupo de pacientes e seu valor prognóstico para morte súbita¹².

Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos têm elucidado uma relação entre o sistema nervoso autônomo (SNA) e a função imunológica, e têm contribuído para desvendar alguns mecanismos envolvidos nesta interação. Na cardiopatia chagásica crônica, nosso grupo tem participação ativa neste sentido¹³⁻¹⁸. É possível que anticorpos circulantes funcionalmente ativos, contra receptores acoplados à proteína G capazes de interferir com receptores de ambos os sistemas, parassimpático e simpático, afetem fisiopatologicamente o comportamento autonômico cardíaco e modulem propriedades eletrofisiológicas envolvidas em mecanismos de arritmias ventriculares complexas¹⁸⁻²⁰. Tais anticorpos não são mero epifenômeno da destruição do sistema nervoso autônomo e são independentes das lesões cardíacas^{14,20,21,22,23}. Recentemente, mostramos que, no paciente chagásico com função sistólica preservada, a modulação autonômica simpática cardíaca é afetada. Isto foi demonstrado pela destruição do nervo cardíaco que ocorreu a nível ventricular demonstrado pela cintilografia com ¹²³I-MIBG²³.

Estudos da variabilidade RR (VRR) têm sido estabelecidos como real e reproduzível marcador de função autonômica cardiovascular²⁴. Dentre as manobras para avaliação da resposta parassimpática, a arritmia sinusal respiratória (ASR) tem demonstrado ser o estímulo mais potente para evocar a ação do nervo vago^{25,26}. Na doença de Chagas, no grupo sem disfunção ventricular, a avaliação do sistema nervoso autônomo através da VRR por diferentes métodos, tem evidenciado comprometimento variável da modulação parassimpática e simpática²⁷⁻³⁰. No presente estudo buscamos identificar, dentre os pacientes chagásicos sem disfunção ventricular, aqueles com alteração da modulação autonômica vagal sobre a VRR em resposta à ASR e à manobra de estimulação simpática fisiológica (inclinação passiva a 70°), e correlacioná-la à presença de anticorpos funcionalmente ativos contra receptores cardíacos muscarínicos m2 e adrenérgico β 1.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo de série de casos realizado entre Outubro/2009 e Agosto/2010. A seleção dos pacientes foi feita no ambulatório de cardiopatia chagásica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - UFRJ/HUCFF. De 310 indivíduos acompanhados regularmente, 76 pacientes que tiveram os soros caracterizados para a presença de anticorpos funcionalmente ativos contra receptores acoplados à proteína G (anti-m2 e/ou anti-β1) foram selecionados. Foram excluídos do estudo pacientes com doenças crônicas, especialmente cardiovasculares; com fração de ejeção (FE) menor que 50%; arritmias cardíacas freqüentes e/ou ritmos não sinusais; diabetes mellitus; doença de Parkinson ou neuropatias; pacientes em uso de medicações que pudessem interferir com o sistema cardiovascular, com doença pulmonar obstrutiva crônica, disfunção tireoidiana ou renal, gravidez, alcoolismo, tabagismo e aqueles usando drogas esteróides. Os restantes 41 pacientes (17 homens; idade entre 26 e 75 anos) com diagnóstico definitivo para doença de Chagas (2 diferentes testes sorológicos com reação positiva para o *T cruzi*) tinham história, exame físico e os seguintes exames normais: hemograma completo, hormônio estimulante da tireóide (TSH), T4 livre, glicose, potássio, uréia e creatinina. Todos os pacientes tinham o Holter de 24 horas livre de arritmias freqüentes; ecocardiograma (ECO) normal ou alterado (entende-se como ECO alterado a presença de qualquer alteração segmentar detectável, mas com FE > 50%); eletrocardiograma (ECG) de 12 derivações normal ou alterado (entende-se por ECG alterado a presença de bradicardia sinusal – FC < 50 bpm, bloqueio completo ou incompleto de qualquer ramo, bloqueio atrioventricular em qualquer grau, extrasístoles ventriculares monomórficas ou polimórficas, área eletricamente inativa e taquicardia ventricular não sustentada); radiografia de tórax normal e ausência de isquemia miocárdica e/ou arritmias ventriculares esforço induzidas no teste ergométrico.

Quarenta e quatro voluntários sadios (9 homens, idade variando de 15 a 75 anos) foram os controles. Todos os controles e chagásicos examinados estavam em ótimas condições física e mental, não apresentam história de sedentarismo, realizavam atividades regulares diárias, sem uso de qualquer fármaco. Os pacientes chagásicos não receberam tratamento específico anti-*T cruzi*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição sob o nº 233/09 e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido em conformidade com a legislação vigente e com as normas do CEP do HUCFF-UFRJ.

Ambos os grupos foram submetidos à avaliação da VRR através do teste de inclinação passiva, em sala climatizada e com isolamento acústico, após jejum de 4 horas. O exame foi

realizado ao longo de 3 etapas – ASR, repouso e inclinação passiva a 70°. A primeira etapa consistiu em inspirar e expirar a 12 incursões/minuto durante 2 minutos, entre o 10° e 12° minuto. A segunda etapa foi realizada em repouso – no qual a VRR foi analisada sem qualquer estímulo, entre o 15° e 20° minuto. A terceira e última etapa iniciou-se no 20° minuto, quando os pacientes foram inclinados passivamente a 70° e os complexos foram avaliados até o 25° minuto²⁶.

A VRR foi analisada no domínio da frequência. Foram avaliados a alta frequência (AF) em termos percentuais - que representa o componente vagal do sistema nervoso autônomo cardiovascular, e a relação baixa/alta (rel B/A) – que expressa o balanço entre o componente simpático e parassimpático. A alta frequência e a baixa frequência foram medidas em unidades normatizadas, que indicam o valor relativo de cada componente em relação ao poder total do espectro. A reserva vagal foi avaliada pelo aumento da AF em termos percentuais durante a ASR, comparando-a ao repouso. A modulação vagal perante o estímulo simpático foi calculada pelo incremento na relação B/A nos primeiros cinco minutos após inclinação passiva, comparada com o repouso - na qual grandes diferenças expressam melhor resposta.

Apenas no soro de pacientes chagásicos foi pesquisada presença de anticorpos circulantes funcionalmente ativos, contra receptores cardíacos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti-β1) através do método de Langendorf em corações isolados de coelhos¹³. A presença de anti-m2 foi definida quando ocorria, no experimento *in vitro*, uma diminuição de 10% da frequência cardíaca sinusal em relação ao controle ou algum grau de bloqueio intra-atrial ou átrio-ventricular, revertidos após adição de atropina. A presença de anti-β1 foi definida quando ocorria, no experimento *in vitro*, um aumento de 5% na FC sinusal em relação ao controle, revertido após adição de propranolol^{31,32}.

A separação da fração IgG com ação muscarínica e adrenérgica foi feita através de purificação em coluna de afinidade. A fração IgG foi separada do soro dos pacientes por precipitação em (NH₄)₂SO₄ 50% e diálise extensiva contra PBS, pH 7.4, ao longo de 24 horas, a 4°C. A imunoglobulina assim preparada foi carregada numa coluna de gel de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (CNBr) (Pharmacia), a qual o peptídeo correspondente à segunda alça extracelular dos receptores (m2 ou β1) foi covalentemente ligado. Após lavagem com PBS, a fração da imunoglobulina que se ligou à coluna foi eluída com tiocianato de potássio 3M (pH 7.4), seguida rapidamente de extensiva diálise contra PBS. Esta fração assim obtida foi utilizada no coração isolado de coelho para a caracterização do soro, seguindo as

metodologias descritas acima¹³.

Agradecemos à FAPERJ e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento desta pesquisa.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi usado o Stata software (versão 8.0, 2003) e CIA software. Os valores da mediana com seus respectivos interquartis foram reportados devido à distribuição assimétrica dos dados. Variáveis foram comparadas pelo teste T de Student. Nós também apresentamos o intervalo de confiança 95% para as diferentes medianas. O valor de $p < 0,05$ foi aceito como significativo para toda análise no estudo.

RESULTADOS

Foram avaliados 41 pacientes chagásicos (17 homens e 24 mulheres) e 44 controles (9 homens e 35 mulheres). No grupo chagásico, a idade oscilou entre 26 e 75 anos, mediana de 57 anos e entre 15 e 75 anos no grupo controle, mediana de 38 anos. O nível de atividade física foi similar entre os grupos. Os chagásicos apresentaram IMC médio de 23,3, hemoglobina média de 13 g/dL e contagem média de leucócitos igual a 12.9 mil/mm³. Todos apresentavam TSH dentro da faixa da normalidade, com valor médio de 2,92 mUI/L.

Os achados mais frequentes encontrados no eletrocardiograma e ecocardiograma transtorácico dos pacientes chagásicos estão discriminados na tabela 1. Apenas 2 pacientes (4,9%) apresentaram disfunção leve – a FE média foi de 64,9% (Teicholz). Todos os pacientes do grupo controle apresentavam ECG normal. Não foi realizado ecocardiograma no grupo controle.

A avaliação da atividade parassimpática através do componente de AF durante ASR demonstrou que os pacientes chagásicos com função de VE preservada são capazes de expressar atividade parassimpática durante a manobra da ASR, tendo-se o repouso como estado basal (figura 1). Entretanto, comparando os pacientes chagásicos aos controles, os primeiros manifestaram atividade parassimpática significativamente menor em relação aos últimos ($p=0,00002$), expressando uma reduzida reserva vagal (tabela 2). No grupo chagásico, durante a inclinação passiva a 70° houve uma elevação da relação B/A em relação ao repouso ligeiramente superior à observada nos controles ($p=0,01$), com maior dispersão de valores conforme

demonstrado na figura 2. Este dado mostra que a disfunção parassimpática também se expressa na inclinação.

Conforme a figura 3, os pacientes chagásicos foram analisados de acordo com a presença de anticorpos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti-β1) e subdivididos em 4 grupos: ausência de anticorpos (n=11), presença de anti-m2 puro (n=2), presença de anti-m2 associado a anti-β1 (n=8) e, finalmente, presença de anti-β1 puro (n=19). Observamos que pacientes que apresentaram apenas anticorpos anti-m2 ou anti-β1 puros, expressaram menor modulação vagal durante ASR. Entretanto, quando associados, os mesmos promoveram um aumento da resposta vagal, comparados ao grupo de pacientes sem anticorpos.

Independente da presença de alterações eletrocardiográficas, encontramos resposta similar quanto aos parâmetros de variabilidade RR medidos (tabela 3). Do mesmo modo, o coeficiente de contigência entre ECG alterado e a identificação de anticorpos com ação anti-m2 foi de 0,1388, mostrando que não há associação entre as variáveis.

DISCUSSÃO

Em sintonia com estudos prévios que abordaram pacientes chagásicos crônicos com função ventricular preservada, o presente trabalho mostra que, ainda que persista uma atividade parassimpática evocada pela arritmia sinusal respiratória neste grupo de pacientes, eles apresentam menor reserva vagal em relação aos controles^{27-29,33}. Esta redução da reserva vagal não foi acompanhada de alteração na frequência cardíaca basal do paciente. O mais relevante e original resultado foi a observação de que esta redução esteve associada à presença de anticorpos funcionalmente ativos acoplados à proteína G – particularmente anticorpos com ação anti-β1. Este achado foi independente da presença de lesões cardíacas estruturais, sugerindo que a modulação vagal possa estar condicionada a presença de anticorpos.

Embora sujeito a extensa investigação, a causa da disfunção autonômica presente na miocardite chagásica crônica não tem sido ainda claramente estabelecida. Vários estudos demonstram que o processo inflamatório está diretamente relacionado com a intensidade da resposta imunológica tecidual^{34,35}. Por outro lado, a ligação entre sistema nervoso autônomo parassimpático e o processo de regulação imunológica foi sugerida há mais de 30 anos, quando foi notada atenuação da citotoxicidade do linfócito T pela estimulação colinérgica muscarínica³⁶. Foram descritas vias de sinalização aferentes e eferentes que integram um arco reflexo, o

reflexo “neuroimunológico” ou reflexo “inflamatório”. Dessa forma, os dois sistemas (nervoso e imunológico) podem se comunicar de forma bidirecional, utilizando como mediadores das informações citocinas e neurotransmissores comuns aos dois sistemas. A via eferente do sistema nervoso central (SNC) atua sobre o Sistema Imunológico (SI) por meio do sistema nervoso parassimpático, a denominada via antiinflamatória colinérgica. O SN parassimpático inerva órgãos do SI, e seu mediador acetilcolina age em células do sistema imune, em especial nos macrófagos, via ativação do receptor da acetilcolina³⁷. De fato, a contribuição da regulação imunológica na disautonomia foi hipotetizada mesmo em estudos iniciais desta doença devido à bradicardia inapropriada presente nos pacientes chagásicos³⁸. Um dos prováveis mecanismos é a reatividade cruzada (mimetismo molecular)¹³.

No presente estudo, foi possível observar que anticorpos circulantes funcionalmente ativos contra receptores cardíacos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti-β1) quando associados, atuam de modo positivo na modulação parassimpática, fato manifestado pelo aumento do componente de alta frequência na análise de VRR supostamente por uma interação entre eles. Entretanto, a ação isolada de ambos promove menor modulação vagal, particularmente nos pacientes com anti-m2 isoladamente. Esses dados permite inferir uma relação entre esses anticorpos e a modulação vagal. Em trabalhos prévios, nosso grupo demonstrou que o soro de pacientes chagásicos crônicos com ação muscarínica foi capaz de reduzir a FC e/ou gerar distúrbios de condução atrioventricular no coração isolado de coelho^{13-18,21}. Recentemente, Ribeiro e cols mostraram correlação entre altos níveis de anti-m2 detectados pelo método ELISA e redução no componente de alta frequência na análise de VRR ($r=-0.32$, $p=0.023$)²⁰. Os autores sugerem que esta disfunção vagal seja pelo efeito inibitório do anti-m2, embasado no fenômeno de dessensibilização.

Outro achado no presente estudo é a manutenção da frequência cardíaca basal dos pacientes chagásicos apesar da redução na reserva vagal. Esta manutenção da FC poderia ser justificada pela não dessensibilização dos receptores muscarínicos m2. Em outras palavras, os anticorpos agonistas contra receptores cardíacos muscarínicos alteram a modulação vagal (índices de VRR) mas não o tônus vagal. Em trabalho prévios, mostramos que anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos contra receptores muscarínicos m2 não induziram uma dessensibilização dos receptores no coração isolado de coelho^{13,14}. A falta de dessensibilização dos receptores muscarínicos m2 não é particularmente surpreendente, já que ambos os ligantes (acetilcolina e IgG) possivelmente interagem em diferentes locais nos

receptores situados na superfície das células do nódulo sinusal.

Nosso grupo controle apresentou idade média inferior à encontrada nos chagásicos. Este efeito da idade na disfunção autonômica na doença de Chagas ainda não está bem claro. Resende e cols comparando idosos saudáveis, adultos jovens e idosos chagásicos, demonstraram não haver diferenças na VRR entre os idosos frente aos estímulos simpático e parassimpático. Uma justificativa aventada pelos autores seria a de que as alterações da senescência já promoveriam resposta autonômica distinta, mascarando as alterações induzidas pela doença de Chagas³⁹.

A maioria dos estudos disponíveis, realizada em vários centros independentes, mostra que são praticamente constantes as lesões do sistema nervoso intracardíaco, principalmente a agressão ao sistema parassimpático^{39,40}. Por outro lado, sabemos que o ECG alterado expressa comprometimento miocárdio. Então, seria plausível supor que a disfunção autonômica (índices de VRR) poderia ser secundária a lesão cardíaca estrutural. Neste estudo, nós mostramos que o ECG alterado não esteve associado ao comprometimento da VRR, tornando esta hipótese menos provável. Villar e colaboradores igualmente não encontraram, dentre os pacientes com ECG alterado, diferenças no componente de AF em repouso²⁵. Também, Rocha e colaboradores mostram que a modulação autonômica (índices de VRR) é independente da disfunção ventricular cardíaca³³.

A presença de anticorpos circulantes funcionalmente ativos contra receptores cardíacos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti-β1) em pacientes com doença de Chagas é um achado já estabelecido. Em estudos prévios, nosso grupo e outros reportamos que estes anticorpos são independentes de disfunção ventricular^{13,21,40}. A busca por eventual correlação entre a presença de anticorpos circulantes funcionalmente ativos contra receptores cardíacos acoplados à proteína G (anti-m2 e anti-β1) e alterações eletrocardiográficas, foi realizada através do coeficiente de contingência. O valor encontrado de 0,1388 torna pouco provável que o primeiro evento justifique o segundo.

A avaliação da relação baixa alta durante a inclinação permite observar a modulação do sistema simpático sobre o vago. Embora em termos absolutos haja menor ação parassimpática durante o estímulo ortostático, como existe frequentemente um comprometimento concomitante do componente simpático do SNA na doença de Chagas, a relação entre eles pode não sofrer alteração na medida em que ambos estão reduzidos⁴⁰. No presente trabalho, ela foi ligeiramente

maior nos chagásicos em relação aos controles, fato possivelmente justificado pela menor reserva vagal (representada pela AF que compõe o denominador da relação).

Relevância clínica: A disfunção autonômica na doença de Chagas pode estar envolvida no mecanismo de lesão-reparação do coração em diferentes situações clínicas. Pouco se conhece sobre os efeitos da estimulação da via antiinflamatória colinérgica sobre a modulação das arritmias cardíacas e morte súbita na doença de Chagas. Os resultados do presente estudo poderão trazer importantes informações a respeito da interação do sistema nervoso autônomo e sua relação com o sistema imunológico através da via antiinflamatória colinérgica, abrindo uma linha de investigação que colocará a modulação farmacológica da atividade vagal como alvo terapêutico em diferentes modelos de lesão-reparação do miocárdio - com reflexo nas arritmias cardíacas e morte súbita. Contudo, até o presente momento, isto ainda tem sido muito mais uma hipótese teórica do que propriamente um fenômeno clínico, e ainda necessita ser demonstrado.

CONCLUSÃO

A menor reserva vagal em pacientes chagásicos com função preservada esteve associada à presença de anticorpos acoplados à proteína G funcionalmente ativos, e não à presença de lesão cardíaca estrutural.

TABELAS

Tabela 1 – Alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas de pacientes chagásicos

Variáveis	Grupo Chagásico (n=41)	
ECG	Normal	19 (46,3%)
	BAV	5 (12,2%)
	HBAE	8 (19,4%)
	BRD	4 (9,7%)
	BRD + HBAE	5 (12,2%)
	BAV + BRD + HBAE	1 (2,4%)
ECOTT	Normal	19 (46,3%)
	Déficit de relaxamento	18 (44%)
	Alteração segmentar	11 (27%)
	Disfunção leve	2 (4,9%)

ECG - eletrocardiograma / ECOTT – ecocardiograma transtorácico / BAV – bloqueio atrioventricular / HBAE – hemibloqueio anterior esquerdo / BRD – bloqueio de ramo direito

Tabela 2 – Dados da variabilidade RR no domínio da freqüência em pacientes chagásicos e controles, durante arritmia sinusal respiratória, repouso e inclinação (mediana e intervalo interquartil)

Variáveis	Chagásicos (IQ) (n = 41)	Controles (IQ) (n = 44)	p
FC média	69 bpm	72 bpm	0,64
AF – ASR (IQ)	33,9% (IQ 20,8 - 48,4%)	50,4% (IQ 38,8 - 69,2%)	
AF – repouso (IQ)	11,9% (IQ 7,6 - 22,6%)	20,5% (IQ 13,7 - 26,5%)	0,16
AF – inclinação (IQ)	4,5% (IQ 1,8 - 16,5%)	9,7% (IQ 3,6 - 19,4%)	0,60
Relação B/A - ASR (IQ)	0,3 (IQ 0,2 - 0,7)	0,2 (IQ 0,1 - 0,3)	0,01
Relação B/A - repouso	1,8 (IQ 0,9 - 2,9)	2,0 (IQ 1,1 - 2,8)	0,88
Relação B/A - inclinação	5,2 (IQ 2,5 - 15,0)	4,1 (IQ 2,1 - 8,2)	0,28

FC – freqüência cardíaca / AF – alta freqüência / ASR – arritmia sinusal respiratória / IQ – intervalo interquartil
Relação B/A – relação baixa/alta

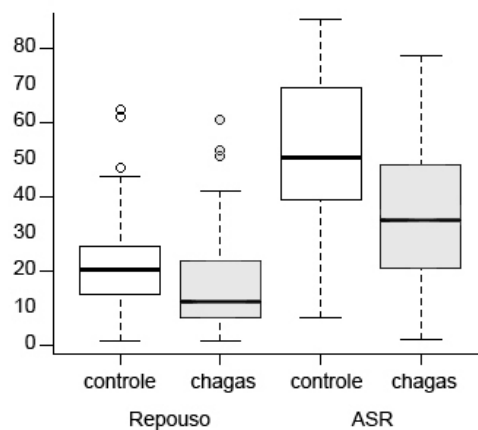
Tabela 3 - Dados da variabilidade RR no domínio da freqüência em pacientes chagásicos com ECG normal e alterado, durante arritmia sinusal respiratória, repouso e inclinação (mediana e intervalo interquartil)

	Chagas ECG normal (n=19)	Chagas ECG alterado (n=22)	p
AF - ASR	40,5% (IQ 21,2 - 49,8)	33,0% (IQ 21,6 - 37,4)	0,59
AF - repouso	13,3%(IQ 7,9 - 22,8)	11,45%(IQ 7,3 - 21,9)	0,74
AF - inclinação	3,9% (IQ 1,5 - 8,7)	10,8% (IQ 3,1 - 22,9)	0,14
Relação B/A - ASR	0,3 (IQ 0,1 - 0,5)	0,5 (IQ 0,2 - 1,2)	0,3167
Relação B/A - repouso	1,6 (IQ 1,3 - 3,3)	1,95 (IQ 0,8 - 2,8)	0,32
Relação B/A - inclinação	5,3 (IQ 4,3 - 19,9)	3,2 (IQ 1,4 - 7,5)	0,29

AF – alta freqüência / ASR – arritmia sinusal respiratória / IQ – intervalo interquartil / Relação B/A – relação baixa/alta

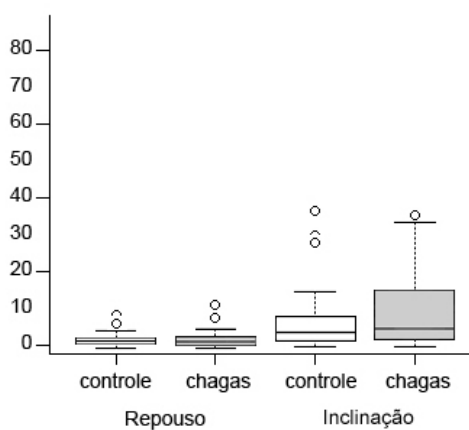
FIGURAS

Figura 1. Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes chagásicos e controles – AF durante repouso e ASR



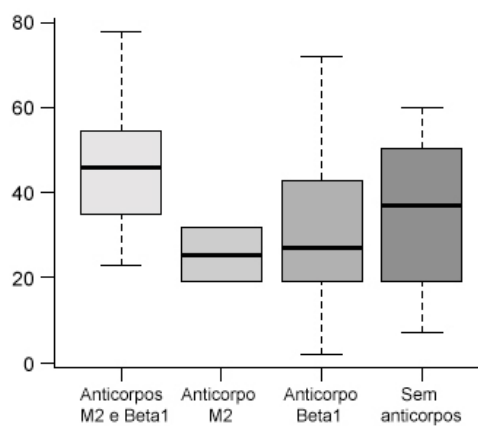
VRR – variabilidade RR / AF – alta frequência / ASR – arritmia sinusal respiratória

Figura 2. Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes chagásicos e controles – relação B/A durante repouso e inclinação



VRR – variabilidade RR / relação B/A – relação baixa/alta

Figura 3. Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes chagásicos de acordo com o tipo de anticorpo: AF na ASR



VRR – variabilidade RR / AF – alta frequência / ASR – arritmia sinusal respiratória

REFERÊNCIAS

1. Engels D, Savioli L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. *Trends Parasitol.* 2006;22(8):363-6.
2. Dias, JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cadernos de Saúde Pública.* Rio de Janeiro. 2007;(1):13-22.
3. Mota EA, Guimarães AC, Santana OO, Sherlock I, Hoff R, Weller TH. A nine year prospective study of Chagas' disease in a defined rural population in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42(5):429-40.
4. Bestetti RB, Freitas OC, Muccillo G, Oliveira JS. Clinical and morphological characteristics associated with sudden cardiac death in patients with Chagas' disease. *Eur Heart J.* 1993;14(12):1610-4.
5. Rassi A, Rassi SG. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2001;76(1):75-96.
6. Sarabanda AV, Sosa E, Simões MV, Figueiredo GL, Pintya AO, Marin-Neto JA. Ventricular tachycardia in Chagas' disease: a comparison of clinical, angiographic, electrophysiologic and myocardial perfusion disturbances between patients presenting with either sustained or nonsustained forms. *Int J Cardiol.* 2005;102(1):9-19.
7. Xavier SS, Souza AS, do Brasil PEAA, Gabriel FG, de Holanda MT, Hasslocher-Moreno A, Garcia MY, Siciliano APRV. Incidência e preditores de morte súbita na cardiopatia chagásica crônica com função sistólica preservada. *Revista da SOCERJ.* 2005b;v. set/out:457- 463.
8. Xavier SS, Haffner P, Souza AS, de Holanda MT, de Castro PHR, do Brasil PEAA, Hasslocher-Moreno A. Mecanismo de morte e grau de acometimento miocárdico na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da SOCERJ.* 2007;v. 20, f.02, mar/abril:133-139.
9. Sternick EB, Martinelli M, Sampaio R, Sampaio RC, Gerken LM, Teixeira RA, et al. Sudden cardiac death in patients with chagas heart disease and preserved left ventricular function. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17(1):113-6.
10. Cardinalli-Neto A, Bestetti RB, Cordeiro JA, Rodrigues VC. Predictors of all-cause mortality for patients with chronic Chagas' heart disease receiving implantable cardioverter defibrillator therapy. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007;18(12):1236-40.
11. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA.* 2007;298(18):2171-81.
12. Andrade, JP et al. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica: resumo executivo. *Arq. Bras. Cardiol.* [online]. 2011, vol.96, n.6, pp. 434-442.
13. de Oliveira SF, Pedrosa RC, Nascimento JH, Campos de Carvalho AC, Masuda MO. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. *Circulation.* 1997;96(6):2031-7.
14. Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, Dos Santos Costa PC, Bergami PL, Dos Santos Almeida NA, et al. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J.* 1998;12(14):1551-8.
15. Hernandez CC, Barcellos LC, Gimenez LE, Cabarcas RA, Garcia S, Pedrosa RC, et al.

- Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca²⁺ currents. *Cardiovasc Res.* 2003;58(1):55-65.
16. Retondaro FC, Dos Santos Costa PC, Pedrosa RC, Kurtenbach E. Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. *FASEB J.* 1999;13(14):2015-20.
 17. Medei E, Pedrosa RC, Benchimol Barbosa PR, Costa PC, Hernandez CC, Chaves EA, et al. Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. *Int J Cardiol.* 2007;115(3):373-80.
 18. Medei EH, Nascimento JH, Pedrosa RC, Carvalho AC. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(4):257-62, 81-6.
 19. Sterin-Borda L, Borda E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:27
 20. Ribeiro AL, Gimenez LE, Hernandez CC, de Carvalho AC, Teixeira MM, Guedes VC, et al. Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2007;117(1):59-63.
 21. Altschuller MB, Pedrosa RC, Pereira BeB, Correa Filho WB, Medeiros AS, Costa PC, et al. [Chronic Chagas disease patients with sinus node dysfunction: is the presence of IgG antibodies with muscarinic agonist action independent of left ventricular dysfunction?]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(6):665-71.
 22. Landesmann MC, da Fonseca LM, de B Pereira B, do Nascimento EM, Rosado-de-Castro PH, de Souza SA, et al. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine cardiac imaging as a method to detect early sympathetic neuronal dysfunction in chagasic patients with normal or borderline electrocardiogram and preserved ventricular function. *Clin Nucl Med.* 2011;36(9):757-61.
 23. Schmidt G, Malik M, Barthel P, Schneider R, Ulm K, Rolnitzky L, et al. Heart-rate turbulence after ventricular premature beats as a predictor of mortality after acute myocardial infarction. *Lancet.* 1999;353(9162):1390-6.
 24. Bainbridge FA. The relation between respiration and the pulse-rate. *J Physiol.* 1920;54(3):192-202.
 25. Villar JC, Leon H, Morillo CA. Cardiovascular autonomic function testing in asymptomatic *T. cruzi* carriers: a sensitive method to identify subclinical Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 2004;93(2-3):189-95.
 26. Junqueira LF. 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.
 27. Correia D, Junqueira LF, Molina RJ, Prata A. Cardiac autonomic modulation evaluated by heart interval variability is unaltered but subtly widespread in the indeterminate Chagas' disease. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2007;30(6):772-80.
 28. Ribeiro AL, de Carvalho AC, Lombardi F, Teixeira MM, Rocha MO. Enhanced parasympathetic activity in Chagas disease still stands in need of proof. *Int J Cardiol.* 2009;135(3):406-8.
 29. Vasconcelos DF, Junqueira LF. Distinctive impaired cardiac autonomic modulation of heart rate variability in chronic Chagas' indeterminate and heart diseases. *J Electrocardiol.* 2009;42(3):281-9.

30. Costa PC, Fortes FS, Machado AB, Almeida NA, Olivares EL, Cabral PR, et al. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(4):439-46.
31. Sterin-Borda L, Borda E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:273-80.
32. Goin JC, Borda E, Leiros CP, Storino R, Sterin-Borda L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. *J Auton Nerv Syst.* 1994;47(1-2):45-52.
33. Rocha AL, Lombardi F, da Costa Rocha MO, Barros MV, Val Barros VaC, Reis AM, et al. Chronotropic incompetence and abnormal autonomic modulation in ambulatory Chagas disease patients. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2006;11(1):3-11.
34. Haensel A, Mills PJ, Nelesen RA, Ziegler MG, Dimsdale JE. The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(10):1305-12.
35. Owen N, Steptoe A. Natural killer cell and proinflammatory cytokine responses to mental stress: associations with heart rate and heart rate variability. *Biol Psychol.* 2003;63(2):101-15.
36. Strom TB, Deisseroth A, Morganroth J, Carpenter CB, Merrill JP. Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(10):2995-9.
37. Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol.* 1984;132(3):1067-70. Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med.* 2005;257(2):126-38.
38. Chagas C, Villela E. Forma Cardíaca da Trypanosomíase Americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1922;14:5-61.
39. de Resende LA, Molina RJ, Ferreira BD, Carneiro AC, Ferreira LA, da Silva VJ, et al. Cardiac autonomic function in chagasic elderly patients in an endemic area: A time and frequency domain analysis approach. *Auton Neurosci.* 2007;131(1-2):94-101.
40. Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Borda E, Sterin-Borda L, Teixeira MM. Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. *Microbes Infect.* 2006;8(9-10):2459-64.