

## Disfunção Autonômica e Anticorpos contra Receptores anti-m2 e anti-β1 em Pacientes Chagásicos

*Autonomic Dysfunction and Anti-M2 and Anti-β1 Receptor Antibodies in Chagas Disease Patients*

Clarissa Antunes Thiers<sup>1,2</sup>, João Luis Barbosa<sup>1,2</sup>, Basílio de Bragança Pereira<sup>2,4</sup>, Emília Matos do Nascimento<sup>3</sup>, José Hamilton do Nascimento<sup>5</sup>, Emiliano Horácio Medei<sup>5</sup>, Roberto Coury Pedrosa<sup>2</sup>

Instituto Nacional de Cardiologia<sup>1</sup>, Serviço de Cardiologia, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho / Instituto de Cardiologia Edson Saad – UFRJ<sup>2</sup>, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro<sup>3</sup>, Serviço de Bioestatística e Estatística Aplicada, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro<sup>4</sup>, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro<sup>5</sup> – Rio de Janeiro, RJ - Brasil

### 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 doença 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:** Mediante 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 ante 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, independentemente 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. (Arq Bras Cardiol 2012;99(2):732-739)

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; denervação autônoma; anticorpos.

### Abstract

**Background:** Sudden death is the leading cause of death in Chagas' disease, affecting patients even in the early stages of the disease. The impairment of the autonomic nervous system in this disease has been recognized, as well as its potential as a trigger for malignant arrhythmias when associated with structural or metabolic changes.

**Objective:** We sought to identify, in Chagas patients with preserved systolic function, the impairment of the autonomic nervous system and its association with functionally active anti-m2 and anti-β1 receptor antibodies.

**Methods:** Using spectral analysis of RR variability during passive tilt test, chronic chagasic patients were compared with healthy controls matched for age. Subsequently, the association of autonomic dysfunction with functionally active antibodies with anti-m2 and anti-β1 action was investigated by the Langendorf method.

**Results:** We observed that patients with Chagas disease without ventricular dysfunction express parasympathetic activity against a vagal stimulus, however with less intensity compared to controls. Chagasic patients with anti-m2 or anti-β1 antibodies showed a further significant reduction of the vagal response during respiratory sinus arrhythmia, regardless of the presence of structural lesion. However, the association of both factors promoted response to vagal stimulation similar to that seen in Chagas disease without their presence.

**Conclusion:** The lower vagal reserve in Chagas patients with preserved function was associated with functionally active anti-m2 or anti-β1 antibodies, and not with the presence of structural heart lesion. (Arq Bras Cardiol 2012;99(2):732-739)

**Keywords:** Chagas disease; autonomic denervation; antibodies.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Roberto Coury Pedrosa •

Serviço de Cardiologia/ICES - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ - Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco, 255, Cidade Universitária.

CEP 21941-913, Ilha do Fundão, RJ - Brasil

E-mail: coury@hucff.ufrj.br

Artigo recebido em 08/01/12; revisado em 12/01/12; aceito em 10/02/12.

## 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 (OMS), ainda que a transmissão vetorial tenha sido interrompida em países como 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 mil novos casos a cada ano, e 50 mil mortes anuais associadas à doença<sup>1</sup>. No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos da doença, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados<sup>2</sup>.

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 morbimortalidade nesse grupo de pacientes<sup>3-11</sup>. Uma recente revisão tem sugerido que em pacientes nessa 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 individuais<sup>11</sup>. 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 súbita<sup>12</sup>.

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 nessa interação. Na cardiopatia chagásica crônica, nosso grupo tem participação ativa nesse sentido<sup>13-18</sup>. 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 complexas<sup>18-20</sup>. Tais anticorpos não são mero epifenômeno da destruição do sistema nervoso autônomo e são independentes das lesões cardíacas<sup>14,20-23</sup>. Recentemente, mostramos que, no paciente chagásico com função sistólica preservada, a modulação autonômica simpática cardíaca é afetada. Isso foi demonstrado pela destruição do nervo cardíaco que ocorreu em âmbito ventricular demonstrado pela cintilografia com <sup>123</sup>I-MIBG<sup>23</sup>.

Estudos da variabilidade RR (VRR) têm sido estabelecidos como real e reproduzível marcador de função autonômica cardiovascular<sup>24</sup>. 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<sup>25,26</sup>. Na doença de Chagas, no grupo sem disfunção ventricular, a avaliação do sistema nervoso autônomo por meio da VRR por diferentes métodos tem evidenciado comprometimento variável da modulação parassimpática e simpática<sup>27-30</sup>. 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  $\beta$ 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- $\beta$ 1) foram selecionados. Foram excluídos do estudo 35 pacientes com doenças crônicas, especialmente cardiovasculares; com Fração de Ejeção (FE) menor que 50%; arritmias cardíacas frequentes e/ou ritmos não sinusais; diabete melito; 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 esteroides. Os restantes 41 pacientes (17 homens; idade entre 26 e 75 anos) com diagnóstico definitivo para doença de Chagas (dois diferentes testes sorológicos com reação positiva para o *T cruzi*) tinham história, exame físico e os seguintes exames normais: hemograma completo, hormônio estimulante da tireoide (TSH), T4 livre, glicose, potássio, ureia e creatinina. Todos os pacientes tinham o Holter de 24 horas livre de arritmias frequentes; 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 (nove 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 por meio do teste de inclinação passiva, em sala climatizada e com isolamento acústico, após jejum de quatro horas. O exame foi realizado ao longo de três etapas – ASR, repouso e inclinação passiva a 70°. A primeira etapa consistiu em inspirar e expirar a 12 incursões/minuto durante dois minutos, entre o 10° e o 12° minutos. A segunda etapa foi realizada em repouso – no qual a VRR foi analisada sem nenhum estímulo, entre o 15° e o 20° minutos. 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° minuto<sup>26</sup>.

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 normalizadas, 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) pelo método de Langendorf em corações isolados de coelhos<sup>13</sup>. 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 atrioventricular, 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<sup>19,31</sup>.

A separação da fração IgG com ação muscarínica e adrenérgica foi feita por meio de purificação em coluna de afinidade. A fração IgG foi separada do soro dos pacientes por precipitação em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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. Essa fração assim obtida foi utilizada no coração isolado de coelho para a caracterização do soro, seguindo as metodologias descritas acima<sup>13</sup>.

### 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/mm<sup>3</sup>. 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 dois 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 por meio 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. Esse 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 quatro grupos: ausência

**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

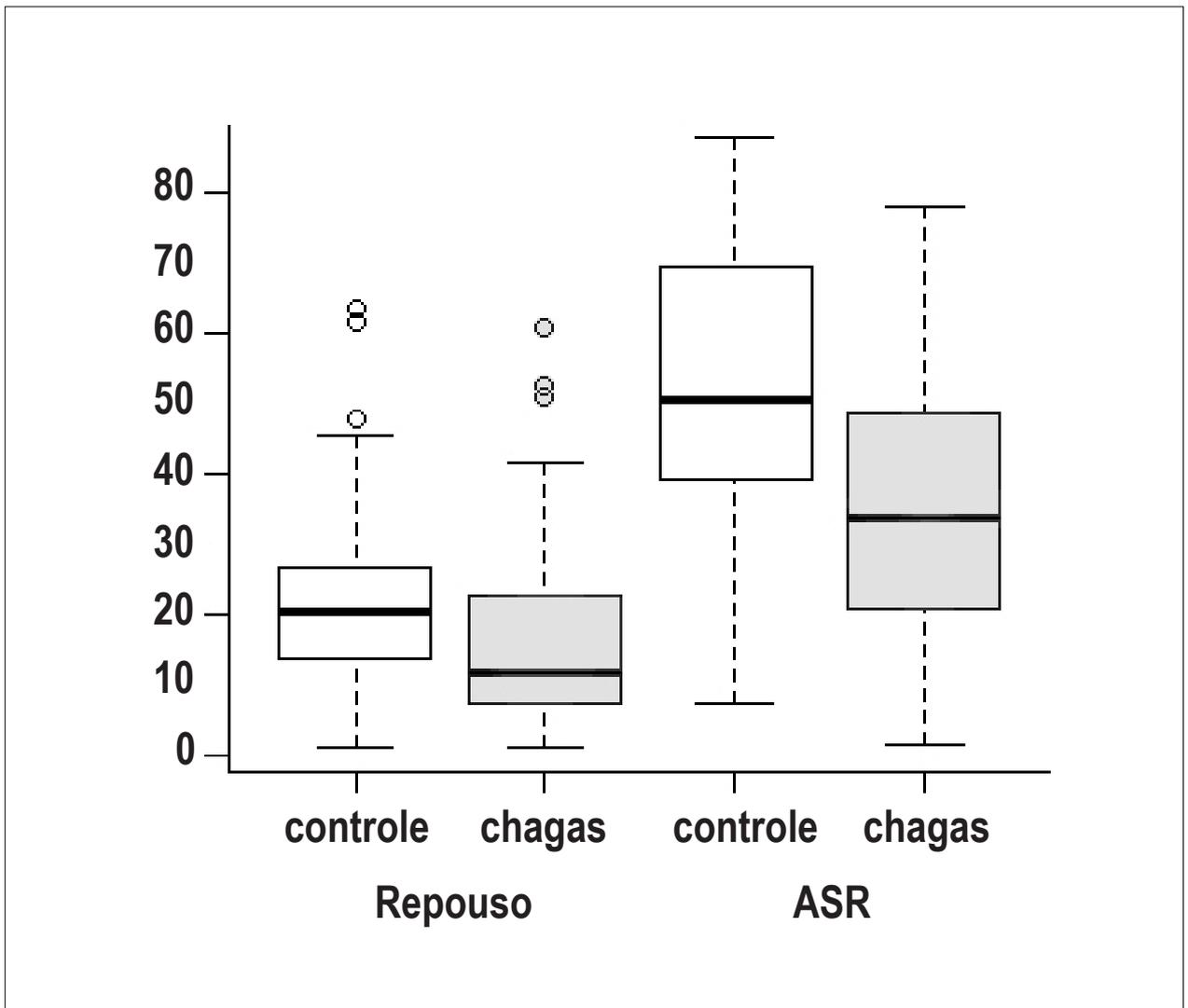


Fig. 1 – Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes chagásicos e controles – AF durante repouso e ASR / VRR: variabilidade RR / AF: alta frequência / ASR: arritmia sinusal respiratória

Tabela 2 – Dados da variabilidade RR no domínio da frequência 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%)	0,00002
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, 0,01
Relação B/A - repouso (IQ)	1,8 (IQ 0,9 - 2,9)	2,0 (IQ 1,1 - 2,8)	0, 0,88
Relação B/A - inclinação (IQ)	5,2 (IQ 2,5 - 15,0)	4,1 (IQ 2,1 - 8,2)	0 0,28

FC: frequência cardíaca / AF: alta frequência / ASR: arritmia sinusal respiratória / IQ: intervalo interquartil Relação B/A: relação baixa/alta.

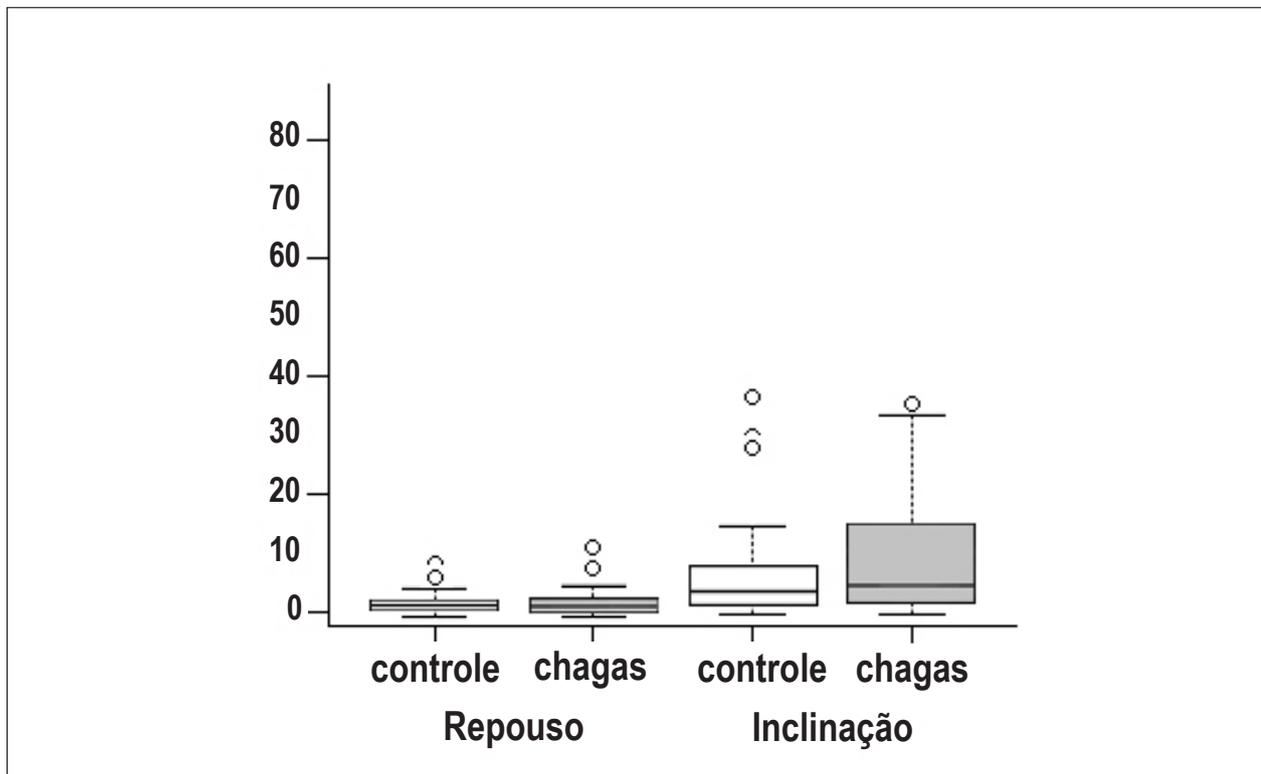


Fig. 2 – Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes chagásicos e controles – relação B/A durante repouso e inclinação. VRR: variabilidade RR / relação B/A: relação baixa/alta

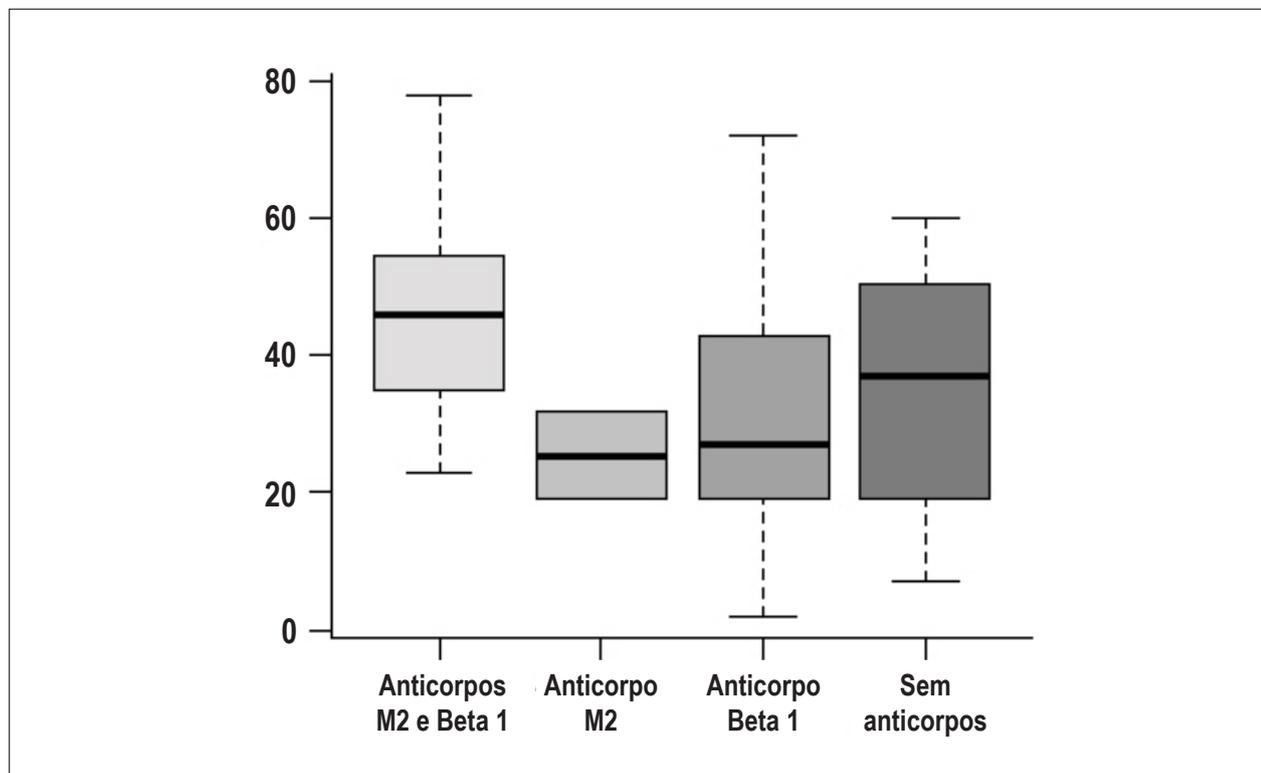


Fig. 3 – Mediana, intervalo interquartil e valores extremos da análise espectral da VRR no domínio da frequência em pacientes chagásicos de acordo com o tipo de anticorpo: AF na ASR / VRR: variabilidade RR / AF: alta frequência / ASR: arritmia sinusal respiratória

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, esses promoveram um aumento da resposta vagal, comparados ao grupo de pacientes sem anticorpos.

Independentemente 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 nesse grupo de pacientes, eles apresentam menor reserva vagal em relação aos controles<sup>27-29,32</sup>. Essa 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 essa redução esteve associada à presença de anticorpos funcionalmente ativos acoplados à proteína G – particularmente anticorpos com ação anti-β1. Esse 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<sup>33,34</sup>. Por sua vez, 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<sup>35</sup>. 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 anti-inflamatória 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<sup>36,37</sup>. De fato, a contribuição da regulação imunológica na disautonomia foi hipotetizada mesmo em estudos iniciais dessa doença devido à bradicardia inapropriada presente nos pacientes chagásicos<sup>38</sup>. Um dos prováveis mecanismos é a reatividade cruzada (mimetismo molecular)<sup>13</sup>.

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<sup>13-18,21</sup>. 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)<sup>20</sup>. Os autores sugerem que essa 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. Essa 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 trabalhos prévios, mostramos que anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos contra receptores muscarínicos

**Tabela 3 – Dados da variabilidade RR no domínio da frequência 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 frequência / ASR: arritmia sinusal respiratória / IQ: intervalo interquartil / Relação B/A: relação baixa/alta

m2 não induziram uma dessensibilização dos receptores do coração isolado de coelho<sup>13,14</sup>. 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. Esse 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 ante os 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<sup>39</sup>.

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<sup>39,40</sup>. 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 essa hipótese menos provável. Villar e cols.<sup>25</sup> igualmente não encontraram, dentre os pacientes com ECG alterado, diferenças no componente de AF em repouso. Também, Rocha e cols.<sup>32</sup> mostram que a modulação autonômica (índices de VRR) é independente da disfunção ventricular cardíaca.

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 esses anticorpos são independentes de disfunção ventricular<sup>13,21,40</sup>. 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 por meio 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 reduzidos<sup>40</sup>. 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 anti-inflamatória 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 pela via anti-inflamatória 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, isso 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.

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

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de mestrado da Dra. Clarissa Antunes Thiers, pela UFRJ - ICES e INC.

## Referências

- Engels D, Savioli L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. *Trends Parasitol.* 2006;22(8):363-6.
- Dias JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2007;23(supl. 1):S13-22.
- 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.
- 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.
- Rassi A Jr, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2001;76(1):75-96.

06. 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.
07. Xavier SS, Souza AS, do Brasil PEAA, Gabriel FG, de Holanda MT, Hasslocher-Moreno A, et al. Incidência e preditores de morte súbita na cardiopatia chagásica crônica com função sistólica preservada. *Rev SOCERJ.* 2005;18(5):457-63.
08. 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. *Rev SOCERJ.* 2007;20(2):133-9.
09. Sternick EB, Martinelli M, Sampaio R, Gerken LM, Teixeira RA, Scarpelli R, 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. Cardinali-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 Jr, 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, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol.* 2011;96(6):434-42.
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 Ca<sup>2+</sup> 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, 281-6.
19. Sterin-Borda L, Borda E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:273-80.
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 Jr. A summary perspective on the clinical-functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(Suppl 3):64-9.
27. Correia D, Junqueira LF Jr, 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 Jr. 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. 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.
32. Rocha AL, Lombardi F, da Costa Rocha MO, Barros MV, Val Barros VdaC, Reis AM, et al. Chronotropic incompetence and abnormal autonomic modulation in ambulatory Chagas disease patients. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2006;11(1):3-11.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol.* 1984;132(3):1067-70.
37. 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*. *Mem Inst 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.