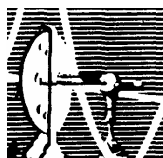


Emiliano Horacio Medei

“Modulação da repolarização ventricular mediada por anticorpos na cardiomiopatia chagásica crônica”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2 0 0 7

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Emiliano Horacio Medei

# Modulação da repolarização ventricular mediada por anticorpos na cardiomiopatia chagásica crônica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientadores: Antonio Carlos Campos de Carvalho  
Jose Hamilton Matheus Nascimento

Rio de Janeiro

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Emiliano Horacio Medei

Modulação da repolarização ventricular mediada por anticorpos na cardiomiopatia chagásica crônica/ Emiliano Horacio Medei. Rio de Janeiro:UFRJ/IBCCF, 2007. XV, 155 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-Graduação em Fisiologia, 2007.

Orientador: Campos de Carvalho, Antonio Carlos; Nascimento, José Hamilton.

1. Anticorpos. 2. Eletrofisiologia. 3. Repolarização ventricular – Teses. I. Campos de Carvalho, Antonio Carlos Nascimento, José Hamilton (Orient.).
- II. Universidade Federal do Rio de Janeiro Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-Graduação em Fisiologia. III. Modulação da repolarização ventricular mediada por anticorpos na cardiomiopatia chagásica crônica

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Emiliano Horacio Medei**

**Modulação da repolarização ventricular mediada por anticorpos na cardiomiopatia  
chagásica crônica**

**Rio de Janeiro, 2 de Março de 2007.**

\_\_\_\_\_  
**(Antonio Carlos Campos de Carvalho, doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro).**

**Orientador**

\_\_\_\_\_  
**(José Hamilton Matheus Nascimento, doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro).**

**Orientador**

\_\_\_\_\_  
**(Gisele Zapata Sudo, doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

\_\_\_\_\_  
**(Jose Geraldo Mill, doutor, Universidade Federal de Espirito Santo)**

\_\_\_\_\_  
**(Sergio Salles Xavier, doutor, Hospital Universitario Clementino Chagas Filho-UFRJ)**

\_\_\_\_\_  
**(Masako Oya Masuda, doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro). Revisor**

**Aos meus pais, Mirta e Horacio,  
À Fernanda, minha esposa.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Mirta e Horacio, pelo apoio incondicional na minha vida e na carreira profissional. Exemplos eternos no meu caminho. Pela falta de egoísmo e MUITA compreensão. (Muchas GRACIAS!!!!)

À minha esposa Fernanda, que com seu amor e PACIENCIA, me dá forças para lutar a cada dia. Uma pessoa diferente, sempre presente sempre...

Ao Professor Antonio Carlos Campos de Carvalho, por ter confiado em mim desde sempre, pelo apoio ao “livre pensamento” nos experimentos!!! Por ter aberto as portas de sua família na minha chegada no Brasil. A sua família muito obrigado pelo aconchego.

Ao Professor “Zé” Hamilton, exemplo de humildade, sabedoria e respeito, pelos conselhos e pela paciência no dia a dia.

À Professora Masako, por ter confiança sempre nos meus empreendimentos, pelas críticas sempre construtivas.

Ao amigo Roberto Pedrosa que fez possível conhecer novos horizontes. Pela contribuição no trabalho.

Ao Dr. Serge Sicouri, pelas dicas e por ter pasado seus conhecimentos. Responsável de meu caminho com pesquisador...

A Sandra Moro e Daniela Celestino, colegas do Hospital Ramos Mejia, que sempre me apoiaram e me ajudaram a entender as bases da eletrofisiologia cardíaca. Pela compreensão!!!!

A João Pedro e família, pela força e aconchego na minha chegada no Brasil.

Ao Ricardo Frazão, grande amigo e professor de arte, muito obrigado pelos gratos momentos.

À Professora Regina, que sempre deu uma grande força desde minha chegada ao Laboratório.

À Senhora Daisy pela eterna paciência...pelas festas de aniversário organizadas, adorei!!!!

Aos meus colegas do Laboratório, pela compreensão e pelo esforço para entender as diferenças culturais no dia a dia, muito obrigado!!!

A meus amigos, Matias, Poli, Acido, Ricardo Henrique "São Pedro" da Serra" Costa e Souza...

À Senhora secretaria da pós-graduação Sandra Brito, por ter colaborado desde sempre desinteressadamente. Mesmo antes de chegar ao Brasil...

Ao corpo técnico e administrativo do IBCCF, por ajudar a ser mais fácil nosso dia.



## RESUMO

MEDEI, Emiliano Horacio. Modulação da repolarização ventricular mediada por anticorpos na cardiomiopatia chagásica crônica. Rio de Janeiro, 2007. Tese de doutorado (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

A Doença de Chagas é um sério problema de saúde na América Latina. Entre 25 a 30% dos pacientes infectados evoluem para a forma crônica (PChc), observando-se danos miocárdicos progressivos e frequentemente morte súbita. Anticorpos (Ac) ativando receptores de membrana, adrenérgicos (Ac- $\beta$ ) ou colinérgicos (Ac-M) estão presentes no soro destes pacientes. O presente trabalho teve como objetivos: Identificar marcador/es e/ou preditor/es de morte cardíaca entre os parâmetros clínicos analisados em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica e avaliar se os Ac presentes no soro destes pacientes modulam a repolarização ventricular. Foram avaliados 38 pacientes seguidos por até 10 anos. O intervalo QT máximo e o índice do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo foram identificados como preditores independentes de morte cardíaca. Os pacientes com Ac-M apresentaram maior dispersão do intervalo QT (dQT) no eletrocardiograma. Os soros dos pacientes Ac-M e Ac- $\beta$ , incrementaram e diminuíram o intervalo QT, respectivamente, em corações isolados de coelho. Este efeito foi abolido pelos respectivos antagonistas dos receptores muscarínicos e adrenérgicos. Foi achada uma correlação positiva entre a dQT nos pacientes e o efeito *in vitro* dos Ac no intervalo QT. Os Ac- $\beta$  reduziram a duração do potencial de ação das células M. Este efeito foi abolido na presença do antagonista adrenérgico atenolol. Ac- $\beta$  e Ac-M não modularam  $I_{to}$ , porém, os Ac-M inibiram  $I_{Ks}$  irreversivelmente. Os Ac- $\beta$  também modularam  $I_{Ks}$ , ativando-a de forma reversível. Os dados obtidos sugerem que os Ac modulam a repolarização ventricular ativando receptores de membrana que regulam  $I_{Ks}$ , podendo contribuir assim na gênese de eventos arritmogênicos nos pacientes chagásicos crônicos.

## ABSTRACT

MEDEI, Emiliano Horacio. Modulation of ventricular repolarization by antibodies in chronic Chagasic cardiomyopathy. Rio de Janeiro, 2007. Tese de doutorado (Doutorado em Fisiologia)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Chagas disease is a serious health problem in Latin America. About 18 million people are infected. Among 25 to 30% of them evolve to a chronic phase with progressive cardiac damage and frequently, sudden cardiac death. Antibodies (Ac) with beta-like (Ac- $\beta$ ) or muscarinic-like (Ac-M) activity are present in the serum of these patients. The objectives of the present work were: to identify markers and/or predictors of cardiac death among the clinical parameters analyzed in patients with chronic chagasic cardiomyopathy and to investigate if the Ac present in these patients' sera modulate ventricular repolarization. We followed 38 patients for as long as 10 years. Maximum QT interval and left ventricle final diastolic diameter index were identified as independent predictors of cardiac death. Patients with Ac-M had larger dispersion of the Qt interval (dQT) in the ECG. Ac- $\beta$  and Ac-M sera diminished and prolonged respectively the QT interval in isolated rabbit heart. These effects were abolished when corresponding adrenergic and cholinergic receptor antagonists were added. There was a positive correlation between the dQT measured in the patients and in vitro effect of the Ac in the QT interval. Ac- $\beta$  shortened M cell action potential duration. The  $\beta$ -blocker atenolol reversed this effect. Neither, Ab- $\beta$  or Ab-M modulated  $I_{to}$ . However, Ac-M inhibited  $I_{Ks}$  irreversibly while Ac- $\beta$  activated this current reversibly. The data suggest that the Ac modulate ventricular repolarization through membrane receptors that regulate  $I_{Ks}$  and may thus contribute to evoke arrhythmic events in chronic chagasic patients.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS  | XV        |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>16</b> |
| 1.1 DOENÇA DE CHAGAS  | 16        |
| 1.1.1 Cardiomiopatia chagásica crônica e distúrbios elétricos subjacentes   | 20        |
| 1.1.2 Morte súbita na doença de Chagas  | 25        |
| 1.2. REPOLARIZAÇÃO VENTRICULAR NO ECG   | 27        |
| 1.2.1 Heterogeneidade da parede ventricular: células M  | 28        |
| 1.2.2 Contribuição das células M no ECG e na dispersão transmural da repolarização                                    | 30        |
| 1.2.3 Correntes iônicas envolvidas na repolarização ventricular e sua contribuição para a heterogeneidade ventricular | 34        |
| 1.2.4 Heterogeneidade nas correntes iônicas   | 37        |
| 1.3 IMUNIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS   | 38        |
| 1.3.1 Efeito dos anticorpos com atividade muscarínica ou adrenérgica na eletrogênese cardíaca                         | 44        |
| 1.4 HIPÓTESE DE TRABALHO  | 47        |
| 1.4.1 OBJETIVOS   | 47        |
| <b>2. MATREIAS E MÉTODOS</b>  | <b>48</b> |
| 2.1 PACIENTES E SELEÇÃO DOS PACIENTES   | 48        |
| 2.2 PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS E DE REPOLARIZAÇÃO VENTRICULAR  | 50        |
| 2.3 REGISTRO DO POTENCIAL DE AÇÃO NAS CÉLULAS M DE COBAIA   | 54        |
| 2.4 PATCH-CLAMP   | 56        |
| 2.5 DROGAS  | 61        |
| 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA   | 61        |
| <b>3 RESULTADOS</b>   | <b>64</b> |
| 3.1 MODULAÇÃO COLINÉRGICA DA REPOLARIZAÇÃO VENTRICULAR MEDIADA POR ANTICORPOS   | 64        |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.1.1   | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS RELEVANTES DOS PACIENTES   | 64  |
| 3.1.1.1 | Inclusão e seguimento dos pacientes   | 66  |
| 3.1.1.2 | Análise logística multivariada  | 67  |
| 3.1.1.3 | Dispersão do QT, QTmax e QTc no ECG dos pacientes   | 68  |
| 3.1.2   | MODULAÇÃO DO INTERVALO QT NO ECG DE CORAÇÕES ISOLADOS DE COELHO                                 | 70  |
| 3.1.2.1 | Correlação entre dQT nos pacientes e QT no coração isolado de coelho                            | 72  |
| 3.1.3   | EFEITO DAS IgG DOS PACIENTES Ac-M NAS CORRENTES REPOLARIZANTES DE POTÁSSIO, $I_{to}$ E $I_{Ks}$ | 73  |
| 3.2     | MODULAÇÃO ADRENÉRGICA DA REPOLARIZAÇÃO VENTRICULAR MEDIADA POR ANTICORPOS                       | 80  |
| 3.2.1   | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS RELEVANTES DOS PACIENTES   | 80  |
| 3.2.1.1 | Dispersão do QT e QTmax no ECG dos pacientes Ac- $\beta$  | 81  |
| 3.2.2.1 | Modulação do intervalo QT no ECG de corações isolados de coelho                                 | 82  |
| 3.2.3   | CÉLULAS M NA PAREDE DO VENTRÍCULO DE COBAIA   | 82  |
| 3.2.3.1 | Modulação adrenérgica das células M   | 86  |
| 3.2.3.2 | Efeito do Ac- $\beta$ no potencial de ação das células M de cobaia                              | 88  |
| 3.2.4   | EFEITO DAS IgG DOS PACIENTES Ac- $\beta$ NAS CORRENTES REPOLARIZANTES $I_{to}$ E $I_{Ks}$       | 92  |
| 4.      | <b>DISCUSSÃO</b>  | 100 |
| 4.1     | DADOS OBTIDOS NO ECG DOS PACIENTES  | 101 |
| 4.2     | ORIGEM DOS ANTICORPOS NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS                                       | 105 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 4.3 | MECANISMOS BÁSICOS DA MODULAÇÃO DA REPOLARIZAÇÃO VENTRICULAR MEDIADA PELOS ANTICORPOS | 110 |
| 4.4 | RELEVÂNCIA CLÍNICA DO PRESENTE TRABALHO   | 121 |
| 5   | <b>CONCLUSÃO</b>  | 124 |
| 6   | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 125 |
|     | ANEXO 1   | 148 |

## ABREVIações

$\chi^2$ : qui-quadrado

4-AP: 4-aminopiridina

Ac-: anticorpos que não ativam receptores de membrana

Ac-M: anticorpos que ativam receptores muscarínicos subtipo M2

Ac- $\beta$ : anticorpos que ativam receptores beta adrenérgicos

AD/DA: analógico digital/digital analógico

AEI: área eletricamente inativa

Ag: prata

AgCl: cloreto de prata

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

BRD: bloqueio de ramo direito

BRD+BFAE: bloqueio de ramo direito mais bloqueio fascicular anterior esquerdo

CAA: células apresentadoras de antígeno

CCh: carbacol

CD4+: linfócitos T-CD4+

CD8+: linfócitos T-CD8+

cGMP: guanosina monofosfato cíclico

Ctrl.: controle

DPA<sub>30</sub>: duração do potencial de ação medido a 30% da repolarização

DPA<sub>90</sub>: duração do potencial de ação medido a 90% da repolarização

dQT: dispersão do intervalo QT

DTR: dispersão transmural da repolarização

ECG: eletrocardiograma

EGTA: etilenoglicol-bis ( $\beta$ -aminoetileter)-N, N, N, N-ácido tetraacético

ELISA: teste imunoenzimático

Endo: células endocárdicas

Epi: células epicárdicas

EVI: endocárdio (E), estruturas vasculares (V) e interstício (I)

Fc $\gamma$ R: receptores para a região Fc de imunoglobulinas G

FEVE: fração de ejeção no ventrículo esquerdo

G $\Omega$ : giga ohms

H26R: sigla do peptídeo correspondente à segunda alça extracelular do receptor beta-1

HUCFF-UFRJ: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

I/V: relação corrente voltagem

IC: índice de confiança

I<sub>Ca</sub>: corrente de cálcio

IDFDVE: Índice do diâmetro diastólico final do ventricular esquerdo

IgG/s: imunoglobulina/s G

I<sub>K</sub>: corrente de potássio retificadora retardada

I<sub>K,Ach</sub>: corrente de potássio retificadora de influxo ativada por acetilcolina

I<sub>K,ATP</sub>: corrente de potássio retificadora de influxo ativada por ATP

I<sub>K1</sub>: corrente de potássio retificadora de influxo

I<sub>Kr</sub>: corrente de potássio retificadora retardada componente rápido

I<sub>Ks</sub>: corrente de potássio retificadora retardada componente lento

I<sub>Kss</sub>: corrente de potássio do estado estacionário

I<sub>Kur</sub>: corrente de potássio ultra-rápida

IL: interleucina

I<sub>Na</sub>: corrente de sódio

I<sub>Na-Ca</sub>: trocador sódio/cálcio

INT- $\gamma$ : interferon-gama

iso : Isoproterenol

I<sub>to</sub>: corrente transiente de saída de potássio

Lav.= lavagem

M: região M ou células M da parede ventricular

M2: receptor muscarínico subtipo 2

Média  $\pm$  EPM: média  $\pm$  erro padrão da média

MHC: complexo de histocompatibilidade maior  
ms: milisegundos  
mV: milivolt  
NYHA: *New York Heart Association*  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
p: nível de significância (alfa)  
P0: proteína ribossomal do *Trypanosoma cruzi*  
P0- $\beta$ : proteína ribossomal do *Trypanosoma cruzi*  
P2 $\beta$ : proteína ribossomal do *Trypanosoma cruzi*  
PA: potencial de ação  
pA: picoampère  
PKA: proteína kinase A  
QTc: intervalo QT corrigido  
Qtmax: máximo intervalo QT  
SNA: sistema nervoso autônomo  
S-T: intervalo S-T  
T: onda T  
*T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*  
TEA-Cl: Cloreto de tetraetilamônio  
Th: linfócitos T auxiliares (T Helper)  
Th1: resposta T helper 1  
Th2: resposta T helper 2  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa  
UI: unidades internacionais  
V<sub>1/2</sub>: voltagem media



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita pelo Dr. Carlos Chagas em 1908-09 (CHAGAS, 1908-09, LEWINSOHN & CHAGAS, 1979), é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É de índole endêmica, que não apresenta variações cíclicas ou sazonais de importância epidemiológica. Antes de se iniciar o programa de controle da doença, a maioria dos casos ocorria na área rural, nos domicílios infestados por triatomíneos. Com a migração populacional, estima-se que, hoje, muitos dos infectados residem em área urbana. O Dr. Carlos Chagas documentou o primeiro caso humano da doença em março de 1909 em uma criança de nome “Berenice”, que apresentou febre alta e sinais faciais – chagoma - característicos desta enfermidade (CHAGAS, 1910).

A doença de Chagas, cerca de 100 anos após ser descrita, constitui ainda um sério problema de saúde na América Latina, causando cerca de 50.000 mortes por ano e com aproximadamente 18 milhões de pessoas infectadas. Mesmo sendo esta uma doença predominantemente ou quase que exclusiva dos países subdesenvolvidos, devido as correntes migratórias desde os anos 1970, há a presença de imigrantes infectados com a doença de Chagas nos Estados Unidos, onde se estima que aproximadamente 50.000-100.000 imigrantes possuem a doença (MILEI et. al. , 1992, KIRCHOFF, 1993, SHULMAN et. al. , 1997). Um estudo que confirma esses achados foi realizado com 11.430 pacientes que realizaram cirurgia cardíaca, detectando 6 (0.05%) pacientes com diagnóstico positivo para doença de Chagas (SHULMAN et. al. , 2000). Na década de 1990, estimava-se que 8% da população da América do Sul fosse soro

positiva, sendo que 10% a 30% deles poderiam apresentar sintomatologia. (BARRET et. al. , 2003).

A doença de Chagas pode se dividir em três fases clínicas:

Fase aguda

Fase indeterminada

Fase crônica

Entretanto, alguns autores consideram a fase indeterminada como parte da fase crônica.

**Fase Aguda:** quando aparente, corresponde aos fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dias ou meses da infecção inicial, sendo diagnosticada pelo encontro do parasita no sangue periférico. É caracterizada por uma miocardite, na maioria das vezes só traduzível eletrocardiograficamente. As manifestações gerais são de febre (pouco elevada), mal-estar geral, cefaléia, astenia, hiporexia, edema e hipertrofia de linfonodos. Frequentemente ocorre hepato-esplenomegalia. Às vezes se agrava em uma forma meningoencefálica, principalmente nos primeiros meses ou anos de vida. Quando existe porta de entrada aparente, ela pode ser ocular (Sinal de Romaña) ou cutânea (Chagoma de Inoculação). O Sinal de Romaña é um edema bi palpebral (que, às vezes, se expande à face), elástico indolor, de início geralmente brusco, coloração róseo violácea das pálpebras, congestão conjuntival, enfartamento dos linfonodos satélites (pré-auriculares, parotídeos ou submaxilares), e com menos freqüência secreção conjuntival e dacrioadenite. O Chagoma de Inoculação é uma formação cutânea ligeiramente saliente, arredondada, eritematosa, dura, incolor, quente

e circundada por edema elástico, assemelhando-se a um furúnculo que não supura, mas que às vezes pode exulcerar. É acompanhado de linfonodos satélites.

As alterações eletrocardiográficas estão na dependência do maior ou menor acometimento do coração. As principais são: alargamento do intervalo PR, alterações primárias de onda T (baixa voltagem, bifasismo ou inversão), extra-sístoles ventriculares. Em casos muito graves ocorrem: bloqueios intraventriculares e desnivelamento de S-T com alterações da onda T. Em geral, as alterações eletrocardiográficas são revertidas após essa fase da doença. O exame radiológico do tórax pode mostrar imagem cardíaca discretamente aumentada, logo no início da doença.

**Fase Indeterminada:** compromete aproximadamente 60% (12 milhões) dos pacientes com a doença, entre 20 e 50 anos de idade (REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA DA DOENÇA DE CHAGAS, 1985, BARRETO & IANNI, 1995, BESTTI & ROSSO, 1997, MACEDO, 1999). Define-se como a presença comprovada da infecção chagásica, seja pela presença do parasita e/ou teste para anticorpos imunoglobulinas G (IgG) específicos, na ausência de sinal e sintomas clínicos, registro eletrocardiográfico sem alterações e tamanho normal de coração, esôfago e cólon diagnosticado por imagens radiológicas. É possível observar nesta fase uma inflamação bem menos intensa que na fase crônica, chamada de miocardite focal. Um trabalho publicado por Ribeiro e cols. (1995) mostrou alterações na resposta fisiológica no teste ergométrico em pacientes nesta fase, sugerindo um possível comprometimento do sistema nervoso autônomo.

Geralmente o diagnóstico nestes pacientes é feito de forma ocasional, durante exames médicos para admissão em novo emprego ou mesmo no *screening* do banco de sangue ante uma doação ocasional de um deles. A vida destes pacientes ocorre com aparente normalidade, igual à população em geral. Infelizmente, muitas vezes são excluídos do emprego por causa de um diagnóstico positivo.

**Fase crônica:** Existem cerca de 2 milhões de pacientes chagásicos na fase crônica em nosso país. Constitui-se em uma forma clínica tardia da infecção pelo *T. cruzi* resultando em dano intestinal e/ou miocárdico progressivo. Aproximadamente 30% dos pacientes com sorologia positiva desenvolvem alguma forma de expressão da doença crônica cardíaca. Prata (2001) mostrou que o tempo médio que transcorre entre a passagem da fase aguda para fase crônica da doença é de  $28 \pm 7$  anos.

Paradoxalmente, estima-se que uma vez apresentados os sintomas, após 20 anos, a expectativa de vida desses pacientes é de aproximadamente cinco anos. Entre esses pacientes, um terço apresenta manifestações clínicas significativas, associando-se a conspícua mortalidade e morbidade (HAGAR & RAHIMTOOLA, 1991). Entre as manifestações clínicas mais freqüentes encontram-se a bradicardia e arritmias cardíacas (Ver abaixo; ELIZARI, 2002). Um estudo em 1345 autópsias mostrou uma incidência de 44% de trombo ou tromboembolismo no coração, sendo de igual proporção na câmara direita e esquerda (SAMUEL et. al. , 1983). Nesta fase, o cardioembolismo é a principal causa de acidente cérebro vascular nestes pacientes (CAROD-ARTAL et. al. , 2005). Um grupo menor de pacientes infectados por *T. cruzi* (cerca de 5% a 8%) desenvolve alterações no tubo digestivo (os chamados

megaesôfago e megacólon), aparentemente por destruição dos neurônios que controlam sua motilidade (esses problemas digestivos dificilmente levam ao óbito).

### **1.1.1. Cardiomiopatia chagásica crônica e distúrbios elétricos subjacentes**

Como foi descrito acima, aproximadamente 30% dos pacientes com doença de Chagas evoluem para a forma crônica. Isto ocorre de forma progressiva, lenta e irreversível. O principal achado no tecido cardíaco nesta fase é uma miocardite difusa, incluindo a destruição das fibras cardíacas e substituição por fibrose cicatricial, associada a um considerável infiltrado inflamatório difuso, composto por linfócitos T e macrófagos.

As bases fisiopatológicas dos acontecimentos anátomo-patológicos que podem ser observados nestes pacientes ainda são de intenso debate.

Diversas são as propostas para entender estes fenômenos, tais como isquemia miocárdica (DIAS et. al. , 1956), disfunção microvascular (ROSSI & RAMOS, 1996, MUKHERJEE et. al. , 2004, HASSAN et. al. , 2006), transtornos no sistema nervoso autônomo (OLIVEIRA, 1985, GALLO et. al. , 1987, IOSA et. al. , 1989, BESTETTI et. al. , 1995, MACHADO et. al. , 2000) e uma outra hipótese, a qual é de interesse em nosso trabalho, sendo proposta uma alteração na imunoregulação.

Como foi citado anteriormente, a isquemia é um fator que contribui na gênese da cardiomiopatia chagásica crônica. Assim, Torres e cols. (1995) observaram em 9 pacientes chagásicos crônicos com diagnóstico de isquemia miocárdica, uma disfunção na resposta do endotélio vascular da artéria coronariana descendente anterior esquerda, utilizando agonistas dependente (acetilcolina) e independente (adenosina) do

endotélio, propondo este como o mecanismo do fenômeno isquêmico. Anos após, Consolim-Colombo e cols. (2004) observaram que os pacientes chagásicos crônicos sem insuficiência cardíaca não apresentavam disfunção do endotélio sugerindo que a disfunção endotelial estaria relacionada com a disfunção cardiológica subjacente presente na fase crônica da doença de Chagas.

Agora focalizando na hipótese da disfunção microvascular, os primeiros relatos do comprometimento vascular foram realizados por Vianna (1911), achando uma periarterite nas artérias do cerebelo. Já Tanowitz e cols. (1996) mostraram em um modelo agudo de infecção chagásica, em rato, um aumento do espasmo vascular nos segmentos venoso e arteriolar, originando uma diminuição na velocidade do fluxo dos glóbulos vermelhos em arteríolas de primeira e terceira ordem, e nas vênulas, associadas a uma resposta inflamatória intensa. Estes achados foram revertidos com o uso do verapamil (bloqueador de canal de cálcio), indicando um papel importante do cálcio nesse mecanismo. Em um trabalho recente, esse mesmo grupo observou que a infecção de células do músculo liso vascular com *T. cruzi* incrementava a proliferação celular assim como induzia um aumento na via da *ERK-ciclina/D1-endotelina*, incrementando o conhecimento dos mecanismos básicos envolvidos nos achados previamente descritos (MUKHERJEE et. al. , 2004).

Apontando na hipótese de disfunção do sistema nervoso autônomo (SNA), Machado e cols. (2000) compararam corações de 19 pacientes que apresentavam insuficiência cardíaca congestiva, sendo que um grupo deles possuía doença de Chagas. Nessa oportunidade foi observada uma diminuição tanto das terminações nervosas simpáticas quanto parasimpáticas, sendo que estas últimas encontravam-se

em menor número nos corações dos pacientes chagásicos, mostrando um claro comprometimento do SNA.

Tal como foi mencionado acima, uma alteração na imunoregulação pode contribuir para a cardiopatia chagásica. Assim a produção de IgGs que ativam receptores de membrana acoplados a proteína G pode contribuir na gênese da cardiomiopatia. Para entender melhor este ponto vamos citar alguns trabalhos que ajudaram a entender o papel dos anticorpos na fisiopatologia da cardiomiopatia chagásica crônica. Fu e cols. (1996) imunizaram coelhos com o peptídeo correspondente ao receptor M2 muscarínico e observaram um aumento na densidade de receptores M2 nos tecidos dos animais imunizados; também foi observada a produção de anticorpos funcionais contra o receptor M2 e foi mostrado que eles são capazes de induzir disfunção cardíaca. Em 1997, Matsui e cols. imunizaram coelhos com os peptídeos da segunda alça extracelular dos receptores beta-adrenérgicos e M2 colinérgicos. Nesse modelo foi possível purificar anticorpos contra estes receptores e os animais imunizados apresentaram hipertrofia cardíaca, mostrando um papel deletério dos anticorpos. Baseado neste e outros trabalhos, Gimenez e cols. (2005) imunizaram camundongos com um plasmídeo codificando para o receptor M2 e beta-1 adrenérgico. Neste trabalho os autores acharam, não só anticorpos contra a segunda alça dos receptores M2 e beta-1, mas também contra a terceira alça intracelular do receptor M2. Com ensaios de binding, foi possível observar um incremento de quase o dobro do controle nos receptores M2, e uma diminuição nos beta-1, e sinais de desregulação autonômica nos animais imunizados. Desarranjo miofibrilar e fibrose foram outros achados importantes nesses animais como consequência da exposição prolongada aos anticorpos. Recentemente Garcia e cols. (2005) mostraram a presença de distúrbios da

condução em um modelo chagásico crônico murino. Nesse modelo, foi observada a presença de anticorpos contra a segunda alça extracelular dos receptores beta e muscarínico. Interessantemente, os títulos desses anticorpos assim como os episódios arrítmicos diminuíram no grupo de camundongos que foram tratados com benznidazole, um agente tripanosomicida.

Outro achado importante na cardiomiopatia chagásica são as formações aneurismáticas do ventrículo esquerdo. A patogenia destes aneurismas, geralmente na região apical, ainda não está claramente definida e passa por opiniões que a relacionam com hipoxia determinando a destruição das fibras cardíacas por isquemia e com fenômeno inflamatório direto, ou ao fator mecânico determinando o afastamento dos feixes componentes do ápice. É provável que todos estes fatores possam estar envolvidos. Borges-Pereira e cols. (1998) realizaram um estudo que incluiu 298 pacientes chagásicos e 90 não-chagásicos, que foram submetidos ao exame ecocardiográfico, achando em 18.8% aneurisma no ventrículo esquerdo, presente só em pacientes chagásicos. Este trabalho confirma os achados em relatos prévios realizados em pacientes chagásicos selecionados, onde o aneurisma de ponta foi um achado freqüente na fase crônica dessa doença (GRANZOTTI et. al. , 1974, ACQUATELLA et. al. , 1980). Os aneurismas, especialmente da região apical, adquirem importância clínica pelo elevado potencial gerador de graves distúrbios eletrofuncionais.

Como foi comentado recentemente, não só os aneurismas, mais também as lesões na parede do miocárdio, secundárias ao processo inflamatório, e áreas de fibrose contribuem para a presença das alterações da condução dos impulsos elétricos no coração e para o desenvolvimento de arritmias. Os pacientes possuem um



substrato anátomo-patológico favorável para desenvolver uma variedade de taquiarritmias auriculares e ventriculares, bradiarritmias e transtornos da condução. Manzullo & Chuit (1999) mostraram em um estudo que incluía 5710 pacientes chagásicos crônicos, com um seguimento de cinco anos, que 4.2% deles apresentaram disfunção sinusal durante os primeiros três anos, e 8.9% apresentaram essa mesma alteração após 10 anos de seguimento. Ainda, observaram que 96% dos pacientes falecidos (63 mortes) possuíam bloqueio de ramo direito, e todos eles possuíam algum tipo de arritmia ventricular polifocal. Tal como foi descrito por Chiale e Elizari (2003), a anormalidade auricular mais freqüente nesta doença é a bradiarritmia sinusal persistente.

Uma das possíveis causas deste fenômeno poderia estar relacionada com uma alteração na regulação autonômica. Assim, vários estudos histo-patológicos demonstraram uma diminuição apreciável dos neurônios intramurais das aurículas. (REIS LOPES, 1970, ALCANTARA, 1970). É importante ressaltar que nesta fase da doença a disfunção bi-nodal é também freqüente.

Com relação às arritmias ventriculares, as extra-sístoles e os bloqueios intraventriculares são geralmente os indicadores mais precoces do comprometimento ventricular na doença chagásica crônica. Tal como descreveu Rosenbaum (1964), uma alta incidência de bloqueio de ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo é freqüente na doença de Chagas, atribuindo-se este fenômeno ao fato que tanto o ramo direito quanto a divisão anterior do ramo esquerdo são muito finas e longas, sendo mais vulneráveis ao processo destrutivo dado pela fibrose na pancardite chagásica.

As arritmias descritas podem em muitas ocasiões ser o fator deflagante de morte súbita na doença de Chagas.

### **1.1.2 Morte súbita na doença de Chagas**

Não existe uma definição única de morte súbita, principalmente no que se refere ao intervalo de tempo no qual ela transcorre. Neste trabalho adotamos a definição do Dr. Myerburg (MYERBURG, 2004), que considera a morte súbita como: “morte natural de causa cardíaca, iniciada com perda abrupta da consciência, em período de uma hora do início dos sintomas, em pacientes com ou sem cardiopatia previamente reconhecida”.

O Dr. Carlos Chagas, fez as primeiras descrições de arritmias e morte súbita em pacientes chagásicos em 1910 através de estudos do aparelho circulatório no exame físico, e os registros dos batimentos cardíacos no ápice do coração e do pulso radial e da jugular com o polígrafo de Jacquet. Assim ele descreveu extra-sístoles auriculares e ventriculares, bloqueio atrioventricular e bradicardias, com frequência cardíaca menor que 30 batimentos por minuto.

A morte súbita, dentro da fase crônica da doença de Chagas, é uma das principais causas de morte, contribuindo com aproximadamente 55-65% das mortes nesta doença (REIS LOPES, 1999, RASSI et. al. , 2001). A mesma manifesta-se entre os 30 e 50 anos de idade e prevalece no sexo masculino. Diversos trabalhos foram realizados para determinar as causas e mecanismos que desencadeiam este fenômeno.

Em um trabalho recente Grell e cols. (2006), mostraram que em 26 de 29 pacientes chagásicos crônicos os potenciais tardios no eletrocardiograma (ECG) foram achados entre as associações que mostraram uma incidência maior de morte súbita. Outro trabalho relevante, publicado por Carrasco e cols. (1994), realizado em 556

pacientes chagásicos crônicos, mostrou que a presença de arritmias complexas incrementa a mortalidade nessa população. É importante ressaltar que não é sempre que a ocorrência de morte súbita está relacionada com o grau de comprometimento miocárdico, tal como foi publicado recentemente por Sternick e cols. (2006), onde os episódios de síncope precediam a morte súbita em pacientes chagásicos crônicos com função ventricular conservada. Mendoza e cols. (1992) analisou o registro de ECG Holter de 24hs em 10 pacientes chagásicos crônicos com episódios de morte súbita e observou a presença de fibrilação ventricular como evento final em 9 deles, sendo o precursor deste fenômeno a *Torsade de Pointes* em 6 e taquicardia ventricular nos três restantes.

Ante o alto índice de morte súbita nos pacientes chagásicos crônicos, diferentes estudos foram realizados para identificar os possíveis fatores de risco e/ou preditores da deflagração destes episódios. Entre eles, Bestetti e cols. (1996) descreveram em uma população de 74 pacientes chagásicos crônicos, o aneurisma apical e a dilatação ventricular esquerda como fatores independentes de morte súbita.

A repolarização ventricular tem um papel fundamental na fisiopatologia da morte súbita cardíaca. Para entender qual é seu papel aprofundaremos este tópico nos parágrafos seguintes.

## 1.2 Repolarização ventricular no ECG

O eletrocardiograma é uma importante ferramenta clínica, dado seu baixo custo, fácil reprodutibilidade e análise. Ele permite observar indiretamente a atividade elétrica cardíaca. O mesmo foi descrito por Waller em 1887, mas entre 1895 e 1901 Willhem Eithoven foi o primeiro a registrar um ECG com as cinco ondas até hoje reconhecidas no ECG (P, Q, R, S e T).

No traçado do ECG encontram-se ondas, segmentos e intervalos refletindo a atividade elétrica do coração. Nosso trabalho dará especial ênfase aos parâmetros eletrocardiográficos que representam a repolarização ventricular, sendo eles o máximo intervalo QT (QTmax), o intervalo QT corrigido (QTc) e dispersão do intervalo QT (dQT).

O intervalo QT é a medição no ECG de superfície, do tempo requerido pelos ventrículos para se despolarizarem e repolarizarem, compreendido desde o início do complexo QRS até o final da onda T. Alterações na frequência cardíaca alteram a duração do intervalo QT, sendo possível corrigir esse efeito da frequência mediante a utilização da matemática como ferramenta. Assim diferentes fórmulas podem ser utilizadas com esse objetivo, sendo a fórmula de Bazett umas das mais aceitas. (BROUWER et. al. , 2003).

A dispersão do intervalo QT é dada pela diferença entre os valores máximo e mínimo do intervalo QT medido em pelo menos 9 derivações do ECG (Ver abaixo: bases celulares do ECG).

Como já foi publicado anteriormente, a dispersão do intervalo QT é um parâmetro que reflete a heterogeneidade da repolarização ventricular (DAY et. al. ,

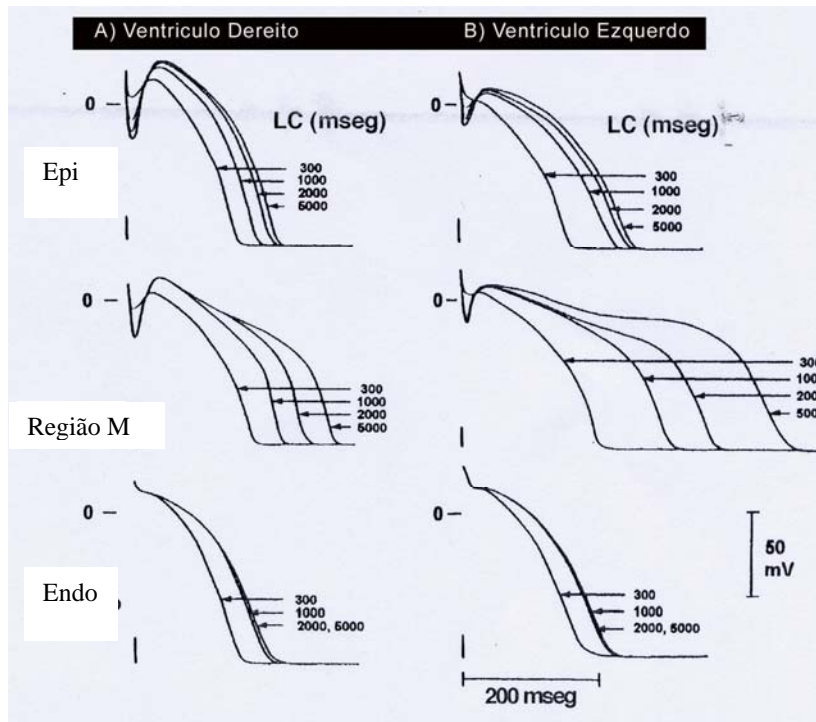
1990, BEAUBIEN et. al. , 2002, CARDOSO et. al. , 2003), assim como também pode ser utilizado como preditor independente de morte súbita na doença de Chagas (SALLES et. al. , 2003). Diferentes trabalhos demonstraram que o valor padrão da dQT de uma população sadia está em torno dos 40-50 ms (SURAWICZ & WILL, 1996).

Salles e cols. (2003) demonstraram que uma duração da dQT ou do intervalo QT, maior que 65ms e 465ms, respectivamente, foram preditores independentes de morte súbita na doença de Chagas.

Os parâmetros da repolarização ventricular podem sofrer mudanças conforme a estimulação de cada uma das camadas do miocárdio. Tal como veremos a seguir, existe uma heterogeneidade da parede ventricular. Uma resposta diferenciada em alguma destas camadas pode induzir ou evocar eventos pro-arritmogênicos.

### **1.2.1 Heterogeneidade da parede ventricular: células M.**

A parede ventricular cardíaca é constituída por diversos tipos celulares, entre eles, cardiomiócitos das regiões epicárdica e endocárdica, células de Purkinje e células da região do miocardio medio ou células M. Estas últimas, descritas por Sicouri & Antzelevitch (1991), localizam-se nas camadas do subepicárdio e miocárdio profundo. Um comportamento elétrico heterogêneo nestes diferentes tipos celulares implica em uma resposta diferenciada a drogas cardioativas e a diversas condições fisiopatológicas (LITOVSKY & ANTZELEVITCH, 1988). Dentre os tipos de células ventriculares mencionados acima, a maior diferença reside no processo de repolarização e sua resposta a diferentes freqüências de estimulação (Figura 1).



**Figura 1.** Heterogeneidade dos diferentes tipos celulares na parede ventricular. A figura mostra a diferença da resposta do potencial de ação de células epicárdicas (Epi), região M e endocárdicas (Endo), obtidas a diferentes freqüências de estimulação, tanto no ventrículo direito (A) quanto no esquerdo (B). Modificado de Sicouri e cols. (1991)

Assim, as células M e as epicárdicas apresentam uma morfologia do potencial de ação tipo “*spike and dome*”, dado pela presença de uma fase 1 proeminente, que está ausente ou é muito pequena nas células endocárdicas. Pode-se destacar como a principal característica das células M o prolongamento da duração das fases 2 e 3 do potencial de ação de forma desproporcional, quando comparadas com os outros tipos celulares, em resposta a uma diminuição da freqüência de estimulação e/ou na resposta a uma droga que prolonga o potencial de ação. Esta característica é semelhante ao observado nas células de Purkinje, mas, as células M não possuem

despolarização diastólica espontânea durante a fase 4 do potencial de ação. Uma resposta à fenilefrina oposta ao das células de Purkinje caracteriza as células M, sendo que nestas últimas o potencial de ação encurta, enquanto nas células de Purkinje é prolongado. Estas diferenças eletrofisiológicas, inerentes a cada tipo celular, predisõem a uma dispersão transmural da repolarização ventricular (DTR).

Estima-se que as células M e as células transicionais ocupam entre 30 e 40% da massa do ventrículo do coração canino. Estas se localizam no ventrículo esquerdo, preferencialmente desde o subepicárdio profundo ao miocárdio médio na parede livre postero-lateral, no sub-endocárdio da parede livre anterior, através de toda a parede ventricular, nos tratos de saída e na parte profunda de certas estruturas endocárdicas: septo interventricular, trabéculas e músculos papilares (SICOURI & ANTZELEVITCH, 1994).

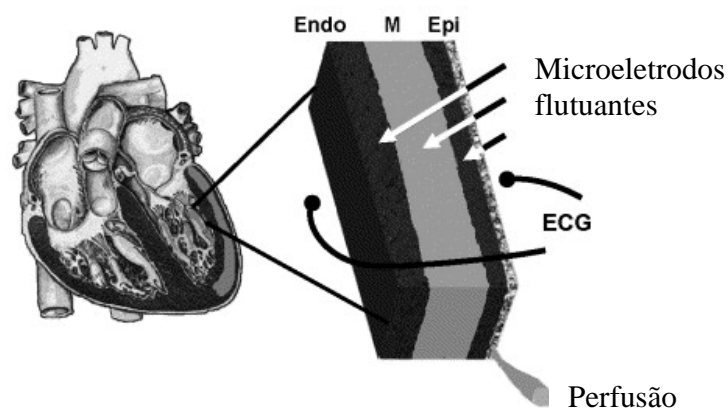
As células M, identificadas inicialmente no coração canino (SICOURI & ANTZELEVITCH, 1991), também foram descritas em corações de cobaia (SICOURI et. al. , 1996), porco (STANKOVICOVA et. al. , 2000) e humano (DROUIN et. al. , 1995).

### **1.2.2 Contribuição das células M no ECG e na dispersão transmural da repolarização**

O fato da parede ventricular apresentar uma quantidade variada de células com propriedades eletrofisiológicas diferentes acarreta importantes conseqüências na gênese de vários fenômenos eletrocardiográficos. Isto inclui a onda T, o intervalo QT e a onda U, entre outros. Em meados dos anos 1990, Antzelevitch e cols. desenvolveram uma técnica com objetivo de poder registrar simultaneamente os potenciais de ação de

3 tipos de células diferentes e o pseudo-ECG em preparações da parede ventricular canina perfundidas a pressão constante através de uma artéria coronariana (YAN & ANTZELEVITCH, 1996). Mediante esta técnica é possível registrar simultaneamente o “ECG” transmural, utilizando eletrodos extracelulares em contato com as superfícies endocárdica e epicárdica, e os potenciais de ação das células endocárdicas, epicárdicas e M com 3 microeletrodos flutuantes. A preparação, por sua vez, é estimulada eletricamente mediante um par de eletrodos de prata colocados na superfície endocárdica (LU et. al. , 2006). (Figura 2).

Técnica do “wedge”



**Figura 2.** Desenho esquemático da técnica do “Wedge”. Técnica que permite realizar registros simultâneos do potencial de ação do epicárdio (Epi), endocárdio (Endo) e células M (M), mais o eletrograma de superfície. Modificado de Antzelevitch (2001).

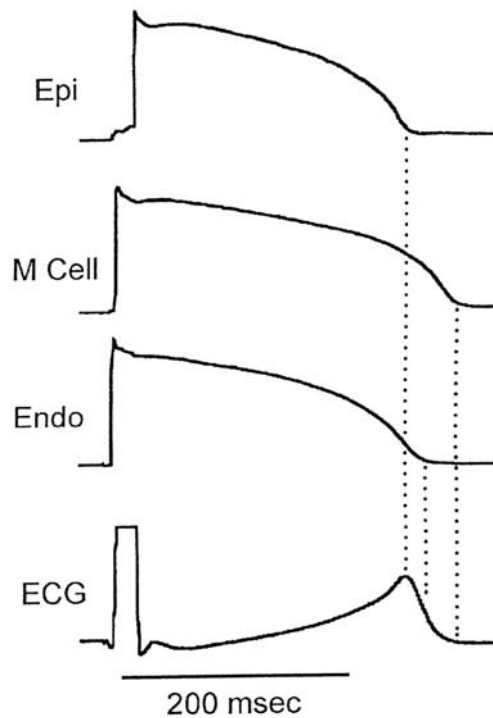
Como é amplamente aceito, o intervalo QT representa o tempo que transcorre entre a ativação mais precoce até a repolarização mais tardia do miocárdio ventricular, e a onda T resulta da soma dos gradientes elétricos da repolarização dentro dos ventrículos (Antzelevitch et. al. , 1994). Porém, a relação temporal entre os potenciais



de ação dos distintos tipos celulares da parede ventricular e o intervalo QT ou a onda T não tinha sido ainda definida com registros simultâneos de potencial de ação intracelular.

Com a técnica do “*wedge*” foi possível aceder a essa informação e compreender a relação “potencial de ação-ondas do ECG”. Em condições fisiológicas, a primeira estrutura ventricular a se repolarizar é a última que se despolarizou. Como consequência da repolarização precoce do epicárdio, a onda T possui a mesma polaridade que o complexo QRS, correspondente a despolarização ventricular. O início da onda T é originado pela queda brusca da fase 1 do potencial de ação epicárdico. Assim cria-se um gradiente de voltagem e um fluxo elétrico de corrente através da parede ventricular. Dito gradiente, aumenta de forma progressiva à medida que avança a repolarização epicárdica e alcança seu valor máximo quando está finalizado. Este gradiente máximo encontra-se expresso no ECG como o pico da onda T.

Sob condições normais, o fluxo de corrente entre as células M e o epicárdio é maior, o que dá origem a fase ascendente da onda T positiva. Uma vez atingida a repolarização total do epicárdio, a contínua repolarização do endocárdio incrementa de maneira progressiva o gradiente entre as células M e o endocárdio, resultando desta a fase descendente da onda T positiva. Dado que as células M são as últimas a se repolarizarem, estas contribuem na formação do último segmento da onda T, sendo que a repolarização total delas marca o final da onda T (Figura 3).



**Figura 3.** Contribuição dos potenciais de ação das camadas ventriculares na gênese da onda T do ECG. As linhas tracejadas mostram a contribuição do final da repolarização de cada uma das células no ECG, mostrando as células M como responsáveis pelo componente final da onda T. Registro obtido no ventrículo canino, mediante a técnica do *wedge*. Modificado de Shimizu & Antzelevitch (1998).

Pode-se inferir também, que o intervalo que transcorre entre o pico da onda T (final da repolarização do epicárdio) e o final da onda T (fim da repolarização das células M) expressa a dispersão transmural da repolarização.

### 1.2.3 Correntes iônicas envolvidas na repolarização ventricular e sua contribuição para a heterogeneidade ventricular.

A atividade elétrica cardíaca é dada pela interação de diferentes correntes iônicas participantes na gênese do potencial de ação (PA). Essas correntes podem ser classificadas em dois grandes grupos: correntes despolarizantes e repolarizantes. Este segundo grupo é de interesse vital dada sua importância na gênese das arritmias. Qualquer alteração nas correntes repolarizantes pode gerar mudanças na duração do potencial de ação, precipitando um gradiente elétrico propício a eventos arrítmicos.

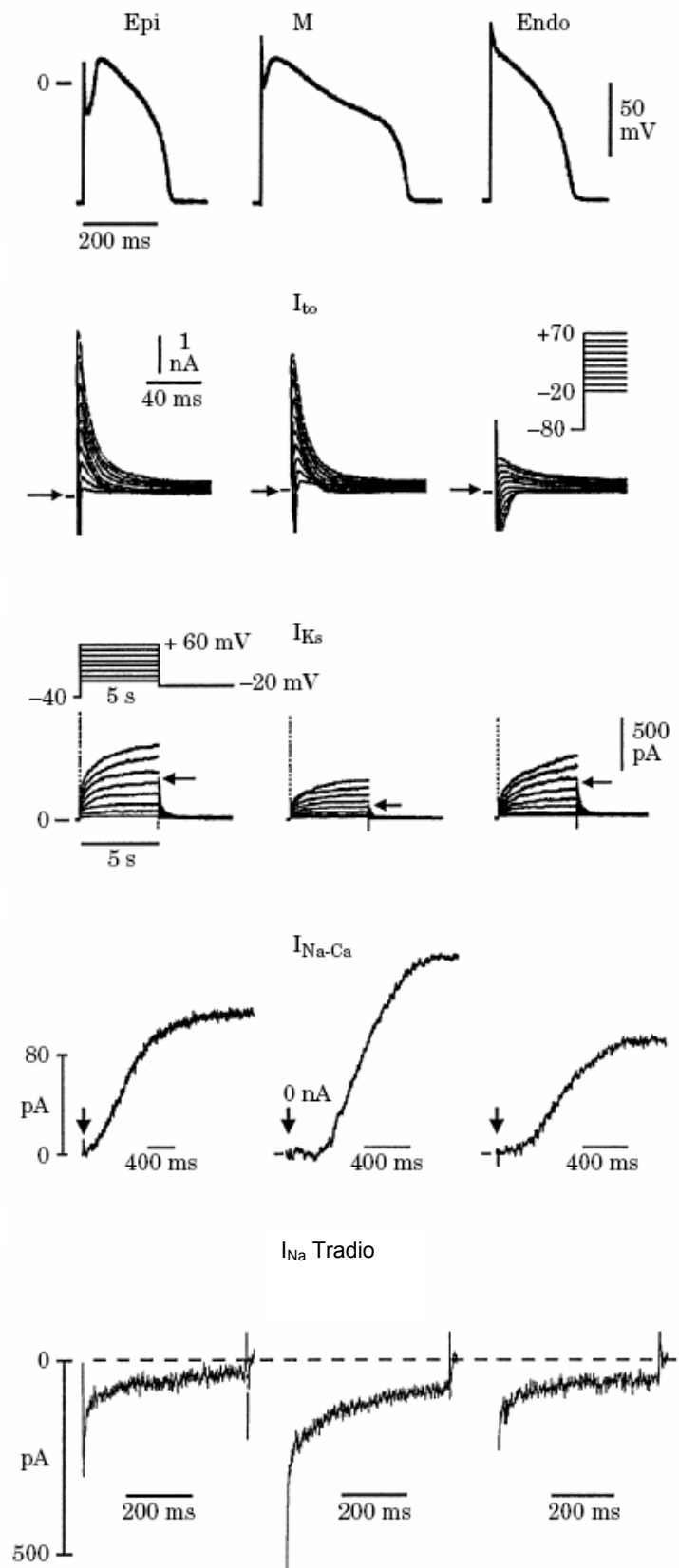
Dentro do grupo das correntes iônicas repolarizantes, as correntes de potássio são predominantes. Entre elas encontra-se a corrente transiente de saída ( $I_{to}$ ), sensível a 4-aminopiridina (JOSEPHSON et. al. , 1984); a corrente de potássio retificadora retardada ( $I_K$ ) com seus dois componentes, rápido ( $I_{Kr}$ ) e lento ( $I_{Ks}$ ), tal como foi demonstrado por Sanguinetti & Jurkiewicz (1990) e Li e cols. (1996) no miocárdio humano; e, a corrente de potássio retificadora de influxo ( $I_{K1}$ ). Também outras correntes repolarizantes de potássio podem ser citadas, tais como,  $I_{kur}$ ,  $I_{K,ACh}$ ,  $I_{K,ATP}$ ,  $I_{Kss}$  (TAMARGO et. al. , 2004).

O fato de uma célula cardíaca ter uma maior ou menor densidade de uma determinada corrente caracteriza as propriedades eletrofisiológicas da mesma. Assim as células epicárdicas e células M possuem uma proeminente corrente  $I_{to}$  quando comparadas com as células endocárdicas, o que confere a elas uma marcante fase 1 ou forma de “*spike and dome*” (Figura 4). Por outro lado, as células M possuem um perfil iônico diferenciado com respeito ao endocárdio e epicárdio, como uma baixa

densidade de expressão da corrente  $I_{Ks}$  e uma forte expressão da corrente de sódio tardia e do trocador sódio/cálcio ( $I_{Na-Ca}$ ) (LIU & ANTZELEVITCH, 1995, ZYGMUNT et. al. , 2000, ZYGMUNT et. al. , 2001). Uma diminuição das correntes repolarizantes na fase 2 e 3 nas células M induzem, portanto, um incremento na duração do potencial de ação. Desta maneira, agentes que bloqueiam as correntes  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  ou incrementam as correntes  $I_{Ca}$  ou  $I_{Na}$  tardia, geram um maior incremento na duração do potencial de ação das células M, que nas células endocárdicas ou epicárdicas. Este prolongamento na duração do potencial de ação pode induzir a ocorrência de respostas elétricas anômalas, tais como pós-potenciais precoces e tardios, os quais são claramente pontos de partida de eventos arritmogênicos graves.

**Figura 4.** Potenciais de ação típicos das células das diferentes camadas ventriculares.

As diferenças nas formas do potencial de ação de cada uma delas são resultantes da heterogeneidade na expressão das correntes iônicas previamente descritas Modificado de Antzelevitch (2001).(ver próxima página).



#### 1.2.4 Heterogeneidade nas correntes iônicas

Assim como descrevemos previamente que existem diferentes células cardíacas, localizadas de forma heterogênea dentro da parede ventricular, as correntes iônicas também se encontram distribuídas heterogeneamente dentro desta, tal como foi descrito por Casis e cols. (1998), mostrando as diferenças na distribuição das correntes de potássio na parede ventricular do coração do rato. Interessantemente, Zicha e cols. (2003) mostraram a diferença de expressão das correntes iônicas de potássio de forma espécie dependente, o que é de vital importância na hora de escolher o modelo adequado para realizar os experimentos.

Justamente dentre as correntes de potássio, Patel & Campbell (2005) mostraram que diferentes componentes da corrente  $I_{to}$ , rápido e lento, podem ser característicos de uma região da parede ventricular, como tinha sido descrito por Litovsky e cols. (1988), mostrando maior densidade dessa corrente no epicárdio, comparado ao endocárdio. Outro trabalho demonstrando a heterogeneidade da expressão das correntes de potássio no ventrículo canino foi o publicado por Volders e cols. (1999). Nesse trabalho os autores mostraram que a densidade da corrente  $I_{Kr}$  nas células M dos ventrículos direito e esquerdo eram similares, porém, as densidades das correntes  $I_{to}$  e  $I_{Ks}$  foram maiores no ventrículo direito que no esquerdo. Esta heterogeneidade na densidade da corrente  $I_{Ks}$  através da parede do ventrículo direito tem sido relacionada com a dispersão da repolarização e o risco de deflagar *Torsade de pointes* com maior incidência nesta região (ANYUKHOVSKY et. al. , 1988, GINTANT, 1995, LIU & ANTZELEVITCH, 1995).

As propriedades biofísicas das correntes iônicas podem ser moduladas por diferentes agentes, farmacológicos e não farmacológicos.

Em um trabalho prévio publicado por nosso Laboratório, observou-se que as correntes iônicas podem ser moduladas por imunoglobulinas interagindo com receptores de membrana acoplados a proteína G. Deste modo foi mostrado que imunoglobulinas G, com atividade muscarínica, provenientes de pacientes chagásicos crônicos, diminuía a corrente de cálcio tipo L em cardiomiócitos isolados de coelho (HERNANDEZ et. al. , 2003). Nascimento e cols. (2001) descreveram o mecanismo pelo qual a ativação dos receptores muscarínicos M2 modulava a  $I_{Ca}$ . Utilizando anticorpos monoclonais contra a segunda alça extracelular do receptor M2, mostraram que a inibição da corrente de cálcio mediada pelos anticorpos era dada por um incremento no nível intracelular de cGMP.

Diferentes trabalhos têm sido realizados com objetivo de desvendar a origem desses anticorpos (IgG) na doença de Chagas (Ver abaixo).

### **1.3 Imunidade na doença de Chagas**

Na doença de Chagas a imunidade humoral é demonstrada pela detecção de anticorpos circulantes nas fases aguda e crônica da infecção. A imunidade celular tem sido imputada como importante no desencadeamento das lesões teciduais das formas crônicas da doença, por se tratar de fenômenos desencadeados presumivelmente por auto-imunidade.

Sucintamente, podemos determinar o início da resposta imune quando o antígeno é captado por células, conhecidas como células apresentadoras de antígeno

(CAA), especializadas em processá-los e apresentá-los aos linfócitos T auxiliares (T Helper - Th) ou por interação direta de antígenos com células do sistema imune. O resultado desse contato inicial entre o antígeno, as CAA e as células do sistema imune é a ativação de outras classes celulares que irão executar suas funções específicas. Os linfócitos e outras células envolvidas nesse processo se comunicam através de contato direto ou por citocinas. Assim a resposta imunológica pode ser dividida em resposta T *helper* 1 (Th1) ou T *helper* 2 (Th2). A resposta Th1 produz citocinas, tais como, interleucina 2 (IL-2), interferon-gama (INT- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. A IL-2 ativa receptores dos linfócitos CD4+, estimulando a formação de clones celulares, responsáveis pela manutenção da produção de citocinas e, paralelamente, estimulam células natural killer, com ação de potencializar uma maior produção de IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  age sobre macrófagos, estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular, levando a maior produção de TNF- $\alpha$ , que incrementa a ativação macrofágica, atuando através de um mecanismo sinérgico cíclico. As células pertencentes à resposta Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10.

As citocinas IL-4 e IL-10 são supressoras da atividade macrofágica, produzindo bloqueio da estimulação de macrófagos, com conseqüente desvio da resposta imunológica. Adicionalmente, IL-4 estimula linfócitos B, que se tornam produtores de imunoglobinas, e mastócitos, que passam a produzir mais IL-4, incrementando a resposta supressora macrofágica.

O balanço entre a resposta Th1 e Th2 é influenciado por diversos fatores, com tendência a prevalecer determinada resposta. Dentre esses fatores podemos destacar:



perfil de citocinas do meio, dose antigênica, tipo de antígeno e atividades de hormônios presentes no meio.

Assim na Doença de Chagas, os linfócitos da resposta de tipo Th-1, CD4+, são os principais mediadores da indução da resposta imune protetora contra *T. Cruzi* (HOFT et. al. , 2000). Os linfócitos CD8+, o interferon gama, o fator de necrose tumoral alfa e os macrófagos são importantes elementos para controlar a replicação intracelular do parasita durante a fase aguda da enfermidade. Já na fase crônica, anticorpos específicos contra o parasita, que fixam complemento e lisam os tripomastigotas sanguíneos, seriam as moléculas responsáveis pela latência da infecção. As células da resposta Th-1, que secretam interleucina 2 (IL-2), estão envolvidas na síntese de imunoglobulinas G de tipo 2 (IgG<sub>2</sub>). Na resposta Th-2 encontra-se uma secreção predominante de IL-4, IL-5, e IL-10, que estão envolvidas na resposta humoral e inibem a resposta Th-1 e macrófagos (MINOPRIO et. al. , 1993).

Dentro da resposta imune Th-1 e Th-2, a tolerância imunológica tem um papel fundamental na doença de Chagas. A tolerância imunológica é uma propriedade característica dos linfócitos B e T. O timo é o órgão que participa da caracterização fenotípica dos linfócitos T para discriminarem entre o próprio e o não próprio. Este tipo de imunidade pode ser mantida pela eliminação física (deleção clonal) ou pela inativação funcional (anergia clonal) de linfócitos B e T auto-reativos. Assim, pode-se achar receptores na superfície dos linfócitos T que reconhecem antígenos apresentados pelo complexo de histocompatibilidade maior (MHC) na superfície de células apresentadoras de antígeno, tais como as células dendríticas, linfócitos B ou macrófagos. É sabido que a ativação de certos receptores na membrana é de vital importância para desencadear uma resposta inflamatória, como o exemplo dos

receptores para a região Fc de imunoglobulinas G (FcγR). Em um modelo experimental da doença de Chagas em camundongos, foi demonstrado um incremento na expressão dos FcγR nos linfócitos T-CD8. Foram achados CD8 em grande quantidade no infiltrado inflamatório nos corações dos animais infectados, sugerindo um papel importante na resposta imune e inflamatória (HENRIQUES-PONS et. al. , 2005). Em 1993, Sun & Tarleton já tinham um indício desses resultados recém descritos. Naquela oportunidade eles demonstraram em um modelo murino da fase aguda da doença de Chagas, que entre as células T do infiltrado infamatório, os CD8+ (47.0-58.9%) foram achados em maior quantidade que as células CD4+ (9.3-18.6%). Outro trabalho do mesmo grupo, pesquisando o papel da resposta Th-1, demonstrou que uma depleção de CD8+ e/ou CD4+, antes da inoculação, resultava em um incremento da parasitemia e mortalidade em camundongos (TARTELON et. al. , 1994). Reis e cols. (1993) mostraram os mesmos achados na cardiomiopatia chagásica crônica humana, onde os linfócitos CD8+ são predominantes. Outro achado interessante é a mudança na relação CD4+/CD8+, que só acontece nos pacientes com comprometimento intestinal, mas não nos pacientes com distúrbios cardíacos. Assim foi observada uma diminuição na quantidade de CD4+ nos pacientes com afecção intestinal da doença de Chagas (LEMOS et. al. , 1998).

Como conseqüência da resposta humoral previamente citada, foi possível observar a presença no soro de pacientes com doença de Chagas crônica componentes que podem reagir com o endocárdio (E), estruturas vasculares (V) e com o interstício (I) em camundongos. Os primeiros achados foram realizados por Cossio e cols. (1974), que nomearam esses anticorpos de anti-EVI. As primeiras suspeitas deste fenômeno foram observadas pelo Dr. Cossio que observou alterações em preparações

de átrio murino quando perfundidos com soro proveniente de pacientes chagásicos crônicos.

Em 1976, o grupo de Sterin-Borda, demonstrou que esses anticorpos anti-EVI presentes nos soros de pacientes, modulava a frequência de contração em preparações isoladas de átrio de rato. Os anti-EVI aumentaram a frequência de contração, e esse incremento foi abolido pelo tratamento prévio com antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos. Em outro experimento, no mesmo trabalho, observaram que ante a pré-estimulação da preparação de átrio com noradrenalina, os anticorpos podiam também diminuir o efeito evocado.

Partindo da base dos estudos citados anteriormente foram achados anticorpos que ativam receptores do sistema nervoso autônomo, tanto adrenérgico (Ac- $\beta$ ) e/ou colinérgico (Ac-M) (STERIN-BORDA et. al. , 1984, GOIN et. al. , 1994), em pacientes chagásicos crônicos. Mijares e cols. (1996) e Mobini e cols. (1999) mostraram que estes anticorpos poderiam se unir na segunda alça extracelular dos receptores, ativando-os.

É importante ressaltar que a presença dos anticorpos funcionais não é só uma característica dos pacientes chagásicos crônicos, pois foi descrito também, em uma baixa porcentagem (10% e 11.3% de Ac- $\beta$  e Ac-M respectivamente), em 408 pacientes sadios (LIU et. al. , 1999). Na cardiomiopatia dilatada é possível encontrar estes e outros anticorpos (NEUMANN et. al. , 1990). Fu e cols. (1993) observaram o reconhecimento dos receptores M2 muscarínico pelo soro de 36 pacientes com cardiomiopatia dilatada. Entre eles 38.8% dos soros reconheceram o receptor, sendo este o primeiro trabalho a demonstrar a presença destes na cardiomiopatia dilatada. Outro trabalho a demonstrar a presença dos Ac- $\beta$  no soro e sua união com a segunda alça extracelular foi o descrito por Magnusson e cols. (1990), em 30% dos pacientes

com cardiomiopatia dilatada. Anos após, este mesmo grupo caracterizou esses anticorpos, observando efeito funcional dos mesmos em cultura de cardiomiócitos neonatos de rato. No mesmo trabalho, os autores compararam os resultados obtidos com anticorpos produzidos por coelhos imunizados com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta-1 adrenérgico, obtendo resultados semelhantes (MAGNUSSON et. al. , 1994).

A gênese destes anticorpos ainda não foi elucidada, mas alguns pesquisadores acreditam em um processo de mimetismo molecular entre proteínas do parasita e proteínas humanas. Entre eles, Ferrari e cols. (1995) mostraram que os anticorpos presentes nos pacientes chagásicos crônicos podiam reconhecer a parte C-terminal da proteína ribossomal P0 do *Trypanosoma cruzi* e a segunda alça extracelular do receptor beta-1 adrenérgico. Quando compararam os dois peptídeos, observaram uma alta homologia em uma seqüência C-terminal da P0- $\beta$  (**AESEE**) com um epitopo polianiônico do receptor beta-1 humano (**AESDE**). No mesmo trabalho os autores mostraram que o reconhecimento do peptídeo P0 por anticorpos presente em soro dos pacientes chagásicos crônicos foi inibido tanto pelos peptídeos derivados da proteína ribossomal P0- $\beta$ , quanto pelo peptídeo correspondente à segunda alça extracelular do receptor beta-1 (H26R). Interessantemente, eles realizaram ensaios funcionais para poder determinar o efeito destes peptídeos, observando um incremento na frequência cardíaca em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos na presença de H26R, e que esse incremento era abolido na presença do bloqueador beta-1, bisoprolol e do peptídeo P0- $\beta$ . Masuda e cols. (1998), descreveram a participação do receptor M2 muscarínico no mecanismo de mimetismo molecular entre epitopos deste e proteínas P ribossomais do *T. cruzi*. Nessa oportunidade, utilizando a eletrofisiologia como

ferramenta, observaram o efeito depressor na eletrogênese do coração isolado de coelho produzido pelo soro de pacientes chagásicos crônicos. Assim, quando o soro foi previamente incubado com o peptídeo correspondente à segunda alça extracelular do receptor muscarínico M2, contendo um epitopo polianiônico imunodominante já descrito (ELIAS, 1996), o efeito depressor foi inibido. Este efeito foi caracterizado como muscarínico (DE OLIVEIRA et. al. , 1997), sendo também inibido na presença das proteínas recombinantes de *T. Cruzi*, sugerindo que a presença de cargas negativas nestes é de vital importância na interação dos anticorpos com o receptor. Estes dados são concordantes com resultados previamente descritos por Lopez-Bergami e cols. (1997) em camundongos imunizados com a proteína P2 $\beta$  do *T. Cruzi*, assim como os de outro trabalho publicado por Fu e cols. (1995), mostrando a importância da união dos anticorpos ao receptor M2 muscarínico.

### **1.3.1 Efeito dos anticorpos com atividade muscarínica ou adrenérgica na eletrogênese cardíaca**

Em nosso laboratório, soros de pacientes chagásicos crônicos com e sem arritmias complexas foram caracterizados em ensaios funcionais, usando registro de ECG de corações isolados de coelhos. Só os soros dos pacientes com arritmias complexas evocaram distúrbios da condução atrioventricular (DE OLIVEIRA et. al. , 1997), tais como bloqueio atrioventricular e diminuição da frequência cardíaca. Estes fenômenos foram revertidos na lavagem dos soros perfundidos. Na oportunidade, os autores observaram que a perfusão da fração IgG desses soros era responsável por esses fenômenos, assim como os efeitos eram abolidos na presença do bloqueador

muscarínico atropina, sugerindo uma participação da modulação colinérgica nesses efeitos mediada pela estimulação do receptor M2 muscarínico.

Também em nosso laboratório, Costa e cols. (2000), realizaram um *screening* em 58 soros de pacientes chagásicos crônicos, observando seus efeitos sobre a frequência cardíaca espontânea de corações isolados de coelhos. 17% dos soros tiveram efeito beta adrenérgico (Ac- $\beta$ ), 45% muscarínico (Ac-M), e, 38% sem efeito algum (Ac-). Em todos os experimentos se utilizou antagonistas adrenérgico (propranolol) ou colinérgico (atropina) quando apropriado, permitindo concluir que os efeitos era mediados por ativação de receptores acoplados a proteína G, fossem eles muscarínicos ou adrenérgicos.

Chiale e cols. (2001), demonstraram uma correlação entre o tipo de distúrbio de condução e o tipo de resposta das IgGs presentes no soro dos pacientes. O estudo foi realizado em pacientes com cardiomiopatia dilatada e pacientes chagásicos crônicos. Interessantemente, 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%), na cultura de cardiomiócitos de rato. Este trabalho é mais uma contribuição para entender a hipótese já levantada por Masuda e cols. (1998) acima citada, onde as IgGs possuem um papel aparentemente pro-arritmogênico. Outro trabalho que sustenta o papel arritmogênico dos anticorpos foi publicado por Fukuda e cols. (2004), no qual foram imunizados coelhos com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta-adrenérgico, mostrando um incremento nos pós-potenciais precoces e uma diminuição da densidade das correntes de potássio nas células M desses animais.

Recentemente Escobar e cols. (2006), utilizando anticorpos contra o receptor adrenérgico beta-2, observaram a presença de distúrbios de condução (bloqueio A-V) no coração isolado de camundongo. Essas arritmias não foram observadas nos corações perfundidos com IgGs com efeito sobre o receptor beta-1 adrenérgico. Os autores sugerem neste trabalho uma via alternativa da via tradicional dos receptores beta-adrenérgicos.

## 1.4 Hipótese de trabalho

Anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos poderiam modular a repolarização ventricular ativando receptores de membrana acoplados a proteína G.

### Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo geral

Investigar se os anticorpos dos pacientes chagásicos crônicos modulam a repolarização ventricular, observando os possíveis mecanismos básicos envolvidos neste fenômeno.

#### Objetivos específicos

1. Identificar entre os parâmetros clínicos analisados, preditores e ou marcadores de morte de causa cardíaca nos pacientes.
2. Avaliar a relação entre os efeitos dos soros de pacientes chagásicos crônicos no intervalo QT medido *ex vivo* e os parâmetros da repolarização ventricular do ECG de pacientes chagásicos crônicos.
3. Caracterizar os efeitos dos anticorpos chagásicos no potencial de ação das células M, visando investigar um possível incremento na heterogeneidade da repolarização ventricular induzido pelos anticorpos chagásicos.
4. Caracterizar os efeitos dos anticorpos chagásicos nas correntes iônicas repolarizantes,  $I_{to}$  e  $I_{Ks}$ , visando identificar as possíveis correntes iônicas envolvidas na modulação ventricular mediada pelos anticorpos.



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Pacientes e seleção dos pacientes**

Ao longo de 10 anos, em nosso laboratório, foram caracterizados aproximadamente 100 soros de pacientes com doença de Chagas: Os pacientes eram provenientes de áreas endêmicas de Minas Gerais e Bahia e moravam fora dessas áreas há pelo menos 10 anos, o que permite descartar uma possível re-infecção.

Foi realizada uma caracterização clínica no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ), pelo Dr. Roberto Pedrosa. A cada 4 meses realizavam-se estudos clínicos e laboratoriais, incluindo avaliação física, ECG de 12 derivações, ecocardiograma no modo M e bidimensional, e quando necessário ECG holter de 24 h e prova ergométrica. Estudos bioquímicos, inclusive de função tireóideana, foram realizados também.

Pacientes que apresentavam doença de Chagas concomitantemente com: hipertensão arterial, doença pulmonar obstrutiva crônica, cardiomiopatia, doença valvular cardíaca, disfunção da tireóide, abuso de consumo de álcool, disfunções imunológicas conhecidas, alterações hidro-eletrolíticas (cálcio e potássio) ou doenças sistêmicas, foram excluídos deste estudo.

Adicionalmente, foram excluídos os pacientes cujos ECG apresentaram: 1) impossibilidade de medir o intervalo QT em pelo menos 5 derivações, 2) fibrilação atrial, 3) paciente com marcapassos e bloqueio atrioventricular, 2:1, 4) presença constante de batimentos prematuros ventriculares e/ou supraventriculares e 5)

alterações próprias na qualidade dos registros. Após estas especificações foram estudados 38/100 pacientes na presente tese.

### **Coleta do sangue e diagnóstico sorológico**

Durante o acompanhamento dos pacientes que participaram deste trabalho, foi obtida uma amostra de sangue no setor de Imunologia do HUCFF-UFRJ. Todos os pacientes estavam clinicamente estáveis nos últimos três meses antes da coleta. Para realização desta, foram suspensas as drogas administradas a eles 48hs antes, para evitar qualquer interferência das mesmas na caracterização dos soros.

Para diagnosticar a doença de Chagas, foram utilizados os testes de imunofluorescência indireta, ELISA e hemoaglutinação indireta (MONCAYO & LUQUETTI, 1990, LEVI et. al. , 1996). O controle positivo foi checado pelo método de ELISA (DE MEIRELLES et. al. , 1990) realizado no Laboratório de Imunologia Molecular do IBCCFF-UFRJ. Os pacientes foram considerados chagásicos positivos, quando pelo menos 2 dos 3 métodos aplicados foram positivos.

### **Purificação das frações de Imunoglobulinas G**

Com o objetivo de obter a fração policlonal total de IgG, estas foram purificadas dos soros de cada paciente por cromatografia de troca iônica em coluna de *sepharose-DEAE* (Amersham Pharmacia) ou em coluna de proteína A (HiTrap®, Pharmacia Biotech). Quando o fracionamento foi feito por DEAE, os soros foram previamente precipitados em sulfato de amônio saturado a 40% durante 4 h, sob agitação constante

a 4°C. Os precipitados foram centrifugados a 20000 g por 30 min, o precipitado obtido ressuspendido em tampão fosfato 10 mM, pH 8.0 durante 12 h., a 4°C. A fração protéica dialisada foi dispensada na coluna de sepharose-DEAE previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 8.0, incubada a temperatura ambiente durante 2 h., e a fração de IgG eluída após o tampão fosfato 10 mM, pH 8.0, dialisada extensivamente em PBS, pH 7.4 durante 12 h. Pelo método de proteína A, os soros foram pré-equilibrados com tampão Tris-HCL 1M, pH 8.0 e aplicados na coluna de proteína A equilibrada no mesmo tampão. Após a passagem do gradiente contínuo do tampão Tris-HCL 100 e 10 mM, pH 8.0, a fração de IgG foi eluída com tampão glicina 100 mM, pH 3.0 e imediatamente dialisada contra PBS, pH 7.4 durante 12 h. As frações IgG obtidas foram alíquotadas e armazenadas a -20 °C. A pureza das frações IgG coletadas foi confirmada por imunodifusão radial em gel de agarose contra Anti-IgG total e Anti-IgG humana (DAKO A/S, Denmark) obtendo-se uma banda única de precipitação. A quantificação de proteína total em cada fração foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et. al. , 1951).

## **2.2 Parâmetros eletrocardiográficos e de repolarização ventricular**

Para cada paciente, foi registrado um ECG de 12 derivações, com uma velocidade do papel de 25 mm/s e uma amplitude de 10 mm/mV. As alterações apresentadas nos ECG foram classificadas conforme a *New York Heart Association* (NYHA), usando o código modificado de Minnesota, para cardiopatia de Chagas (MAGUIRE et. al. , 1982). Os parâmetros medidos foram: intervalo QT máximo (QTmax) definido como o máximo valor de QT, QT corrigido (QTc) utilizando a fórmula de Bazet

e a dispersão do intervalo QT (dQT), em três complexos consecutivos. A variabilidade inter-observador foi avaliada mediante a medida da dQT em duas oportunidades, em forma consecutiva, não apresentando diferenças significativas.

O retorno da onda T à linha de base foi determinado visualmente e em concordância com os métodos descritos na literatura (LEPESCHKIN, 1952). Na presença da onda U, a onda T foi medida entre o vale das duas. Quando a onda T não estava bem definida descartou-se o registro e eliminou-se o paciente. Extra-sístoles e pós-extrasístoles também foram excluídas.

A dispersão do intervalo QT foi definida como a diferença entre o máximo QT e o mínimo QT em um registro de 12 derivações. Não foi necessário corrigir a dQT com a frequência conforme mostra a bibliografia (ZABEL et. al., 2003). Os resultados foram comparados aplicando o Teste-t não pareado.

Foram usadas as pautas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Tratado de Helsinky (1963), revisado em Veneza (1963). O protocolo usado foi aprovado pelo Comitê de Ética do HUCFF e obteve o consentimento escrito dos pacientes.

### **ECG no coração isolado de coelho**

O registro de ECG em corações isolados de coelho é uma ferramenta muito útil utilizada em nosso laboratório para caracterizar os soros provenientes dos pacientes chagásicos crônicos e outras cardiomiopatias, como cardiomiopatia dilatada.

Utilizaram-se coelhos de ambos os sexos da linhagem Nova Zelândia com peso entre 1,5 a 2 kg. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, praticando-se esternotomia alargada, e o coração rapidamente retirado, canulado

pela artéria aorta e ligado a um sistema de perfusão com solução de Tyrode (ver soluções) a  $36\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

Com a técnica de Langendorff é possível a manutenção do fluxo coronário e oxigenação miocárdica, sendo o excesso de solução drenado pelo seio coronariano. O fluxo foi mantido durante todo o experimento a 10ml/min, com auxílio de uma bomba peristáltica. (Gilson Miniplus 3)

Três eletrodos de Ag-AgCl dentro de tubos de vidro preenchidos com KCl 3 M foram usados para obter os registros de ECG. Dois eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial (3A9, TEKTRONIX Inc.) e o terceiro foi conectado a terra.

Os soros foram caracterizados previamente usando-se o seguinte protocolo: 1) registro controle por 30 minutos perfundindo o coração com solução Tyrode, 2) 30 minutos com soro dos pacientes (diluído 1/100 v/v) e 3) 30 minutos de lavagem com solução Tyrode.

Protocolo:

|          |      |         |
|----------|------|---------|
| CONTROLE | SORO | LAVAGEM |
|----------|------|---------|

Também foram utilizados, como controle, soros de pacientes sem doença de Chagas ou outra doença qualquer, que seriam submetidos à cirurgia ortopédica.

O eletrocardiograma foi continuamente monitorado em um osciloscópio (561 TEKTRONIX, Inc.) e registrado em polígrafo (2200, Gould Inc.) a cada 5 min.

Os soros foram caracterizados como tendo efeito muscarínico (Ac-M) quando diminuía a frequência cardíaca espontânea em mais de 10% quando comparado

ao controle e esse efeito era bloqueado com o antagonista muscarínico atropina (1 $\mu$ M). Foram caracterizados como tendo efeito beta adrenérgico (Ac- $\beta$ ) quando incrementavam a frequência cardíaca espontânea em mais de 10% quando comparados ao controle e esse efeito era bloqueado com o antagonista beta adrenérgico propranolol (1 $\mu$ M). Os soros que não possuíam efeito cronotrópico algum foram considerados como Ac-.

Para eliminar a variabilidade no intervalo QT dada pela frequência cardíaca, os corações foram estimulados com um par de eletrodos conectados ao átrio direito, para controlar a frequência de batimentos, a qual foi mantida 10% acima da frequência cardíaca basal. Com esta ferramenta evitamos a correção do intervalo QT pela frequência cardíaca. Assim também utilizando ritmo constante evitamos a influencia da frequência na ativação de diversas correntes iônicas dependentes do tempo.

Os intervalos QT de cada um dos ECGs foram medidos por duas pessoas diferentes sem ter conhecimento do efeito do soro testado. Os dados obtidos foram comparados aplicando Teste-t pareado.

### **2.3 Registro do potencial de ação nas células M de cobaia.**

#### **Obtenção das preparações**

Corações de cobaia (250/300 gr.) de ambos os sexos foram utilizados para obter preparações multicelulares. Os animais foram heparinizados (500 UI/100grs por animal) anestesiados com éter e sacrificados através de deslocamento cervical.

O coração foi retirado rapidamente e realizou-se a dissecação das preparações para localizar as células M. As células M foram localizadas no subepicárdio do ventrículo esquerdo assim como nos músculos papilares do ventrículo direito. Para poder obter as preparações de subepicárdio contou-se com o auxílio de um dermatomo (Davol Simon Dermatome Power Handle, folha nº 3295, Cranston R.I.) obtendo-se fatias de subepicárdio ultrafinas, aproximadamente 10 mm de largura, 15 mm de comprimento e 1-2 mm de espessura.

Assim os tecidos obtidos foram perfundidos inicialmente em solução de Tyrode borbulhada com mistura carbogênica (95 % O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>), pH= 7,4 ± 0,1. A temperatura inicial de perfusão foi de 25 °C, a mesma foi incrementada gradativamente ate atingir os 37 ± 0.5 °C. As preparações foram equilibradas durante aproximadamente 2 h. antes da realização dos registros. A solução de Tyrode foi perfundida mediante o auxílio de uma bomba de perfusão a fluxo constante de 800 ml/hora (LifeCare Pump, modelo 4, Abbot/Shaw). Os soros dos pacientes foram diluídos na solução de Tyrode, na concentração de 1/100 v/v.

## **Estimulação e registro**

Foi utilizada estimulação de campo mediante um par de eletrodos Ag/AgCl. Foram aplicados pulsos retangulares de corrente com 0,5-3 ms de duração, com o dobro da intensidade do estímulo limiar, e aplicados à intervalos de ciclo de 300 a 2000 ms. Os registros de potenciais transmembranais foram obtidos com microeletrodos de vidro preenchidos com solução 3M de KCl, apresentando uma resistência de ponta entre 10 e 25 M $\Omega$ , conectados através de um fio de Ag/AgCl a um amplificador de alta impedância de entrada (model KS-700, World Precision Instruments, New Haven, CT). Os sinais foram monitorados em um osciloscópio (Tektronix), e digitalizados através de um sistema conversor AD/DA de aquisição de dados (Digidata 1200 interface, Axon Instruments, Inc.), controlado por um microcomputador Pentium 166 MHz (Intel®, USA), onde os sinais foram armazenados para posterior análise. A análise dos sinais foi feita off-line, utilizando-se os softwares Axotape e Clampfit 6 (Axon Instruments, Inc.).

Para o estudo do efeito do soro dos pacientes no potencial de ação foi medida a duração do potencial de ação a frequência de estimulação (300, 500, 800, 1000 e 2000 ms). Este parâmetro foi medido aos 90% e 30 % da repolarização (DPA<sub>90</sub> e DPA<sub>30</sub>). Além disso, foram medidos também o potencial de repouso (mV) e a amplitude do potencial de ação (mV).



## 5.5 Patch-clamp

Outra técnica eletrofisiológica utilizada neste trabalho, foi o *patch-clamp* tal como descrito por Hamill e cols. (1981). Este método permite observar tanto correntes macroscópicas como unitárias. Para o estudo das correntes macroscópicas utilizou-se a modalidade *whole cell*, onde o *patch* é rompido e a integridade do restante da membrana mantida. Deste modo tem-se acesso à totalidade dos canais iônico presentes na célula e com a aplicação de pulsos de voltagem pode-se observar uma resposta da corrente que passa por toda a célula naquele momento. Esta foi a configuração utilizada neste trabalho.

As micropipetas para *patch* foram confeccionadas a partir de capilares de vidro de borosilicato (com diâmetro externo 1,2 mm e interno 0,68 mm; A-M Systems Inc.) e tracionadas em dois estágios através de um estirador horizontal de pipetas (Sutter Instruments, Co, Mod. P-97). Em seguida as pipetas tiveram as suas pontas polidas pelo calor em uma microforja (Narishige, MF-9, Tóquio, Japão) e, quando preenchidas com solução salina atingiam resistências entre 3 e 7 M $\Omega$ . quando a medida era feita na solução externa padrão. O eletrodo de referência consistia de um fio de Ag/AgCl imerso no banho.

As correntes macroscópicas foram medidas através das micropipetas por meio de um eletrodo de Ag/AgCl conectado a um pré-amplificador conversor corrente-voltagem (*headstage* CV 4, Axon Instruments). O conjunto, pipeta e pré-amplificador, estavam acoplados a um micromanipulador hidráulico (Narishige, Nikon, Japão) que permite a aproximação da pipeta em direção às células através de movimentos

ultrafinos. O conversor por sua vez está ligado a um amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) que permite a leitura do potencial de membrana (na configuração *current clamp*) ou a fixação do potencial de membrana e a quantificação das correntes iônicas (modo potencial controlado - *voltage clamp*).

### **Obtenção dos cardiomiócitos**

Corações de ratos ou cobaias de ambos os sexos foram utilizados para obter os cardiomiócitos. Os animais foram heparinizados (500 UI/100grs por animal), anestesiados com éter e sacrificados através de deslocamento cervical.

Foi aberto o tórax e extraído o coração rapidamente. O coração foi canulado pela artéria aorta, e perfundido retrogradamente com solução de Tyrode e  $\text{CaCl}_2$  (0,2 mM), usando-se a técnica de Langendorff modificada, assegurando assim a perfusão e oxigenação miocárdica.

Para obtenção dos cardiomiócitos, perfundi-se o coração inicialmente com solução Tyrode contendo baixa concentração de cálcio (0,2 mM/L) para realizar a lavagem do sangue. Em seguida, foi perfundida a solução Tyrode sem cálcio nominal, até que se observava uma diminuição da força de contração e finalmente parada dos batimentos. A partir desse momento iniciava-se a perfusão de Tyrode sem cálcio contendo 0.5 mg/ml de solução de colagenase tipo II (Worthington, USA) durante 5-15 minutos ou até que o coração ficasse com um aspecto amolecido. Seguiu-se a lavagem com Tyrode sem cálcio durante 10 minutos, com objetivo de tirar os restos de colagenase. Durante todo o experimento as soluções foram mantidas a uma temperatura de  $36 \pm 0.5$  °C e borbulhadas com oxigênio a 100%.

Separaram-se os átrios, ventrículos, septo e ápice, colocando-se cada um deles nos 24 poços de uma placa de cultura contendo solução KB modificada (em mM): KCl 30, Ácido glutâmico 70, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 1, glicose 10, Taurina 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, EGTA (etilenoglicol-bis(β-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácidotetraacético) 0,3, pH 7,3. Os mesmos foram cortados com tesoura em pequenos pedaços e conservados nessa solução até o momento de sua utilização, (aproximadamente 1h). Para obter células isoladas pequenos pedaços de tecido eram pipetados diversas vezes com um pipeta Pasteur e a solução dispensada na cuba de registro. As células foram usadas dentro de 8 hs após a dissociação.

### **Aquisição e Análise de Dados**

A geração dos protocolos de voltagem e a obtenção dos registros das correntes macroscópicas foram obtidos através do programa pClamp 6.0 (Axon Instruments). As correntes macroscópicas foram filtradas a 1 kHz através de um filtro Bessel passa-baixa de 8 pólos (Frequency Devices Modelo 902). Em seguida os dados foram digitalizados a uma frequência de 10 kHz através de um sistema conversor AD/DA de aquisição de dados (Digidata 1200 – Axon Instruments, USA) controlado por um microcomputador Pentium (Intel®, USA) onde os sinais foram armazenados para posterior análise.

Os dados analisados foram ajustados a funções matemáticas através do programa MicroCal Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA, USA).

Todos os registros foram efetuados à temperatura ambiente (25<sup>0</sup>C) em banho estático (100 μL). As trocas de solução externa foram obtidas em cerca de 50-60 seg.,

usando-se uma bomba peristáltica (Gilson, Minipuls 3). No início de cada experiência, antes da formação do selo, o potencial de junção entre a solução de pipeta e o do banho foi ajustado para zero através do circuito de *offset* do amplificador.

Após a formação de um selo de elevada resistência (gigaômica) entre a pipeta e a membrana celular, os transientes capacitivos rápidos foram minimizados utilizando a compensação de capacitância do amplificador. Com o estabelecimento da configuração *whole-cell*, foram aplicados 4 pulsos de voltagem compreendidos entre -85 mV e -75 mV com incrementos de 5 mV, a partir de um potencial imposto de -70 mV, para determinar a capacitância da membrana celular e utilizar este valor em cálculos posteriores envolvendo a densidade de corrente membranar. A capacitância membranar foi avaliada através da razão entre a carga total,  $Q$ , (estimada através da integração da área sob os transientes capacitivos registrada com um filtro de 10 kHz) e a magnitude do pulso (5 mV).

A resistência de selamento era cerca de 5-10 G $\Omega$  e a de acesso, logo após o rompimento, de 1-2 G $\Omega$ . Os registros foram efetuados 2 minutos após o rompimento e as células mantidas a um potencial constante ( $V_h$ ) de -70 mV. Para correntes superiores a 500 pA, quando necessário, a resistência em série foi compensada em 70-80%.

## Soluções

Tyrode (em mM): NaCl 132, KCl 4, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 1,2, glicose 5, CaCl<sub>2</sub> 1. pH: 7.3

Soluções externas para obtenção das correntes iônicas:

**I<sub>ks</sub>**: Tyrode+ Nicardipina (1μM) + E-4031 (5 μM)

**I<sub>to</sub>**: Tyrode + Nicardipina (1μM) + TEA-CL (50 mM)

Soluções de pipeta para registro das correntes iônicas:

**I<sub>ks</sub>** (mM): KCl 15, MgCl<sub>2</sub> 3.75, EGTA (etilenoglicol-bis (β-aminoetileter)-N, N, N, N-ácido tetraacético) 5, Gluconato de potássio 119, HEPES 5 e ATP 2.84. A solução foi titulada com KOH para pH 7,2.

**I<sub>to</sub>** (mM): KCl 50, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA (etilenoglicol-bis (β-aminoetileter)-N, N, N, N-ácido tetraacético) 10, Acido L-Aspártico 80, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, HEPES 5 e ATP (Na<sup>+</sup>) 3. A solução foi titulada com KOH para pH 7,2.

## 2.5 Drogas

As drogas utilizadas foram preparadas em água bidestilada ou diretamente na solução de Tyrode e divididas em alíquotas para serem posteriormente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia da experiência as alíquotas foram diluídas até a concentração desejada nas soluções externas. O cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl), 4-aminopiridina (4-AP, 5mM), isoproterenol ( $1\mu\text{M}$ ), Atropina ( $1\mu\text{M}$ ), propranolol ( $1\mu\text{M}$ ), atenolol ( $1\mu\text{M}$ ), cloreto de cádmio ( $200\mu\text{M}$ ) e carbacol ( $1\mu\text{M}$ ) foram adquiridas da Sigma (Sigma Chemical Corp. St. Louis, EUA). As mesmas foram dissolvidas na solução externa. Para inibir a corrente de potássio  $I_{Kr}$ , foi utilizado  $5\mu\text{M}$  de E-4031 (Tocris Corp. EUA). Chromanol-293 (Tocris Corp. EUA) foi usado para bloquear  $I_{Ks}$ . Nicardipina, bloqueador da corrente de cálcio foi adquirido da SIGMA. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 2.6 Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  erro padrão média (Média  $\pm$  EPM) e as variáveis categóricas foram apresentadas tanto em porcentagens quanto razão. Para identificar a normalidade das variáveis foi aplicado o teste de Shapiro-Wilks.

Variáveis contínuas foram comparadas tanto com o teste de Kolmogorov-Smirnov quanto com teste-t não pareado entre os grupos sobreviventes e não-sobreviventes e grupos muscarínicos e não-muscarínicos. Quando foram comparados os efeitos dos soros no coração isolado de coelhos de ambos os grupos

de soros testados (i.e. muscarínicos e beta adrenérgicos com o controle), foi utilizado análise de variância (ANOVA One-Way) para amostras repetidas, com o pós-teste de Newman-Keuls.

Foi empregado o coeficiente de correlação de Pearson para analisar o grau de associação entre dQT no ECG dos sujeitos do estudo aos intervalo QT nos registros obtidos no ECG de corações isolados de coelhos. Utilizou-se o teste t de Student aplicado à correlação linear para avaliar a hipótese de ausência de correlação.

As variáveis categóricas foram comparadas com teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado.

Para obter a variabilidade interobservador na análise dos intervalos medidos, Teste-t e análise de variância de F-Snedecor foram aplicados.

Variáveis que apresentavam diferenças significativas às análises uni-variadas entre os grupos sobreviventes e não sobreviventes foram ajustadas a um modelo de regressão logística multivariada, utilizando o procedimento hierárquico “stepwise” para excluir co-variantes significativas, com o objetivo de identificar aquelas com valor preditivo independente para mortes de causa cardíaca, avaliadas ao final de nosso seguimento. O valor de significância de cada variável foi avaliado empregando teste de Wald. Assim, para análise “stepwise” foi utilizando o seguinte algoritmo: i) todas as variáveis admitidas no modelo foram correlacionadas duas a duas para avaliação do grau de dependência entre si; ii) Entre variáveis que apresentavam correlação  $>0,5$  foram excluídas aquelas que apresentavam menor valor de significância estatística ao teste de Wald; iii) o procedimento foi repetido até que todas as variáveis restantes apresentassem correlação não significativa entre si, duas a duas, definindo assim um conjunto de variáveis independentes entre si. iv) O conjunto restante de variáveis

independentes entre si duas a duas definido em (iii) foi finalmente admitido ao modelo. O ajuste final dos dados ao modelo logístico foi avaliado pelo teste de  $\chi^2$  aderência. Para identificar um conjunto de variáveis preditivas dos padrões muscarínico e não-muscarínico encontrado no soro dos sujeitos do estudo, foi ajustado o modelo logístico multivariado, empregando o procedimento hierárquico “stepwise” baseado no algoritmo acima descrito, às variáveis que demonstraram diferenças significativas às análises univariadas entre os grupos muscarínico e não-muscarínico.

Todas as variáveis empregadas no modelo logístico apresentavam ajuste adequado à distribuição normal, com exceção de dQT e do índice do diâmetro diastólico do ventricular esquerdo (Shapiro-Wilks; respectivamente,  $p=0.003$  e  $p=0.01$ ).

Para a comparação entre o efeito dos soros e/ou IgG dos diferentes grupos de pacientes tanto no registro do potencial de ação quanto na densidade das correntes iônicas analisadas foi utilizado *Teste-t* pareado.

A análise estatística foi realizada no EPI Info software versão 6.04 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA), MS Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Statgraphics Plus versão 5.0 (Manugistic, Rockville, MD, USA) e Prism (San Diego, USA). O nível de significância alfa foi fixado em 0,05 para todos os testes.



### 3. Resultados

#### 3.1 Modulação colinérgica da repolarização ventricular mediada por anticorpos

##### 3.1.1. Características clínicas relevantes dos pacientes

Os dados clínicos a seguir, foram analisados com a valiosa colaboração do Dr. Roberto Coury Pedrosa (HUCFF-UFRJ), quem ao longo de mais de 10 anos vem colaborando com nosso laboratório. O Dr. Paulo Benchimol Barbosa, também colaborou com sua experiência na análise dos presentes dados.

A tabela 1 mostra as características de 32 pacientes chagásicos crônicos que apresentaram anticorpos funcionais contra o receptor muscarínico cardíaco (Ac-M; n=17) ou que não apresentavam anticorpos funcionais contra este receptor (Ac-; n=15). Em sua maioria, os pacientes (71%) possuem alterações eletrocardiográficas, porém áreas eletricamente inativas foram observadas em 53% dos pacientes Ac-M, mas não no grupo Ac- (*odds ratio*=∞, p=0.001). Em concordância com esses dados, os pacientes Ac-M, apresentaram sinais ecocardiográficos de dilatação cardíaca (Índice do diâmetro de fim de diástole do ventricular esquerdo (IDDFVE):  $39.6 \pm 0.6 \text{ mm m}^{-2}$  vs  $32.7 \pm 0.8 \text{ mm m}^{-2}$  nos pacientes Ac-; teste Kolmogorov-Smirnov p<0.001) e menor fração de ejeção no ventrículo esquerdo (FEVE, Ac-M:  $36.6 \pm 0.6\%$  vs.  $45.6 \pm 0.4\%$  nos Ac-; teste t, p<0.001).

Síncope e pré-síncope foram associados com bloqueio átrio-ventricular completo (3 pacientes) ou taquicardia ventricular (5 pacientes) no grupo Ac-M. Entretanto no grupo Ac-, um paciente apresentou síncope atribuída a bloqueio átrio-ventricular

completo, outro por hipersensibilidade do seio carotídeo, dois por taquicardia ventricular e dois por causas desconhecidas.

**Tabela 1.**

Table 1  
Baseline characteristics of all Chagas disease patients and those without (non-muscarinic) and with (muscarinic) functionally active cardiac muscarinic antibodies

|                             | All patients<br>(n=32) | Non-muscarinic<br>patient (n=15) | Muscarinic<br>patient (n=17) |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| <i>Clinical variables</i>   |                        |                                  |                              |
| Age, years                  | 57.6±9                 | 55.5±9                           | 59.5±9                       |
| Sex, M/F                    | 12/20                  | 5/10                             | 7/10                         |
| BMI                         | 21.5±1                 | 22.11±1                          | 21.0±1.2                     |
| Syncope                     | 13 (40.6%)             | 5 (33%)                          | 8 (47%)                      |
| Pre-syncope                 | 5 (15.6%)              | 2 (13.3%)                        | 3 (17.5%)                    |
| Palpitations                | 10 (31%)               | 3 (20%)                          | 7 (41%)                      |
| NYHA (Class III/IV)         | 11 (34%)               | 4 (26.6%)                        | 7 (41%)                      |
| <i>Echocardiography</i>     |                        |                                  |                              |
| LVEDDI (mm/m <sup>2</sup> ) | 36.4±4                 | 32.7±3                           | 39.7±3***                    |
| LVEF%                       | 40.9±5                 | 45.7±1                           | 36.7±2***                    |
| <i>Electrocardiography</i>  |                        |                                  |                              |
| Abnormal ECG                | 24 (75%)               | 10 (66.6%)                       | 14 (82.4%)                   |
| RBBB+LAFB                   | 15 (47%)               | 10 (66,6%)                       | 5 (29%)                      |
| EIA                         | 9 (28%)                | 0                                | 9 (53%)***                   |

BMI: body mass index, LVEDDI: left ventricular end-diastolic diameter index; LVEF: left ventricular ejection fraction; RBBB+LAFB: right bundle branch block and left anterior fascicular block; EIA: electrically inactive area. Symptoms and ECG parameters refer to number of patients. Age, IMC, and echocardiography parameters are expressed as mean±SD. \*\*\* $P < 0.001$ .  $P = NS$  for all other comparisons.

Tabela em Medei e. cols. (2007)

### 3.1.1.1. Inclusão e seguimento dos pacientes

Dez dos 32 (31.3%) pacientes chagásicos crônicos morreram durante o estudo (*follow-up*): cinco (50%) por insuficiência cardíaca, sendo quatro deles do grupo Ac-M e um do grupo Ac-. Quatro pacientes morreram de arritmias severas (40%, dois em cada grupo), e, ocorreu um óbito, secundário a neoplasia (10%).

Marca-passo bicameral foi indicado em 5 dos 32 pacientes (15.6%), sendo 60% do grupo Ac-M. O marca-passo foi indicado devido a bloqueio átrio-ventricular completo em 4 pacientes e síndrome do nodo sinusal em um deles. Os cinco pacientes possuíam uma moderada disfunção ventricular.

Analisando os parâmetros ecocardiográficos dos pacientes que morreram, observou-se uma função ventricular alterada (FEVE:  $38.0 \pm 1.3$  %) quando comparada aos pacientes vivos ( $42.0 \pm 1.1$ %, teste t,  $p=0.04$ .), assim como uma significativa cardiomegalia (IDDFVE: vivos  $35.1 \pm 1.0$  mm.m<sup>-2</sup> vs. falecidos  $38.7 \pm 1.0$  mm.m<sup>-2</sup>;  $p=0.004$ ). Quando analisados os parâmetros de repolarização ventricular nesses dois grupos, os intervalos QTmax (vivos  $436.6.0 \pm 13.7$  ms vs. falecidos  $506.6 \pm 16.1$  ms;  $p=0.007$ ) e dQT (vivos:  $60.9 \pm 5.3$  ms vs. falecidos:  $71.1 \pm 5.6$  ms,  $p=0.02$ ) mostraram diferenças significativas entres os grupoos. Entre outros parâmetros de mal prognóstico encontra-se a classe funcional III/IV, da classificação da *New York Heart Association* (NYHA), sendo que os pacientes em ditas classes apresentaram menor sobrevida (*odds ratio*=7.2, 95% CI [1.0–57.5];  $p=0.03$ ). Mesmo sendo diferente o número de óbitos entre os grupos (Ac-M: 35.4% vs. Ac-: 20%), não houve diferença estatística significativa.

### 3.1.1.2 Análise logística multivariada

A função logística multivariada foi ajustada a variáveis eletrocardiográficas (áreas eletricamente inativas, dQT, QTmax e QTc), ecocardiográficas (FEVE e IDDFVE) e clínicas (NYHA), as quais mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes vivos vs. pacientes mortos ao longo dos 10 anos de seguimento. Depois de excluídas as co-variantes, a função foi ajustada às seguintes variáveis: IDDFVE, QTmax e dQT. Os dois fatores INDEPENDENTES de morte cardíaca foram: QTcmax e IDDFVE (QT odds ratio=0.98; 95% C.I. [0.95–1.00]; p=0.03; IDDFVE: odds ratio=0.72; 95% C.I. [0.51–1.0]; p=0.02, Tabela 2).

O valor preditivo positivo foi de 82.6%, o valor preditivo negativo 88.9% e o valor preditivo total de 84.4% (valor de corte 36.4 mm.m<sup>2</sup>, para IDDFVE; 456.3 ms para QTcmax e 64 ms dQT).

#### Tabela 2.

Resultado do modelo stepwise de regressão logística multivariada com as variáveis explanatórias ecocardiográficas e eletrocardiográficas como função de morte de causa cardíaca.

| Variáveis | Coeficiente (β) | Erro Padrão | χ <sup>2</sup> | p    | Odds Ratio | 95% IC          |                 |
|-----------|-----------------|-------------|----------------|------|------------|-----------------|-----------------|
|           |                 |             |                |      |            | Limite inferior | Limite Superior |
| QTcma     | -0.02           | 0.01        | 4.8            | 0.00 | 0.98       | 0.95            | 1.0             |
| dQT       | 0.02            | 0.02        | 0.5            | 0.46 | 1.02       | 0.97            | 1.06            |
| IDFDVE    | -0.33           | 0.17        | 5.0            | 0.02 | 0.72       | 0.51            | 1.0             |

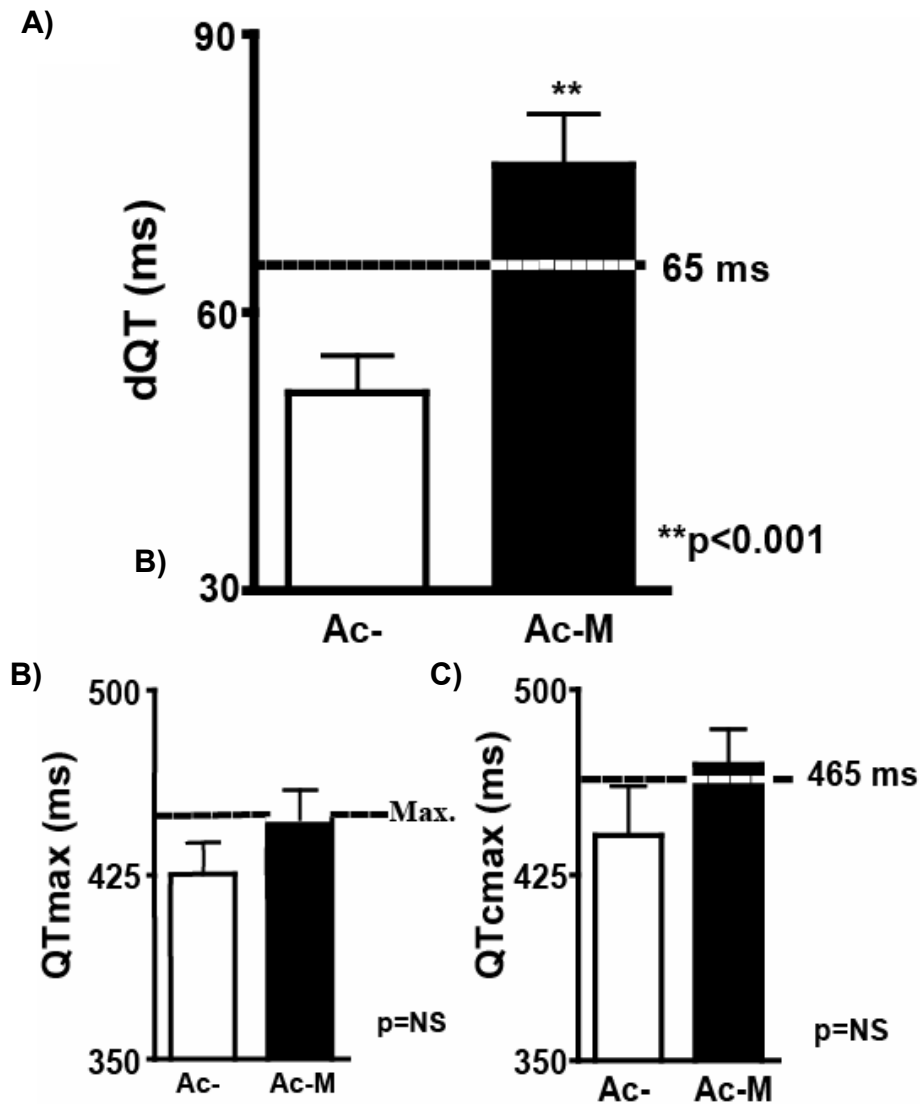
Tabela 2. QTcmax e IDDFVE como preditores de morte de causa cardíaca. QTcmax: máximo intervalo QT; dQT: dispersão do QT; IDDFVE: índice do diâmetro do final da diástole do ventrículo esquerdo; χ<sup>2</sup>: qui-quadrado; IC: índice de confiança. p: valor de significância; Tabela modificada de Medei e cols. (2007).

### 3.1.13. Dispersão do QT, QTmax e QTc no ECG dos pacientes.

Durante o seguimento dos pacientes foram registrados e analisados os eletrocardiogramas de cada um deles, ressaltando os parâmetros correspondentes da repolarização ventricular, os quais constituem uma importante ferramenta diagnóstica e prognóstica.

Assim, encontramos que a dispersão do intervalo QT (dQT) foi significativamente maior nos pacientes Ac-M ( $75.9 \pm 5.5$  ms) quando comparados com os pacientes Ac- ( $50.0 \pm 4.0$  ms;  $p=0.0003$ ) (Figura 5-A) Entretanto, os intervalos QTmax (Ac-M:  $447.6 \pm 11.7$  ms vs. Ac-:  $425.3 \pm 13.0$  ms; Fig. 5-B) e QTc (Ac-M:  $469.6 \pm 19.8$  ms vs. Ac-:  $441.1 \pm 14.3$  ms, Fig. 5-C) não foram estatisticamente diferentes entre os grupos.

Dado que o comprometimento miocárdico pode se refletir no sistema de condução, realizamos uma análise separada nos pacientes com NYHA I/II. Com essa discriminação observamos que dQT foi significativamente maior no grupo Ac-M quando comparado com o grupo Ac- (respectivamente,  $82.0 \pm 7.5$  ms vs.  $50.9 \pm 4.1$  ms;  $p=0.002$ ). Em concordância com os dados acima observados, QTc e QTmax não mostraram diferença significativa entre os grupos.



**Figura 5.** Pacientes com Ac-M possuem maior dQT. Figura A mostra maior dQT nos pacientes Ac-M. O intervalo QTmax e QTcmax não foram diferentes (B-C). As linhas tracejadas representam o valor de corte no quais esses parâmetros foram preditores independentes de morte súbita no trabalho de Salles e cols. (2003). Resultados expressados como Média  $\pm$  EPM. Gráfico modificado de Medei e cols. (2007)

### 3.1.2. Modulação do intervalo QT no ECG de corações isolados de coelho

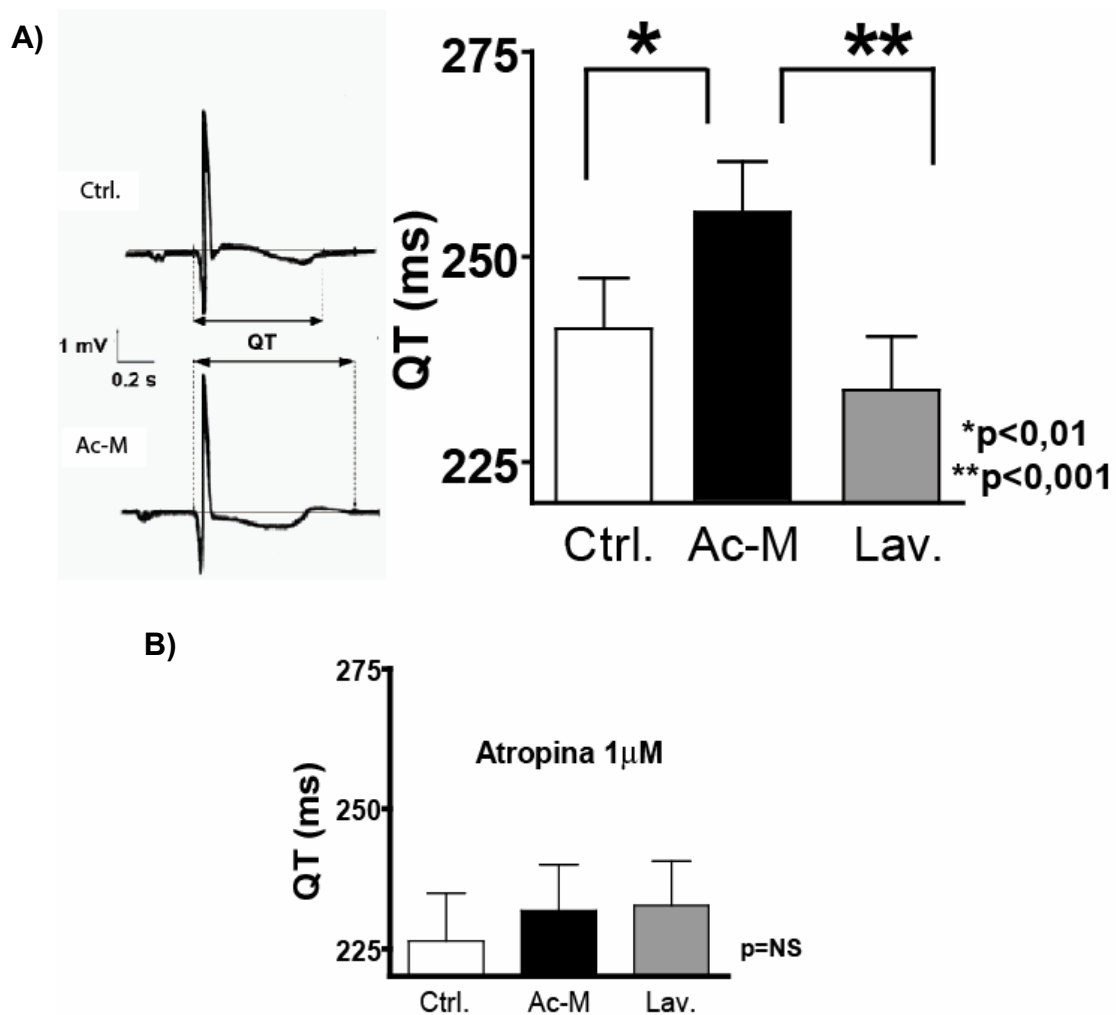
Ao longo de 10 anos em nosso laboratório foram caracterizados mais de 100 soros provenientes de pacientes chagásicos crônicos, tal como descrito acima. No presente trabalho foi analisado o intervalo QT de ECGs realizados em corações isolados de coelhos sadios (ver métodos) correspondentes aos pacientes incluídos neste trabalho.

Dado que os parâmetros da repolarização ventricular podem ser modulados pelas mudanças na frequência cardíaca, somente foram analisados os intervalos QT dos ECGs realizados nos experimentos em que a frequência foi controlada mediante marca-passo externo.

Os soros Ac-M prolongaram significativa e reversivelmente o intervalo QT (Tyrode:  $241.3 \pm 6.1$  ms, Ac-M:  $255.0 \pm 6.1$  ms e lavagem:  $233.8 \pm 6.5$  ms, ANOVA One-Way,  $p=0.0002$ ; Figura 6-A). Para poder observar se o efeito estava sendo mediado pelos receptores muscarínicos, foram repetidos os experimentos, em outro coração, na presença do bloqueador de receptores muscarínicos, atropina ( $1 \mu\text{M}$ ) durante as três condições Tyrode/Ac-M/lavagem. Nestas condições experimentais não foram observadas diferenças significativas, tal como mostra a figura 6-B (Tyrode/Atropina:  $226.4 \pm 8.5$  ms, Tyrode/Atropina/Ac-M:  $231.8 \pm 8.1$  ms e Tyrode/Atropina:  $232.7 \pm 7.8$  ms, ANOVA one-way,  $p=0.18$ ).

No grupo Ac-, os soros dos pacientes não modificaram significativamente o intervalo QT, tal como esperado. (Tyrode:  $249.1 \pm 7.8$ , Ac-:  $252.7 \pm 9.8$  ms e lavagem:  $245.5 \pm 8.6$  ms, ANOVA one-way,  $p=0.13$ ). De fato o pós-teste de Newman-Keuls,

confirma que só os Ac-M incrementam, reversivelmente, o intervalo QT comparado com a condição Tyrode ( $p < 0.01$ ) e lavagem ( $p < 0.001$ ).

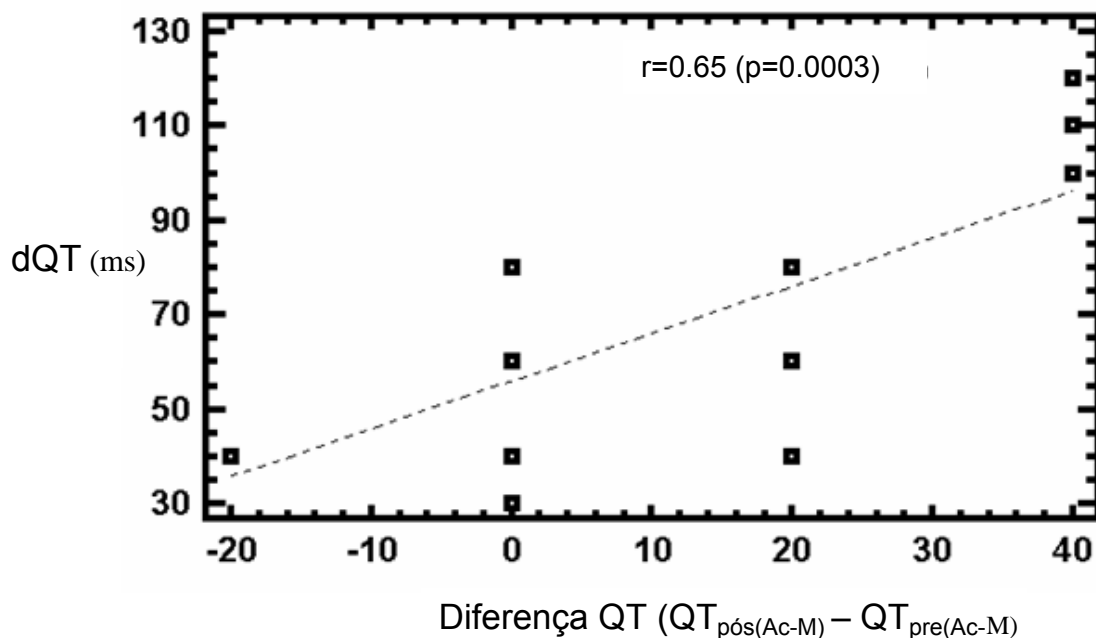


**Figura 6.** Ac-M prolonga reversivelmente o intervalo QT mediante estimulação muscarínica. Figura A na esquerda, mostra um registro representativo do efeito do Ac-M sobre o intervalo QT no ECG, antes (Ctrl.) e durante (Ac-M+) Ac-M (Ac-M:  $n = 15$ , ANOVA One-Way,  $p = 0.0002$ ). Na direita, o sumário dos resultados. Na figura B, o gráfico mostra que, utilizando um antagonista muscarínico, o efeito dos Ac-M é sobre os receptores muscarínicos. Resultados expressados como  $\text{Media} \pm \text{EPM}$ . Modificado de Medei e cols. (2007).



### 3.1.2 .1. Correlação entre dQT nos pacientes e QT no coração isolado de coelho

A dQT nos pacientes Ac-M foi o único parâmetro medido da repolarização ventricular estatisticamente diferente com respeito ao grupo Ac-. Também apenas os soros provenientes destes pacientes (Ac-M) induziram prolongamento do QT no coração isolado de coelhos. Para determinar se existe algum tipo de relação entre estes dois fenômenos, correlacionamos a diferença (em milisegundos) do efeito dos soros no intervalo QT (Relação: pós-Ac-M menos pré-Ac-M) com a respectiva dQT de cada paciente, observando correlação entre os dados analisados e obtendo um coeficiente de Pearson's de 0.65 ( $p < 0.0003$ , Figura 7).



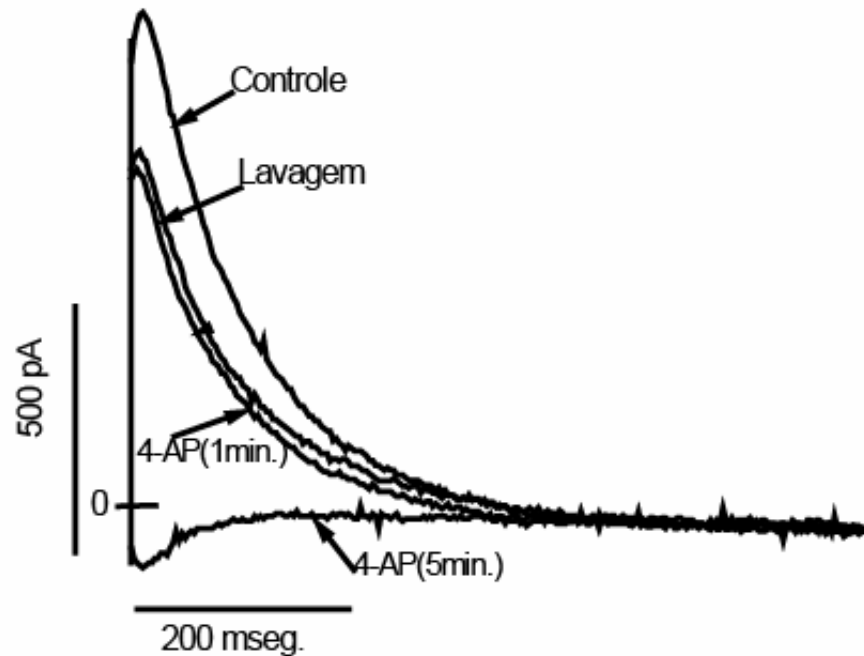
**Figura 7.** Correlação dos parâmetros “*in vivo*” e “*in vitro*”. Modificado de Medei e cols. (2007)

### 3.1.3 Efeito das IgG dos pacientes Ac-M nas correntes repolarizantes de potássio, $I_{to}$ e $I_{ks}$ .

#### Corrente repolarizante transitória de saída de potássio ( $I_{to}$ )

Para avaliar o efeito do soro de Ac-M sobre  $I_{to}$ , registros eletrofisiológicos foram obtidos utilizando-se a técnica de patch-clamp em sua configuração *whole-cell*, em cardiomiócitos ventriculares isolados de corações de ratos adultos. A corrente  $I_{to}$  foi isolada acrescentando na solução externa de Tyrode bloqueador específico da corrente de cálcio, (cloreto de cádmio, 200  $\mu$ M) e bloqueador da corrente de potássio  $I_K$  (cloreto de tetraetilamônio, 50 mM), aplicou-se ainda um pré-pulso despolarizante de -70 para -40 mV, para bloquear a corrente de sódio.

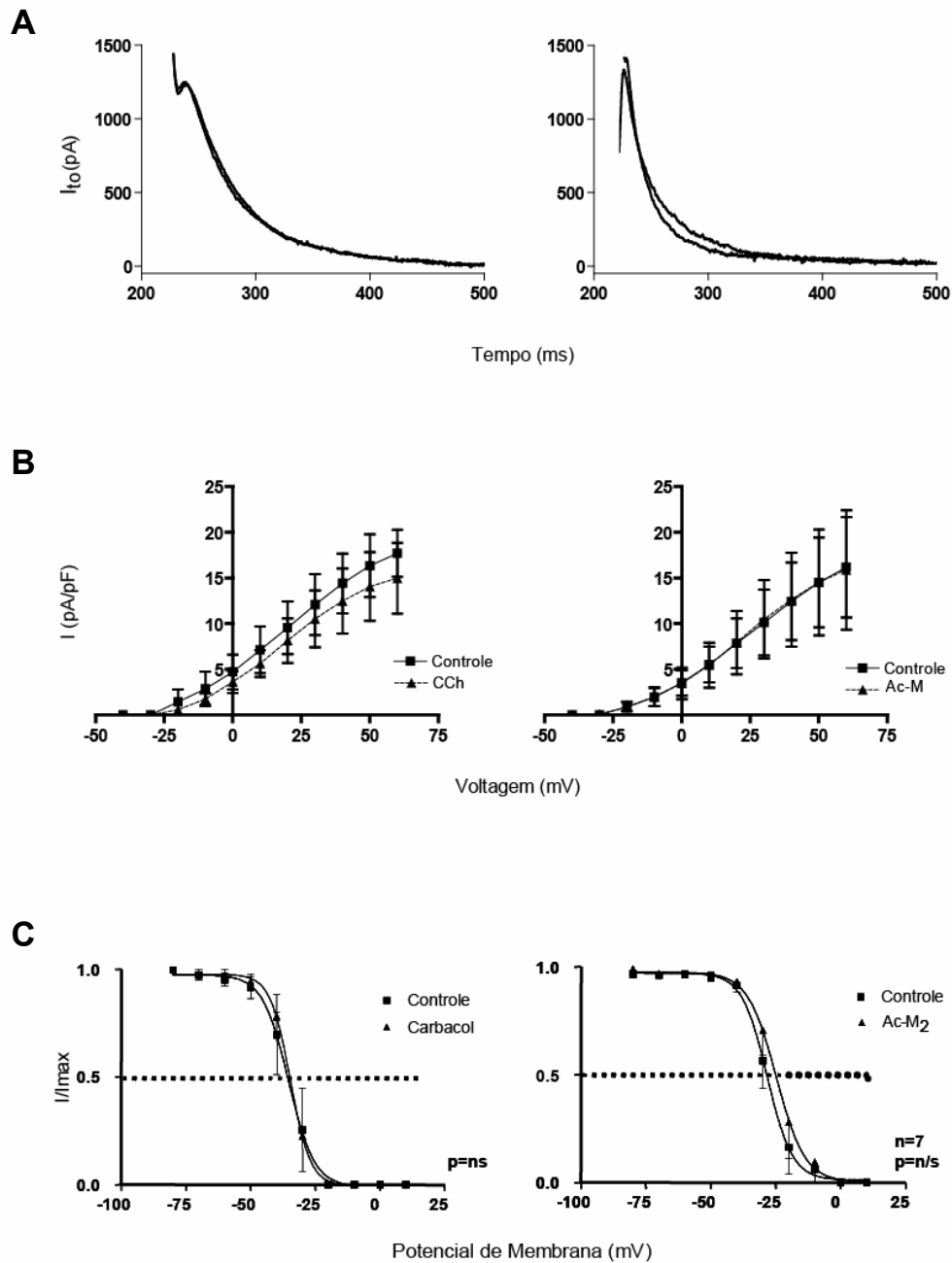
Para ter certeza de que a corrente iônica era sensível a 4-aminopiridina foi realizado um teste com dita droga (3 mM), confirmando a sensibilidade de  $I_{to}$  a esta droga como descrito na literatura. (Figura 8)



**Figura 8.** Corrente sensível a 4-Aminopiridina. Corrente transitória de saída de potássio, ( $I_{to}$ ) inibida de forma reversível pela 4-Aminopiridina. Corrente  $I_{to}$  registrada em cardiomiócitos de ratos. A partir do potencial de “holding” de -70 mV, foi aplicado, a cada 6 segundos, pré-pulso para -40mV (duração), seguido de pulso despolarizante para +40 mV durante 500 ms.

A fração IgG purificada por afinidade dos soros dos pacientes Ac-M (IgG-M; DE OLIVEIRA *et. al.*, 1997) foi testada agudamente na corrente  $I_{to}$ , sem mostrar mudanças significativas nas correntes registradas (Figura 9-B).

Esse efeito foi congruente com o apresentado pelo agonista muscarínico correspondente, carbacol (Figura 9-A). Outro parâmetro biofísico medido foi à inativação da corrente  $I_{to}$ , na presença de IgG-M, assim como na resposta ao agonista carbacol. Não se observaram mudanças significativas neste parâmetro. (Figura 9-C-D)



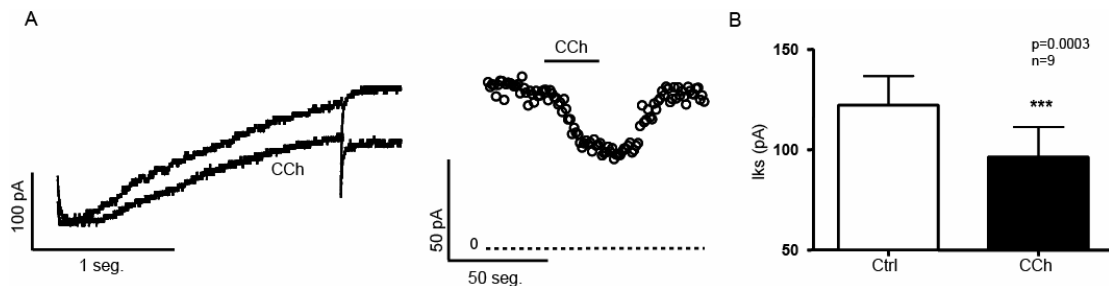
**Figura 9.** Atividade muscarínica aguda não modula a corrente repolarizante  $I_{to}$ . Figura A, traçados representativos de  $I_{to}$  em resposta a pulsos despolarizantes de -40 para +60 mV (potencial de “holding”: -70mV), mostrando a falta de efeito muscarínico em  $I_{to}$ . Figura B, relação corrente-voltagem (I/V) para  $I_{to}$  ativada em potenciais entre -40 e +60mV, em intervalos de 10mV. Figura C, a curva de inativação “steady-state” de  $I_{to}$  não é modificada pela ação muscarínica de carbacol ou Ac-M. Resultados expressados como Média  $\pm$  EPM.

### Corrente retificadora retardada de potássio ( $I_{Ks}$ )

Em cardiomiócitos isolados de cobaia foi registrada a corrente  $I_{Ks}$ , um dos componentes mais importantes da repolarização ventricular em humanos.

Para obter esta corrente foi aplicado um pulso despolarizante de um potencial de “holding” de -50 mV para +40 mV, voltando para -40 mV. Foi utilizada a diidropiridina nicardipina para bloquear a corrente de cálcio tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) e aplicado um pré-pulso para -40 mV para inibir a corrente de sódio.

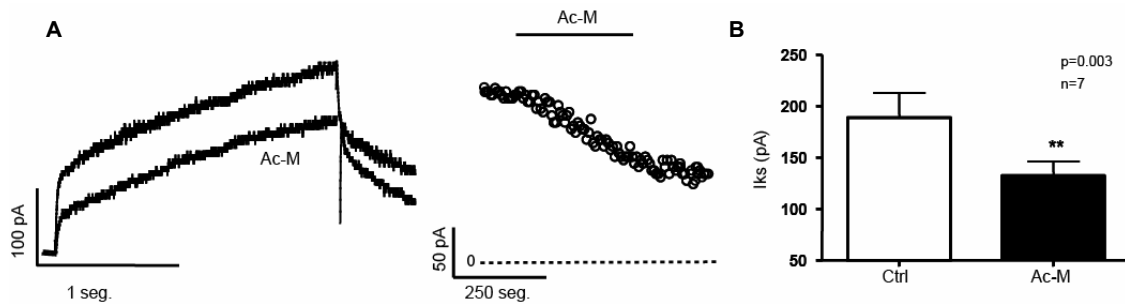
Assim, o agonista muscarínico carbacol (CCh: 1 $\mu$ M) inibiu a corrente (Controle =  $122.2 \pm 14.6$  vs. CCh  $96.31 \pm 15.0$  pA,  $p=0.0003$ ) de forma reversível tal como mostrado no traçado da figura 10-A (Figura 10).



**Figura 10.** Inibição da  $I_{Ks}$  mediada por carbacol. Figura A, à esquerda, traçado representativo da inibição da  $I_{Ks}$  mediada pelo agonista muscarínico carbacol (CCh), com a curva temporal correspondente à direita. Figura B, gráfico mostrando a inibição significativa de  $I_{Ks}$  por CCh (1 $\mu$ M). Corrente obtida a +40mV, com potencial de “holding” de -50 mV. Cardiomiócitos de cobaia. Resultados expressados como Média  $\pm$  EPM.

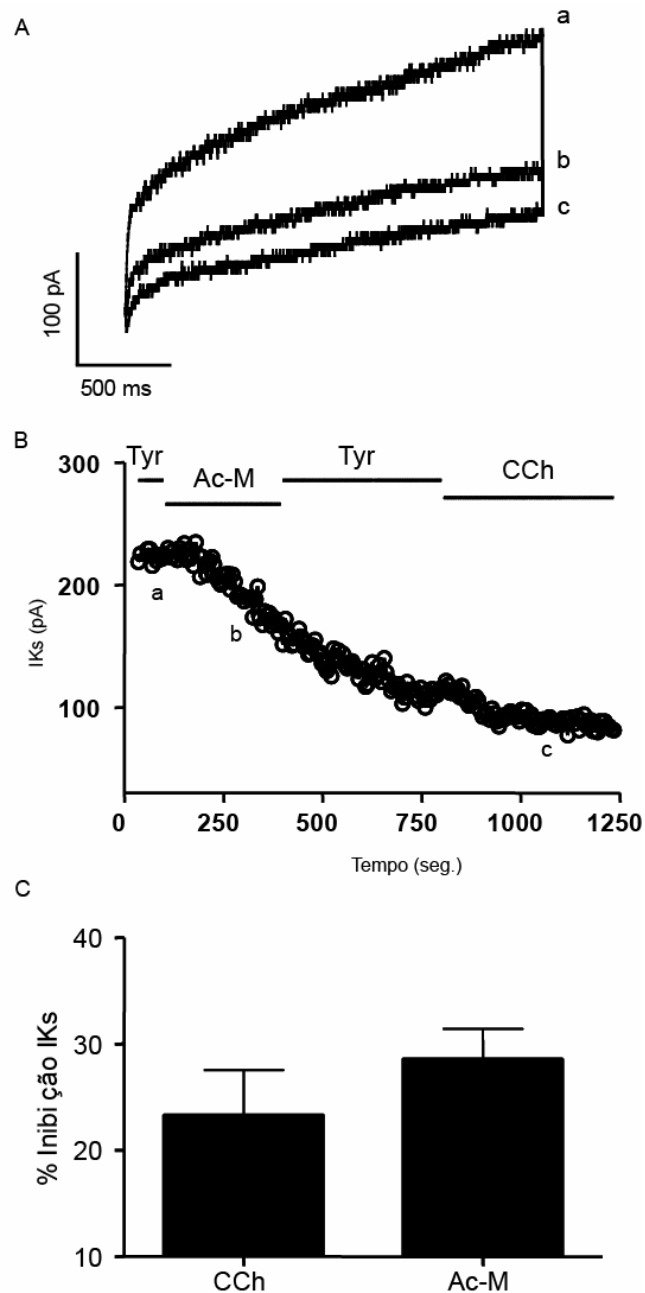
Em outros experimentos, utilizando as IgGs provenientes de pacientes chagásicos crônicos previamente caracterizadas como tendo atividade agonista

muscarínica (Ac-M), observamos uma inibição significativa da corrente  $I_{Ks}$  (Controle:  $189.1 \pm 23.8$  vs. Ac-M:  $132.7 \pm 13.5$  pA,  $p=0.003$ ) porém, não foi possível lavar o efeito do anticorpo, tal como mostrado na figura 11.



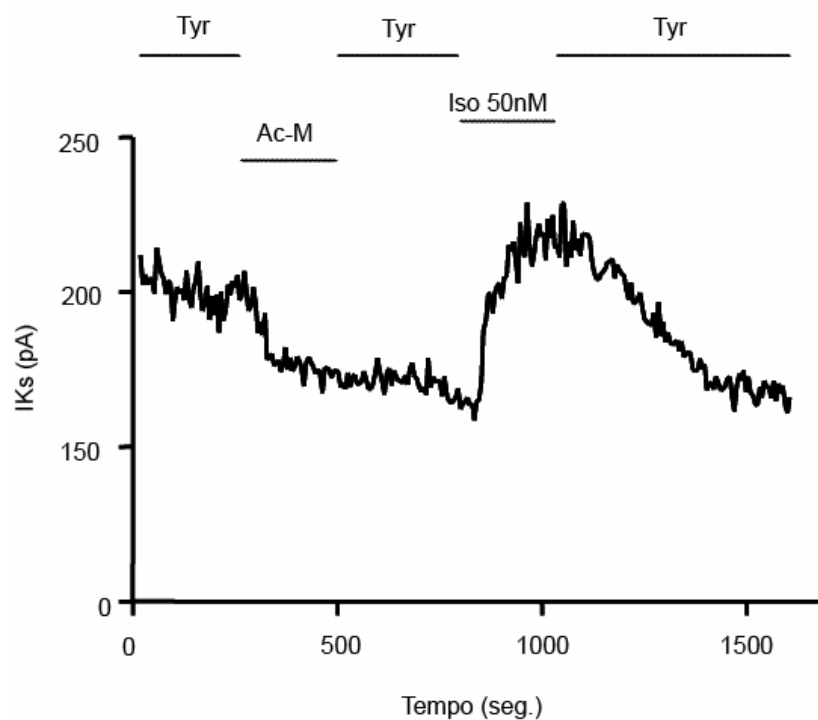
**Figura 11.** Inibição da corrente  $I_{Ks}$  mediada pelos Ac-M. Figura A, traçado representativo da inibição dos Ac-M sobre  $I_{Ks}$ , na esquerda, e a curva temporal correspondente na direita. Figura B mostra o sumário da inibição de  $I_{Ks}$  pelos Ac-M. Corrente obtida a +40mV com potencial de “holding” de -50 mV. Cardiomiócitos de cobraia. Resultados expressados como Media  $\pm$  EPM.

Em seguida comparamos o nível de inibição de  $I_{Ks}$  pelo carbacol ( $23.3 \pm 4.2\%$ ) e dos Ac-M ( $28.6 \pm 2.8\%$ ), não obtendo diferença significativa (Figura 12 A-C). Na figura 12-B, é possível observar que uma vez inibida a corrente por Ac-M, a perfusão com carbacol não consegue evocar uma inibição adicional significativa, tal como mostrado acima por dita droga quando é adicionada inicialmente (Figura 10). Se os anticorpos Ac-M inibirem  $I_{Ks}$  ativando os receptores muscarínicos de tipo 2 (M2), podemos levantar a hipótese de que o efeito destes é via desforilação do canal, com a conseqüente diminuição da corrente. Isto poderia explicar a pouca inibição da corrente quando o carbacol foi adicionado após a ação dos Ac-M, nesta situação ao estar o canal previamente desforilado, o carbacol não teria “substrato” para inibir esta mesma corrente.



**Figura 12.** Inibição colinérgica da corrente  $I_{Ks}$ . Na figura A observamos os traçados da corrente  $I_{Ks}$  no controle (a), na presença de Ac-M (b) e do carbacol após da lavagem do Ac-M (c). Na figura B, observamos na curva temporal que a inibição prévia da  $I_{Ks}$  pelos Ac-M (b) é irreversível, com a consequente inibição menor pelo carbacol (c). Não observamos diferenças significativas entre a inibição mediada por carbacol (CCh, n=9) e pelos Ac-M (n=7) em nosso trabalho (Figura C). Resultados expressados como Média  $\pm$  EPM.

Quando acrescentamos isoproterenol, após ter perfundido com Ac-M, a corrente foi incrementada, o que não teria acontecido se estivéssemos na presença de “*run down*” da corrente (Figura 13), sugerindo que os Ac-M ao ativar receptores M2 desfosforilariam o canal de  $I_{Ks}$  o canal e que este efeito seria revertido na presença de um agente que fosforila o canal via proteína kinase A (PKA) como o isoproterenol.



**Figura 13.** Ac-M inibem  $I_{Ks}$  irreversivelmente. O incremento da corrente previamente inibida por Ac-M, na presença do isoproterenol (50 nM) sugere uma diminuição no nível de fosforilação do canal. Traçado de curva temporal obtido pela medida do pico da corrente  $I_{Ks}$  em resposta a pulsos despolarizantes de -50 para +40 mV, a intervalos de 6 segundos. Resultados expressados como Média  $\pm$  EPM.



### 3.2 Modulação adrenérgica da repolarização ventricular mediada por anticorpos

#### 3.2.1 Características clínicas relevantes dos pacientes

No presente trabalho foram incluídos também pacientes com doença de Chagas que apresentaram anticorpos com atividade anti-receptores beta-1 adrenérgicos (Ac- $\beta$ , n=6). Os pacientes Ac- $\beta$  apresentaram uma idade média de  $57.83 \pm 2$  anos, sendo dois homens e quatro mulheres. A media de fração de ejeção destes foi de  $58.8 \pm 4$  % (Tabela 2). Dentro deste grupo, 2 pacientes apresentaram cardiomegalia, e ao longo do estudo foram ao óbito 3 pacientes.

**Tabela 2. Características clínicas e funcionais dos Pacientes Ac- $\beta$**

| Variáveis clínicas |          |            |             |                        | Ecocardiograma          |              | Eletrocardiograma |            |     |
|--------------------|----------|------------|-------------|------------------------|-------------------------|--------------|-------------------|------------|-----|
| Idade anos         | Sexo M/F | Peso Kg.   | Altura cm   | Insuficiencia Cardíaca | DDFVE mm/m <sup>2</sup> | FEVE %       | ECG C/Alt         | BRD + BFAE | AEI |
| 57 $\pm$ 2         | 2/4      | 59 $\pm$ 3 | 163 $\pm$ 4 | 2                      | 35 $\pm$ 6              | 58.8 $\pm$ 4 | 3                 | 3          | 2   |

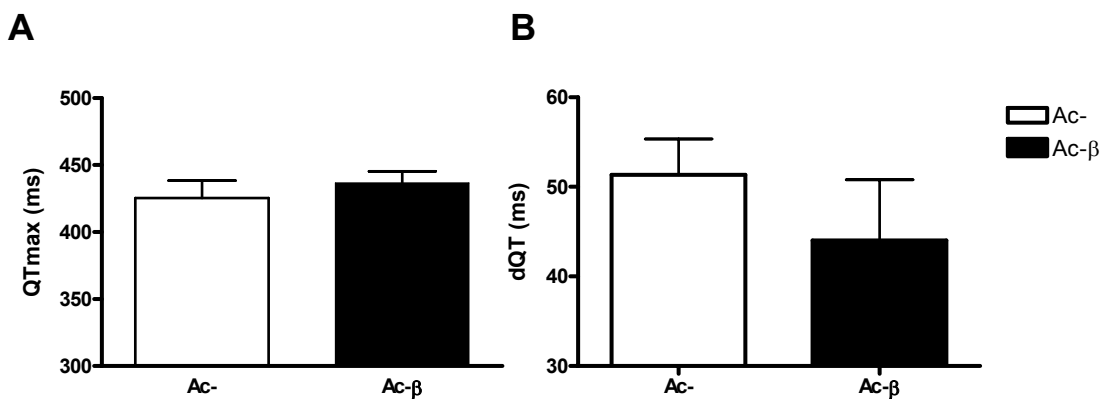
IDDFVE: índice do diâmetro diastólico final do ventriculo esquerdo; FEVE: fração de ejeção do ventriculo esquerdo; BRD+BFAE: bloqueio de ramo direito + bloqueio fascicular anterior esquerdo. AEI: área eletricamente inativa. Os parâmetros ECG e sintomas referem-se ao numero de pacientes. Idade, IMC, e os parâmetros ecocardiográficos foram expressos como média  $\pm$  EPM.

### 3.2.1.1. Dispersão do QT e QTmax no ECG dos pacientes Ac-β

No ECG dos seis pacientes que apresentaram Ac-β, foi medido o intervalo QTmax e a dispersão do QT. Estes parâmetros da repolarização ventricular neste grupo de pacientes não mostraram diferenças significativas com respeito ao grupo Ac-.

A dQT neste grupo foi de  $44.0 \pm 15.1$ ms, comparada com Ac- de  $50.0 \pm 4.0$  ms. (Figura 14-A) A duração do intervalo QTmax foi de  $436,7 \pm 26,4$ ms vs  $425.3 \pm 13.0$  ms nos pacientes Ac- (Figura 14-B).

Quando comparados os parâmetros da repolarização ventricular deste grupo com os dados de pacientes Ac-M, observamos uma diferença significativa na dQT (teste *T*,  $p = 0.008$ ). Porém os demais dados da repolarização ventricular analisados não foram estatisticamente diferentes.

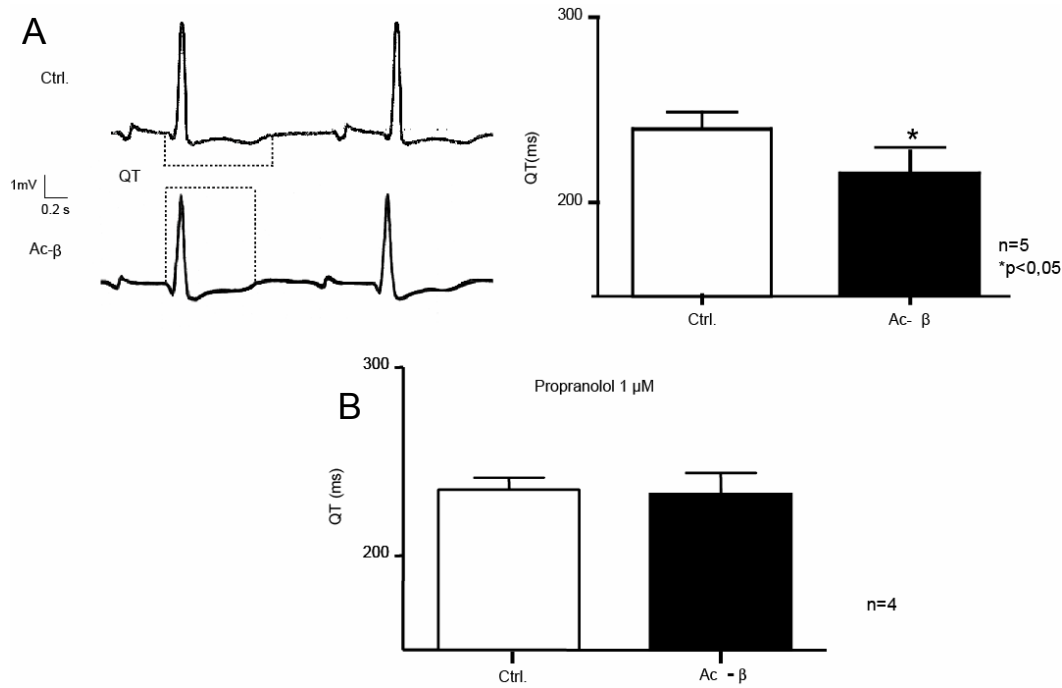


**Figura 14.** Parâmetros da repolarização ventricular nos pacientes Ac-β. As figuras A-B mostram a falta de diferenças significativas tanto do QTmax quanto da dQT nos pacientes Ac-β quando comparados aos pacientes Ac-. Resultados expressados como Média ± EPM.

### 3.2.2.1 Modulação do intervalo QT no ECG de corações isolados de coelho

Utilizando a técnica de Langendorff, corações isolados de coelhos foram perfundidos com Ac- $\beta$ , e registrado o ECG correspondente em cada coração. É de vital importância ressaltar que estes experimentos foram realizados a frequência cardíaca controlada, com objetivo de evitar a influência da variação da mesma no parâmetro analisado. Assim, observamos que os Ac- $\beta$  diminuíram a duração do intervalo QT de forma significativa, quando comparados com o controle (Controle=  $240.0 \pm 20$  ms vs. Ac- $\beta$ =  $216.0 \pm 26$  ms,  $p < 0.032$ ) (Figura 15-A). Para validar a hipótese de que os anticorpos modularam o intervalo QT pela ativação dos receptores de membrana beta adrenérgicos, foram repetidos os experimentos na presença do antagonista beta adrenérgico, propranolol. Nessas experiências não foram observadas diferenças significativas no intervalo QT (Controle:  $235.0 \pm 6.4$  ms vs. Ac- $\beta$ :  $232.8 \pm 11.2$  ms,  $p = ns$ ) (Figura 15-B).

Para validar se o efeito observado sob o intervalo QT se devia ao fato dos soros pertencerem a pacientes com Doença de Chagas, foi avaliado também, o efeito de soros de pacientes que não possuíam doença de Chagas. Neste grupo de pacientes, provenientes de cirurgias ortopédicas do HUCFF-UFRJ, como era esperado não foram observadas diferenças no intervalo QT (Tyrode:  $271.1 \pm 12.1$ , Soro:  $275.7 \pm 13.7$  e lavagem:  $266.7 \pm 15.28$  ms; ANOVA one-way,  $p = 0.45$ ).

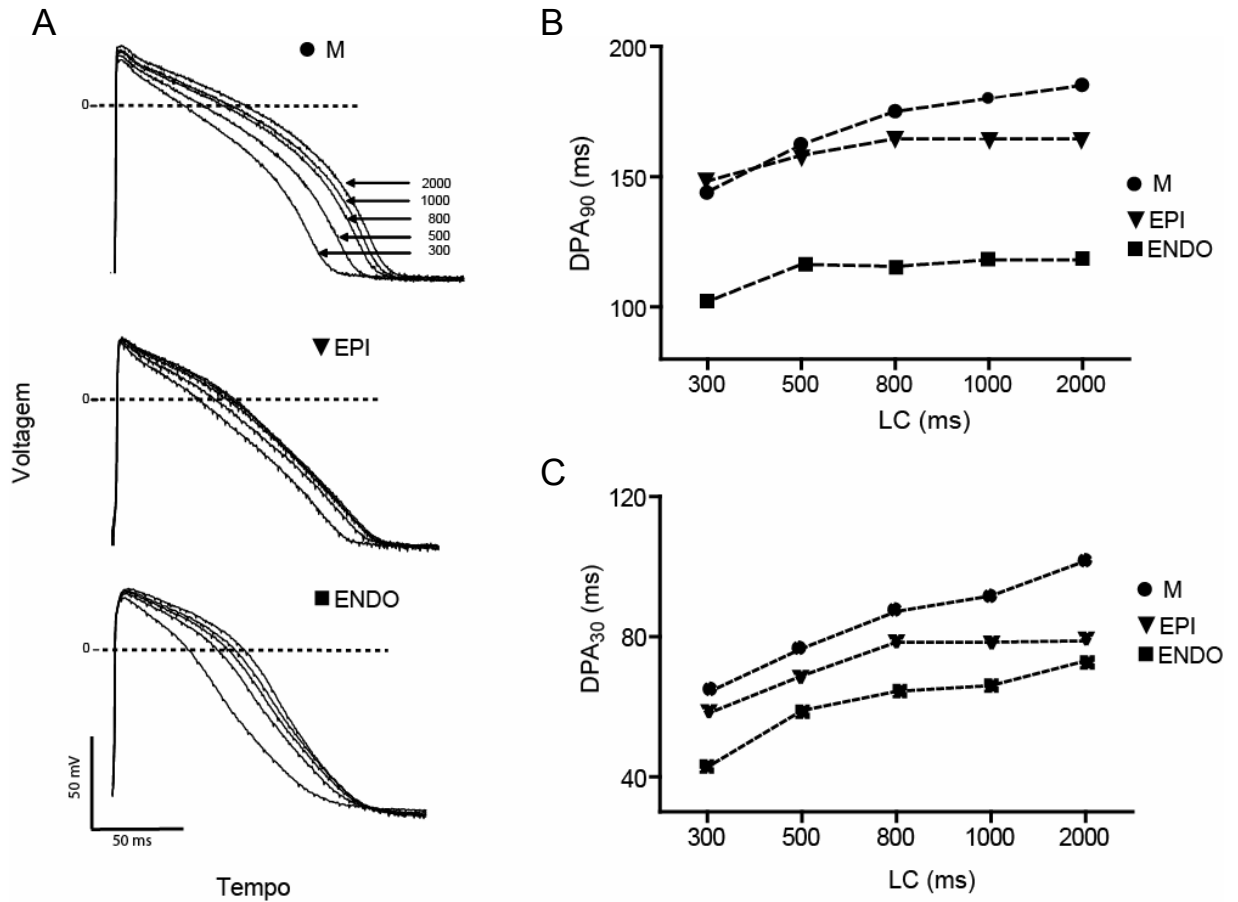


**Figura 15.** Ac-β encurta o intervalo QT no coração isolado de coelho ativando receptores beta adrenérgicos. Figura A mostra o encurtamento do intervalo QT no traçado representativo do ECG obtido no coração isolado de coelho. Na direita, resumo dos dados obtidos (Ac-β: n= 4, p< 0.032) . O efeito sobre o intervalo QT foi abolido na presença do beta bloqueador propranolol (1μM), tal como mostra a figura B. Resultados expressados como Media ± EPM.

### 3.2.3. Células M na parede do ventrículo de cobaia

O presente trabalho foi realizado em colaboração com o Dr. Sergio Sicouri, no Laboratório de Eletrofisiologia Celular (Buenos Aires, Argentina).

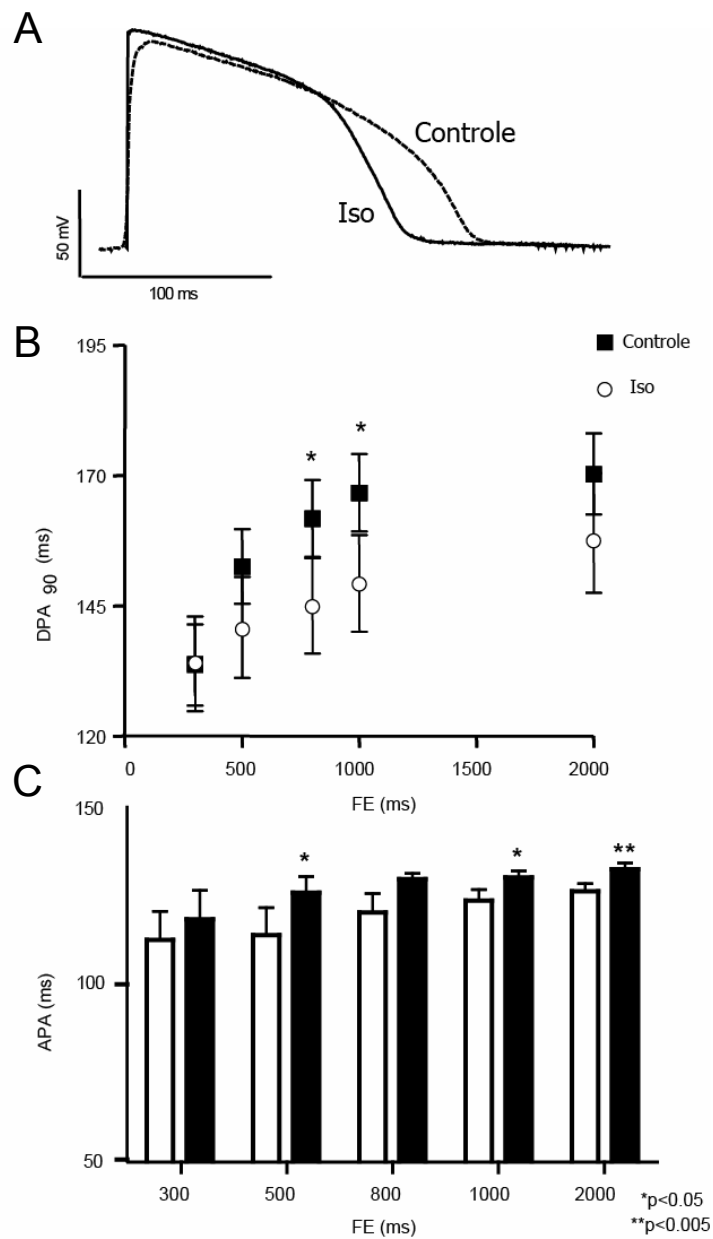
Primeiramente, registramos o potencial de ação em diferentes tipos celulares presentes na parede ventricular de cobaia. Assim, estimulando o tecido isolado a diferentes frequências de estimulação ( $FE = 300, 500, 800, 1000$  e  $2000$  ms) foi medida a duração do potencial de ação a 90% ( $DPA_{90}$ ) e 30% ( $DPA_{30}$ ) da repolarização, nos três tipos celulares: endocárdio, epicárdio e células M (Figura 16). Na figura 16 é possível observar claramente que as células M possuem um incremento da  $DPA_{90}$  dependente da frequência de estimulação, o que não acontece com as células endocárdicas e epicárdicas, as quais manifestam um incremento da  $DPA_{90}$  a altas frequências, ficando constante ou inalteradas a baixas frequências. Na  $DPA_{30}$ , as células M mostraram também um incremento dependente da frequência, porém, as células endocárdicas e epicárdicas apresentaram uma modulação da  $DPA_{30}$  semelhante ao das células M.



**Figura 16.** Heterogeneidade na parede ventricular de cobaia. Traçados dos potenciais de ação das células M (●), endocárdicas (ENDO ■) e epicárdicas (EPI ▼), a 2000, 1000, 800, 500 e 300 ms de frequência de estimulação (A). Em B e C, duração do potencial de ação a 30 e 90% da repolarização, respectivamente, a diferente FE nas camadas ventriculares.

### 3.2.3.1. Modulação adrenérgica das células M

Ainda nenhum trabalho tinha mostrado o efeito da atividade adrenérgica nas células M de cobaia. Assim, utilizando um agonista adrenérgico (isoproterenol, 1 $\mu$ M), observamos a resposta das mesmas sob diferentes freqüências de estimulação. As células M na presença de isoproterenol diminuíram a DPA<sub>90</sub>, sendo a diferença estatisticamente significativa a freqüência de estimulação de 1000 ms (Controle: 166.7  $\pm$  7.4 vs. Iso: 149.3  $\pm$  9.2 ms, p<0.05 e 800 ms (Controle: 161.8 $\pm$ 7.4 vs. 145 $\pm$ 9.2 ms, p<0.05) (Figura 17-B). Outro parâmetro medido foi a DPA<sub>30</sub>; mesmo mostrando uma tendência a incrementar este parâmetro, provavelmente dado pela estimulação adrenérgica sobre a corrente de cálcio de tipo L e exibindo uma retificação na fase 2 do PA não achamos diferenças significativas. Também foram medidos nesta série de experimentos a amplitude do potencial de ação (APA) e o potencial de repouso (PR), observando-se, que a perfusão com isoproterenol gera uma maior amplitude no PA. Esses dados foram estatisticamente significativos a FE de 2000 (Controle: 126.3  $\pm$  2.1 vs. Iso: 132.5  $\pm$  1.8 mV, p<0.001), 1000 (Controle: 123.6  $\pm$  3.2 vs. Iso: 130.2  $\pm$  1.8 mV, p<0.05) e 500 ms (Controle: 113.9  $\pm$  7.7 vs. Iso: 125.9  $\pm$  4.5 mV, p<0.05) (Figura 17-C). Entretanto, o potencial de repouso não foi modificado pela estimulação adrenérgica.



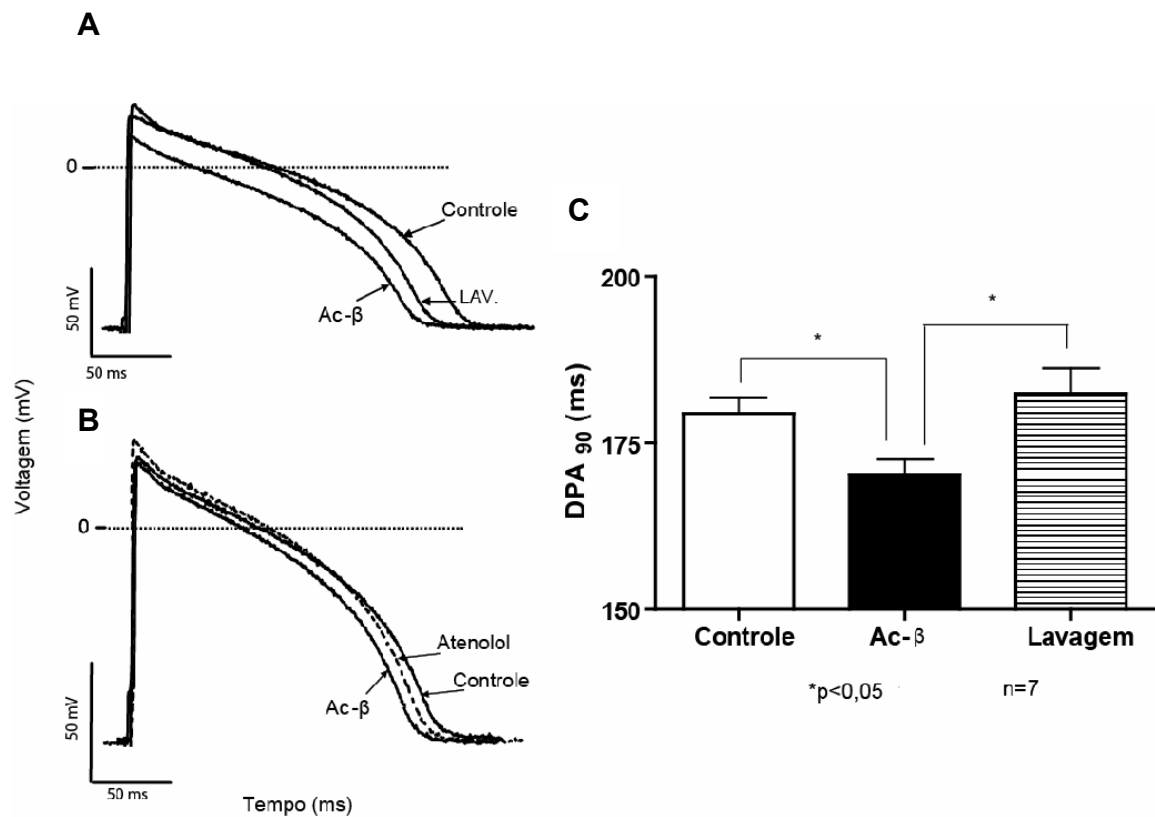
**Figura 17.** Modulação adrenérgica do potencial de ação de células M. Figura A mostra o encurtamento do potencial de ação (PA) de células M a frequência de estimulação de 1000 ms. Figura B, a estimulação adrenérgica (isoproterenol,  $1\mu\text{M}$ ) encurta o PA das células M a diferente FE (Controle: símbolos redondos brancos; isoproterenol: símbolos quadrados pretos). Figura C, gráfico de barra mostrando um aumento da amplitude do PA a diferente FE na presença de isoproterenol ( $1\mu\text{M}$ ). Resultados expressados como Media  $\pm$  EPM.



### 3.2.3.2. Efeito do Ac- $\beta$ no potencial de ação das células M de cobaia

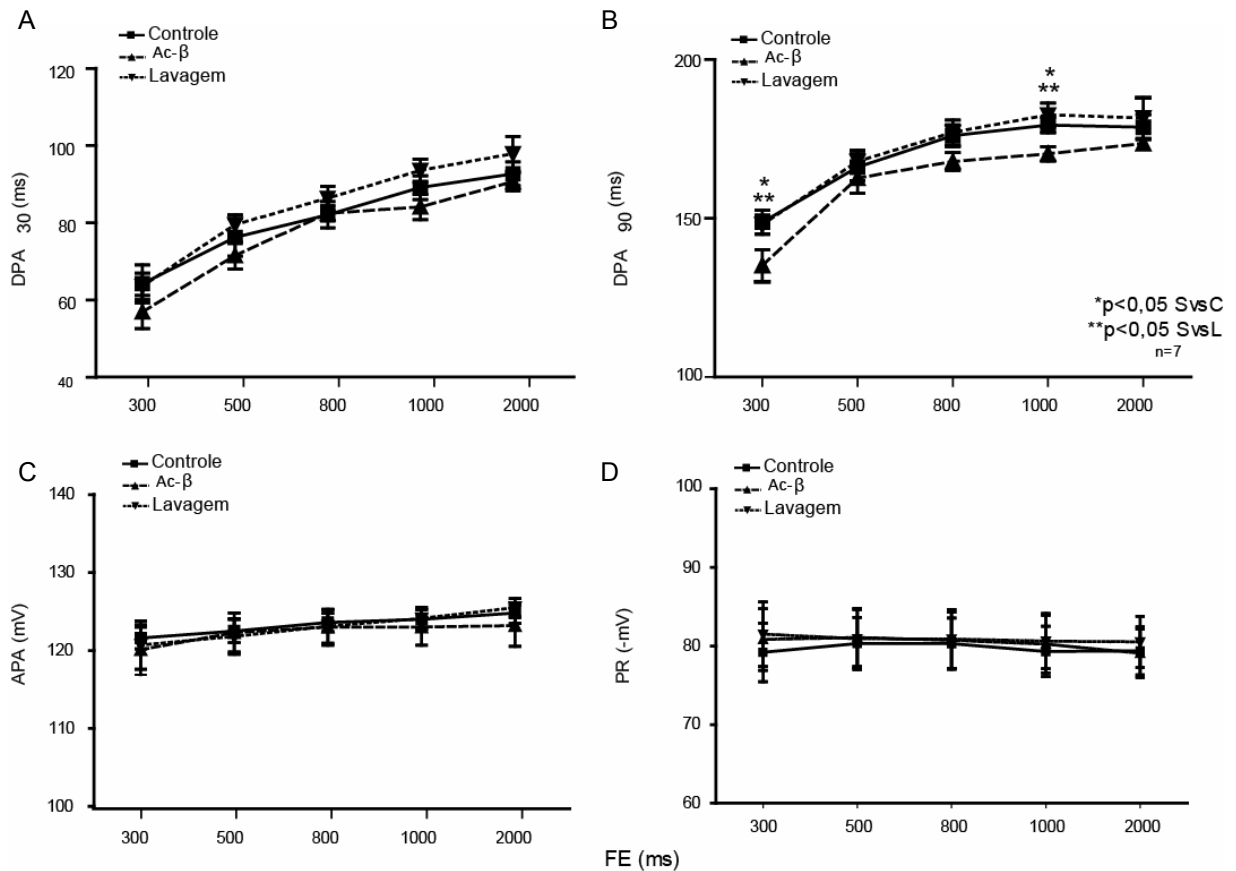
Como já foi descrito, as células M tem um papel fundamental no processo de repolarização ventricular. Elas apresentam mudanças abruptas de duração e amplitude do PA em diferentes frequências de estimulação. Assim, como mostramos acima, as mesmas podem ser moduladas pelo estímulo adrenérgico. Portanto resolvemos investigar se os Ac- $\beta$  também podem modular o potencial de ação destas células do miocárdio ventricular.

A figura 18 mostra uma diminuição estatisticamente significativa e reversível na DPA<sub>90</sub> a FE: 1000 ms (Tyr: 179.4 $\pm$ 2.5, Ac- $\beta$ : 170.3 $\pm$ 2.2, Lav: 182.5 $\pm$ 3.8 ms,  $p < 0.05$  Tyr vs Ac- $\beta$  e Ac- $\beta$  vs Lav.,  $n=7$ ), na presença dos Ac- $\beta$ . Dito efeito foi abolido na presença do antagonista beta-1 adrenérgico atenolol (1 $\mu$ M) tal como mostra a figura 18-B. Na figura 19-B podemos observar que a FE: 300 ms os Ac- $\beta$  também diminuíram a DPA<sub>90</sub> de forma significativa e reversível (Tyr: 148.8  $\pm$  3.8, Ac- $\beta$ : 135.1  $\pm$ 5 e Lav: 148.0  $\pm$ 3 ms,  $p < 0.05$  Tyr vs. Ac- $\beta$  e Ac- $\beta$  vs. Lav). Entretanto, mesmo não observando uma diferença estatisticamente significativa a FE de 500 (Tyr: 166.1  $\pm$  4.2 vs. Ac- $\beta$ : 162.6 $\pm$ 4.7, Lav: 167.9 $\pm$ 3.5 ms,  $p=0.58$ ), 800 (Tyr: 176.0  $\pm$  3.4, Ac- $\beta$ : 167.9  $\pm$  2.7, Lav: 177.0  $\pm$  3.8 ms,  $p < 0.058$ ) e 2000 ms (Tyr: 178.7 $\pm$ 4 Ac- $\beta$ : 173.5  $\pm$  1.5, Lav: 181.6  $\pm$  6.4 ms,  $p=0.28$ ), houve uma tendência a diminuir a duração do PA. (Figura 19-B).



**Figura 18.** Ac-β encurtam o potencial de ação das células M ativando receptores beta adrenérgicos. Traçados representativos de PA de células M: Ac-β encurta reversivelmente o PA (A). O efeito dos Ac-β foi inibido na presença do antagonista beta-adrenérgico atenolol (1 μM), FE: 1000 ms. (B). Figura C mostra o resumo dos dados obtidos, sendo Ac-β diferente do Controle, (\*p < 0.05) e diferente da lavagem (\*\*p < 0.05). Resultados expressados como Média ± EPM.

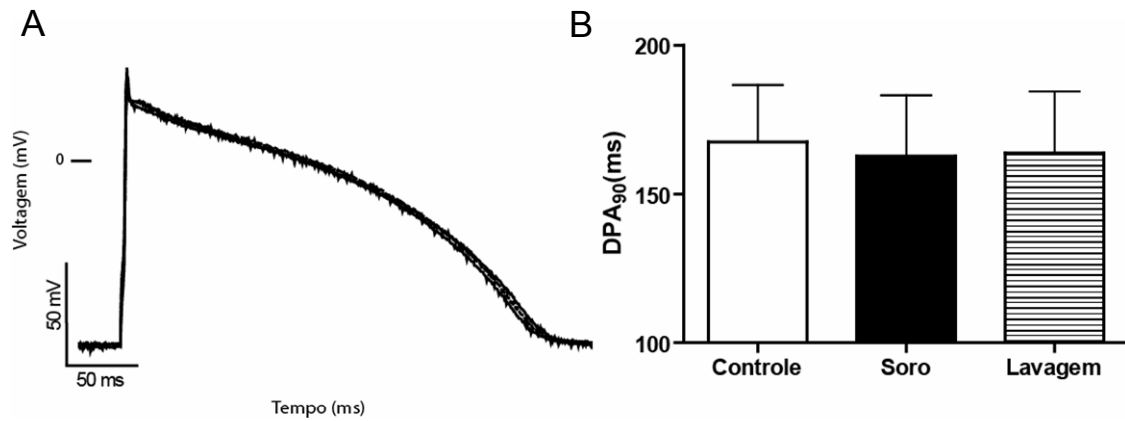
Diferentemente do que observamos com a estimulação com isoproterenol, não achamos uma diferença estatisticamente significativa na amplitude do PA em presença de Ac-β. A medida do potencial de repouso também não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 19 D).



**Figura 19.** Os Ac-β encurtam a duração do potencial de ação a 90% da repolarização nas células M. Os Ac-β encurtam a  $DPA_{90}$  sem modificar significativamente a  $DPA_{30}$  (A-B). Os Ac-β não modificaram amplitude e potencial de repouso do PA das células M. (C-D). Controle: C; Soro: S e Lavagem: L. FE: frequência de estimulação. Resultados expressados como Média  $\pm$  EPM.

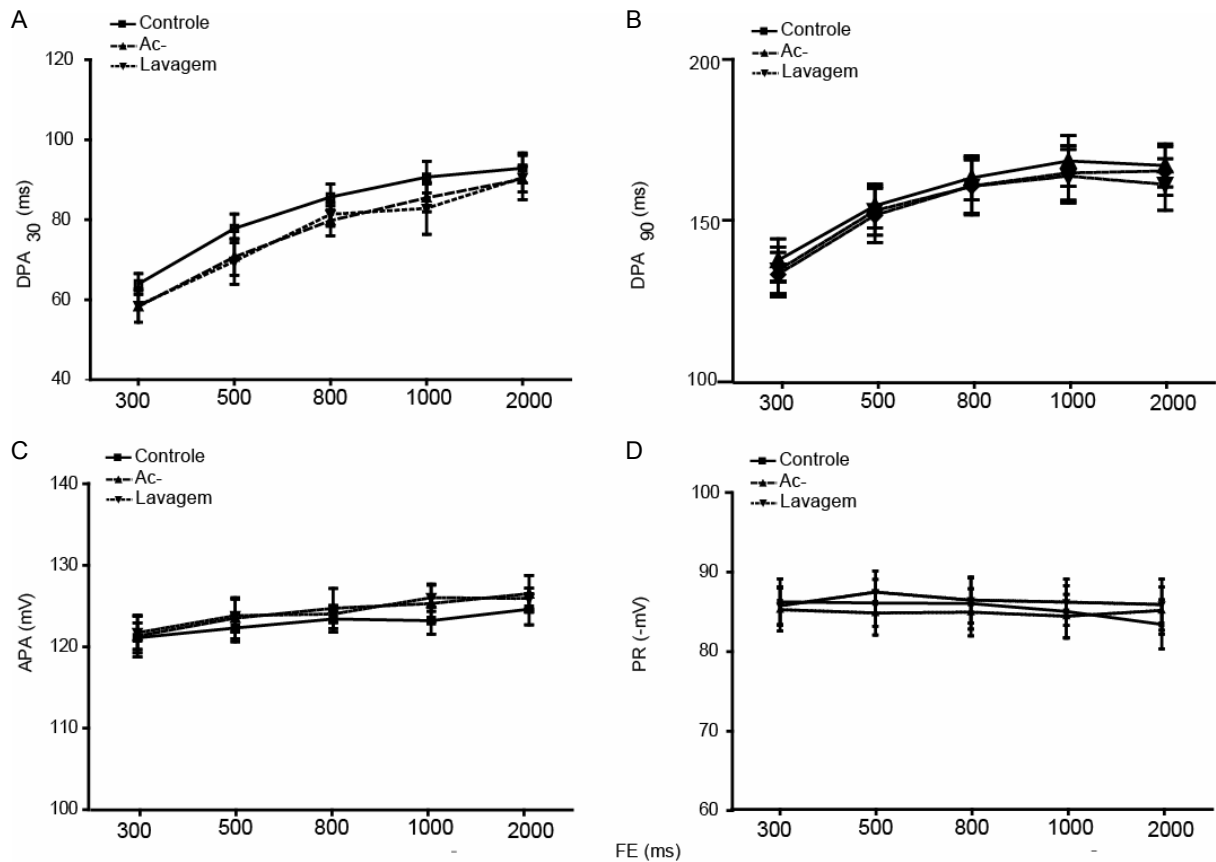
A fim de verificar se os resultados obtidos com os Ac-β eram dados pela estimulação da IgG sobre os receptores beta-adrenérgicos, e não por algum outro fator que poderia estar presente no soro de pacientes chagásicos crônicos, aplicamos os mesmos protocolos experimentais, observando o efeito dos Ac- no potencial de ação das células M de cobaias. Na figura 20 podemos observar que o potencial de ação não

é modulado pelos Ac-, tal como mostra o gráfico de barras para uma FE: 1000 ms (Tyr:  $164.7 \pm 8$ ; Ac-:  $160.1 \pm 8.3$  e Lav:  $161.5 \pm 8.4$  ms;  $p=0.23$ ;  $n=6$ ).



**Figura 20.** Soro de pacientes chagásicos crônicos sem atividade adrenérgica não modula o potencial de ação das células M. Traçados representativos do potencial de ação de células M. Na presença de soro Ac- não foi observada modulação do potencial de ação, FE: 1000 ms. (A). Figura B mostra o resumo dos dados obtidos (B). Resultados expressados como Média ± EPM.

Nenhum dos parâmetros medidos no potencial de ação ( $DPA_{30}$ ,  $DPA_{90}$ , APA e PR) apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 21).



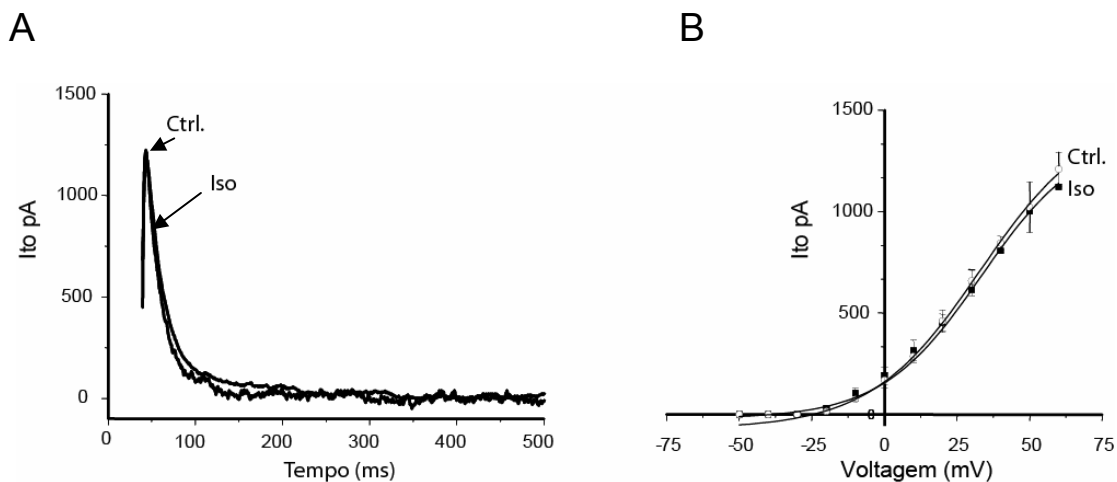
**Figura 21.** Ac- não modulam o potencial de ação das célula M. Nenhum dos parâmetros considerados (DPA<sub>30</sub>, DPA<sub>90</sub>, APA e PR) foram alterados pelos Ac- (A-B-C-D). FE: frequência de estimulação. Resultados expressados como Média ± EPM.

### 3.2.4. Efeito das IgG dos pacientes Ac-β nas correntes repolarizantes $I_{to}$ e $I_{Ks}$ .

#### Modulação da corrente transitória de saída de potássio ( $I_{to}$ )

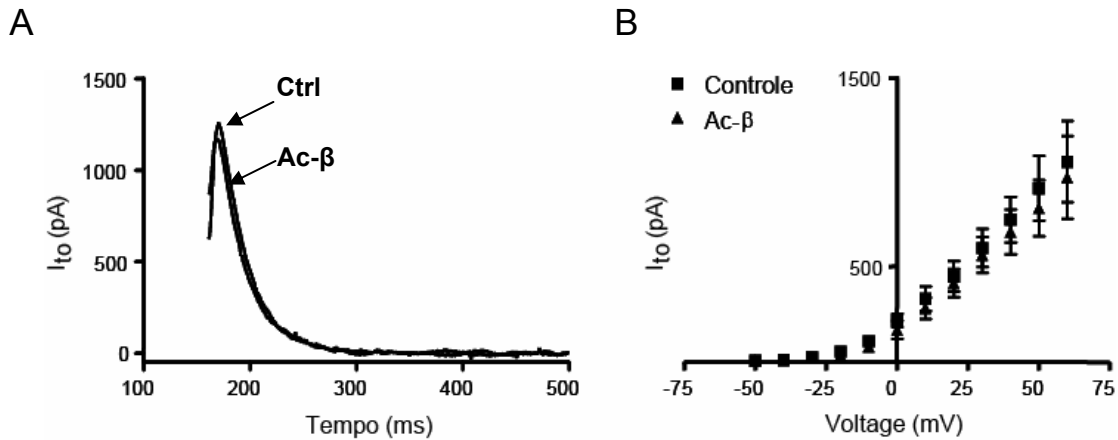
A corrente transiente de saída de potássio ( $I_{to}$ ) tem um papel fundamental, tanto na repolarização ventricular quanto na gênese de arritmias. Foi avaliado o efeito agudo da estimulação adrenérgica, na presença do agonista isoproterenol na dose de 50 nM

(n=4) (Figura 22-A). Não foram observadas diferenças na relação corrente/voltagem (I/V) determinada em condição controle ou em presença de isoproterenol (Figura 22-B). Quando foi realizado o ajuste dos dados pela equação de Boltzman obteve-se  $V_{1/2}$  de  $32.8 \pm 6.1$  mV e  $33.3 \pm 1.4$  mV respectivamente.



**Figura 22.** Isoproterenol não modula  $I_{to}$ . Em A na esquerda, traçado representativo de  $I_{to}$  em condições controle (Ctrl.○) vs. 50 nM isoproterenol (Iso■). Em B, na direita, curva da corrente em função da voltagem (I/V). Ditos registros foram obtidos em potencial de “holding” de -60 mV, aplicando pulsos despolarizantes na faixa de -50 até +60 mV, em incrementos de 10 mV a cada 6 s. Os dados foram expressados como média  $\pm$  SEM.

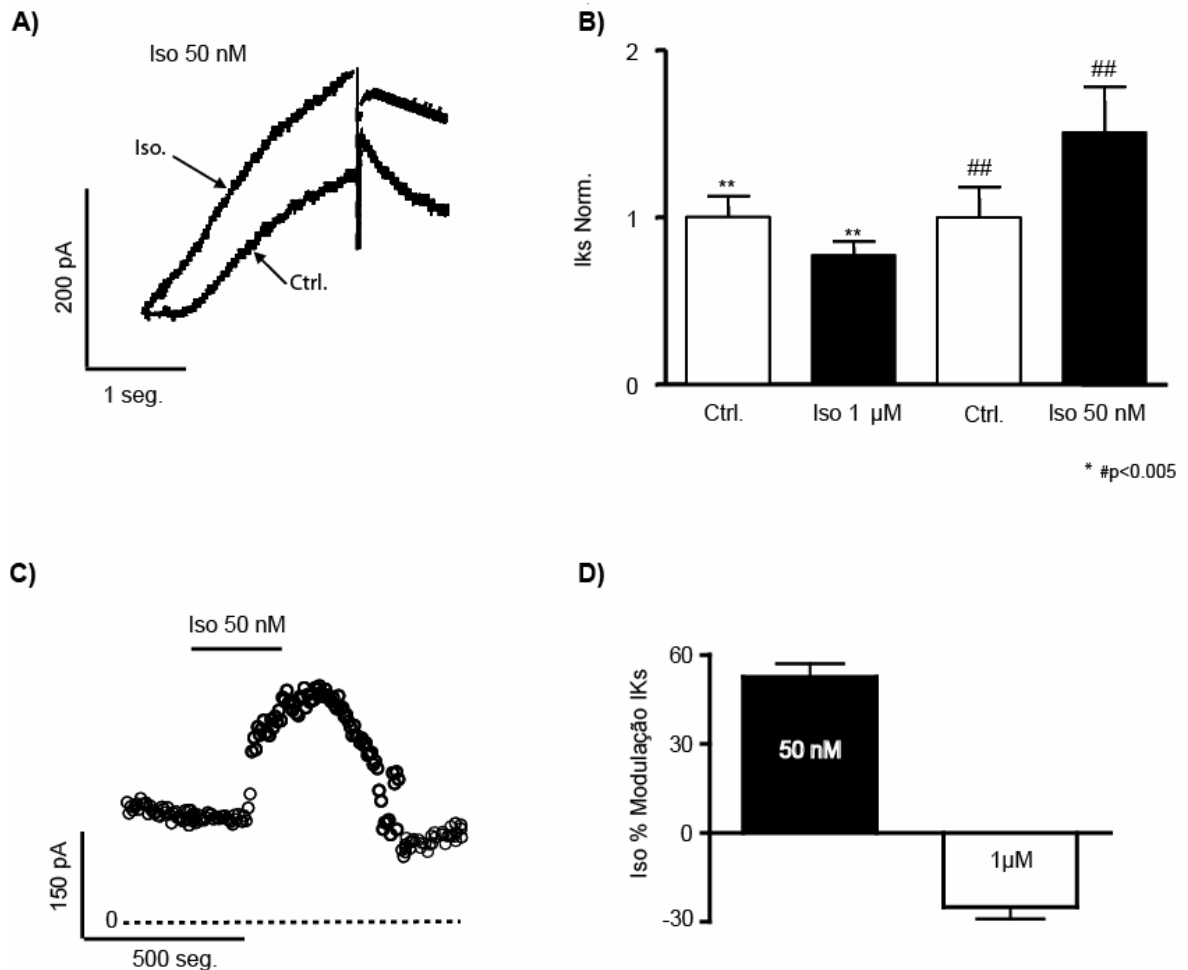
Aplicando o mesmo protocolo para obter  $I_{to}$ , desta vez perfundindo com Ac- $\beta$ , a corrente não foi modulada, tal como mostra a figura 23-A, no traçado representativo a +60mV. Como resultado destes registros foi construída a curva corrente em função da voltagem que ratifica os dados observados previamente com o agonista, isoproterenol (Figura 23-B).



**Figura 23.** Ac- $\beta$  não modulam a corrente  $I_{to}$ . Na figura A traçados representativos das correntes registradas em resposta a pulsos despolarizantes de -60mV para +60 mV, a cada 6 s, em condições controle (Ctrl. ▲) e após adição de Ac- $\beta$  (■). Em B, curva corrente em função da voltagem, em condições controle ou na presença de Ac- $\beta$ . n=4, p=ns. Resultados expressados como Média  $\pm$  EPM.

### Corrente retificadora retardada de potássio ( $I_{Ks}$ )

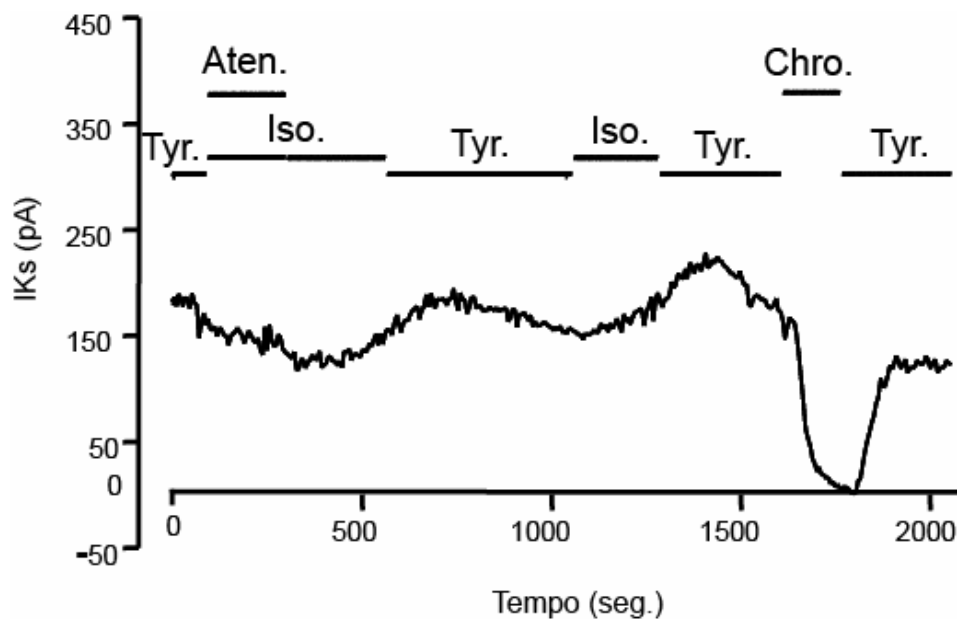
Dentro da repolarização ventricular  $I_{Ks}$  é considerada uma das correntes mais importantes. Assim, observamos o efeito agudo da estimulação adrenérgica mediado pelo agonista beta, isoproterenol. Foram utilizadas duas doses: 1  $\mu$ M e 50 nM de isoproterenol. Dito agonista, na dose de 50 nM incrementou a corrente  $I_{Ks}$ , enquanto que, na dose de 1  $\mu$ M inibiu a mesma (Figura 24).



**Figura 24.** Isoproterenol modula a corrente  $I_{Ks}$ . 50 nM de isoproterenol incrementa  $I_{Ks}$ , de forma reversível, tal como mostram os traçados representativos (A) e a curva temporal em C. 1  $\mu$ M de Isoproterenol reduz  $I_{Ks}$  em 26 %, em relação ao controle, entretanto 50 nM de isoproterenol incrementa  $I_{Ks}$  em 57% (B-D). Registros obtidos em +40 mV, com potencial de “holding” de -50 mV. Em B as correntes de pico de  $I_{Ks}$  foram normalizadas pelo valor médio do controle e assim comparadas com a condição isoproterenol correspondente. Resultados expressados como Media  $\pm$  EPM.

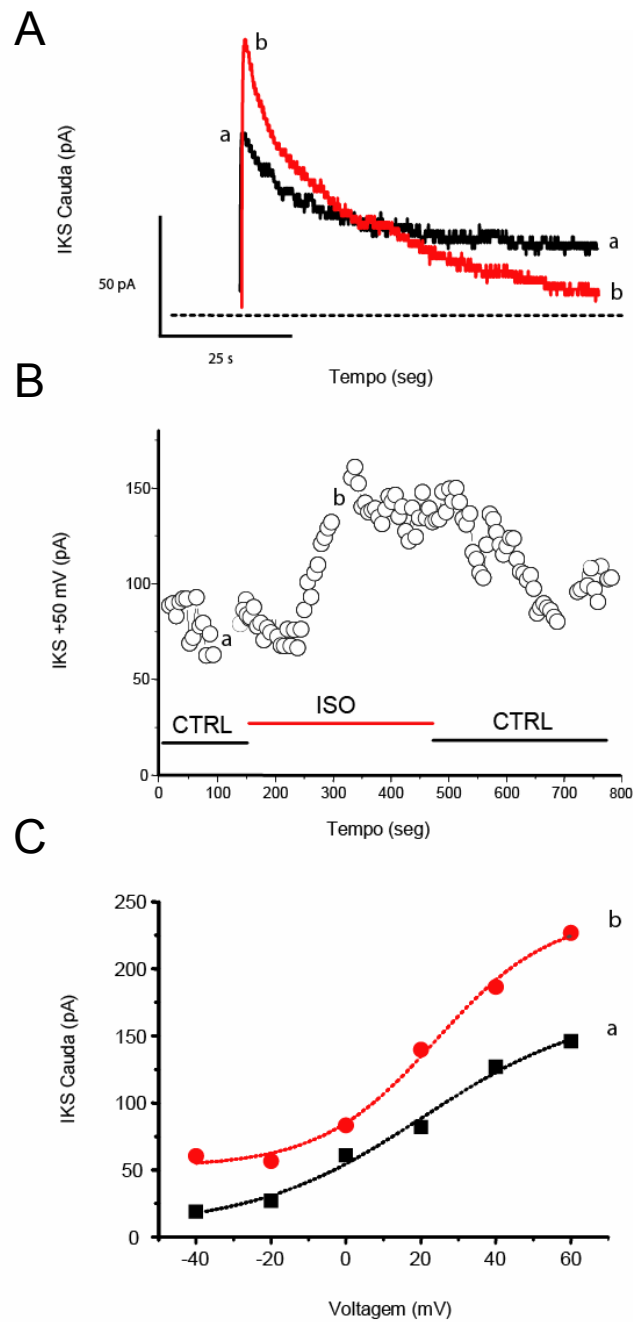


Para verificar se o efeito do isoproterenol (50 nM) ocorria pela ativação dos receptores adrenérgicos de tipo beta-1, foi realizada uma curva temporal na presença do antagonista seletivo para receptores beta-1, atenolol (1 $\mu$ M). Isoproterenol (50 nM) não incrementou a corrente nessas condições experimentais. Porém, quando o atenolol foi retirado do banho, foi observado um efeito bifásico, com um leve diminuição da corrente, e logo após um marcado incremento dado pelo isoproterenol. Na mesma célula foi perfundido um dos inibidores específicos da corrente  $I_{Ks}$ , chromanol 293 (4 $\mu$ M), abolindo reversivelmente a corrente  $I_{Ks}$ , confirmando desta forma que efetivamente estávamos trabalhando com  $I_{Ks}$ . (Figura 25)



**Figura 25** Isoproterenol 50 nM modula  $I_{Ks}$  de forma bifásica. Aten.: atenolol, Iso: isoproterenol, Tyr.: tyrode, Chro.: Chromanol 293b.

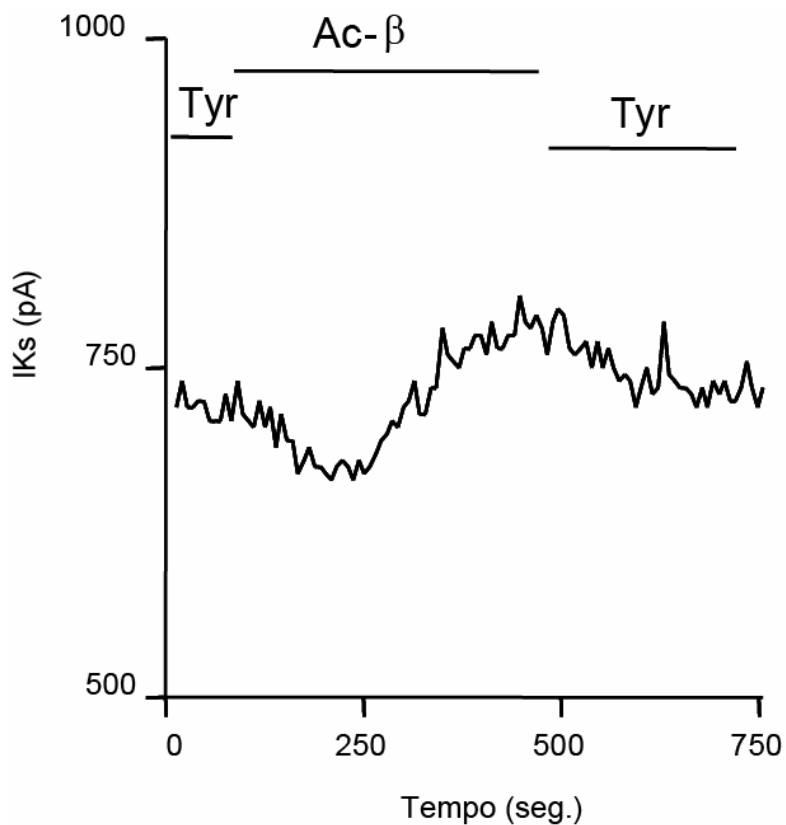
A seguir efetuamos registros da corrente  $I_{Ks}$  em função da voltagem na presença de 50 nM de isoproterenol. Nesta oportunidade foi medida a corrente de cauda (Figura 26 A-C), dado que esta não é modulada pela diferença de potencial que o protocolo aplicado ocasiona. A amplitude da corrente de cauda de  $I_{Ks}$  foi graficada em função da voltagem do pulso aplicado, gerando uma relação corrente-voltagem sigmoidal (obtida pelo ajuste dos pontos a uma equação de Boltzmann). Isoproterenol incrementou a corrente de cauda de  $I_{Ks}$ , deslocando a curva sigmoidal para a esquerda. O  $V_{1/2}$  da curva controle foi 20 mV e 24 mV na curva do isoproterenol. As inclinações das curvas obtidas foram diferentes nas duas condições, sendo de 22.7 para o isoproterenol e 15.4 no controle. (Figura 26-C)



**Figura 26.** 50 nM de isoproterenol incrementa a corrente de cauda de  $I_{Ks}$ . Traçados representativos da corrente de cauda de  $I_{Ks}$  (em +50 mV), controle (preto)(a) vs. Isoproterenol (vermelho) (b) em A. Em B, curva temporal do pico da corrente de cauda de  $I_{Ks}$  ativada em +50 mV em situação controle (Preto) e isoproterenol 50 nM (vermelho). Nos pontos a e b foram aplicados protocolos para

determinação da relação corrente-voltagem. Em C foi aplicado um protocolo de pulsos, consistindo de pulsos partindo do potencial de “holding” de -50 mV para potenciais na faixa de -40 a +60 mV, a cada 6 s, com incremento de 20 mV a cada pulso. Aplicando-se a equação de Boltzmann, foram ajustadas curvas sigmóides aos pontos experimentais, as quais mostraram diferenças nos valores de  $V_{1/2}$  e inclinação das mesmas, entre a condição controle (preto)(a) e isoproterenol 50 nM (vermelho (b)); ver texto).

As IgGs dos pacientes Ac- $\beta$  modularam também a corrente  $I_{Ks}$  de forma bifásica tal como mostra a figura 27 (em que se mostra a curva temporal medido o pico da corrente a +40 mV).



**Figura 27.** Modulação bifásica de  $I_{Ks}$  pelos Ac- $\beta$ . Corrente ativada por pulsos despolarizantes partindo do potencial de “holding” de -50 para +40 mV, aplicados a intervalos de 6 s, na presença do Ac- $\beta$ .

#### 4. Discussão

O presente trabalho mostra que os anticorpos, tanto os com atividade muscarínica (Ac-M), quanto os com atividade beta-adrenérgica (Ac- $\beta$ ) presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos, modulam a repolarização ventricular. Estudamos os possíveis mecanismos iônicos e celulares pelos quais estes anticorpos, ativando receptores de membrana acoplados a proteína G, conseguem concretizar essa modulação. Embora os três grupos Ac-M, Ac- $\beta$  e Ac- sejam provenientes de pacientes chagásicos na fase crônica, somente o soro e fração IgG dos pacientes Ac-M e Ac- $\beta$  foram capazes de modular a repolarização ventricular.

Também, encontramos uma correlação entre parâmetros da repolarização ventricular medidos “*in vivo*” (dQT) e “*ex vivo*” (QT), no grupo Ac-M, fortalecendo ainda mais a hipótese de que estes estão envolvidos na gênese da heterogeneidade da repolarização ventricular e talvez nas arritmias cardíacas que cursam com a doença de Chagas (Figura 7).

A seguir discutiremos os dados obtidos separadamente: 1) dados do ECG dos pacientes, 2) origem dos anticorpos, 3) mecanismos básicos da modulação da repolarização ventricular mediada pelos anticorpos, e 4) relevância clínica deste trabalho.

#### 4.1 Dados obtidos no ECG dos pacientes

Estudos epidemiológicos assinalam as arritmias cardíacas como um achado muito freqüente na cardiomiopatia chagásica crônica, sendo que a morte súbita é responsável por até 55-66% das mortes nessa fase da doença (REIS, 1999, RASSI et. al. , 2001).

Assim, o ECG de superfície é uma ótima ferramenta tanto para diagnóstico quanto para prognóstico da morte súbita. A medição da dispersão do intervalo QT (dQT) no ECG de superfície é um marcador de heterogeneidade espacial da repolarização ventricular (SYLVEN et. al , 1984, MIRVIS 1985) e substrato de arritmias ventriculares (JAIN & AVASTHI, 2004).

Embora a medida da dQT seja uma ferramenta muito útil como preditor de morte súbita, a sua correta medição é às vezes discutida e questionada (KAUTZNER et. al. , 1994). Por tal motivo, ainda não existe um consenso nos valores normais e patológicos deste parâmetro (CELIK et. al , 2006). Surawicz (1996) mostrou que esse valor estaria entre 40 e 50 ms, relatando que é possível achar valores acima de 65 ms em pacientes com distúrbios respiratórios e taquiarritmias, e maiores de 110 ms em pacientes com síndrome congênita do QT longo. Gupta e cols. (2002) também reportaram que uma dQT maior que 110 ms estava associada a maior incidência de morte súbita em crianças sob tratamento com antraciclinas. Todavia, Taneja e cols. (2001) mostraram diferenças na dQT em 56 pacientes sadios de diferentes sexos e idade, obtendo valores maiores no sexo masculino que no sexo feminino, e pacientes de maior idade que de menor idade, respectivamente, mostrando a influência destas variáveis neste parâmetro.

A dQT tem sido utilizada como preditor de morte súbita em diferentes patologias, tais como doença coronária e taquicardia ventricular não sustentada (BOGUN et. al. , 1996), em pacientes com intervalo QT longo (DAY et. al. , 1990), na cardiomiopatia hipertrófica (BUJA et. al. , 1993), na insuficiência cardíaca (BARR et. al. , 1994), e em pacientes sob terapia de ressincronização ventricular (CHALIL et. al. , 2006), entre outras.

Na cardiomiopatia chagásica na fase crônica, o grupo do HUCFF-UFRJ, integrado pelo Dr. Salles e cols. (2003) mostraram em um estudo envolvendo 738 pacientes, que um valor de dQT maior que 60 ms era preditor de disfunção ventricular esquerda. Em outro trabalho este mesmo grupo mostrou, em estudo longitudinal com 814 pacientes na mesma fase da doença, que valores de dQT maiores que 65 ms e intervalo QTc maior que 465 ms eram preditores independentes de morte súbita (SALLES et. al., 2003a).

Em nosso trabalho, só os pacientes Ac-M apresentaram dQT maior que 65 ms, e QTcmax maior que 465 ms, e foram capazes de aumentar a duração do QT de forma reversível no coração isolado de coelho, sendo este efeito abolido pela presença do inibidor muscarínico atropina. Estes dados sugerem um efeito direto dos Ac-M sobre os parâmetros da repolarização ventricular nos pacientes.

Mesmo que o intervalo QT nos pacientes do grupo Ac-M não tenha sido significativamente maior quando comparado com o grupo Ac-, somente no grupo Ac-M observamos uma correlação positiva entre a dQT e QTmax ( $r=0.71$ ,  $p<0.001$ ), sugerindo mais uma vez a associação entre a atividade muscarínica e o incremento na duração do intervalo QT. De fato, mostramos que os pacientes Ac-M possuem um

QTcmax maior que 465 ms, valor máximo indicado por Salles e cols. (2003) como preditor independente de morte súbita em pacientes chagásicos na fase crônica.

Embora a dQT seja estatisticamente diferente no grupo dos pacientes Ac-M quando comparados com os pacientes Ac- e Ac- $\beta$ , os demais parâmetros medidos (QTcmax e QTmax), não mostraram diferença estatística em nenhum dos 3 grupos estudados. Para explicar este resultado podemos citar o trabalho de Pathak e cols. (2002), que utilizando um modelo animal de obesidade, obtiveram dados similares aos apresentados por nós, mostrando um incremento na dQT sem mudanças no QTmax, nos animais onde foi induzida obesidade. Os autores atribuíram esse fenômeno nos parâmetros da repolarização, a uma possível disfunção no sistema autonômico.

No grupo de pacientes Ac- $\beta$ , não achamos diferenças significativas nos parâmetros clínicos analisados quando comparado com o grupo Ac-, embora este resultado possa ser devido ao pequeno número de pacientes que compõem dito grupo.

Um dos achados relevantes comum aos pacientes Ac-M (9/17) e Ac- $\beta$  (2/6), foi a presença de áreas eletricamente inativas, porém somente observamos diferença significativa no grupo Ac-M, quando comparado com o grupo Ac- (0/15,  $p=0.0001$ ). A presença destas áreas eletricamente inativas concomitantemente com os distúrbios na repolarização ventricular observados nos pacientes Ac-M, levam a pensar que este grupo estaria propenso a apresentar pior prognóstico a longo prazo.

Para compreender o grau de participação direta dos Ac-M e Ac- $\beta$  no dano miocárdico, um número variado de pesquisadores realizaram estudos com diferentes modelos animais. Um dos primeiros trabalhos a demonstrar que estes anticorpos possuíam relevância funcional *in vivo* foi realizado por Fu e cols. (1996), imunizando coelhos com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor muscarínico M2,



mostrando dano nos cardiomiócitos dos coelhos imunizados, assim como produção de Ac-M, com efeito, funcional *in vitro*.

Em outro trabalho realizado pelo mesmo grupo, desta vez com o objetivo de comparar o dano induzido pelos Ac-M vs Ac- $\beta$ , imunizaram coelhos durante um período de um ano, com peptídeos da segunda alça extracelular do receptor beta-1 ou M2 muscarínico, observando que 2 animais morreram no grupo Ac- $\beta$ , atribuindo este episódio a disfunção secundária a presença dos Ac- $\beta$ , e que esse mesmo grupo possuía maior comprometimento da cavidade ventricular esquerda, comparado com o grupo M2 muscarínico. Porém, os animais deste último grupo apresentaram maior acometimento cardíaco na câmara direita. Os corações dos dois grupos de animais apresentaram um rico infiltrado inflamatório, necrose celular, e degeneração multifocal. Esse infiltrado inflamatório observado nos animais foi comparado com o achado em corações humanos com cardiomiopatia dilatada (MATSUI et. al., 1997).

Jahns e cols. (2004) imunizando ratos com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta-adrenérgico, utilizando seqüência idêntica a do receptor humano, acharam Ac- $\beta$  no soro dos ratos, e 9 meses após a imunização uma progressiva dilatação e disfunção do ventrículo esquerdo. Quando inocularam os Ac- $\beta$  das ratas imunizadas em animais sadios observaram o mesmo acometimento cardíaco, em uma janela de tempo similar, mostrando o papel funcional dos Ac- $\beta$  na fisiopatologia do dano miocárdico, provocando uma resposta do tipo auto-imunológica.

Neste contexto, Gimenez e cols. (2005) imunizaram camundongos com cDNAs correspondentes aos receptores M2 e beta-1 adrenérgico, mostrando alterações na parede ventricular em ambos os grupos. Foi interessante observar que nesse estudo os autores acharam uma diminuição dos receptores beta-1 adrenérgicos e um incremento

dos receptores M2 muscarínicos, sugerindo uma alteração na modulação autonômica nesses animais.

#### **4.2 Origem dos anticorpos na fase crônica da doença de Chagas**

Muitos foram os trabalhos que observaram a presença e atividade funcional de Ac-M e/ou Ac- $\beta$ , na fase crônica da doença de Chagas, porém, ainda hoje não se conhece a origem destes anticorpos. Duas grandes linhas de pensamento têm proposto hipóteses diferentes para poder explicar este fenômeno. 1) auto-imunidade provocada por mecanismo de mimetismo molecular; e, 2) a própria presença do parasita.

A hipótese de auto-imunidade gerando a presença de anticorpos (Ac-M e Ac- $\beta$ ) que ativam receptores de membrana acoplados a proteína G e causam dano miocárdico tem sido reforçada por Matsui e cols. (2006) em um modelo animal de cardiomiopatia auto-imune. O autor mostrou que imunização de coelhos com peptídeos dos receptores beta-1 e M2 poderia induzir estes animais a desenvolverem anticorpos contra os respectivos peptídeos e que a transferência de IgG e/ou linfócitos do sangue periférico para camundongos imuno-deficientes, induzia nos corações destes, mudanças miocárdicas comparáveis aos primeiros estágios da cardiomiopatia observada nos coelhos imunizados. Dados similares foram obtidos pelo mesmo grupo utilizando a mesma estratégia, mas imunizando só com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta adrenérgico (MATSUI et. al. , 2003).

Entretanto, a idéia de mimetismo molecular na cardiomiopatia chagásica crônica surgiu do trabalho do grupo do Dr. Mariano Levin (Argentina), que em 1989 mostrou uma reação entre antígenos recombinantes do parasita com soros de pacientes

chagásicos na fase crônica, identificando assim o JL5 como o principal antígeno a reagir com o soro desses pacientes. Em seguida o grupo de Levin identificou que o antígeno JL5 codificava um peptídeo de 35 aminoácidos, correspondente à porção C-terminal da proteína ribossomal P2 $\beta$  do *T. cruzi* (Mesri et. al. , 1990). Interessantemente, parte da seqüência desse antígeno, com 13 aminoácidos da região C-terminal da proteína ribossomal P2 $\beta$ , denominado R13 (**EEEDDDMGFGLFD**), possui um grau de homologia de 90% em relação ao peptídeo correspondente a proteína ribossomal humana, o H13 (**EESDDDMGFGLFD**). A mesma seqüência da proteína P humana tem sido identificada como epítipo no soro de pacientes que apresentavam Lupus (LEVITUS et. al. , 1991). Porém, mesmo tendo um alvo similar, Kaplan e cols. (1997) mostraram que diferentemente dos anticorpos presentes nos pacientes com Lupus, os anticorpos dos pacientes chagásicos possuíam atividade funcional. Este efeito funcional dos anticorpos era devido ao reconhecimento do epítipo polianiônico da segunda alça extracelular do receptor adrenérgico de tipo  $\beta_1$  (**AESDE**), evocando um efeito cronotrópico positivo na cultura de cardiomiócitos de ratos neonatais. Desta maneira, a hipótese do mimetismo molecular tomou mais força e começou a demonstrar que não era tão só uma coincidência molecular, mas, que existia um mimetismo *funcional*, demonstrado pela ativação de receptores de membrana acoplados a proteína G. Nesta direção, Ferrari e cols. (1995) demonstraram este mimetismo *funcional* entre a segunda alça extracelular dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos e epítipos da proteína ribossomal de *T. cruzi* P0. Mantendo esta linha de pensamento, Lopez Bergami e cols. (1997) imunizaram camundongos com a proteína recombinante P2 $\beta$ , e mesmo não observando mudanças significativas em nível inflamatório, acharam alterações eletrocardiográficas, tais como um incremento na duração do complexo QRS, dados

que sugeriram prováveis defeitos na condução atrioventricular, mostrando mais uma vez o mimetismo *funcional* dos anticorpos produzidos pela imunização. Outro alvo deste mimetismo molecular *funcional* foi o receptor muscarínico M2. Masuda e cols. (1998) mostraram um efeito depressor da eletrogênese mediada por anticorpos em coração isolado de coelho, sendo este efeito inibido quando os soros provenientes dos pacientes chagásicos crônicos foram pré-incubados com o peptídeo correspondente a segunda alça extracelular do receptor M2 (FIVGVRTV**EDGE**CYIQFFSNA), previamente descrito por Elies e cols. (1996). Neste trabalho os autores utilizaram também outros peptídeos contendo parte da P2 $\beta$ : os peptídeos P0-14i (AA**ESEEE**DDDDDF), P0-13 (AA**ESEEE**DDDDDF), R-7 (MGFGLFD) e o R-13. Todos eles inibiram o efeito funcional menos o R-7, que também pertence a região C-terminal da proteína P2 $\beta$  mas não possui os amino-ácidos com carga negativa. Estes dados sugeriram que um dos principais alvos dos anticorpos estaria na segunda alça extracelular dos receptores M2 e  $\beta_1$ .

Um outro grupo também tem destacado o mimetismo molecular (CUNHA-NETO et. al. , 1995), contudo, entre o antígeno B13 (AAAGDK) presente no soro dos pacientes chagásicos crônicos e o epitopo da cadeia pesada da miosina cardíaca (AAALDK). O mesmo grupo demonstrou este mimetismo em camundongos infectados cronicamente com *T. cruzi* (RIZZO et. al. , 1989). Dados similares tinham sido observados por Tibbets e cols. (1994) no mesmo modelo.

Posteriormente, o grupo de Cunha-Neto achou anticorpos que reagiam contra a cadeia pesada da miosina em pacientes chagásicos crônicos, assim como clones de linfócitos T CD-4+ reativos nas áreas de infiltrado inflamatório desses pacientes (CUNHA-NETO et. al. , 1996; ABEL et. al. , 1997). A presença desses anticorpos,

descritos previamente em outros modelos, foi proposta como possível fonte patogênica no dano miocárdico (NEU et. al. ,1987).

Uma outra linha de pensamento sugere que a presença do parasita é um dos fatores determinantes para perpetuar o dano miocárdico na fase crônica da doença. Porém, a presença do parasita na fase crônica da doença é bastante discutida. Alguns autores têm detectado por técnicas como PCR ou microscopia confocal (MORTARA et. al., 1999), material genético ou antígenos do parasita, respectivamente (MARCON et. al. , 2002), mas mesmo o parasita inteiro tem sido encontrado nessa fase da doença (ELIAS et. al., 2003) Mediante a técnica de PCR também foi possível demonstrar não só a presença do parasita na fase crônica, mas também a linhagem do *T. cruzi* envolvido na doença, confirmando a hipótese de que o *Trypanosoma cruzi* II seria o agente etiológico desta enfermidade (FREITAS et. al., 2005). Em um outro estudo, Marcet e cols. (2006) detectaram uma alta prevalência desta linhagem (*T. cruzi* II) no vetor biológico desta enfermidade em uma região específica da Argentina, confirmando os dados apresentados anteriormente.

Outros trabalhos que sugerem a presença do parasita na fase crônica da doença têm proposto o tratamento com agentes tripanomicidas. Assim, em um trabalho experimental utilizando um modelo de fase crônica da doença de Chagas em camundongos, Garcia e cols. (2005) mostraram que o tratamento dos animais com agente tripanomicida (benznidazol) diminuía as arritmias cardíacas, assim como os títulos de Ac-M e Ac- $\beta$ . Um outro achado importante nesse trabalho foi o remodelamento na parede cardíaca, obtendo uma melhora significativa no grupo dos animais tratados. Já em pacientes em tratamento com agentes tripanomicidas, são poucos os trabalhos mostrando longo seguimento (VIOTTI et. al., 1994). Ainda assim,

recentemente Viotti e cols. (2006) mostraram em grupo de 566 pacientes chagásicos crônicos, sendo a metade tratados com agente tripamicida (benznidazol) e a outra metade não tratados com este agente, que no grupo tratado 4% morreram e 5% desenvolveram anormalidades eletrocardiográficas, comparados com 14% e 16% no grupo não tratado, respectivamente. Outro dado interessante deste trabalho foi o grau de soro-negatividade que apresentou o grupo de pacientes tratados. Todos estes trabalhos, indiretamente, ajudam a sustentar a hipótese da presença do parasita como fator contribuinte da fisiopatologia na fase crônica da doença.

Outro trabalho a mostrar de forma direta a presença do parasita na fase crônica foi publicado por Elies e cols. (2003), que encontraram tripomastigotas em um de três corações de pacientes chagásicos na fase crônica. Entretanto, mediante a utilização de PCR, detectaram material genético do parasita em todos os corações. Estes dados sugerem que a presença do material genético possivelmente poderia estar envolvido na patogênese, dado que mesmo na ausência do parasita observaram dano miocárdico nos outros 2 corações.

A hipótese descrita acima foi esclarecida, em parte, por Schijman e cols. (2004), os quais observaram uma correlação positiva entre o achado do DNA do parasita nas lesões e fibrose, inflamação e progressão da enfermidade, sugerindo que durante a fase crônica da infecção o parasita tem contato com o coração do paciente em diferentes tempos e locais, ativando resposta imunológica em cada um desses locais. Como consequência disto, os parasitas são lisados, o tecido ao redor é lesado e substituído por fibrose. A somatória das lesões multifocais, principalmente no ventrículo esquerdo, contribuem para a ocorrência de disfunção cardíaca.

Contudo, é bem possível que os dois mecanismos citados (mimetismo molecular e presença do parasita) contribuam para a etiopatogenia da cardiomiopatia chagásica, pois o dano na parede cardíaca após a destruição dos miócitos parasitados pode ativar o sistema imunológico pela exposição de epitopos próprios (*self*) como os receptores acoplados a proteína G, e a presença de antígenos do parasita, tais como as proteínas P ribossomais do *T. cruzi*, induziria e amplificaria uma resposta imune dirigida a gênese dos Ac-M e Ac- $\beta$ .

### **4.3 Mecanismos básicos da modulação da repolarização ventricular mediada pelos anticorpos**

#### **Modulação mediada por Ac-M**

Como foi mostrado no presente trabalho, os Ac-M prolongaram reversivelmente a duração do intervalo QT em corações isolados de coelhos. O agonista muscarínico carbacol e Ac-M inibiram a corrente repolarizante de potássio  $I_{Ks}$ , sem apresentar efeito algum na corrente  $I_{to}$ .

Nosso laboratório tem publicado alguns trabalhos mostrando o efeito dos Ac-M no coração isolado de coelhos, tal como o publicado por De Oliveira e cols. (1997), utilizando soro de pacientes chagásicos crônicos que apresentavam arritmias complexas. Esses soros induziram bloqueios de condução e arritmias que foram abolidos quando o experimento era repetido em presença de atropina. Este foi o primeiro trabalho a sugerir que as IgG presentes no soros desses pacientes eram as responsáveis por esse efeito. Posteriormente, Costa e cols. (2000) caracterizaram mais de 60 soros provenientes de pacientes chagásicos crônicos, mostrando que em sua

maioria estes soros possuíam efeitos muscarínicos e que esses anticorpos eram capazes de evocar alterações na condução atrioventricular, as quais não ocorreram na presença do antagonista muscarínico atropina, sugerindo assim que o efeito destes é por ativação do receptor de membrana acoplado a proteína G, M2. Outro trabalho a demonstrar o papel funcional dos anticorpos e sua relação com os eventos arrítmicos na fase crônica da doença de Chagas, foi o publicado por Chiale e cols. (2001), mostrando que 79% dos pacientes que apresentaram disfunção do nódulo sinusal possuíam Ac-M, enquanto que só 15% dos pacientes com esse tipo de disfunção possuíam Ac- $\beta$ . As IgGs provenientes dos pacientes Ac-M mostraram um efeito depressor do cronotropismo, assim com um incremento do fosfatidilinositol, sugerindo uma via de ação destes anticorpos diferente da via do AMPc.

Os trabalhos acima mostram o papel funcional dos Ac-M sobre o sistema de condução, efeito este mediado pela ativação do receptor de membrana acoplado a proteína G, M2 muscarínico. Estes dados poderiam explicar, pelo menos em parte, a presença em pacientes chagásicos na fase crônica de alterações no sistema de condução mediadas pelos Ac-M. Porém, ainda não há nenhum trabalho mostrando qual poderia ser a contribuição dos Ac-M nos distúrbios da repolarização. Como é sabido, a morte súbita é um dos principais mecanismos de morte na fase crônica da doença de Chagas. Alterações na repolarização ventricular têm sido indicadas como substrato para a morte de origem cardíaca nestes pacientes. Com estes dados nos perguntamos, neste trabalho: 1 – os Ac-M podem modular a repolarização ventricular?; 2 – se a resposta à pergunta 1 é positiva, quais correntes iônicas envolvidas na repolarização ventricular poderiam estar perpetuando esse efeito?



Em nosso trabalho, demonstramos a modulação da repolarização ventricular mediada pelos Ac-M no coração isolado de coelhos, observando um incremento na duração do intervalo QT. Como já foi descrito, o final da repolarização das células M corresponde ao final da onda T no ECG. Assim, procuramos na literatura dados que pudessem explicar estes achados. Como foi descrito na introdução, existe uma heterogeneidade celular na parede ventricular (ANTZELEVITCH et. al. , 1991). Assim, cada um dos tipos celulares que compõe essa parede apresenta uma resposta diferenciada diante de estimulação adrenérgica ou colinérgica. Neste sentido, Litovsky & Antzelevitch (1990) mostraram em coração canino, que as células epicárdicas, mas não as endocárdicas, apresentaram mudanças na duração do potencial de ação ( $DPA_{90\%}$ ) na presença de acetilcolina, sendo essa resposta dose-dependente. Desta forma, em baixas doses Ach prolongava e em altas doses encurtava a  $DPA_{90\%}$ , respectivamente. Todavia, outros autores utilizando endocárdio e epicardio felino, obtiveram o resultado diferencial da acetilcolina nas fibras ventriculares, encurtando a DPA no epicárdio. Também nesse trabalho, demonstraram uma aceleração na repolarização ventricular como consequência da estimulação vagal, com frequência controlada ou não, num modelo animal felino *in vivo*, possivelmente mediada por alguma via de sinalização acoplada a proteína  $G_i$  (ROSENSHTRAUK et. al. , 1994). As fibras de Purkinje são outro tipo de células moduladas pela ação colinérgica. Dita ação, seja evocada pela acetilcolina ou por um agonista específico dos receptores  $M_2$  colinérgicos, induz um encurtamento na DPA destas células (MUBAGWA & CARMELIET, 1983, MALFATTO et. al. , 1996). Nesta linha de pensamento, Yang e cols. (1996) mostraram uma diferença de resposta ante a estimulação colinérgica em diferentes regiões do coração canino, observando um encurtamento da DPA nas

células sub-epicárdicas, sendo este efeito dependente da frequência. Zang e cols. (2005), em coabias, também demonstraram um encurtamento do potencial de ação ventricular mediado pela acetilcolina, dose-dependente.

Com estes achados na literatura, mostrando que um incremento no intervalo QT pode ser devido a um efeito diferenciado da resposta colinérgica sobre os tipos celulares que compõe a parede ventricular, pode-se pensar num possível incremento na duração do potencial de ação mediado pelos anticorpos ativando certas correntes iônicas. Com esta hipótese, começamos a investigar quais poderiam ser as correntes iônicas envolvidas neste fenômeno.

Como é sabido o potencial de ação na parede ventricular é consequência da somatória de correntes iônicas despolarizantes e repolarizantes. Desta forma, na repolarização ventricular diversas são as correntes iônicas envolvidas, como:  $I_{to}$ ,  $I_{K,ACh}$ ,  $I_{Ks}$  e  $I_{Kr}$ . O desbalanço em uma ou mais destas correntes pode evocar e/ou favorecer a presença de eventos arritmogênicos. Assim, é válido pensar que na doença de Chagas algumas destas correntes estejam alteradas ou possam ser moduladas pelos Ac-M, criando um desbalanço iônico na repolarização, favorecendo a presença de arritmias. Um dos primeiros trabalhos a mostrar alterações nas correntes iônicas em um modelo canino infectado com *T. cruzi* foi publicado por Pacioretty e cols. (1995), mostrando uma diminuição na densidade da corrente repolarizante de potássio  $I_{to}$ . Interessantemente, o mesmo autor mostrou *in vitro*, em outro trabalho (HAN et. al. , 1997), que era possível recuperar a densidade normal dessa corrente ( $I_{to}$ ) em células do epicárdio infectadas com *T. cruzi*, quando tratava a cultura com o agonista adrenérgico norepinefrina. Foi sugerida uma alteração no sistema nervoso autônomo como responsável pela baixa densidade da corrente  $I_{to}$  (HAN et. al. , 1997). Porém, em nosso trabalho, em

concordância com os dados publicados previamente por Yan e cols. (1996), a corrente  $I_{to}$  não foi modulada pela estimulação colinérgica, seja pelo carbacol, ou pelos Ac-M, sugerindo que os dados apresentados por Pacioretty e cols. (1995) não seriam devidos ao efeito dos Ac-M, e sim causados pelo próprio dano da parede ventricular. Na mesma linha de pensamento, Zicha e cols. (2004), mostraram uma diminuição no mRNA da subunidade alfa da corrente  $I_{to}$ , em amostras de tecido cardíaco tanto canino quanto humano pertencente a corações que apresentaram insuficiência cardíaca, sugerindo assim que dita corrente estaria diminuída nessas condições.

Uma outra corrente, que foi investigada neste estudo como responsável pelos efeitos da modulação colinérgica foi a corrente  $I_{Ks}$ , descrita por Sanguinetti e cols. (1990). O canal iônico de  $I_{Ks}$  é composto pela subunidade alfa KCNQ1 e pela subunidade beta KCNE1 (SANGUINETTI et. al. , 1996).  $I_{Ks}$  pode ser estimulada pela via da proteína Gs, através de fosforilação mediada pela proteína kinase A (PKA) (YANG et. al. 2003, DILLY et. al. , 2004, STENGL et. al., 2006), sendo que uma estimulação colinérgica inibe dita corrente, tal como foi mostrado por Freeman e cols. (1995) no nódulo sino-atrial de cobaia. Ainda hoje não está claro por qual mecanismo a acetilcolina inibe  $I_{Ks}$ . Assim, a hipótese de que a inibição seja mediada pela ativação dos receptores M2 colinérgicos, defosforilando o canal responsável pela corrente  $I_{Ks}$  é uma das mais aceitas. Um dos dados apresentados neste trabalho mostra evidências indiretas que apóiam essa idéia. O fato de ter observado uma inibição menor da corrente  $I_{Ks}$  pelo carbacol após esta ter sido inibida pelo Ac-M (Figura 12-B), sugere que após a ação do Ac-M o canal fica com um nível de fosforilação muito baixo e por tal motivo a estimulação dos receptores M2 pelo carbacol, agindo provavelmente mediante a estimulação da proteína  $G_i$ , teria pouco substrato para ser defosforilado. Nesta linha

de pensamento, na figura 13 observamos que quando perfundimos com um agonista adrenérgico que incrementa a fosforilação do canal, logo após ter perfundido a célula com Ac-M, há um incremento de  $I_{Ks}$ , mostrando claramente que os Ac-M evocam uma inibição sobre  $I_{Ks}$ , mas sem estimular “*run down*” das células utilizadas. Estes dados, indiretos, sustentam ainda mais a idéia que estas mudanças na fosforilação estariam mediadas pela ativação dos receptores de membrana acoplados a proteína G, M2 e beta-1 adrenérgico. A favor desta idéia, Wang e cols. (2000) já demonstraram que peptídeos da segunda alça extracelular do receptor M2, diminuem a produção de AMPc de cardiomiócitos ventriculares de cobaia. Um trabalho publicado por Freeman & Kass (1995) mostra que aparentemente a corrente  $I_{Ks}$  não seria inibida pelo carbacol mediante ativação dos receptores muscarínicos, dado que a inibição mediada por este não foi abolida pela atropina. Porém estes experimentos foram realizados em células isoladas do nódulo sinoatrial de cobaia, tecido diferente ao utilizado no presente trabalho (Células ventriculares de cobaia).

A corrente  $I_{Ks}$  tem um papel muito importante na repolarização ventricular. A síndrome do QT Longo (SQTL) congênita, do tipo 1 (KCNQ1) ou 5 (KCNE1), onde os pacientes possuem mutações funcionais nos genes que codificam as subunidades que formam o canal  $I_{Ks}$ , é a melhor evidência disso. Assim, foi demonstrado um incremento na dispersão do QT (dQT) em pacientes sintomáticos com SQTL tipo 1, onde a subunidade alfa (KCNQ1) do canal possui uma mutação (SWAN et. al. , 1998). Adicionalmente, o fato desta corrente ter uma expressão heterogênea dentro da parede ventricular, com baixa densidade nas células M responsáveis pela finalização da onda T do ECG, sugere que a inibição desta corrente, neste caso mediada pela ação colinérgica do Ac-M, poderia produzir uma maior dispersão na repolarização ventricular,

modulando conseqüentemente a dQT. Estes dados bibliográficos sustentam a nossa hipótese de que a inibição da corrente  $I_{Ks}$  mediada pelos Ac-M estaria envolvida na fisiopatologia dos fenômenos eletrocardiográficos observados nos pacientes estudados na presente tese. Esta hipótese, de que o bloqueio da  $I_{Ks}$  poderia alterar a heterogeneidade ventricular, independentemente de modificar a DPA, fica ainda mais consistente desde o momento que existem resultados contraditórios de qual é o efeito do bloqueio da mesma na duração do potencial de ação ventricular (BRYANT et. al. , 1998, CORDEIRO et. al. , 1998, BOSCH et. al. , 1989, SANGUINETTI & KEATING, 1997, SCHREIECK et. al. , 1997). Estes dados justificam também, a causa pela qual não foi observado o efeito dos Ac-M no potencial de ação em nosso trabalho.

Quanto ao potencial arritmogênico da inibição de  $I_{Ks}$  sem mudanças na DPA, Jost e cols. (2005) justificaram este efeito como sendo dado pelo estímulo adrenérgico. Assim, eles mostraram que utilizando diferentes inibidores de dita corrente sem estímulo adrenérgico, a DPA não era modificada, porém quando as células foram perfundidas com um agonista adrenérgico simultaneamente com o antagonista de  $I_{Ks}$ , foi observado um incremento significativo na DPA. Continuando com esta hipótese, Terrenoire e cols. (2005) mostraram que na presença de uma mutação em  $I_{Ks}$ , tal como ocorre na síndrome do QT longo de tipo 5, uma estimulação adrenérgica leva a um incremento da DPA, contrariamente ao que acontece em condições fisiológicas.

Assim, a diminuição da duração do potencial de ação pela ação colinérgica, mostrada em outros trabalhos, seja mediada por Ac-M (ZHAO et. al., 1996, DEL CORSO et. al., 2004) ou pelos próprios agonistas colinérgicos (ver acima), pode ser explicada pela ação destes sobre outras correntes iônicas tais como  $I_{Ca}$  e  $I_{K,Ach}$ .

Porém em dois trabalhos diferentes de nosso laboratório foi demonstrado que os Ac-M inibem a corrente  $I_{Ca}$ , anulando assim a hipótese de que esta corrente poderia compensar a inibição da  $I_{Ks}$ . No primeiro trabalho, Hernandez e cols. (2003) mostraram que Ac-M purificados de pacientes chagásicos crônicos, inibiram a  $I_{Ca,L}$ , e que esse efeito era mediado pela estimulação do receptor muscarínico M2, sendo que a ativação deste era tipo alostérica. No segundo trabalho, Del Corso e cols. (2004) utilizando Ac-M purificados de pacientes que apresentavam cardiomiopatia dilatada, mostraram que estes inibiam a  $I_{Ca,L}$  em cardiomiócitos isolados de coelho. Eles mostraram que esse efeito era mediado também pela estimulação dos receptores muscarínicos, subtipo M2.

Quanto a corrente de potássio  $I_{K,Ach}$ , a mesma tem sido descrita no tecido ventricular (KOUMI & WASSERSTROM, 1994, KOUMI et. al., 1995). Mediado pela ativação colinérgica, este canal é ativado pela acetilcolina, acelerando a repolarização ventricular, perpetuando assim uma diminuição na duração do potencial de ação (KOUMI et. al., 1997). Mesmo assim, não tem sido considerada amplamente a participação deste canal na gênese das arritmias ventriculares (XIAO & MORGAN, 1998), tal como nas arritmias atriais. A pequena contribuição deste canal na repolarização ventricular ficou bem demonstrada no trabalho de Wickman e cols. (1998), que realizaram em camundongo uma mutação de um dos genes que codifica para  $I_{K,Ach}$  (GIRK-4), observando que a frequência de repouso dos animais mutados era similar a dos animais controle. Este trabalho sugere vias compensatórias alternativas ante uma diminuição ou falta deste canal.

### **Modulação mediada por Ac- $\beta$ e isoproterenol**

Na presente tese foi observado que os Ac- $\beta$ , modulavam a repolarização ventricular *in vitro* no coração isolado de coelho. Foi observado também que esses anticorpos podem modular a duração do potencial de ação das células M. A corrente  $I_{Ks}$  foi incrementada por esses anticorpos, sem termos observado modulação da corrente  $I_{to}$ . Resultados semelhantes foram observados na presença do isoproterenol.

Fisiologicamente, a estimulação adrenérgica modula a repolarização ventricular, incrementando a frequência cardíaca e conseqüentemente diminuindo a duração do intervalo QT, tal como mostrado por Davidowsky & WOLF. (1984). As bases deste fenômeno poderiam ser explicadas pelo efeito agonista adrenérgico sobre o potencial de ação das fibras miocárdicas. Já foi bem caracterizado que um estímulo adrenérgico diminui a duração do potencial de ação, tal como mostraram Litovski & ANTZELEVITCH (1990) nas células endocárdicas e epicárdicas, mediante a utilização de diferentes doses de isoproterenol. Este efeito poderia ser resultante da estimulação da corrente  $I_{Ks}$ , dado que a estimulação adrenérgica sobre a mesma incrementa a densidade desta corrente, como foi assinalado acima. Uma outra corrente que modula o potencial de ação é a corrente  $I_{to}$ , porém foi demonstrado que na dose de isoproterenol de  $1\mu\text{M}$ , dita corrente não é modulada (GALLEGO et. al. , 2005). Em concordância com estes dados em nosso trabalho também mostramos que isoproterenol não modula essa corrente. Dado que o isoproterenol pode gerar down regulation dos receptores beta de forma dose dependente, tivemos que ajustar a dose deste utilizada nas preparações das células M para realizar os experimentos de células isoladas (patch-clamp). Assim primeiramente realizamos os experimentos com uma dose de isoproterenol de  $1\mu\text{M}$

observando inibição da corrente. Interessantemente, Dilly e cols. (2004) utilizaram a mesma concentração de isoproterenol mostrando um incremento da corrente, ao contrário do observado em nosso trabalho (Figura 24 B-D). Este mesmo grupo reportou que a estimulação adrenérgica sobre  $I_K$  (ainda não tinham sido descritos os dois componentes  $I_{Ks}$ - $I_{Kr}$ ) era dependente da temperatura, sendo que na temperatura de 32 °C o isoproterenol (1 $\mu$ M) incrementou  $I_K$ , enquanto que a 22 °C não observaram mudanças em dita corrente (WALSH et. al. , 1989). Dados similares com isoproterenol foram mostrados por Sanguinetti e cols. (1991). Porém, quando utilizadas doses na faixa do nM, Stengl e cols. (2003) mostraram um incremento nesta corrente mesmo a temperatura de 22 °C, tal como mostramos em nosso trabalho, sendo estes resultados coerentes com o efeito do isoproterenol sobre as células M aqui relatado.

Como descrito, o estímulo adrenérgico pode modular a repolarização ventricular, mediante mudanças no PA. Assim um dos primeiros trabalhos a mostrar o efeito dos Ac- $\beta$  sobre a DPA foi o de Christ e cols. (2001), observando um incremento desse parâmetro durante a perfusão de Ac- $\beta$  proveniente de pacientes que apresentavam cardiomiopatia dilatada e iam ser submetidos à imunoabsorção, em preparações de rato. Um outro trabalho publicado pelo mesmo grupo, mostrou que a fração IgG dos soros dos pacientes Ac- $\beta$  incrementou a DPA em preparação de coração de rato (CHRIST et. al. , 2005). Estes dados são opostos aos dados achados em nosso trabalho. Diferenças metodológicas, tais como espécie utilizada, ou concentração das IgG podem ser as causas dessas diferenças. A corrente  $I_{ks}$  não é expressa no ventrículo do coração do rato, por tal motivo, é possível atribuir esta diferença pela espécie utilizada. Por esta razão em nosso trabalho, visando observar o efeito dos anticorpos na repolarização ventricular, utilizamos células M de cobaia, as quais



desempenham um papel fundamental na gênese da onda T do ECG e possuem um perfil eletrofisiológico semelhante ao das células M humanas. De fato, este é o primeiro trabalho a demonstrar um efeito dos Ac- $\beta$  sobre as células M de cobaia.

Com respeito à concentração de IgG utilizada no trabalho de Christ e cols. (2005), a dose usada foi muito superior a usada por nós e outros trabalhos prévios descritos ao longo desta tese. Se levamos em consideração que a corrente  $I_{Ks}$  pode ser modulada positiva ou negativamente pela estimulação adrenérgica, de forma dose-dependente, tal como mostramos em nosso trabalho, essa seria outra das causas pelas quais os autores observaram resultados opostos ao nosso. Um dado que tivemos em comum com esse trabalho foi o pequeno efeito dos Ac- $\beta$  na  $DPA_{30}$ , no platô do potencial de ação.

Um outro grupo que tem estudado o remodelamento elétrico mediado pela imunização de animais com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta-1 adrenérgico é o de Fukuda e cols. (2004). Mais uma vez levando em consideração o papel fundamental das células M na repolarização ventricular, registraram o potencial de ação de ditas células, tanto nos animais considerados controles quanto nos animais imunizados, achando um incremento na DPA destes últimos. Assim, no mesmo trabalho, obtiveram o registro das correntes iônicas que poderiam estar envolvidas na fisiopatologia desses achados, mostrando uma diminuição nas correntes  $I_{Ks}$  e  $I_{to}$ . Os autores assinalam que este efeito é resultado do remodelamento iônico da parede ventricular e não do efeito eletrofisiológico direto dos anticorpos sobre as correntes iônicas em questão.

Um outro aspecto interessante, que envolve os Ac- $\beta$ , é que estes não gerariam dessensibilização dos receptores beta, tal como demonstrado por Magnusson e cols.

(1994). Neste trabalho, os Ac- $\beta$  sustentaram o efeito cronotrópico positivo por 6 h. Porém, posteriormente, um dos próprios autores desse trabalho (PADLOWSKI et. al. , 1998) mostrou que esses anticorpos diminuíram tanto o RNAm quanto os níveis de proteína do receptor beta-1 adrenérgico. Em outro trabalho Iwata e cols. (2001) confirmaram este achado, em corações de coelhos imunizados cronicamente com o peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta-1 adrenérgico.

#### **4.4 Relevância clínica do presente trabalho**

Em nosso trabalho 38 pacientes chagásicos crônicos foram seguidos durante 10 anos e divididos em três grupos conforme o efeito funcional evocado pelo soro de cada um deles na eletrogenese cardíaca. Os pacientes apresentaram disfunção ventricular global, com 34% em classe funcional III/IV da NYHA. O grupo Ac-M foi quem apresentou maior acometimento cardíaco, como mostrado nas Tabelas 1 e 2.

Um dos resultados clínicos mais relevantes do presente trabalho foi identificar potenciais parâmetros preditores de morte cardíaca nestes pacientes. Assim, o índice do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e QTcmax foram confirmados como preditores, em concordância com trabalhos prévios (BESTETTI & MUCCILLO, 1997, SALLES et. al., 2003).

Outros parâmetros, tais como dQT, áreas eletricamente inativas e a classe funcional da NYHA, foram preditores univariados de morte cardíaca, porém não independentes no modelo multivariado, dado semelhante ao achado por Salles e cols. (2003). Mesmo sendo a função ventricular um marcador prognóstico per-se, as alterações elétricas presentes no grupo Ac-M demonstram um prognóstico

desfavorável. Nossos dados são congruentes com os dados publicados recentemente por Corbucci e cols. (2006), que mostram a relação entre a dQT com diferentes comorbidades numa população de 99 pacientes chagásicos na fase crônica. Neste trabalho foi achado um valor de dQT ( $73.3 \pm 29.6$  ms) similar ao achado em nosso trabalho ( $75.9 \pm 5.5$  ms) em pacientes que morreram subitamente e pacientes com Ac-M, respectivamente. Também neste trabalho a dQT mostrou diferenças significativas, na presença de batimentos prematuros, na classe funcional da NYHA e na presença de aneurisma de ponta. Os dados mostrados por este grupo, junto com os dados apresentados por Salles e cols. (2003) na dQT em pacientes chagásicos crônicos, reforçam os achados de nosso trabalho.

Portanto, na doença de Chagas, os pacientes com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca poderiam ter não só a terapia farmacológica convencional e antiarrítmica, mas também a opção de reparar e/ou prevenir os efeitos patogênicos dos Ac-M, já que diversos trabalhos de nosso grupo e de outros autores tem demonstrado uma ação direta destes anticorpos na fisiopatologia da doença de Chagas.

Uma opção terapêutica alternativa para prevenir ou talvez reparar os efeitos deletérios dos Ac-M nestes pacientes seria a “Imunoabsorção de imunoglobulinas”. Técnica que consiste na retirada das IgG através da técnica de plasmaferese, passando o sangue por uma coluna que adere os anticorpos desejados. Este procedimento descrita por Berta e cols. (1994), já foi utilizado em pacientes com miastenia gravis. Tempo após, esta técnica foi utilizada em pacientes com cardiomiopatia dilatada, removendo nessa oportunidade anticorpos com atividade adrenérgica, obtendo um resultado satisfatório na sobrevida e nos parâmetros hemodinâmicos dos pacientes (MULLER et. al. , 2000, FELIX et. al. , 2002).

Com respeito aos Ac- $\beta$ , estes poderiam ter uma função fundamental nos primeiros estágios da doença, ativando os receptores adrenérgicos. Dita ativação e consequente encurtamento do potencial de ação poderia predispor para possíveis eventos arritmogénicos, pelo mecanismo de reentrada.

Tempo depois, estes anticorpos funcionais poderiam provocar ou contribuir com a “*down regulation*” dos receptores beta-adrenérgicos, em sinergismo com o incremento do nível das catecolaminas circulantes presente nos pacientes. Em nosso trabalho, os pacientes que apresentaram este tipo de anticorpos (Ac- $\beta$ ) possuíam um desempenho cardíaco semelhante ao do grupo controle (Ac-). Porém, o pequeno número de pacientes incluídos neste grupo foi um fator limitante para não podermos ter uma conclusão clínica determinante.

## **5. CONCLUSÃO**

Ao longo do presente trabalho foi possível observar como o sistema imunológico, através das imunoglobulinas, modulou a repolarização ventricular nos pacientes chagásicos crônicos. Dita modulação, encontrou-se diretamente relacionada com a presença dos distúrbios elétricos que os pacientes apresentaram.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, novas opções terapêuticas poderiam ser consideradas, tal como “Imunoabsorção de imunoglobulinas”.

## 6. REFERENCIAS

ABEL, LC; KALIL, J; CUNHA NETO, E. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Tripanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Braz J Med Biol Res.* vol.11 p. 1305-8. 1997

ACQUATELLA, H; SCHILLER, NB; PUIGBÓ, JJ; GIORDANO, H; SUAREZ, JA; CASAL H, ARREAZA, N; VALECILLOS, R; HIRSCHHAUT, E. M-mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chagas' heart disease. *Circulation.* vol. 62 p.787-795. 1980

ALCANTARA, FG. Denervação dos ganglios cardíacos intramurais e cervicotorácicos na molestia de chagas. *Rev Goiana Med.* vol. 16. p. 159. 1970

ANTZELEVITCH, C; SICOURI, S; LITOVSKY, SH; LUKAS, A; KRISHNAN, SC; DI DIEGO, JM; GINTANT, GA; LIU, DW. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res.* vol. 69. p. 1427-49. 1991

ANTZELEVITCH, C; SICOURI, S; LUKAS. Clinical implications of electrical heterogeneity in the heart. The electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial and M cells. Em: Podrid PJ, Kowey PR. *Cardiac Arrhythmias: Mechanism, Diagnosis and Management.* Baltimore, MD: Williams & Wilkins, p. 88. 1994

ANTZELEVITCH, C. Heterogeneity of cellular repolarization in LQTS: the role of M cells. *European Heart Journal. Supplements.* 3. p. K2-K16. 2001

ANTZELEVITCH C. Sudden cardiac death Em: Zipes-Jalife *Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside* 4 th ed. Saunders, p. 151. 2004

ANYUKHOVSKY, EP; SOSUNOV, EA; ROSEN, MR. Regional differences in electrophysiological properties of epicardium, midmyocardium, and endocardium: in vitro and in vivo correlations. *Circulation.* vol 94. p.1981-1988. 1996

BARR, CS; NAAS, A; FREEMAN, M; LANG, CC; STRUTHERS, AD. QT dispersion and sudden unexpected death in chronic heart failure. *Lancet.* vol. 343. p.327-329. 1994

BARRETTO, AC; IANNI, BM. The undetermined form of Chagas' heart disease: concept and forensic implications. *Sao Paulo Med J.* vol. 113. p. 797-801. 1995

BARRETT, MP; BURCHMORE, RJ; STICH, A; LAZZARI, JO; FRASCH, AC; CAZZULO, JJ; KRISHNA, S. The trypanosomiases. *Lancet*. vol. 1362(9394). p. 1469–80. 2003

BEAUBIEN, ER; PYLYPCHUK, GB; AKHTAR, J; BIEM, HJ. Value of corrected QT interval dispersion in identifying patients initiating dialysis at increased risk of total and cardiovascular mortality. *Am J Kidney Dis*. vol. 39(4). p. 834-42. 2002

BERTA, E; CONFALONIERI, P; SIMONCINI, O; BERNARDI, G; BUSNACH, G; MANTEGAZZA, R; CORNELIO, F; ANTOZZI, C. Removal of antiacetylcholine receptor antibodies by protein-A immunoadsorption in myasthenia gravis. *Int J Artif Organs*. vol. 17. p. 603–8. 1994

BESTETTI, RB; COUTINHO-NETTO, J; STAIBANO, L; PINTO, LZ; MUCCILLO, G; OLIVEIRA, JS. Peripheral and coronary sinus catecholamine levels in patients with severe congestive heart failure due to Chagas' disease. *Cardiology*. Vol. 86(3). p.202-6. 1995

BESTETTI, RB; ROSSI, MA. A rationale approach for mortality risk stratification in Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. vol.58(3). p. 199–209. 1997

BESTETTI, RB; DALBO, CM; ARRUDA, CA; CORREIA FILHO, D; FREITAS, OC. Predictors of sudden cardiac death for patients with Chagas' disease: a hospital-derived cohort study. *Cardiology*. vol. 87(6). p. 481-7. 1996

BESTETTI, RB; MUCCILLO, G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. vol.60. p. 187–93. 1997

BOGUN, F; CHAN, K; HARVEY, M; GOYAL, R; CASTELLANI, M; NIEBAUER, M; DAOUD, E; MAN, KC; STRCKBERGER, SA; MORADY, F. QT dispersion in nonsustained ventricular tachycardia and coronary artery disease. *Am J Cardiol*. vol. 77. p. 256–259. 1996

BORGES-PEREIRA, J; SALLES, S X; PIRMEZ, C; Rodrigues Coura, J. Doença de Chagas em Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. IV. Aspectos clínicos e epidemiológicos do aneurisma ventricular esquerdo. *Rev Soc Bras Med Trop*. vol. 31(5). p. 457-63. 1998

BOSCH, R. F.; GASPO, R.; BUSCH, A. E.; LANG, H. J.; LI, G. R. ; NATTEL, S. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current on repolarisation in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*. vol. 38. p. 441—450. 1998

BROUWER, J; VAN DEN BERG, M. P.; GROBBEE, D.E; HAAKSMA, J; WILDE, A.A. Diagnostic performance of various QTc interval formulas in a large family with long QT syndrome type 3: Bazett's formula not so bad after all. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. vol. 8(4). p. 269-74. 2003

BUJA, G; MIORELLI, M; TURRINI, P; NAVA, A. A comparison of QT dispersion in hypertrophic cardiomyopathy between patients with and without ventricular arrhythmias and sudden death. *Am J Cardiol*. vol. 72. p. 973—976. 1993

BRYANT, S. M.; WAN, X.; SHIPSEY, S. J.; HART, G. Regional differences in the delayed rectifier current (IKr and IKs) contributes to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea pig. *Cardiovascular Research*. vol. 40. p. 322—331. 1998

CAROD-ARTAL, FJ; VARGAS, AP; HORAN, TA; NUNES LG. Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas disease. *Stroke*. vol. 36. p. 965—70. 2005

CASIS, O; IRIARTE, M; GALLEGO, M; SANCHEZ-CHAPULA. J.A. Differences in regional distribution of K<sup>+</sup> current densities in rat ventricle. *Life Sci*. vol. 63(5). p. 391-400. 1998

CARDOSO, C.R; SALLES, G.F.; DECCACHE, W. Prognostic value of QT interval parameters in type 2 diAcetes mellitus: results of a long-term follow-up prospective study. *J Diabetes Complications*.vol. 17(4). p. 169-78. 2003

CARRASCO, H.A.; PARADA, H; GUERRERO, L; DUQUE, M; DURAN, D; MOLINA, C. Prognostic implications of clinical, electrocardiographic and hemodynamic findings in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol*. vol. 43. p. 27-38. 1994

CELIK, T; IYISOY, A; KURSAKLIOGLU, H; TURHAN, H. QT dispersion: Electrophysiological holy grail or the greatest fallacy in the surface ECG? *Int J Cardiol*. Aug 3. 2006 [Epub ahead of print]



CHAGAS, C. *Tripanosoma minasense*. Nota preliminar. *Braz Med.* vol. 22. p. 471. 1908

CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*) (Nota prévia). *Bras Med.* vol. 23. p. 161. 1909

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi*. sp. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* vol. 1. p. 159 – 218. 1909

CHAGAS, C. Aspecto clínico geral da nova entidade mórbida produzida pelo *Schyzotrypanum cruzi*. *Braz Med.* vol. 24. p. 263– 5. 1910

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. *Braz Med.* vol. 24. p. 423– 8. 1910

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* vol. 3. p. 219– 75. 1911

CHALIL, S; YOUSEF, Z.R.; MUYHALDEEN, S.A.; SMITH, R.E.; JORDAN, P; GIBBS, C.R.; LEYVA, F. Pacing-induced increase in QT dispersion predicts sudden cardiac death following cardiac resynchronization therapy. *J Am Coll Cardiol.* vol. 47(12). p. 2486-92. 2006

CHIALE, P.A.; FERRARI, I; MAHLER, E; VALLAZZA, M.A.; ELIZARI, M.V.; ROSENBAUM, M.B.; LEVIN, M.J. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation.* vol. 103(13). p.1765-71. 2001

CHRIST, T; WETTWER, E; DOBREV, D; ADOLPH, E; KNAUT, M; WALLUKAT, G; RAVENS, U. Autoantibodies against the beta1 adrenoceptor from patients with dilated cardiomyopathy prolong action potential duration and enhance contractility in isolated cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* vol. 33(8). p. 1515-25. 2001

CHRIST, T; ADOLPH, E; SCHINDELHAUER, S; WETTWER, E; DOBREV, D; WALLUKAT, G; RAVENS, U. Effects of immunoglobulin G from patients with dilated cardiomyopathy on rat cardiomyocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* vol. 96(6). p. 445-52. 2005

CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; LOPES, H.F.; ROSETTO, E.A.; RUBIRA, M.C.; BARRETO-FILHO, J.A.; BARUZZI, A.C.; ROCHA, N.N.; MADY, C; IRIGOYEN, M.C.; KRIEGER, E.M. Endothelial function is preserved in Chagas' heart disease patients without heart failure. *Endothelium*. vol. 11(5-6). p. 241-6. 2004

CORBUCCI, H.A.; HABER, D.M.; BESTETTI, R.B.; CORDEIRO, J.A.; FIORONI, M.L. QT interval dispersion in patients with chronic heart failure secondary to Chagas' cardiomyopathy: correlation with clinical variables of prognostic significance. *Cardiovasc Pathol*. vol. 1. p. 18-23. 2006

CORDEIRO, J. M.; SPITZER, K. W.; GILES, W. R. Repolarising K currents in rabbit heart Purkinje cells. *Journal of Physiology*. vol. 508. p. 811-823. 1998

COSSIO, P. M.; C. DIEZ, A.; SZARFMAN, E.; KREUTZER, B.; CANDIOLO V; ARANA, M. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*. vol. 49. p. 13–21. 1974

COSTA, P.C.; FORTES, F.S.; MACHADO, A.B.; ALMEIDA, N.A.; OLIVARES, E.L.; CABRAL, P.R.; PEDROSA, R.C.; GOLDENBERG, R.C.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; MASUDA, M.O. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. *Braz J Med Biol Res*. vol. 33(4). p. 439-46. 2000

CUNHA-NETO, E.; M. DURANTI, A; GRUBER, B.; ZINGALES, I.; DE MESSIAS, N.; STOLF, G.; BELLOTTI, F.; PILLEGGI, M.E.; PATARROYO, J.; KALIL. Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol. 92. p. 3541–3545. 1995

CUNHA-NETO E, COELHO V, GUILHERME L, FIORELLI A, STOLF N, KALIL J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest*. 1996 Oct 15;98(8):1709-12.

DAVIDOWSKI, T.A.; WOLF, S.. The QT interval during reflex cardiovascular adaptation. *Circulation*. vol. 69(1). p. 22-5. 1984

DAY, C.P.; MCCOMB, J.M.; CAMPBELL, R.W. QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. *Br Heart J*. vol. 63(6). p. 342-4. 1990

DE MEIRELLES MDE N, BONECINI-ALMEIDA MDA G, PESSOA MH, GALVAO-CASTRO B. Trypanosoma cruzi: experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. II. Ultrastructural and cytochemical studies of peroxidase and acid phosphatase activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Apr-Jun;85(2):173-81.

DEL CORSO, C; CAMPOS DE CARVALHO, A.C.; MARTINO, H.F.; VARANDA, W.A. Sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy decrease L-type calcium Currents in cardiomyocytes isolated from rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. vol. 287(5). p. H1928–36. 2004

DIAS, E; LARANJA, F.S.; MIRANDA, A; NOBREGA, G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. vol. 14(6). p. 1035-60. 1956

DILLY, K.W.; KUROKAWA, J; TERRENOIRE, C; REIKEN, S; LEDERER, W.J.; MARKS, A.R.; KASS, R.S. Overexpression of beta2-adrenergic receptors cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and modulates slow delayed rectifier potassium channels expressed in murine heart: evidence for receptor/channel co-localization. *J Biol Chem*. vol. 279 (39). p. 40778-87. 2004

DORFFEL, W.V.; WALLUKAT, G; DORFFEL, Y; FELIX, S.B.; BAUMANN, G. Immunoabsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J Cardiol*. vol. 97(3). p. 529–34. 2004

DROUIN, E ; CHARPENTIER, F; GAUTHIER, C ; LAURENT, K ; LE MAREC, H. Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. *J Am Coll Cardiol*. vol. 1. p. 185-92. 1995

EINTHOVEN, W. Un nouveau galvanometer. *Arch Neer Sc Nat*. vol. 6. p. 625. 1901

ELIAS, F.E.; VIGLIANO, C.A.; LAGUENS, R.P.; LEVIN, M.J.; BEREK, C. Analysis of the presence of Trypanosoma cruzi in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg*. vol. 68(2). p. 242-7. 2003

ELIES, R.; FERRARI, I.; WALLUKAT, G.; LEBESGUE, D.; CHIALE, P.; ELIZARI, M.; ROSENBAUM, M.; HOEBEKE, J.; LEVIN, M. J. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J. Immunol*. vol. 157. p. 4203–4211. 1996

ELIZARI, M.V. Arrhythmias associated with Chagas' heart disease. *Card Electrophysiol Rev.* vol. 6. p. 115–9. 2002

ELIZARI, M.V.; CHIALE, P. Arritmias Cardíacas, Fundamentos celulares y moleculares, diagnóstico y tratamiento. 2º Edición. Cap. 41. pp 497-807. 2003

ESCOBAR, A.L.; FERNANDEZ-GOMEZ, R; PETER, J.C.; MOBINI, R; HOEBEKE, J; MIJARES, A. IgGs and Mabs against the beta2-adrenoreceptor block A-V conduction in mouse hearts: A possible role in the pathogenesis of ventricular arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol.* vol. 40(6). p. 829-37. 2006

DE OLIVEIRA, PEDROSA, R.C.; NASCIMENTO, J.H.M.; CAMPOS DE CARVALHO, A.C.; MASUDA M.O. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. *Circulation.* vol. 96. p. 2031–2037. 1997

FELIX, S.B.; STAUDT, A; LANDSBERGER, M; GROSSE, Y; STANGL, V; SPIELHAGEN, T; WALLUKAT, G; WERNECKE, K.D.; BAUMANN, G; STANGL, K. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol.* vol. 39(4). p. 646–52. 2002

FERRARI, I; LEVIN, M.J.; WALLUKAT, G; ELIES, R; LEBESGUE, D; CHIALE, P; ELIZARI, M.V.; ROSENBAUM, M; HOEBEKE, J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J Exp Med.* vol. 182(1). p. 59-65. 1995

FREEMAN, L.C.; KASS, R.S. Cholinergic inhibition of slow delayed-rectifier K<sup>+</sup> current in guinea pig sino-atrial node is not mediated by muscarinic receptors. *Mol Pharmacol.* vol. 47(6):1248-54. 1995

FREITAS, J.M.; LAGES-SILVA, E; CREMA, E; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol.* vol.35(4). p. 411-7. 2005

FU, L.X.; MAGNUSSON, Y; BERGH, C.H.; LILJEQVIST, J.A.; WAAGSTEIN, F; HJALMARSON, A; HOEBEKE, J. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* vol. 91. p. 1964–1968. 1993

FU, M.L.; SCHULZE, W; WALLUKAT, G; HJALMARSON, A; HOEBEKE, J. A synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human M2 acetylcholine receptor induces pharmacological and morphological changes in cardiomyocytes by active immunization after 6 months in rabbits. *Clin Immunol Immunopathol.* vol. 78(2). p. 203-7. 1996. Erratum in: *Clin Immunol Immunopathol* vol. 80(1). p. 101. 1996

FUKUDA, Y; MIYOSHI, S; TANIMOTO, K; OOTA, K; FUJIKURA, K; IWATA, M; BABA, A; HAGIWARA, Y; YOSHIKAWA, T; MITAMURA, H; OGAWA, S. Autoimmunity against the second extracellular loop of  $\beta$ 1-adrenergic receptors induces early afterdepolarization and decreases in K-channel density in rabbits. *J Am Coll Cardiol.* vol. 43. p. 1090–100. 2004

GALLEGO, M; SETIEN, R; PUEBLA, L; BOYANO-ADANEZ, C; ARILLA, E; CASIS, O.  $\alpha$ 1-Adrenoceptors stimulate a Galphas protein and reduce the transient outward K<sup>+</sup> current via a cAMP/PKA-mediated pathway in the rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 288(3). p. C577-85. 2005

GALLO, L.JR, MORELO FILHO, J, MACIEL, B.C.; MARIN NETO; MARTINS LIMA, FILHO. Functional evaluation of sympathetic and parasympathetic system in Chagas disease using dynamic exercise. *Cardiovascular Research.* vol. 21. p. 922–927. 1987

GARCIA, S; RAMOS, C.O; SENRA, J.F; VILAS-BOAS, F; RODRIGUES, M.M; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R; SOARES, M.B. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 49(4). p. 1521-8. 2005

GINTANT, G.A. Regional differences in IK density in canine left ventricle: role of IK<sub>s</sub> in electrical heterogeneity. *Am J Physiol.* vol. 268. p. H604–H613. 1995

GIMENEZ, L.E; HERNANDEZ, C.C.; MATTOS, E.C.; BRANDAO, I.T.; OLIVIERI, B; CAMPELO, R.P.; ARAUJO-JORGE, T; SILVA, C.L.; CAMPOS DE CARVALHO, A.C.; KURTENBACH, E. DNA immunizations with M2 muscarinic and beta1 adrenergic receptor coding plasmids impair cardiac function in mice. *J Mol Cell Cardiol.* vol. 38(5). p. 703-14. 2005

GOIN, J.C.; BORDA, E; LEIROS, C.P.; STORINO, R; STERIN-BORDA, L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. *J Auton Nerv Syst.* vol. 47. p. 45–52. 1994

GRELL EDE S, DE PAULA RS, TOBIAS NM, MOFFA PJ, GRUPI CJ, MANSUR AJ. Time domain analysis of the signal averaged electrocardiogram to detect late potentials in heart failure patients with different etiologies. *Arq Bras Cardiol.* Vol. 87(3). p. 241-7. 2006

GRANZOTTI, J.A.; MARIN NETO, J.A.; GALLO, J.R.L.; MANÇO, J.C.; RASSI, A; AMORIM, D.S. Contribuição ao estudo do "aneurisma" da ponta na cardiopatia chagásica crônica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* vol. 27. p. 477-484. 1974

GUPTA, M; THALER, H.T.; STEINHERZ, L. Presence of prolonged dispersion of QT intervals in late survivors of childhood anthracycline therapy. *Pediatr Hematol Oncols.* vol. 8. p. 533-42. 2002

HAGAR, J.M.; RAHIMTOOLA, S.H. Chaga's heart diseases in the United States. *N Engl J M.* vol. 325. p. 763-769. 1991

HAMILL, O.P.; SAKMANN, B. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature.* vol. 294(5840). p. 462-4. 1981

HAMILL, O.P.; MARTY, A; NEHER, E; SAKMANN, B; SIGWORTH, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* vol. 391(2). p. 85-100. 1981

HAN, W; BARR, S.C.; PACIORETTY, L.M.; GILMOUR, R.F. JR. Restoration of the transient outward potassium current by noradrenaline in chagasic canine epicardium. *J Physiol.* vol. 500( Pt 1). p. 75-83. 1997

HASSAN, G.S.; MUKHERJEE, S; NAGAJYOTHI, F; WEISS, L.M.; PETKOVA, S.B.; DE ALMEIDA, C.J.; HUANG, H; DESRUISSEAU, M.S.; BOUZAHZAH, B; PESTELL, R.G.; ALBANESE, C; CHRIST, G.J.; LISANTI, M.P.; TANOWITZ, H.B. Trypanosoma cruzi infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells. *Infect Immun.* vol. 74(1). p. 152-9. 2006

HENRIQUES-PONS, A; OLIVIERI, B.P.; OLIVEIRA, G.M.; DAERON, M; DE ARAUJO-JORGE, T.C. Experimental infection with Trypanosoma cruzi increases the population of CD8(+), but not CD4(+), immunoglobulin G Fc receptor-positive T lymphocytes. *Infect Immun.* vol. 73(8). p. 5048-52. 2005

- HERNANDEZ, C.C.; BARCELLOS, L.C.; GIMENEZ, L.E.; CACARCAS, R.A.; GARCIA, S.; PEDROSA, R.C.; NASCIMENTO, J.H.; KURTENBACH, E, MASUDA MO, CAMPOS DE CARVALHO AC. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca<sup>2+</sup> currents. *Cardiovascular Research*. vol. 58 (1). p. 55-65. 2003
- HILLE, B. Ionic channel of excitable membranes. Sinauer ed. Text book. 1984
- HOFT, D.F.; SCHNAPP, A.R.; EICKHOFF, C.S.; ROODMAN, S.T. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. vol. 68(1). p. 197-204. 2000
- HORVATH, B; MAGYAR, J; SZENTANDRASSY, N; BIRINYI, P; NANASI, P.P.; BANYASZ, T. Contribution of I (Ks) to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflugers Arch*. vol. 452(6). p. 698-706. 2006
- IOSA, D; DEQUATTRO, V; LEE, DD; ELKAYAM, U; PALMERO, H. Plasma norepinephrine in Chagas' cardioneuromyopathy: a marker of progressive dysautonomia. *Am Heart J*. vol. 117(4). p. 882-7. 1989
- IWATA, M; YOSHIKAWA, T; BABA, A; ANZAI, T; NAKAMURA, I; WAINAI, Y; TAKAHASHI, T; OGAWA, S. Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces beta-adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res*. vol. 88(6). p. 578-86. 2001
- JAHNS, R; BOIVIN, V; HEIN, L; TRIEBEL, S; ANGERMANN, C.E.; ERTL, G; LOHSE, M.J. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. vol. 113(10). p. 1419-29. 2004
- JAIN, H; AVASTHI, R. Correlation between dispersion of repolarization (QT dispersion) and ventricular ectopic beat frequency in patients with acute myocardial infarction: a marker for risk of arrhythmogenesis? *Int J Cardiol*. vol. 93(1). p. 69-73. 2004
- JOSEPHSON, I.R.; SANCHEZ-CHAPULA, J; BROWN, A.M. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res*. vol. 54(2). p. 157-62. 1984
- JOST, N; VIRAG, L; BITAY, M; TAKACS, J; LENGYEL, C; BILICZKI, P; NAGY, Z; BOGATS, G; LATHROP, D.A.; PAPP, J.G.; VARRO, A. Restricting excessive cardiac

action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation*. vol. 112(10). p. 1392-9. 2005

KAPLAN, D; FERRARI, I BERGAMI, P.L.; MAHLER, E; LEVITUS, G; CHIALE, P; HOEBEKE, J; VAN REGENMORTEL, M.H.; LEVIN, M.J. 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*. vol. 94(19). p. 10301-6. 1997

KAUTZNER, J; YI, G; CAMM, A.J.; MALIK, M. Short- and long-term reproducibility of QT, QTc, and QT dispersion measurement in healthy subjects. *Pacing Clin Electrophysiol*. vol. 5. p. 928-37. 1994

KIRCHOFF, L.V. "American Trypanosomiasis (chagas disease)--a tropical disease now in the United States." *N Engl J Med*. vol. 329(9). p. 639-44. 1993

KOUMI, S; WASSERSTROM, J.A. Acetylcholine-sensitive muscarinic K<sup>+</sup> channels in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol*. vol. 266(5 Pt 2). p. H1812-21. 1994

KOUMI, S; SATO, R; HAYAKAWA, H. Characterization of the acetylcholine-sensitive muscarinic K<sup>+</sup> channel in isolated feline atrial and ventricular myocytes. *J Membr Biol*. vol. 145(2). p. 143-50. 1995

KOUMI, S; SATO, R; NAGASAWA, K; HAYAKAWA, H. Activation of inwardly rectifying potassium channels by muscarinic receptor-linked G protein in isolated human ventricular myocytes. *J Membr Biol*. vol. 157(1). p. 71-81. 1997

LEMOS, E.M.; REIS, D; ADAD, S.J.; SILVA, G.C.; CREMA, E; CORREA-OLIVEIRA, R. Decreased CD4(+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal chagas disease. *Clin Immunol Immunopathol*. vol. 88(2). p. 150-5. 1998

LEPESCHKIN, E.S. The measurement of the QT interval of the electrocardiogram. *Circulation*. vol. VI. p. 378, 1952.

LEVY AM, BOAINAIN E, KLOETZEL JK. In situ indirect fluorescent antibody: a new specific test to detect ongoing chagasic infections. *J Clin Lab Anal*. 1996;10(2):98-103.



LEVIN, M.J.; MESRI, E; BENAROUS, R; LEVITUS, G; SCHIJMAN, A; LEVY-YEYATI, P; CHIALE, P.A.; RUIZ, A.M.; KAHN, A; ROSENBAUM, M.B.; et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* vol. 41(5). p. 530-8. 1989

LEVITUS, G; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M; VAN REGENMORTEL, M.H.; LEVIN, M.J. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol.* vol. 85(3). p. 413-7. 1991

LEWINSOHN, R.; CHAGAS, C: the discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med.* vol. 73. p. 513– 23. 1979

LI; G.R.; FENG, J; YUE, L; CARRIER, M; NATTEL, S. Evidence for two components of delayed rectifier K1 current in human ventricular myocytes. *Circ Res.* vol. 78. p. 689–696. 1996

LITOVSKY, S.H.; ANTZELEVITCH, C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res.* vol. 62(1). p. 116-26. 1988

LITOVSKY, S.H.; ANTZELEVITCH, C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular subendocardium and subepicardium to acetylcholine and isoproterenol. A direct effect of acetylcholine in ventricular myocardium. *Circ Res.* vol. 67. p. 615–27. 1990

LIU, H.R.; ZHAO, R.R.; ZHI, J.M.; WU, B.W.; FU, M.L. Screening of serum autoantibodies to cardiac beta1-adrenoceptors and M2-muscarinic acetylcholine receptors in 408 healthy subjects of varying ages. *Autoimmunity.* vol. 29(1). p. 43-51. 1999

LIU, D.W.; ANTZELEVITCH, C. Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. *Circ Res.* vol. 76. p. 351–365. 1995

LIU, D.W.; ANTZELEVITCH, C. Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes: a weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res.* vol. 76. p. 351–365. 1995

LOPEZ BERGAMI, P; CABEZA MECKERT, P; KAPLAN, D; LEVITUS, G; ELIAS, F; QUINTANA, F; VAN REGENMORTEL, M; LAGUENS, R; LEVIN, M.J. Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2beta protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* vol. 1. p. 75-85. 1997

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

LU, H.R.; VLAMINCKX, E; VAN DE WATER, A; ROHRBACHER, J; HERMANS, A; GALLACHER, D.J. In-vitro experimental models for the risk assessment of antibiotic-induced QTprolongation. *Eur J Pharmacol.* Sep 23; [Epub ahead of print] 2006

MACEDO, V. Indeterminate form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* vol.94. p. 311-316. 1999

MACHADO, C.R.; CAMARGOS, E.R.; GUERRA, L.B.; MOREIRA, M.C. Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. *Hum Pathol.* vol. 31(1). p. 3-10.2000

MACIEL, R. Willem Einthoven de um começo árduo ao prêmio Nobel. *Publicações da Sociedade Brasileira de Cardiologia*, 2007.

MAGNUSSON, Y; MARULLO, S; HOYER, S; WAAGSTEIN, F; ANDERSSON, B; VAHLNE, A; GUILLET, J.G.; STROSBERG, A.D.; HJALMARSON, A; HOEBEKE, J. Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* vol. 86. p. 1658–1663. 1990

MAGNUSSON, Y; WALLUKAT, G; WAAGSTEIN, F; HJALMARSON, A; HOEBEKE, J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy: characterization of antibodies against the  $\beta_1$ -adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation.* vol. 89. p. 2760-2767. 1994

MAGUIRE, J.H.; MOTT, K.E.; SOUZA, J.A.A.; ALMEIDA, E.C.; RAMOS, N.B.; GUIMARAES, A.C. Electrocardiographic classification and Ac abbreviated lead system for population-based studies of Chagas disease. *Bull Pan Am health Org.* vol. 16. p. 47-58. 1982

MALFATTO, G; ZAZA, A; VANOLI, E; SCHWARTZ, P.J. Muscarinic effects on action potential duration and its rate dependence in canine Purkinje fibers. *Pacing Clin Electrophysiol.* vol. 11. p. 2023-6. 1996

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

MARCET, P.L.; DUFFY, T; CARDINAL, M.V.; BURGOS, J.M.; LAURICELLA, M.A.; LEVIN, M.J.; KITRON, U; GURTLER, R.E.; SCHIJMAN, A.G. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology.* vol. 132(Pt 1). p. 57-65. 2006

MARCON, G.E.; ANDRADE, P.D.; DE ALBUQUERQUE, D.M.; WANDERLEY, J.D.A.; DE ALMEIDA, E.A.; GUARIENTO, M.E.; COSTA, S.C. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* vol. 43(1). p. 39-43. 2002

MASUDA, M.O.; LEVIN, M; DE OLIVEIRA, S.F.; DOS SANTOS, C.P.C.; BERGAMI, P.L.; DOS SANTOS ALMEIDA, N.A.; PEDROSA, R.C.; FERRARI, I; HOEBEKE, J; CAMPOS DE CARVALHO, A.C. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J.* vol. 14. p. 1551-8. 1998

MATSUI, S; FU, L.X.M.; KATSUDA, S; HAYASE, M; YAMAGUCHI, N; TERAOKA, K; KURIHARA, T; TAKEKOSHI, N; MURAKAMI, E; HOEBEKE, J; HJALMARSON, A. Peptides derived from cardiovascular G-protein coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol.* vol. 29. p. 641-55. 1997

MATSUI, S; FU, M; HAYASE, M; KATSUDA, S; YAMAGUCHI, N; TERAOKA, K; KURIHARA, T; MURANO, H; TAKEKOSHI, N. Transfer of immune components from rabbit autoimmune cardiomyopathy into severe combined immunodeficiency (SCID) mice induces cardiomyopathic changes. *Autoimmunity.* vol. 39(2). p. 121-8. 2006

MATSUI, S; FU, M; HAYASE, M; KATSUDA, S; YAMAGUCHI, N; TERAOKA, K; KURIHARA, T; TAKEKOSHI, N. Transfer of rabbit autoimmune cardiomyopathy into severe combined immunodeficiency mice. *J Cardiovasc Pharmacols.* vol. 42 Suppl 1. p. S99-103. 2003

MENDOZA, I; MOLEIRO, F; MARQUES, J. Morte súbita na doença de Chagas. *Arq BrasCardiol.* vol. 59. p. 3-4. 1992

MESRI, E.A.; LEVITUS, G; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M; DIGHIRO, G; VAN REGENMORTEL, M.H.; LEVIN, M.J. Major Trypanosoma cruzi antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J Clin Microbiol.* vol. 6. p. 1219-24. 1990

MIJARES, A; VERDOT, L; PEINEAU, N; VRAY, B; HOEBEKE, J; ARGIBAY, J. Antibodies from Trypanosoma cruzi infected mice recognize the second extracellular loop of the beta 1-adrenergic and M2-muscarinic receptors and regulate calcium channels in isolated cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* vol. 163-164. p. 107-12. 1996

MILEI, J; MAUTNER, B; STORINO, R; SANCHEZ, J.A.; FERRANS, V.J. Does Chagas' disease exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United States? *Am Heart J.* vol. 123(6). p. 1732-5. 1992

MINOPRIO P, EL CHEIKH MC, MURPHY E, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, COFFMAN R, COUTINHO A, O'GARRA A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol.* 15;151(8):4200-8. 1993

MIRVIS DM. Spatial variation of QT interval in normal persons and patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*;5:625-631. 1985

MOBINI, R; STAUDT, A; FELIX, S.B.; BAUMANN, G; WALLUKAT, G; DEINUM, J; SVENSSON, H; HJALMARSON, A; FU, M. Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta(1)-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun.* vol. 20. p. 345-50. 2003

MOBINI, R; MAGNUSSON, Y; WALLUKAT, G; VIGUIER, M; HJALMARSON, A; HOEBEKE, J. Probing the immunological properties of the extracellular domains of the human beta(1)-adrenoceptor. *J Autoimmun.* vol. 2. p. 179-86. 1999

MONCAYO A, LUQUETTI AO. Multicentre double blind study for evaluation of Trypanosoma cruzi defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990 Oct-Dec;85(4):489-95.

MORTARA RA, DA SILVA S, PATRICIO FR, HIGUCHI ML, LOPES ER, GABBAI AA, CARNEVALE P, ROCHA A, FERREIRA MS, SOUZA MM, DE FRANCO MF, TURCATO G JR, FERRAZ NETO BH. Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* 1999 Oct;85(10):800-8.

MUBAGWA, K; CARMELIET, E. Effects of acetylcholine on electrophysiological properties of rabbit cardiac Purkinje fibers. *Circ Res.* vol. 53(6). p. 740-51. 1983

MUKHERJEE, S; HUANG, H; PETKOVA, S.B.; ALBANESE, C; PESTELL, R.G.; BRAUNSTEIN, V.L.; CHRIST, G.J.; WITTNER, M; LISANTI, M.P.; BERMAN, J.W.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B. *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Infect Immun.* vol. 72(9). p. 5274-82. 2004

MULLER, J; WALLUKAT, G; DANDEL, M; BIEDA, H; BRANDES, K; SPIEGELSBERGER, S; NISSEN, E; KUNZE, R; HETZER, R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* vol. 101. p. 385-91. 2000

MYERBURG RJ. Sudden cardiac death Em: Zipes-Jalife Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside 4 th ed. Saunders, pp 720, 2004.

NASCIMENTO, J.H.; SALLE, L; HOEBEKE, J; ARGIBAY, J; PEINEAU, N. cGMP-mediated inhibition of cardiac L-type Ca(2+) current by a monoclonal antibody against the M(2) ACh receptor. *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 281(4). p. C1251-8. 2001

NEU, N; BEISEL, K. W.; TRAYTSMAN, M. D.; ROSE, N. R.; CRAIG, S. W. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J. Immunol.* vol. 139. p. 3630-3636. 1987

NEU, N; BEISEL, K. W.; TRAYTSMAN, M. D.; ROSE, N. R.; CRAIG, S. W. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J. Immunol.* vol. 138. p. 2488-2492. 1987

NEUMANN, D.A.; BUREK, C.L.; BAUGHMAN, K.L.; ROSE, N.R.; HERSKOWITZ, A. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* vol. 6. p. 839-46. 1990

OLIVEIRA, J.S. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. *Am Heart J.* vol. 110(5). p. 1092-8. 1985

PACIORETTY, L.M.; BARR, S.C.; HAN, W.P.; GILMOUR, R.F. JR. Reduction of the transient outward potassium current in a canine model of Chagas' disease. *Am J Physiol.* vol. 268(3 Pt 2). p. H1258-64. 1995

PODLOWSKI, S; LUTHER, H.P.; MORWINSKI, R; MULLER, J; WALLUKAT, G. Agonistic anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies from cardiomyopathy patients reduce the beta1-adrenergic receptor expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation.* vol. 98(22). p. 2470-6. 1998

PATEL, S.P.; CAMPBELL, D.L. Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol.* vol. 569(Pt 1). p. 7-39. 2005

PATHAK, A ; VERWAERDE, P ; GALINIER, M ; PELAT, M ; COUDERC, P.P. ; ROUET, P ; SMIH, F; BUYS, S ; MONTASTRUC, J.L. ; SENARD, J.M. Study of ventricular repolarization in an experimental model of arterial hypertension associated with obesity. *Arch Mal Coeur Vaiss.* vol. 95. p. 651-5. 2002

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* vol. 1. p. 92-100. 2001

RASSI, A. JR ; RASSI, S.G. ; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* vol. 76(1). p. 75-96. 2001

REIS LOPES; E. Estudio comparativo dos ganglios subepicárdicos nas cardiopatias chagásica crônica reumática e hipertensiva. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* vol. 12. p. 365. 1970

REIS, E. L. Sudden death in patients with Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* vol. 94. p. 321-3. 1999

REIS, D.D; JONES, E.M.; TOSTES, S. JR; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G; COLLEY, D.G.; MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* vol. 48(5). p. 637-44. 1993

Reunião de Pesquisa Aplicada da Doença de Chagas. Validade do conceito da forma indeterminada de doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. vol. 18. p. 46. 1985

RIBEIRO, L.P.; TOSTES, T.V.; TORRES, R.M. Teste ergométrico em chagásicos sem cardiopatia aparente. *Arq Bras Cardiol*. vol. 5. p. 96. 1995

RIZZO; L.V.; CUNHA-NETO, E; TEIXEIRA, A.R. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. vol. 57(9). p. 2640-4. 1989

ROSENBAUM MB. Chagasic myocardopathy. *Prog Cardiovasc Dis*. vol. 7. p. 199-225. 1964

ROSENHTRAUKH L, D.P. JR; ANYUKHOVSKY, E.P.; STEINBERG, S.F.; RYBIN, V; BRITAIN-VALENTI, K; MOLINA-VIAMONTE, V; ROSEN, M.R. Mechanisms for vagal modulation of ventricular repolarization and of coronary occlusion-induced lethal arrhythmias in cats. *Circ Res*. vol. 75(4). p. 722-32. 1994

ROSSI, M.A.; RAMOS, S.G. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. *Am Heart J* vol. 132. p. 207-210. 1996

SALLES, G; XAVIER, S; SOUSA, A; HASSLOCHER-MORENO, A; CARDOSO, C. Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-up study. *Circulation*. vol. 108(3). p. 305-12. 2003

SALLES, G.F.; CARDOSO, C.R.; XAVIER, S.S.; SOUSA, A; HASSLOCHER-MORENO, A. Electrocardiographic ventricular repolarization parameters in chronic Chagas' disease as predictors of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. *Pacing Clin Electrophysiol*. vol. 26(6). p. 1326-35. 2003

SAMUEL, J; OLIVEIRA, M; CORREA DE ARAUJO; NAVARRO, M.A.; MUCCILLO, G. L. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Am J Cardio*. vol. 52. p. 147-51. 1983

SANGUINETTI, M.C.; JURKIEWICZ, N.K. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol.* vol. 96(1). p. 195-215. 1990

SANGUINETTI, M.C.; JURKIEWICZ, N.K.; SCOTT, A; SIEGL, P.K. Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action. *Circ Res.* vol. 68(1). p. 77-84. 1991

SANGUINETTI, M.C.; CURRAN, M.E.; ZOU, A; SHEN, J; SPECTOR, P.S.; KEATING M.T. Coassembly of KvLQT1 and minK(ISK) proteins to form cardiac IKs potassium channel. *Nature.* vol. 384. p. 80–83. 1996

SANGUINETTI, M. C.; KEATING, M. T. Role of delayed rectifier potassium channels in cardiac repolarisation and arrhythmias. *News in Physiological Sciences.* vol. 12. p. 152-158. 1997

SCHIJMAN, A.G.; VIGLIANO, C.A.; VIOTTI, R.J.; BURGOS, J.M.; BRANDARIZ, S; LOCOCO, B.E.; LEZE, M.I.; ARMENTI, H.A.; LEVIN, M.J. Trypanosoma cruzi DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* vol. 70(2). p. 210-20. 2004

SCHREIECK, J.; WANG, Y; GJINI, V; KORTH, M; ZRENNER, B; SCHMITT, C. Differential effect of beta adrenergic stimulation on the frequency dependent electrophysiologic actions of the new class III antiarrhythmics dofetilide, ambasilide, and chromanol 293B. *J.of Cardio. Electro.* vol. 8. p. 1420-1430. 1997

SHIMIZU, W; ANTZELEVITCH, C. Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long-QT syndrome: effects of beta-adrenergic agonists and antagonists and sodium channel blockers on transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes. *Circulation.* vol. 98(21). p. 2314-22. 1998

SHULMAN, I.A.; APPLEMAN, M.D.; SAXENA, S; HITI, A.L.; KIRCHHOFF, L.V.; LEIBY, D.A.; RENTAS, F.J.; NELSON, K.E.; STAMBOLIS, V.A.; NESS, P.M.; PARNIS, C; MCALLISTER, H.A.; YAWN, D.H.; STUMPF, R.J.; KIRCHHOFF, L.V. Evidence of Trypanosoma cruzi infection (Chagas' disease) among patients undergoing cardiac surgery. *Circulation.* vol. 102(24). p. 2978-82. 2000



SHULMAN, I.A.; APPLEMAN, M.D.; SAXENA, S; HITI, A.L.; KIRCHHOFF, L.V. Specific antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, California. *Transfusion*. vol. 37(7). p. 727-31. 1997

SICOURI, S; ANTZELEVITCH, C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res*. vol. 68(6). p. 1729-41. 1991

SICOURI, S; FISH, J; ANTZELEVITCH, C. Distribution of M cells in the canine ventricle. *J Cardiovasc Electrophysiol*. vol. 10. p. 824-37. 1994

SICOURI, S; QUIST, M; ANTZELEVITCH, C. Evidence for the presence of M cells in the guinea pig ventricle. *J Cardiovasc Electrophysiol*. vol. (6). p. 503-11. 1996

STANKOVICOVA, T; SZILARD M DE SCHEERDER, I; SIPIDO, K.R. M cells and transmural heterogeneity of action potential configuration in myocytes from the left ventricular wall of the pig heart. *Cardiovascular Research*. vol. 45(4). p. 952-60. 2000

STENGL, M; VOLDERS, P.G.; THOMSEN, M.B.; SPATJENS, R.L. SIPIDO, K.R.; VOS, M.A. Accumulation of slowly activating delayed rectifier potassium current (IKs) in canine ventricular myocytes. *J Physiol*. vol. 551(Pt 3). p. 777-86. 2003

STENGL, M; RAMAKERS, C; DONKER, D.W.; NABAR, A; RYBIN, A.V.; SPATJENS, R.L.; VAN DER NAGEL, T; WODZIG, W.K.; SIPIDO, K.R.; ANTOONS, G. MOORMAN, A.F.; VOS, M.A.; VOLDERS, P.G. Temporal patterns of electrical remodeling in canine ventricular hypertrophy: focus on IKs downregulation and blunted beta-adrenergic activation. *Cardiovascular Research*. vol. 72(1). p. 90-100. 2006

STERIN-BORDA, L; COSSIO, P.M.; GIMENO, M.F.; GIMENO, A.L.; DIEZ, C; LAGUENS, R.P.; MECKERT, P.C.; ARANA, R.M. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects. *Cardiovascular research*. vol. 6. p. 613-22. 1976

STERNICK, E.B.; MARTINELLI, M; SAMPAIO, R; GERKEN, L.M.; TEIXEIRA, R.A.; SCARPELLI, R; SCANAVACCA, M; NISHIOKA, S.D.; SOSA, E. Sudden cardiac death in patients with chagas heart disease and preserved left ventricular function. *J Cardiovasc Electrophysiol*. vol.1. p. 113-6. 2006. Erratum in: *J Cardiovasc Electrophysiol*. vol. 2. p. 230. 2006

- SUN, J; TARLETON, R.L. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* vol. 48(2). p. 161-9. 1993
- SURAWICZ, B. WILL QT dispersion play a role in clinical decision-making? *J Cardiovasc Electrophysiol.* vol. 8. p. 777-84. 1996
- SWAN, H; SAARINEN, K; KONTULA, K; TOIVONEN, L; VITASALO, M. Evaluation of QT interval duration and dispersion and proposed clinical criteria in diagnosis of long QT syndrome in patients with a genetically uniform type of LQT1. *J Am Coll Cardiol.* vol. 32(2). p. 486-91. 1998
- SYLVEN, J.C; HORACEK, B.M.; SPENCER, C.A.; KLASSEN, G.A.; MONTAGUE, T.J. QT interval variability on the body surface. *J Electrocardiol.* vol. 17. p.179–188. 1984
- TAMARGO, J; CACALLERO, R; GOMEZ, R; VALENZUELA, C; DELPON, E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research.* vol. 62(1). p. 9-33. 2004
- TANEJA, T; LARSEN, J; GOLDBERGER, J; KADISH, A. Age, gender, and autonomic tone effects on surface electrocardiographic indices of ventricular repolarization. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* vol. 4. p. 290-7. 2001
- TANOWITZ, H.B.; KAUL, D.K.; CHEN, B; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol.* vol. 82. p. 124-130. 1996
- TARLETON, R.L.;SUN, J; ZHANG, L; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.* vol. 62(5). p. 1820-9. 1994
- TERRENOIRE, C ; CLANCY, C.E.; CORMIER, J.W.; SAMPSON, K.J.; KASS, R.S. Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circulation Research.* vol. 96(5). p. 25-34. 2005
- TIBBETTS, R.S.; MCCORMICK, T.S.; ROWLAND, E.C.; MILLER, S.D.; ENGMAN, D.M. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Immunol.* vol. 152. p. 1493–1499. 1994

TORRES, F.W.; ACQUATELLA, H; CONDADO, J.A; DINSMORE, R; PALACIOS, I.F. Coronary vascular reactivity is abnormal in patients with Chagas' heart disease. *Am Heart J.* vol. 129(5). p. 995-1001. 1995

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* vol. 3. p. 276-294. 1911

VIOTTI, R; VIGLIANO, C; ARMENTI, H; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J.* vol. 127. p. 151–162. 1994

VIOTTI, R; VIGLIANO, C; LOCOCO, B; BERTOCCHI, G; PETTI, M; ALVAREZ, M.G.; POSTAN, M; ARMENTI, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* vol. 144(10). p. 724-34. 2006

VOLDERS, P.G.; SIPIDO, K.R.; CARMELIET, E; SPATJENS, R.L.; WELLENS, H.J.; VOS, M.A. Repolarizing K<sup>+</sup> currents ITO1 and IKs are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation.* vol. 99(2). p. 206-10. 1999

WALSH, K.B.; BEGENISICH, T.B.; KASS, R.S. Beta-adrenergic modulation of cardiac ion channels. Differential temperature sensitivity of potassium and calcium currents. *J Gen Physiol.* vol. 93(5). p. 841-54. 1989

WALLER, A.D. A demonstration on man of electromotive changes accompanying the heart' beat. *J Physiol.* vol. 8. p. 229. 1887

WANG, W; GUO, G; TANG, J; LI, J; ZHAO, R; HJALMARSON, A; FU, L.X. Stimulatory activity of anti-peptide antibodies against the second extracellular loop of human M2 muscarinic receptors. *Chin Med J (Engl).* vol. 113(10). p. 867-71. 2000

WICKMAN, K; NEMEC, J; GENDLER, S.J.; CLAPHAM, D.E. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron.* vol.1. p. 103-14. 1998

XIAO, Y.F.; MORGAN, J.P. Cocaine blockade of the acetylcholine-activated muscarinic K<sup>+</sup> channel in ferret cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* vol. 284(1). p. 10-8. 1998

YAN, G.X.; ANTZELEVITCH, C. Cellular basis for the electrocardiographic J wave. *Circulation*. vol. 93(2). p. 372-9. 1996

YANG, Z.K.; BOYETT, M.R.; JANVIER, N.C.; MCMORN, S.O.; SHUI, Z; KARIM, F. Regional differences in the negative inotropic effect of acetylcholine within the canine ventricle. *J Physiol*. vol. 492. p. 789-806. 1996

YANG, T; KANKI, H; RODEN, D.M. Phosphorylation of the IKs channel complex inhibits drug block: novel mechanism underlying variable antiarrhythmic drug actions. *Circulation*. vol. 108(2). p. 132-4. 2003

ZANG, W.J.; CHEN, L.N.; YU, X.J.; FANG, P; LU, J; SUN, Q. Comparison of effects of acetylcholine on electromechanical characteristics in guinea-pig atrium and ventricle. *Exp Physiol*. vol. 90(1). p. 123-30. 2005

ZABEL, M; FRANZ, M.R.; KLINGENHEBEN, T; MANSION, B; SCHULTHEISS, H.P.; HOHNLOSER, S.H. Rate-dependence of QT dispersion and the QT interval: Comparison of atrial pacing and exercise testing. *J Am Coll Cardiol*. vol. 36(5). p. 1654–8. 2000

ZHAO, R; WANG, W; WU, B; HOEBEKE, J; HJALMARSON, A; FU, M.L. Effects of anti-peptide antibodies against the second extracellular loop of human M2 muscarinic acetylcholine receptors on transmembrane potentials and currents in guinea pig ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem*. vol. 163-164. p. 185-93. 1996

ZICHA, S; MOSS, I; ALLEN, B; VARRO, A; PAPP, J; DUMAINE, R; ANTZELEVICH, C; NATTEL, S. Molecular basis of species-specific expression of repolarizing K<sup>+</sup> currents in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. vol. 285(4) p. H1641-9. 2003

ZYGMUNT AC, GOODROW RJ, ANTZELEVITCH C. I(NaCa) contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 May;278(5):H1671-8.

ZYGMUNT AC, EDDLESTONE GT, THOMAS GP, NESTERENKO VV, ANTZELEVITCH C. Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Aug;281(2):H689-97.

## ANEXO I

## Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: Basis for electrical disturbance

Emiliano Medei<sup>a</sup>, Roberto C. Pedrosa<sup>a,b</sup>, Paulo Roberto Benchimol Barbosa<sup>c</sup>,  
Patricia C. Costa<sup>a</sup>, Ciria C. Hernández<sup>a</sup>, Elen A. Chaves<sup>a</sup>, Vivian Linhares<sup>a</sup>,  
Masako O. Masuda, Jose H. Nascimento<sup>a</sup>, Antonio C. Campos de Carvalho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca “Antônio Paes de Carvalho”, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Brazil

<sup>b</sup> Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Hospital Universitário Pedro Ernesto-Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

Received 19 October 2005; received in revised form 12 March 2006; accepted 24 March 2006

Available online 1 August 2006

### Abstract

**Introduction:** In chronic chagasic patients sudden death has been reported when QT interval dispersion is increased and antibodies with muscarinic-like activity have been demonstrated to trigger arrhythmias. The aims were to investigate, in vivo and in vitro, relation between these antibodies and heterogeneity of ventricular repolarization and to identify predictors of cardiac death in chronic chagasic patients.

**Methods and results:** Clinical, electrocardiograph and echocardiograph variables from 32 chronic chagasic patients with moderate to severe left ventricular dysfunction, followed-up for 10 years were analyzed. Sera from chronic chagasic patients with or without muscarinic activity were tested in isolated rabbit hearts to study ventricular repolarization. Stepwise multivariate logistic analysis was applied to identify independent predictors of cardiac death.

QT interval dispersion of patients with muscarinic activity ( $75.9 \pm 5.5$  ms) was larger than that of patients without muscarinic activity ( $51.3 \pm 4.0$  ms,  $p < 0.001$ ). Maximum uncorrected and corrected QT intervals were not significantly different between groups of patients. Sera from patients with muscarinic activity significantly and reversibly increased QT interval in isolated rabbit hearts ( $p = 0.002$ ). This effect was abolished in the presence of the muscarinic antagonist atropine. Multivariate analysis identified maximum corrected QT intervals and left ventricular end diastolic index as independent predictors of cardiac death ( $p = 0.03$  and  $p = 0.02$ , respectively).

**Conclusions:** Sera with muscarinic activity from chagasic patients have a strong contribution to evoke ventricular repolarization rhythm disorder. In these patients, ventricular repolarization heterogeneity is increased significantly. In vitro, muscarinic sera reversibly increased repolarization duration. Maximum corrected QT intervals and left ventricular end diastolic index are independent predictors of cardiac death.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Electrophysiology; Antibodies; QT interval; Chagasic cardiomyopathy

### 1. Introduction

Chagas' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is a serious health problem in Latin America where approximately 18 million people are infected resulting in 50,000 deaths each year. Up to 8% of the

population in South America is seropositive, 10–30% will develop symptomatic disease from which 25–30% evolve to chronic Chagas cardiomyopathy [1]. In these patients, a common observation is the presence of severe ventricular arrhythmias and sudden death [2,3].

The maximal dispersion of the QT interval, defined as the greatest interlead variability of QT interval in 12-lead surface electrocardiogram (ECG), reflects heterogeneity of ventricular repolarization and is an important predictor of sudden arrhythmic death as demonstrated by several studies [4,5]. Recently, it was demonstrated that maximal dispersion of the

\* Corresponding author. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, CCS, Bloco G, Ilha do Fundão, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Fax: +55 21 280 8193.

E-mail address: acarlos@biof.ufrj.br (A.C. Campos de Carvalho).

QT interval greater than 65 ms and maximum corrected QT interval longer than 465 ms are independent predictors of sudden death in Chagas' disease [6].

Antibodies with functional muscarinic-like activity have been described in sera from chronic chagasic patients [7] and in animal model [8]. We have reported that muscarinic antibodies isolated from sera of chronic chagasic patients reproducibly and reversibly interfere with cardiac conduction and electrogenesis, inducing atrio-ventricular (AV) block and bradiarrhythmias in isolated rabbit hearts [9]. On the other hand, Del Corso et al. isolated human IgG with muscarinic-like activity from sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, and demonstrated their effect in decreasing both L-type calcium current and action potential duration, with potential pro-arrhythmic role [10]. Therefore, in a rather broad approach, autonomic-like antibodies seem to play a significant role in the abnormal electrical response of the myocardium in different clinical settings.

The aim of this work was to identify independent predictive variables of cardiac death events among patients with chronic chagasic cardiomyopathy with and without antibodies possessing muscarinic-like activity and to investigate the effects of these patients' sera on the ventricular repolarization in isolated rabbit hearts.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients and selection procedures

In a longitudinal retrospective study, thirty-two consecutive patients with chronic chagasic cardiomyopathy, whose sera was tested positive for Chagas' disease, by indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence and cruzi-pain-ELISA were enrolled. Medical visits were scheduled at the outpatient clinic on a regular basis. Clinical and laboratory evaluations included physical examination, 12-lead ECGs, 2-D echocardiogram, 24-h ambulatory ECG monitoring, treadmill exercise stress testing, and blood sample analysis. Patients with concomitant systemic arterial hypertension, coronary artery disease, chronic obstructive pulmonary disease, cardiomyopathy of any other origin than Chagas' disease, valvular heart disease, thyroid dysfunction, liver diseases, primary or secondary immunologic disease, and serum electrolyte (potassium or calcium) abnormalities were excluded. Functional class was assessed by New York Heart Association (NYHA) classification.

All patients were in stable clinical condition for at least 3 months before enrollment. Beta-blockers, calcium channel blockers and Sotalol were transiently discontinued (five half-lives) before blood samples were drawn, the objective of this procedure was to prevent the effect of each drug in our "in vitro" experiments. During a follow-up period of 10 years body weight of the patients did not vary for more than 2 kg, urinary flow was 1.5 L/day, and plasma electrolyte composition was stable.

### 2.2. Electrocardiographic assessment and repolarization parameters

For each patient standard resting ECG were recorded in supine position (Cardimax FX-2111 electrocardiogram, Fukuda Denshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) and blood samples were collected in the same day. Electrocardiographic abnormalities were classified according to the criteria of the NYHA, using the Minnesota code modified for Chagas' cardiomyopathy [11]. Patients in non-sinus rhythm, with high degree AV block, or with more than 30 supra-ventricular or ventricular premature beats per hour in 24-h ambulatory monitoring were excluded. However, patients who had pacemaker or cardio-defibrillators implanted before the follow-up period were included in this study. The presence of incomplete or complete intra-ventricular conduction defects was not exclusion criteria.

Electrically inactive areas on ECG were defined by the presence of pathological Q waves. Intraventricular conduction disturbance was defined as the presence of right bundle branch block and/or left anterior fascicular block.

Overall, abnormal ECG was defined by the presence of either electrically inactive areas or intraventricular conduction disturbance.

QT interval measurements were performed manually in all leads using a magnifying glass by two independent observers blinded to the clinical status of the patients. The preceding RR intervals to the target heart cycles were measured, and the mean RR interval was used to calculate the mean heart rate-corrected QT interval with Bazett's formula. Inter-observer variability was further assessed in two consecutive measurements of the QT dispersion to certify data accuracy in the calculated QT dispersion values. When U waves were present, the QT interval was measured to the nadir between T and U waves and when the end of the T wave could not be identified, the lead was discarded from analysis. Three consecutive cycles were measured and the mean values were approximated to the nearest 5 ms. Any extra-systolic event observed in a particular tracing led to exclusion of the whole ECG tracing from analysis.

The repolarization parameters analyzed were: QT dispersion, maximal QT interval duration (QTmax), and corrected QTmax (QTcmax). Maximal QT interval duration was defined as the largest QT interval duration measured on ECG. QT dispersion was defined as the difference between maximum and minimum values obtained in all 12 leads. No attempt was made to correct QT dispersion for heart rate, as it has been consistently demonstrated that QT dispersion interval is not cycle-length dependent within the heart rate range found in the patients [12].

### 2.3. Echocardiographic recordings

For each patient, M-mode and two-dimensional echocardiogram were recorded using ESAOTE Caris Plus (Italy) with a 4-MHz broadband transducer. The parameters

analyzed were the left ventricular ejection fraction (LVEF), in percent, calculated by Simpson's method, and the left ventricular end diastolic diameter index (LVEDDI), in millimeters per squared meters, defined as end diastolic left ventricular diameter divided by the body surface area.

World Health Organization and Helsinki Treaty regulations (1963), reviewed in Venice (1983), were followed. The institutional review board approved the study protocol, and fully informed written consent was obtained from all patients.

#### 2.4. Characterization of muscarinic and non-muscarinic sera and ECG recordings in isolated rabbit hearts

The presence of muscarinic antibodies in the serum of the chronic chagasic patients was ascertained by Elisa and/or chromatographic purification using a peptide corresponding to the second extra cellular loop of the M2-muscarinic receptor. In addition, in isolated rabbit hearts, heart rate response to sera was assessed during spontaneous rhythm, to dichotomize patients into two groups and to make sure that the antibodies present were functionally active. A given patient's serum was characterized as muscarinic only when the serum was positive in one or both of the immune assays listed above was able to decrease spontaneous heart rate by at least 10% within the 30 min perfusion time of the isolated rabbit heart and this effect was abolished by a muscarinic antagonist atropine (1  $\mu\text{M}$ ). On the other hand, chronic chagasic patients' sera were not muscarinic when sera were not positive in one or both of the immune assays listed above and did not alter spontaneous heart rate when perfused alone or in presence of propranolol (1  $\mu\text{M}$ ) or atropine, excluding possible beta adrenergic and muscarinic effect into these sera.

The method for ECG recording from isolated hearts and electrophysiological characterization of sera has been previously described in detail [9]. Briefly, the experimental protocol consisted of (1) control recordings for 30 min in Tyrode's solution, (2) 30-min perfusion with Tyrode's solution containing total human serum (diluted 1:100 v/v) from chronic chagasic patients, and (3) 30-min washout with Tyrode's perfusion. Sera from healthy orthopedic surgery patients without Chagas' or history of cardiac disease were also used (reference sera). Independent experiments were performed to test each serum.

It is known that QT interval is heart rate dependent, thus to exclude this kind of interference in our experiments, all of the isolated rabbit heart experiments were performed under paced condition (10% greater than the basal spontaneous beat rate). Two observers that were blinded to the sera used in the experiments performed the analysis of the ECG recording.

#### 2.5. Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SEM and categorical variables were presented as either ratio or percentages. The Shapiro-Wilks test was applied to assess

the normality of the variables. Continuous variables were compared by either Kolmogorov-Smirnov or unpaired Student's *t*-tests between groups. Comparison of the effects of both muscarinic and non-muscarinic sera on the repolarization of isolated rabbit hearts was made by one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements, with post-hoc Newman-Keuls tests. The correlation between QT dispersion in vivo and the effect of chronic chagasic patient sera on the QT interval in vitro was assessed by Pearson's coefficient, and tested by Student's *t*-test applied to correlation. Categorical variables were compared by chi-square or Fisher exact test when appropriate.

Inter-observer variability of QT dispersion was assessed by both Student's *t*-test and F Snedecor variance ratio analysis. Variables with significant difference between survivors and non-survivors of the muscarinic and non-muscarinic groups were adjusted into a multivariate logistic regression model, using a stepwise hierarchical procedure to exclude significant covariants, to validate results and to identify independent predictors of cardiac death events (endpoint) during the follow-up. Alpha error level was set at 0.05. All variables had normal distribution, excluding QT dispersion and left ventricular end diastolic diameter index (Shapiro-Wilks; respectively,  $p=0.003$  and  $p=0.01$ ). Statistical analysis was performed with EPI Info software version 6.04 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA), MS Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and Statgraphics Plus version 5.0 (Manugistic, Rockville, MD, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Patients of the study

Table 1 shows the clinical characteristics at enrollment of all 32 patients included in this study and of the two subgroups, muscarinic and nonmuscarinic, for comparison.

Most of patients (71%) had some type of ECG abnormality, but electrically inactive areas were not observed in non-muscarinic group while present in 53% of muscarinic group (odds ratio =  $\infty$ ,  $p=0.001$ ). Accordingly, the muscarinic group showed upon echocardiography examination signs of cardiac dilatation (left ventricular end diastolic diameter index: muscarinic  $39.6 \pm 0.6 \text{ mm m}^{-2}$  vs. non-muscarinic  $32.7 \pm 0.8 \text{ mm m}^{-2}$ ; Kolmogorov-Smirnov test,  $p<0.001$ ) and had lower left ventricular ejection fractions (LVEF: muscarinic  $36.6 \pm 0.6\%$  vs. nonmuscarinic  $45.6 \pm 0.4\%$ ; Student's *t*-test,  $p<0.001$ ) than the non-muscarinic group (Table 1). Syncope and pre-syncope were associated to complete A–V block (3 patients) or ventricular tachycardia (5 patients) in the muscarinic group. In the nonmuscarinic group one patient had syncope attributed to complete A–V block, one to carotid sinus hypersensitivity, two to ventricular tachycardia and two to unknown causes. Patients who had complete A–V block and those presenting ventricular tachycardia had dual chamber pacemakers and



Table 1

Baseline characteristics of all Chagas disease patients and those without (non-muscarinic) and with (muscarinic) functionally active cardiac muscarinic antibodies

|                             | All patients<br>(n=32) | Non-muscarinic<br>patient (n=15) | Muscarinic<br>patient (n=17) |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| <i>Clinical variables</i>   |                        |                                  |                              |
| Age, years                  | 57.6±9                 | 55.5±9                           | 59.5±9                       |
| Sex, M/F                    | 12/20                  | 5/10                             | 7/10                         |
| BMI                         | 21.5±1                 | 22.11±1                          | 21.0±1.2                     |
| Syncope                     | 13 (40.6%)             | 5 (33%)                          | 8 (47%)                      |
| Pre-syncope                 | 5 (15.6%)              | 2 (13.3%)                        | 3 (17.5%)                    |
| Palpitations                | 10 (31%)               | 3 (20%)                          | 7 (41%)                      |
| NYHA (Class III/IV)         | 11 (34%)               | 4 (26.6%)                        | 7 (41%)                      |
| <i>Echocardiography</i>     |                        |                                  |                              |
| LVEDDI (mm/m <sup>2</sup> ) | 36.4±4                 | 32.7±3                           | 39.7±3***                    |
| LVEF%                       | 40.9±5                 | 45.7±1                           | 36.7±2***                    |
| <i>Electrocardiography</i>  |                        |                                  |                              |
| Abnormal ECG                | 24 (75%)               | 10 (66.6%)                       | 14 (82.4%)                   |
| RBBB+LAFB                   | 15 (47%)               | 10 (66.6%)                       | 5 (29%)                      |
| EIA                         | 9 (28%)                | 0                                | 9 (53%)***                   |

BMI: body mass index, LVEDDI: left ventricular end-diastolic diameter index; LVEF: left ventricular ejection fraction; RBBB+LAFB: right bundle branch block and left anterior fascicular block; EIA: electrically inactive area. Symptoms and ECG parameters refer to number of patients. Age, IMC, and echocardiography parameters are expressed as mean±SD. \*\*\* $P<0.001$ .  $P=NS$  for all other comparisons.

cardio-defibrillators implanted, respectively, before enrollment in the study.

### 3.2. Clinical follow-up

Ten of the 32 (31.3%) chronic chagasic patients died during the follow-up: five (50%) by heart failure (one in non-muscarinic and four in muscarinic group), four (40%) by severe ventricular arrhythmias (two from each group), and one (10%) from muscarinic group due to neoplasia. Dual chamber pacing was indicated for 5 of the 32 patients (15.6%), and 3 out of 5 (60%) of these patients belonged to the muscarinic group. Pacemakers were indicated due to complete A–V block (4 patients) and sinus node syndrome (1 patient). All five patients had light to moderate left ventricular dysfunction. Follow-up of these patients showed no detrimental role of cardiac pacing, and all five patients remained in the same NYHA functional class.

All non-surviving patients had worse left ventricular systolic function (LVEF: survivors  $42.0\pm 1.1\%$  vs. non-survivors  $38.0\pm 1.3\%$ ; Student's  $t$ -test,  $p=0.04$ ), greater cardiomegaly (left ventricular end diastolic diameter index: survivors  $35.1\pm 1.0$  mm m<sup>-2</sup> vs. non-survivors  $38.7\pm 1.0$  mm m<sup>-2</sup>;  $p=0.004$ ), larger both maximum corrected QT intervals (survivors  $436.6\pm 13.7$  ms vs. non-survivors  $506.6\pm 16.1$  ms;  $p=0.007$ ) and QT dispersion (in survivors  $60.9\pm 5.3$  ms as compared to nonsurvivors  $71.1\pm 5.6$  ms;  $p=0.02$ ). NYHA III/IV was associated with worse prognosis

with significantly limited survival (odds ratio=7.2, 95% CI [1.0–57.5];  $p=0.03$ ). In addition, QT dispersion of patients with and without electrical inactive area in muscarinic group demonstrated non-significant difference (respectively,  $76.7\pm 7.1$  ms vs.  $75.0\pm 9.1$  ms;  $p=0.5$ ). Total cardiac death rate was not statistically different between the muscarinic (35.3%) and non-muscarinic (20.0%) groups.

### 3.3. QT dispersion, maximum QT and maximum corrected QT intervals in the ECG of chronic chagasic patients

QT dispersion of muscarinic patients was significantly greater than QT dispersion of non-muscarinic (respectively,  $75.9\pm 5.5$  ms vs.  $50.0\pm 4.0$  ms;  $p=0.0003$ ) (Fig. 1A). On the other hand, maximum QT ( $447.6\pm 11.7$  ms in muscarinic, compared to  $425.3\pm 13.0$  ms in non-muscarinic; Fig. 1B) and maximum corrected QT intervals ( $469.6\pm 19.8$  ms in muscarinic, compared to  $441.1\pm 14.3$  ms in non-muscarinic) were not significantly different between muscarinic and non-muscarinic groups (Fig. 1C).

In patients with compensated heart failure, NYHA I/II, QT dispersion, maximum corrected QT and maximum QT intervals were analyzed separately. QT dispersion was greater in the muscarinic than non-muscarinic group (respectively,  $82.0\pm 7.5$  ms vs.  $50.9\pm 4.1$  ms;  $p=0.002$ ),

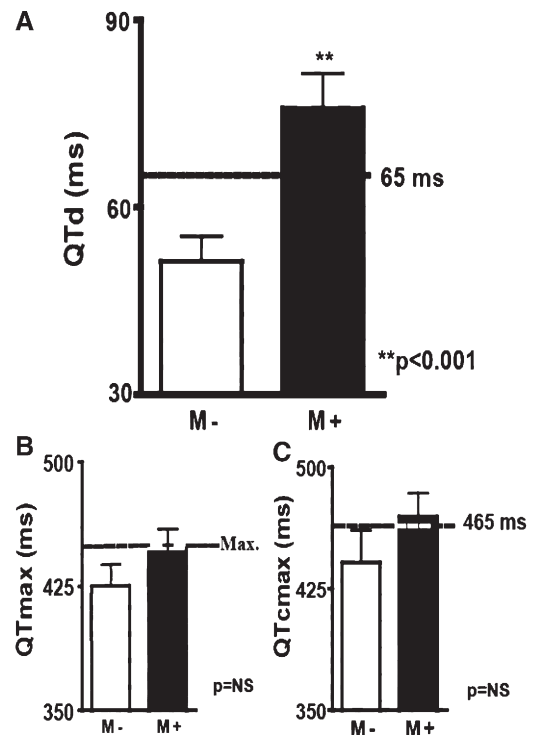


Fig. 1. QT interval dispersion (QTd), QTmax and QTcmax in chronic chagasic patients. QTd was significantly increased in muscarinic group (A). No difference in QTmax and QTcmax interval was observed between non-muscarinic and muscarinic patients (B and C). The dashed lines indicate, in (A) and in (C), the value above which QTd and QTcmax are independent risk factors of sudden death in chronic chagasic patients (6) and in (B) the maximal value of the QT interval.

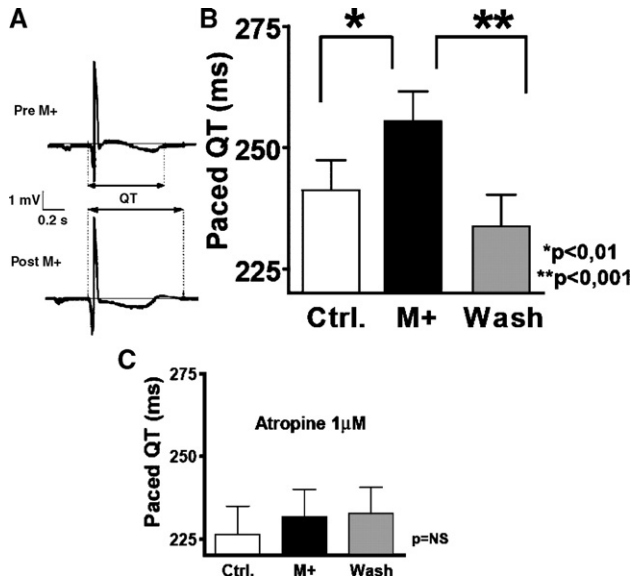


Fig. 2. Acute effects of sera from chronic chagasic (CChpP) on QT interval in isolated rabbit hearts. ECG obtained from isolated rabbit hearts show the longer QT under muscarinic sera perfusion (A). This effect of muscarinic sera was significant and reversible (B). (C) shows evidence that muscarinic activity is involved in the QT prolongation: the prolongation of QT interval under muscarinic serum was abolished in the presence of Atropine 17 μM.

maximum corrected QT and maximum QT intervals did not show significant difference between muscarinic and non-muscarinic groups.

Inter-observer average absolute values and variability of maximum QT interval and QT dispersion demonstrated non-significant differences between both observers, and paired differences between two consecutive blinded measurements were non-significant.

### 3.4. Effects of chronic chagasic patients' sera on QT interval in isolated rabbit hearts

In isolated rabbit hearts, we tested the sera from each chronic chagasic patient to investigate the sera effect and the correlation between this effect on the isolated heart and repolarization parameters on the patients' ECG.

Under paced condition (see Section 2), muscarinic sera significantly and reversibly increased QT intervals in isolated rabbit hearts (from 241.3 ± 6.1 ms in Tyrode, 255.0 ± 6.1 ms in muscarinic sera; and 233.8 ± 6.5 ms washout, ANOVA one-way,  $p=0.0002$ ; Fig. 2A–B). In other series of experiments (new hearts), the effect of muscarinic sera upon QT interval was completely neutralized when a muscarinic receptor antagonist (Atropine 1 μM) was added in the perfusing solution all the time during the experiments (Tyrode–Atropine, Tyrode–Atropine–muscarinic sera, Tyrode–Atropine). As shown in Fig. 2C (QT (Tyrode–Atropine)=226.4 ± 8.5 ms, QT (Tyrode–Atropine–muscarinic sera)=231.8 ± 8.1 ms and QT (Tyrode–Atropine)=232.7 ± 7.8 ms) no increase in QT interval of paced isolated rabbit hearts was observed (ANOVA one-way,  $p=0.18$ ). In addition, sera from non-muscarinic did not significantly alter QT interval (QT during Tyrode perfusion, 249.1 ± 7.8 vs. 252.7 ± 9.8 ms in non-muscarinic sera, and washout 245.5 ± 8.6, ANOVA one-way,  $p=0.13$ ). Post-hoc Newman-Keuls tests confirmed that only muscarinic sera significantly increased QT interval in perfused isolated rabbit hearts when compared with control ( $p<0.01$ ) and washout condition ( $p<0.001$ ) (Fig. 2B). Sera from healthy subject, without Chagas disease, submitted to orthopedic surgery also did not alter QT duration (QT in Tyrode 271.1 ± 12.1, 275.7 ± 13.7 ms in sera, 266.7 ± 15.28 washout; ANOVA one-way,  $p=0.45$ , not shown).

The difference in the QT interval between control and sera-perfused conditions (both muscarinic and non-muscarinic sera) in isolated rabbit hearts was positively correlated with the QT dispersion of the respective sera donor patient, with Pearson's correlation coefficient value of 0.65 ( $p=0.0003$ ) (Fig. 3).

### 3.5. Multivariate regression analysis

The logistic regression function was adjusted to electrocardiograph (electrically inactive areas, QT dispersion, maximum corrected QT and maximum QT intervals), echocardiograph (left ventricular ejection fraction, left ventricular end diastolic diameter index) and clinical variables (NYHA), which showed statistically significant

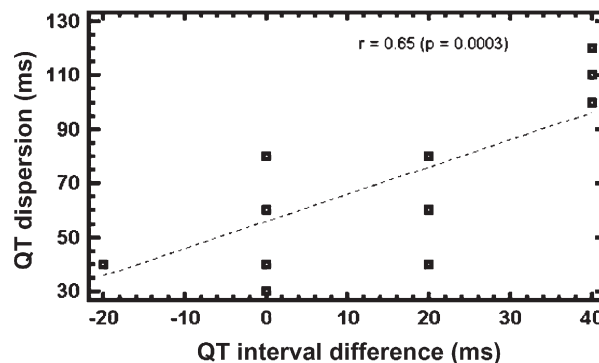


Fig. 3. Linear correlation between QTd (in vivo) and the QT interval (in vitro) difference measured during perfusion with chronic chagasic patient muscarinic sera and pre-muscarinic sera perfusion in isolated rabbit hearts. Sera from all 17 muscarinic patients were used for the analysis, but only 11 points are plotted in the figure since many points overlap. Note significant correlation ( $p=0.0003$ ;  $r=0.65$ )—see text for details.

Table 2  
Results of the stepwise multivariate logistic regression model with electrocardiographic and echocardiographic explanatory variables as function of outcomes<sup>a</sup>

| Variables | Coefficient ( $\beta$ ) <sup>b</sup> | Standard error <sup>b</sup> | Likelihood ratio $\chi^2$ <sup>c</sup> | <i>p</i> | Odds ratio | 95% CI         |                |
|-----------|--------------------------------------|-----------------------------|--|----------|------------|----------------|----------------|
|           |                                      |                             |  |          |            | Inferior limit | Superior limit |
| Intercept | 12.7                                 | 5.2                         | –                                      | –        | –          |                |                |
| QTcmax    | –0.02                                | 0.01                        | 4.87                                   | 0.03     | 0.98       | 0.95           | 1.00           |
| QTd       | 0.02                                 | 0.02                        | 0.55                                   | 0.46     | 1.02       | 0.97           | 1.06           |
| LVEDDI    | –0.33                                | 0.17                        | 5.08                                   | 0.02     | 0.72       | 0.51           | 1.0            |

95% CI: 95% confidence interval; QTd: QT interval dispersion, LVEDDI: left ventricular end diastolic diameter index (see text for details).

<sup>a</sup> Outcomes were defined as total cardiac death events during the follow-up.

<sup>b</sup> The coefficient of the variable in the model and the respective standard error of the estimate.

<sup>c</sup> Maximum likelihood ratio  $\chi^2$  test (1 degree of freedom).

differences between survivors and non-survivors during the follow-up. After co-variants were excluded, the function was successfully adjusted to the following variables: left ventricular end diastolic diameter index, maximum corrected QT and QT dispersion. Independent predictors of cardiac death were left ventricular end diastolic diameter index (odds ratio=0.72; 95% C.I. [0.51–1.0];  $p=0.02$ ) and maximum corrected QT (odds ratio=0.98; 95% C.I. [0.95–1.00];  $p=0.03$ ; Table 2). Adjusted variables showed 88.9% negative predictive value, 82.6% positive predictive value and 84.4% total predictive accuracy, with optimal cut-off values at 36.4 mm m<sup>-2</sup> for left ventricular end diastolic diameter index, 456.3 ms for maximum corrected QT and 64 ms for QT dispersion.

#### 4. Discussion

The present study strongly suggests that the presence of sera with muscarinic-like activity can induce ventricular repolarization disorders. In fact the significant positive correlation between QT dispersion in vivo and the increase of QT interval in vitro (see Fig. 3) brings about strong proof that antibodies with muscarinic-like activity are directly involved in genesis of the heterogeneity of ventricular repolarization and arrhythmia. Thus, these findings support a novel mechanism of electrical disturbance of the heart, which is mediated by specific stimulus of antibodies in the cholinergic muscarinic receptor. Arrhythmias are very common events in chronic cardiomyopathy, mainly in Chagas' disease, and epidemiological studies showed that sudden death accounts for about 55–65% of the deaths in this particular setting [13,14]. Surface ECG interlead QT interval dispersion, on the other hand, is considered a marker of regional repolarization heterogeneity and a substrate for ventricular arrhythmia [15]. In normal subjects, QT dispersion usually ranges from 40 to 50 ms, and the value of 65 ms is regarded as an upper limit of normality by some authors [16]. Salles et al. [6] in a longitudinal study demonstrated in Chagas' disease that QT dispersion greater than 65 ms and maximum corrected QT interval longer than 465 ms were independent predictors of cardiac death.

In the present study, only muscarinic sera from chronic chagasic patients had QT dispersion greater than 65 ms,

maximum corrected QT greater than 465 ms and were able to reversibly increase QT interval in isolated rabbit hearts, an effect abolished by atropine. This finding suggests a direct effect of the antibodies upon ventricular cell electrophysiological parameters.

Although the QT interval in the muscarinic group in vivo was not significantly different from the non-muscarinic group, there was a positive correlation between QT dispersion and maximum QT interval ( $r=0.71$ ,  $p<0.001$ ), indicating an association of muscarinic-like activity and increased QT duration; in addition the muscarinic patients showed maximum corrected QT interval greater than 465 ms, the maximal values described by Salles et al. as an independent sudden death risk factor predictor.

We stress that the presence of normal QT interval and increased QT dispersion can reflect abnormal ventricular repolarization, such as described by Pathak et al. [17] in an experimental model, and confirmed by Barutcu et al. [18] in humans.

Overall, the presence of muscarinic sera correlates with higher prevalence of electrically inactive areas when compared to non-muscarinic sera in chronic chagasic patients ( $p=0.001$ ), and an increased QT dispersion in the former group stresses the presence of a potentially unstable environment for reentry arrhythmia.

##### 4.1. Ionic mechanism

Previous work from our group showed that IgG from chronic chagasic patients with muscarinic activity decreases I<sub>Ca</sub> [19] and does not modulate I<sub>to</sub> [20]. Therefore, we cannot explain the increased QT interval observed during perfusion with the muscarinic sera in rabbit hearts by modulation of either current. On the other hand, the heterogeneous expression of the slow and rapid components of the delayed rectifier potassium currents (I<sub>Ks</sub>–I<sub>Kr</sub>) [21] and a differential cell response to acetylcholine in the ventricular wall [22] could contribute to the genesis of the results shown in this work. In addition, a decrease of the I<sub>Ks</sub> and/or I<sub>Kr</sub> could explain the increase in QT interval observed. The study of the molecular mechanism underlying the increase in QT observed after muscarinic sera perfusion in isolated rabbit hearts will be the subject of future investigation.

#### 4.2. Clinical implication

In the present study, enrolled patients presented global left ventricular dysfunction, with 34% in NYHA class III/IV. Although the muscarinic group had significantly reduced left ventricular systolic function and more pronounced ventricular electrical abnormalities on ECG than the non-muscarinic group, only left ventricular end diastolic diameter index and maximum corrected QT interval were independent predictors of cardiac death, in concordance with previous publications [23,24].

Our data showed that QT dispersion, electrically inactive areas and NYHA class were univariate predictors of cardiac death, although not independent in the multivariate model, which is in partial agreement with Salles et al. [6]. Although left ventricular function is a prognostic marker itself, the electrical damage to myocardium associated with the presence of muscarinic activity demonstrated a worse prognosis. In Chagas' disease, therefore, patients with signs and symptoms of heart failure should be assessed not only regarding a possible electrical substratum of life threatening ventricular arrhythmia but also the presence of muscarinic IgGs [25].

A variety of clinical and experimental data has shown that immunological mechanism may be involved in the pathogenesis and pathophysiology of arrhythmic events. The reversible in vitro effect of sera with muscarinic-like activity on the ventricular repolarization (QT interval; Fig. 2) opens a new window to apply therapeutic approaches consisting of immunoadsorption of antibodies from serum. This brings forward the possibility that antibodies play a pathogenic role in either primary (idiopathic dilated) or secondary (Chagas' disease) chronic cardiomyopathy. Immunoglobulin immunoadsorption was first used successfully by Berta et al. [26] in myasthenia gravis. Later Wallukat et al. employed immunoglobulin adsorption with success in patients with dilated cardiomyopathy, removing beta-adrenergic receptor antibodies, with a potential impact in survival and early hemodynamic improvement. [27–30].

In summary, the presence of serum antibodies with muscarinic-like activity in chronic cardiomyopathy is correlated to increased ventricular repolarization heterogeneity. Although QT interval dispersion, maximum corrected QT interval, NYHA class, electrically inactive areas, left ventricular ejection fraction, and left ventricular end diastolic diameter index are univariate predictors of outcomes, only left ventricular end diastolic diameter index and maximum corrected QT interval are independent predictors of cardiac death in Chagas' disease.

#### Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the valuable contributions of Daisy Avanzi for excellent technical assistance.

Financial support: Grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Car-

los Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, FAPERJ E-6/171.081/2002 and NIH (RO1 HL73732-01).

#### References

- [1] Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, et al. The trypanosomiasis. *The Lancet* 2003;1:1469–80.
- [2] Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 2001;1:92–100.
- [3] Elizari MV. Arrhythmias associated with Chagas' heart disease. *Card Electrophysiol Rev* 2002;6:115–9.
- [4] Day CP, McComb JM, Campbell RW. QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. *Br Heart J* 1990;63:342–4.
- [5] Cardoso CR, Salles GF, Deccache W. Prognostic value of QT interval parameters in type 2 diabetes mellitus: results of a long-term follow-up prospective study. *J Diabetes Complications* 2003;17:169–78.
- [6] Salles G, Xavier S, Sousa A, Hasslocher-Moreno A, Cardoso C. Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-up study. *Circulation* 2003;108:305–12.
- [7] 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;47:45–52.
- [8] Liu HR, Zhao RR, Jiao XY, Wang YY, Fu M. Relationship of myocardial remodeling to the genesis of serum antibodies to cardiac beta (1)-adrenoceptors and muscarinic type 2 acetylcholine receptors in rats. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1866–73.
- [9] 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;96:2031–7.
- [10] Del Corso C, Campos De Carvalho AC, Martino HF, Varanda WA. Sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy decrease I-type calcium currents in cardiomyocytes isolated from rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(5):H1928–36.
- [11] Maguire JH, Mott KE, Souza JA, Almeida EC, Ramos NB, Guimaraes AC. Electrocardiographic classification and abbreviated lead system for population-based studies of Chagas disease. *Bull Pan Am Health Organ* 1982;16:47–58.
- [12] Zabel M, Franz MR, Klingenhoben T, Mansion B, Schultheiss HP, Hohnloser SH. Rate-dependence of QT dispersion and the QT interval: comparison of atrial pacing and exercise testing. *J Am Coll Cardiol* 2000;1;36(5):1654–8.
- [13] Rassi Jr A, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 2001;76:75–96.
- [14] Reis EL. Sudden death in patients with Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:321–3.
- [15] Jain H, Avasthi R. Correlation between dispersion of repolarization (QT dispersion) and ventricular ectopic beat frequency in patients with acute myocardial infarction: a marker for risk of arrhythmogenesis? *Int J Cardiol* 2004;93(1):69–73.
- [16] Surawicz B Will. QT dispersion play a role in clinical decision-making? *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996;7:777–84.
- [17] Pathak A, Verwaerde P, Galinier M, et al. Study of ventricular repolarization in an experimental model of arterial hypertension associated with obesity. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2002;95:651–5.
- [18] Barutcu I, Sezgin AT, Gullu H, Topal E, Acikgoz N, Ozdemir R. Exercise-induced changes in QT interval duration and dispersion in patients with isolated myocardial bridging. *Int J Cardiol* 2004;94(2–3):177–80.
- [19] Hernandez CC, Barcellos LC, Gimenez LE, et al. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca<sup>2+</sup> currents. *Cardiovasc Res* 2003;58:55–65.



- [20] Medei E, Nascimento JH, Pedrosa C, Masuda M, Campos de Carvalho AC. Acute effects of the IgG of chronic Chagasic patients on transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) in isolated rat ventricular myocytes. V Ibero American Congress of Biophysics, Abstracts Book; 2003, p. 164.
- [21] Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, et al. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res* 1991;69:1427–49.
- [22] Litovsky SH, Antzelevitch C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular subendocardium and subepicardium to acetylcholine and isoproterenol. A direct effect of acetylcholine in ventricular myocardium. *Circ Res* 1990;67:615–27.
- [23] Salles GF, Cardoso CR, Xavier SS, Sousa AS, Hasslocher-Moreno A. Electrocardiographic ventricular repolarization parameters in chronic Chagas' disease as predictors of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003;26(6):1326–35.
- [24] Bestetti RB, Rossi MA. A rationale approach for mortality risk stratification in Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 1997;58(3):199–209.
- [25] Hernandez CC, Mattos EC, Brandao IT, et al. DNA immunizations with M2 muscarinic and beta1 adrenergic receptor coding plasmids impair cardiac function in mice. Gimenez LE. *J Mol Cell Cardiol* 2005; vol. 38(5):703–14.
- [26] Berta E, Confalonieri P, Simoncini O, et al. Removal of antiacetylcholine receptor antibodies by protein-A immunoadsorption in myasthenia gravis. *Int J Artif Organs* 1994;17:603–8.
- [27] Muller J, Wallukat G, Dandel M, et al. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000;101:385–91.
- [28] Mobini R, Staudt A, Felix SB, et al. Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta(1)-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 2003;20:345–50.
- [29] Felix SB, Staudt A, Landsberger M, et al. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(4):646–52.
- [30] Dorffle WV, Wallukat G, Dorffle Y, Felix SB, Baumann G. Immunoadsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J Cardiol* 2004;97(3):529–34.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)