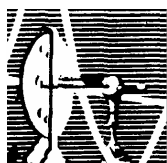


Patrícia Cristina dos Santos Costa

DESEMPENHO CARDÍACO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA: Modulação das funções mecânica e elétrica
cardíacas por autoanticorpos contra receptores acoplados a
proteína G

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
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Patrícia Cristina dos Santos Costa

DESEMPENHO CARDÍACO NA
CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA: Modulação das funções elétrica e mecânica
por autoanticorpos contra receptores acoplados a proteína G

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)

Orientador: Antonio Carlos Campos de Carvalho

Rio de Janeiro
2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia Cristina dos Santos Costa

DESEMPENHO CARDÍACO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA: Modulação das funções elétrica e mecânica por autoanticorpos contra receptores acoplados a proteína G

Rio de Janeiro, 23 de junho de 2006.

(Antônio Carlos Campos de Carvalho, doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Milena Botelho Pereira Soares, doutor, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz – FIOCRUZ BA)

(Tânia Araújo Jorge, doutor, Dep. Ultra-Estrutura e Biol. Celular/ FIOCRUZ RJ)

(Tânia Maria Ortiga Carvalho, doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Masako Oya Masuda, doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Dedicatória

À Alexander da Costa Monteiro, companheiro em todos os momentos, à Edson Martins da Costa e Sílvia Maria dos Santos Costa exemplos de caráter, conduta e dedicação.

Agradecimentos

Meus agradecimentos

A minha família Cauê, Alexsander, Sílvia, Edson, Anderson, Andressa e Nadine pelo apoio incondicional, incentivo e carinho.

Ao professor Antonio Carlos Campos de Carvalho por ter me aceitado como sua aluna de doutorado e por sua contribuição para meu amadurecimento profissional,

Ao professor Jorge Ponce Hornos pela oportunidade de desenvolver parte do trabalho desta tese em seu laboratório.

A professora Masako Oya Masuda que me iniciou no mundo da ciência e sempre será meu exemplo de postura profissional,

A Roberto Coury Pedrosa pelas discussões, idéias e pela amizade.

A Daisy Portocarrero muito mais que companheira de trabalho, professora e acima de tudo amiga.

Aos amigos dos Laboratórios de Cardiologia Celular e Molecular, Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho e de Energética Cardíaca, em especial a Norma, Elen, Vânia, Ciria Quintero, Luis Diaz, Ana Carolina e Ingrid.

As agências de fomento a pesquisa CNPq, FAPERJ, FINEP, IUPAB por apoiarem a realização deste trabalho.

RESUMO

COSTA, Patrícia Cristina dos Santos. **Desempenho elétrico e mecânico cardíaco na cardiopatia chagásica crônica**: Modulação por autoanticorpos contra receptores acoplados a proteína G. Rio de Janeiro, 2006. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Em torno de 25% dos pacientes com doença de Chagas desenvolvem a forma cardíaca da doença. No Brasil, a doença de Chagas é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva. A dissociação entre o número de parasitas no sangue ou no tecido cardíaco e a ocorrência de dano no miocárdio reforçam a idéia da participação da autoimunidade no desenvolvimento da doença chagásica. Neste contexto, autoanticorpos contra receptores cardíacos estão presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos. O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho cardíaco frente à ativação de receptores cardíacos pela interação com anticorpos de pacientes chagásicos crônicos. Para tal avaliamos seu efeito na função elétrica, mecânica e energética cardíaca em modelos *in vitro* e buscamos associação entre a presença destes anticorpos com efeito funcional e a presença de arritmias cardíacas nos pacientes. Observamos que anticorpos com atividade funcional muscarínica (M) diminuíram a frequência cardíaca, bloquearam a condução atrioventricular e prolongaram o tempo de repolarização *in vitro*. A ativação dos receptores β -adrenérgicos pelo soro de pacientes aumentou a frequência cardíaca, aumentou a força de contração e aumentou a economia contrátil muscular, além de promover maior liberação de calor por unidade de pressão cardíaca gerada. Avaliação eletrocardiográfica dos pacientes do grupo M mostrou maior dispersão da repolarização ventricular, parâmetro correlacionado ao aumento do intervalo QT induzido *in vitro* pelo soro dos pacientes. Estudo retrospectivo identificou como preditores independentes para ocorrência de morte cardíaca nos pacientes chagásicos a dispersão do intervalo QT e o índice do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. Concluímos que a presença de anticorpos com atividade funcional contra os receptores acoplados a proteína G contribui para a patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica.

AUTOANTICORPOS. CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA. DESEMPENHO CARDÍACO. ELETROCARDIOGRAMA. ENERGÉTICA CARDÍACA. RECEPTOR BETA-ADRENÉRGICO. RECEPTOR MUSCARÍNICO.

ABSTRACT

COSTA, Patrícia Cristina dos Santos. **Electrical and mechanical cardiac performance in chronic chagasic cardiopathy**: Modulation by autoantibodies against g-protein coupled receptors. Rio de Janeiro, 2006. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Among chagasic patients, 25% develop cardiac form of the chronic disease. In Brazil, Chagas' disease is one of the more important cause of congestive heart failure. Autoimmunity participation in Chagas' disease development is stressed by dissociation between blood or tissue parasite numbers and myocardium damage observation. In this sense, autoantibodies against g-protein coupled receptors are present in chronic patients' sera. The objective of this work was to evaluate heart performance after receptor activation by interaction with patients' antibodies. Therefore, we observed antibodies effects on electrical, mechanical and energetic cardiac function *in vitro* and we sought an association among antibodies with functional activity presence and cardiac arrhythmias in patients. We observed that sera with functional muscarinic activity decreased heart rate, prolonged atrioventricular conduction and ventricular repolarization. β -adrenergic activation by serum increased heart rate, contraction force and contractile muscle economy, meaning a higher energetic expenditure by each unity of pressure generated. Electrocardiographic evaluation from chronic chagasic patients with serum with muscarinic activity showed higher ventricular repolarization dispersion, parameter associated with the higher QT induced by serum from these patients *in vitro*. Retrospective study identified as independent predictors of cardiac death among chagasic patients higher QT dispersion and left ventricular end diastolic diameter index. We conclude that antibodies against g-protein coupled receptors contribute to chronic chagasic pathogenesis.

AUTOANTIBODIES. CHRONIC CHAGASIC CARDIOPATHY. CARDIAC PERFORMANCE. ELETROCARDIOGRAM. CARDIAC ENERGETIC. BETA-ADRENERGIC RECEPTOR. MUSCARINIC RECEPTOR.

Lista de siglas e abreviaturas

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
ATP	Adenosina trifosfato
AV	Atrioventricular
CAPES	Coordenação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Ch	Chagásico
Cx	Conexina
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Imunoensaio ensaio enzimático
f	Frequência de estimulação
FC	Frequência cardíaca
H'a	Energia liberada no estado ativo por batimento
H'a/P	Economia muscular contrátil
H't	Energia total liberada pelo músculo por batimento
H't/P	Economia muscular global
Hr	Energia liberada pelo músculo em repouso
Ht	Energia total liberada
NCh	Não chagásico
NE	Noradrenalina
P	Pressão desenvolvida
P2 β	Proteína ribossomal P isoforma 2 β
PA	Potencial de ação
PKA	Proteína quinase A
QT _c max	QT máximo corrigido
QTd	Dispersão do intervalo QT
QTmax	Duração máxima do intervalo QT
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SEM	Erro padrão da media
SERCA	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 DOENÇA DE CHAGAS	11
1.2 CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA E MECANISMOS DE PATOGÊNESE	14
1.3 ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNAS CARDÍACAS	18
1.4 MODULAÇÃO DO DESEMPENHO CARDÍACO	23
1.4.1 Atividade elétrica cardíaca	23
1.4.1.1 Junções comunicantes tipo <i>gap</i>	23
1.4.1.2 Propagação da atividade elétrica cardíaca	26
1.4.4.3 Potenciais de ação rápido e lento	30
1.4.2 Acoplamento excitação-contração	33
1.4.3 Energética da contração	34
1.4.4 Modulação pelo sistema nervoso autônomo	35
1.5 OBJETIVOS	39
1.5.1 Objetivo geral	39
1.5.2 Objetivos específicos	39
2 METODOLOGIA	40
2.1 ESTUDO DA FUNÇÃO ELÉTRICA CARDÍACA	40
2.2 ESTUDO DA MECÂNICA E ENERGÉTICA VENTRICULAR	40
2.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES CHAGÁSICOS	44
2.3.1 Avaliação eletrocardiográfica dos pacientes e parâmetros de repolarização	44

2.3.2 Registro ecocardiográfico	45
2.3.3 Análise estatística	45
3 RESULTADOS	47
3.1 O SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS DEPRIME A ELETROGÊNESE E CONDUÇÃO CARDÍACAS	47
3.2 EFEITOS MECÂNICOS E ENERGÉTICOS DE ANTICORPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS NO MIOCÁRDIO DE RATO	48
3.3 ANTICORPOS HUMANOS COM ATIVIDADE MUSCARÍNICA MODULAM A REPOLARIZAÇÃO VENTRICULAR: BASES PARA A ORIGEM DO DISTÚRBO ELÉTRICO	49
4 DISCUSSÃO	51
4.1 ORIGEM DOS AUTOANTICORPOS CONTRA RECEPTORES CARDÍACOS	51
4.2 IMPORTÂNCIA DOS PARASITOS NA PATOGÊNESE DA DOENÇA	54
4.3 ESPECIFICIDADE NA INTERAÇÃO ENTRE AUTOANTICORPOS E RECEPTORES	55
4.4 ATIVAÇÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS	56
4.5 ATIVAÇÃO DE RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS	58
4.6 PAPEL DOS ANTICORPOS ANTI-RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G NA PATOLOGIA DA DOENÇA CARDÍACA	60
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

Esta tese será apresentada no formato de artigos plenos publicados dos quais participo como autora ou co-autora. Neste formato o texto em português compreende uma introdução, objetivos do trabalho seguidos pela descrição sucinta da metodologia utilizada nos trabalhos e dos resultados obtidos e demonstrados nos artigos. O trabalho será encerrado com uma discussão também em português e com as referências bibliográficas utilizadas na tese. Os artigos científicos que constituem o corpo de dados da tese e estão anexados ao final da mesma, estão listados abaixo:

1. COSTA, P.C.S., FORTES, F.S.A., MACHADO, A.B., ALMEIDA, N.A., OLIVARES, E.L., CABRAL, P.R., PEDROSA, GOLDENBERG, R.C., CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C. e MASUDA, M.O.. *Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33: 439-446, 2000.
2. SAVIO-GALIMBERTI E, DOS SANTOS COSTA P, CAMPOS DE CARVALHO AC, PONCE-HORNOS JE. *Mechanical and energetic effects of chronic chagasic patients' antibodies on rat myocardium*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 287(3): H1239-45, 2004.
3. MEDEI, E., PEDROSA, RC, BARBOSA, PRB COSTA, PC, HERNÁNDEZ, CC, CHAVES, EA, LINHARES, V, MASUDA, MO, NASCIMENTO, JHM, CAMPOS DE CARVALHO, AC. Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. International Journal of Cardiology *in press*.2006.

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou Trypanosomíase Americana foi descrita e caracterizada pelo médico sanitário brasileiro Carlos Chagas. Ela é observada apenas no continente americano e está presente em todos os países das Américas do Sul e Central. A doença é endêmica em vinte e um destes países, entre os quais

o Brasil está incluído (WHO, 1991). Atualmente, estimativas dos níveis de infecção giram em torno de 13 milhões de pessoas infectadas, onde 3-3,3 milhões seriam de pessoas com a forma sintomática da doença e uma incidência anual de 200,000 novos casos em 15 países (WHO, 2003).

Essa doença tem como agente etiológico o parasito intracelular *Trypanosoma cruzi* que durante o seu ciclo biológico alterna entre a infecção de insetos hematófagos e mamíferos (CHAGAS, 1909).

São descritas na literatura pelo menos seis formas de transmissão do parasito. O principal mecanismo é a transmissão natural, ou vetorial, que se faz pela contaminação da pele ou mucosa do hospedeiro (mamífero) com as fezes do vetor infectado. Além desse, observamos os seguintes mecanismos secundários de transmissão: a via materno-infantil, a oral, a acidental - em laboratórios, através de transfusão de sangue e por transplante de órgãos (SILVEIRA e VINHAES, 1998).

Desde o início da década de 80, foram tomadas várias iniciativas mais efetivas para controlar o transmissor natural da doença, o barbeiro. Com isto, as taxas de transmissão natural vêm diminuindo paulatinamente (DIAS, *et al*, 2002). Entretanto, ressalta-se a necessidade da vigilância após o investimento inicial para erradicação efetiva da transmissão vetorial (MONCAYO, 2003). Adicionalmente, a transmissão pelas formas transfusional e maternal vem diminuindo em consequência de uma melhora nos métodos laboratoriais de detecção do parasito e/ou infecção nos bancos de sangue, bem como de detecção mais precoce em mães infectadas (RASSI *et al*, 2004).

A fase aguda da doença de Chagas tem início logo após a infecção do hospedeiro. A principal característica desta fase é a presença de altos níveis de parasitos circulantes no sangue e tecidos. Os pacientes infectados apresentam

sintomas pouco específicos como febre, tonteiças, dor de cabeça e mal estar. Uma característica marcante apresentada por parte dos pacientes é o sinal de Romaña, um edema subcutâneo na pálpebra, embora também possa ocorrer em outras regiões no corpo após a picada do inseto vetor. Dentre as alterações sistêmicas observadas destacam-se: o aumento do volume dos linfonodos, do fígado e do baço. Manifestações de comprometimento cardíaco e a meningoencefalite também podem ser relatadas nesta fase, mas são raras (MARCONDES e RASSI, 1994).

Terminada a fase aguda, que tem duração entre dois a quatro meses, observa-se a fase crônica. Esta fase é marcada inicialmente pelo período indeterminado, onde não são detectadas alterações clínicas nos pacientes através da utilização de técnicas convencionais como o eletrocardiograma, o raio X e o exame clínico, ou seja, as alterações observadas na fase aguda regridem e deixam de se manifestar. Este período indeterminado pode durar meses, anos, e até a vida toda da pessoa infectada. Mesmo não se observando dano cardíaco evidente, vários estudos já detectam neste período da doença, a miocardite focal, bem como lesão no sistema de condução cardíaco e deficiência de contratilidade no miocárdio. Estas alterações podem ser evidenciadas com o uso de testes mais sensíveis como o eletrocardiograma de longa duração, o teste de esforço, o ecocardiograma e a biópsia endomiocárdica (PARADA, *et al*, 1997; RIBEIRO e ROCHA, 2000; FUENMAYOR, *et al*, 2005).

Após este período indeterminado da fase crônica, pode ocorrer um retorno à sintomatologia em aproximadamente 35% dos pacientes infectados, ainda que poucos parasitos sejam observados nos órgãos internos que são acometidos como o esôfago, cólon e predominantemente, o coração (27%) (BRENNER, 1992). A seguir, descreveremos com maior detalhe as características observadas na cardiomiopatia

chagásica em sua forma crônica.

1.2 CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA E MECANISMOS DE PATOGÊNESE

A evolução da doença cardíaca crônica ocorre de forma progressiva, lenta e irreversível. Essas características foram apontadas por Carlos Chagas desde 1928 (CHAGAS *apud* PRATA, 1928).

Essa forma da doença induz três tipos principais de alterações, a saber: arritmias cardíacas, alterações da microcirculação e/ou desenvolvimento de insuficiência cardíaca que podem existir associados ou não (ACQUATELA, 1998). A seguir descreveremos com maior detalhe cada uma destas alterações.

As principais arritmias cardíacas observadas ao exame eletrocardiográfico são: o bloqueio de ramo direito, o hemibloqueio anterior esquerdo, a bradicardia sinusal, o bloqueio atrioventricular de primeiro grau ou de graus mais avançados, bem como extrassístoles multiformes, fibrilação atrial e morte súbita (ROSENBAUM, 1964; MARIN-NETO *et al*, 2000).

Várias alterações da microvasculatura são observadas no tecido cardíaco dos pacientes chagásicos em sua forma crônica. Dentre elas se destacam a observação de microespasmos (FACTOR, 1985), de microtrombos (ROSSI, GONÇALVES e RIBEIRO DOS SANTOS, 1984), da disfunção de células endoteliais e do aumento de atividade plaquetária. Estas alterações podem estar envolvidas com a ocorrência de morte celular de miócitos e conseqüente formação de fibrose (MORRIS *et al*, 1990, ROSSI e PERES, 1992).

Com relação à insuficiência cardíaca chagásica, ela é geralmente biventricular

(MARIN-NETO *et al*, 1999). Contudo, postula-se que o ventrículo esquerdo é atingido inicialmente, pois se observa dano em maior grau neste lado, e que depois atinge o lado direito do coração (CARRASCO *et al*, 1983).

Estudos sobre a função ventricular esquerda nos pacientes com a cardiopatia chagásica crônica demonstram que há disfunção tanto da contração, quanto do relaxamento da câmara cardíaca, que estas alterações de função diastólica estão presentes desde o início do desenvolvimento da doença cardíaca (CAIERO *et al*, 1983). Outra alteração morfológica que ocorre tipicamente em pacientes chagásicos com disfunção cardíaca é o aneurisma apical, observação determinada com a utilização da técnica do ecocardiograma (OLIVEIRA *et al*, 1981).

É importante ressaltar que embora sejam encontrados pacientes chagásicos que apresentam alto grau de arritmias e têm a função ventricular preservada, geralmente o registro de um aumento de complexidade de arritmias cardíacas tende a correlacionar-se com o grau de disfunção ventricular avançada (MARIN-NETO *et al*, 1999). Carrasco e colaboradores sugerem que os pacientes chagásicos têm pior função ventricular quando seu eletrocardiograma apresenta arritmias complexas (CARRASCO *et al*, 1990). Este tipo de correlação também foi reportado por outros autores em pacientes que apresentavam lesão na região apical cardíaca, que apresentaram nestes estudos alto índice de arritmias e de morte súbita (ALBANESI e GOMES, 1991; BESTETTI *et al*, 1993). Guerrero e colaboradores selecionaram pacientes com cardiomiopatia chagásica e dilatada com características clínicas similares. A única diferença observada foi a maior presença de arritmias complexas no grupo de pacientes chagásicos, cujo índice de mortalidade relatado foi maior (GUERRERO *et al*, 1991). Mazullo e Chuit indicaram que a presença de bloqueio de ramo direito e alterações primárias de repolarização e/ou presença de zonas de

inativação também estão associadas a maior risco de morte em pacientes chagásicos (MAZULLO e CHUIT, 1999).

A gênese da cardiopatia chagásica crônica é um processo complexo que tem a participação de diversos mecanismos. Dentre eles, podemos ressaltar dois fatores inflamatórios associados à persistência do parasito no hospedeiro e a resposta à múltiplos antígenos do miocárdio (ANEZ, *et al*, 1999; GIRONES e FRESNO, 2003). Estes fatores atuam de forma preponderante na gênese da doença cardíaca crônica (MARIN-NETO *et al*, 1999).

O estudo histológico cardíaco em modelo crônico experimental demonstra a presença de miocardite crônica com degeneração e necrose focal de miócitos associada à presença de infiltrado inflamatório do tipo mononuclear (ANDRADE, 1984, 2000). Além da necrose como mecanismo da morte celular observada em cardiomiócitos e células inflamatórias em Chagas (ANDRADE, 1984; ROSSI e SOUZA, 1999), outro mecanismo importante é a apoptose, ao menos em pacientes que apresentam insuficiência cardíaca (TOSTES *et al*, 2005).

O processo reparativo tecidual, que vem associado à morte celular, induz alterações na matriz extracelular. Em conjunto, estes fatores contribuem para a formação da fibrose intersticial no tecido cardíaco (ANDRADE, 2000). As alterações observadas em nível microvascular podem evoluir para lesões isquêmicas no tecido, e que também participam da gênese de fibrose no miocárdio ventricular, nos nodos sinoatrial e átrio-ventricular e ramo direito do fascículo ântero-superior esquerdo do feixe de His (ANDRADE, 1984). A ocorrência de fibrose em regiões excitáveis do coração está fortemente associada à gênese de distintas arritmias cardíacas e também, à ocorrência de morte súbita. Podemos destacar sua participação na gênese de bradiarritmias e de fibrilação. No segundo caso, o mecanismo proposto

para explicar sua ocorrência seria o aparecimento de heterogeneidades no tecido cardíaco pela existência de regiões de fibrose entremeadas por fibras miocárdicas preservadas. Esta distribuição heterogênea de regiões com características distintas em relação à condução da atividade elétrica do coração cria o substrato anatômico para a gênese do fenômeno de reentrada do estímulo elétrico em região circunscrita ao ventrículo (MARIN-NETO *et al*, 2000).

Outro fator importante que participa da gênese da patologia cardíaca é a presença de disfunção do sistema nervoso autonômico. Esta disfunção é observada tanto no ramo simpático quanto no parassimpático, sendo o segundo o mais acometido (OLIVEIRA, 1985, AMORIN e MARIN-NETO, 1994). Sugere-se que esta alteração poderia também estar associada à gênese de arritmias que são observadas na doença crônica de Chagas como as bradiarritmias (MARIN-NETO *et al*, 2000).

O conjunto de alterações descritas acima evolui para o aparecimento de câmaras ventriculares dilatadas e posteriormente, para o aparecimento da insuficiência cardíaca congestiva nos pacientes. Em suma, o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva é explicado em parte pelos processos reparativo e inflamatório desencadeados no tecido cardíaco o que permite um remodelamento cardíaco, com substituição de células mortas por tecido conjuntivo fibrótico e hipertrofia das fibras miocárdicas remanescentes. O coração ficaria aumentado e perderia a forma elíptica para assumir uma forma globosa e menos eficiente durante a contração (ACQUATELA, 1998; DAVILLA *et al*, 2002). Todo este processo estaria associado, em maior ou menor grau, ao dano do tecido neuronal, às alterações da microvasculatura e da matriz extracelular (HIGUCHI *et al*, 2003).

Neste contexto de remodelamento cardíaco, a resposta imune contra

moléculas do hospedeiro é trazida como uma das características importantes na cardiomiopatia chagásica.

1.3 ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNAS CARDÍACAS

Como vimos nos tópicos acima, distintos componentes entram em ação na gênese da doença cardíaca chagásica. Dentre eles, a resposta imune é apontada como fator importante no desenvolvimento da cardiopatia (HIGUCHI *et al*, 2003, GIRONES e FRESNO, 2003). A presença de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, mesmo na ausência de parasitos, pode ser explicada pela resposta imune deflagrada por eles, mas perpetuada por outros fatores, contra alvos distintos presentes no próprio hospedeiro. A autoimunidade se caracteriza pela interação dos auto-anticorpos ou células T auto-reativas com antígenos do hospedeiro (ROSE, 2001).

Dois mecanismos são citados como importantes para o aparecimento dos autoanticorpos na doença de Chagas: o mimetismo molecular e a ativação policlonal de linfócitos B (GRAUERT *et al*, 1993; GIRONES e FRESNO, 2003). No primeiro deles, existe uma homologia entre antígenos do parasito e do hospedeiro que é responsável pela produção e liberação de autoanticorpos. Pela segunda teoria, durante a resposta do sistema imune ao parasito, há uma ativação indiscriminada de clones de células B que começam a produzir anticorpos contra múltiplos epítomos, inclusive próprios. Os principais antígenos cardíacos reconhecidos por estes autoanticorpos gerados são a miosina e os receptores acoplados a proteína G (KIERSZENBAUM, 2003).

A resposta imune contra a miosina cardíaca foi observada tanto em modelos

animais de infecção pelo *T. cruzi* quanto em modelos de imunização com proteínas do parasito (PONTES-DE-CARVALHO, 2002). Esses trabalhos sugerem que exista reação cruzada entre epítomos do parasito e a miosina, e como foi observado em modelo de imunização, sugere-se que essa resposta dependa do processo infeccioso (CUNHA-NETO *et al*, 1996, ABEL *et al* 1997). Também foi demonstrado que existe resposta humoral contra a miosina cardíaca em pacientes cardiopatas não chagásicos após dano do miocárdio (DE SCHEERDER, *et al*, 1989). Entretanto, é importante ressaltar que quando a miosina cardíaca é utilizada para imunizar animais e é observada resposta humoral e celular contra antígenos do parasito, não se detecta infiltrado inflamatório no miocárdio e tampouco a indução de dano tecidual cardíaco (LEON *et al*, 2004).

Levin e colaboradores defendem a teoria do mimetismo molecular no aparecimento de autoanticorpos em pacientes chagásicos. Seu grupo demonstrou a presença de anticorpos no soro de pacientes chagásicos com acometimento cardíaco. Esses anticorpos reconhecem a região carboxi-terminal de proteína P-ribossomal do *Trypanosoma cruzi* (LEVIN *et al*, 1989, LEVIN *et al*, 1991). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que há reação cruzada entre a porção C-terminal da proteína P-ribossomal de *Trypanosoma cruzi* e a região da segunda alça extracelular do receptor β 1-adrenérgico (FERRARI *et al*, 1995) e do receptor colinérgico m2 muscarínico cardíaco (ELIES *et al*, 1996). Esta hipótese foi corroborada por nosso grupo em estudo subsequente. Verificamos o bloqueio da atividade depressora cardíaca por soros de pacientes chagásicos crônicos quando previamente incubados com peptídeo correspondente à região C-terminal da proteína P-ribossomal P2 β de *T. cruzi* (MASUDA *et al*, 1998).

Vários grupos mostram que os autoanticorpos contra receptores acoplados a

proteína G podem induzir alterações na função cardíaca tanto na contração quanto na atividade elétrica. Borda e colaboradores descreveram a presença de anticorpos contra o receptor β 1-adrenérgico (BORDA *et al*, 1984 e STERIN-BORDA *et al*, 1988) e m2 muscarínico (GOIN *et al*, 1994) em pacientes chagásicos. Estes anticorpos interagem com os receptores como agonistas, em experimentos com preparações de átrio isolado (efeito sobre a contração) de rato adulto e ensaios de ligação (*binding*) realizados com preparação de membrana de átrio de rato.

Nosso grupo reportou a presença de anticorpos com atividade funcional em corações isolados de coelho. Estes anticorpos foram isolados de coelhos cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. As frações que exibiram efeito foram capazes de diminuir a eletrogênese cardíaca ou deprimir a condução átrio-ventricular (AV) provocando bloqueio de condução AV (CAMPOS DE CARVALHO *et al*, 1994).

Posteriormente, observamos o mesmo efeito com o teste de soros de pacientes chagásicos na fase crônica da doença. Do mesmo modo, mostramos a presença de anticorpos na fração de imunoglobulinas dos pacientes chagásicos, com atividade agonista sobre o receptor muscarínico, modulando a eletrogênese cardíaca (FARIAS DE OLIVEIRA *et al*, 1997). Também demonstramos que os anticorpos com ação agonista tipo muscarínica, ao interagir com o receptor e ativá-lo, eram capazes de modular a atividade de canais de cálcio do tipo L, diminuindo sua atividade (HERNANDEZ *et al*, 2003).

A ativação dos receptores cardíacos pelos anticorpos promove desdobramentos na atividade celular cardíaca, ativação de correntes e modulação da atividade contrátil. Esta ativação ocorre de maneira similar a de um agonista atuando sobre o receptor. O anticorpo ao reconhecer o receptor cardíaco, interage

com ele e promove sua ativação. Esta interação ocorre na região da segunda-alça extracelular do receptor (tanto no caso do receptor adrenérgico, quanto no caso do muscarínico). É uma região distinta do sítio de ligação do agonista natural do receptor, que é demarcado pela região de alças transmembrana do receptor e alças extracelulares. Contudo, o reconhecimento do receptor pelo anticorpo e conseqüente ativação, não promove ativação clássica agonista-receptor. Está descrito na literatura que esta interação é mais duradoura, chegando a exercer sua atividade agonista por período prolongado (6 h) sem diminuição do efeito máximo (WALLUKAT *et al*, 2000). Estas observações apontam para a existência de modulação no receptor distinta da que normalmente ocorre com diminuição da atividade do receptor e diminuição do número de receptores na membrana citoplasmática (*desensibilization* e *down-regulation*), modulações que permitem a diminuição da resposta máxima em poucos segundos ou minutos, ainda na presença de ligação do agonista.

Em trabalho recente, nosso grupo traz um novo olhar sobre as características desta interação. Demonstramos, através de ensaios de ligação e funcionais com modelo de coração isolado, a existência de uma interação do tipo alostérico entre o anticorpo e seu receptor alvo. Esta interação promove a facilitação e a manutenção da ativação do receptor pelo agonista natural, dados observados por efeitos na eletrogênese cardíaca ou respostas a ligantes nos ensaios de ligação (HERNANDEZ, 2002).

A utilização de diferentes modelos experimentais tem nos ajudado a elucidar o possível papel de autoanticorpos contra receptores na patogênese de doenças cardíacas. Trabalhos que utilizam imunização de coelhos com os peptídeos correspondentes a segunda alça extracelular de receptores cardíacos m2

muscarínico e beta1-adrenérgico nos mostram que os animais imunizados apresentam cardiopatia. O desenvolvimento da doença tem curso temporal comparável ao aparecimento de títulos altos de anticorpos contra estes receptores (MATSUI e FU, 2001).

Jahns e colaboradores mostraram um papel direto dos autoanticorpos contra receptor β 1-adrenérgico na falência cardíaca (JAHNS *et al*, 2004). Estes autores utilizaram em modelo de transferência de anticorpos gerados contra o receptor beta1-adrenérgico de animais imunizados para animais não imunizados e observaram o desenvolvimento de doença cardíaca no grupo receptor. Os anticorpos desenvolvidos neste modelo também têm atividade agonista sobre o receptor. Este trabalho reforça o papel tóxico da ativação excessiva do receptor β 1-adrenérgico cardíaco e seu papel como indutor da doença cardíaca (JAHNS *et al*, 2004).

Chiale e colaboradores publicaram um importante trabalho que mostra uma associação entre a presença dos anticorpos contra receptores acoplados a proteína G e a ocorrência de arritmias em pacientes cardiopatas. A prevalência de autoanticorpos contra o receptor β 1-adrenérgico foi maior nos pacientes que apresentam arritmias ventriculares. Entretanto, a prevalência de anticorpos contra o receptor muscarínico foi maior em um grupo de pacientes que apresentam a disfunção do nódulo sinusal (CHIALE *et al*, 2001). Este trabalho corrobora a idéia de participação de autoanticorpos como geradores de instabilidade na propagação da atividade elétrica cardíaca nos pacientes chagásicos. Da mesma forma, em estudo utilizando soros de cinco pacientes chagásicos com arritmias ventriculares complexas verificou-se que todos exibiam atividade depressora tipo muscarínica quando testados em modelo de coração isolado de coelho (FARIAS DE OLIVEIRA *et*

al, 1997).

1.4. MODULAÇÃO DO DESEMPENHO CARDÍACO

A função primordial do coração é a de bombear o sangue por toda a circulação. Esta atividade contrátil é precedida pelo processo de propagação da atividade elétrica através do coração.

1.4.1 Atividade elétrica cardíaca

A atividade elétrica cardíaca se inicia em um grupo de células especializadas denominado nódulo sinoatrial ou sinusal. Este sinal gera uma onda de despolarização que culmina na ativação de todo o coração. O bom funcionamento deste processo de propagação elétrica é um dos fatores determinantes da contração rítmica, sincrônica e eficiente do coração.

Durante esta ativação, são geradas as correntes iônicas despolarizantes, essencialmente de sódio e cálcio, que se propagam por todo o coração através de vias de comunicação de baixa resistência entre os cardiomiócitos. Desta forma, ocorre uma transferência de corrente entre as células através de canais protéicos que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas, as junções comunicantes.

1.4.1.1 Junções comunicantes tipo *gap*

As junções comunicantes ou junções tipo *gap* são constituídas pelas conexinas (Cx). Esta proteína formadora do poro na membrana plasmática tem quatro domínios transmembrana de aminoácidos e duas alças extracelulares que

são altamente conservadas entre seus membros. Também apresenta uma alça intracelular e região carboxi-terminal que tem aminoácidos únicos, ou seja, não são conservados como os segmentos extracelulares, e seqüências que são responsáveis pelos diferentes pesos moleculares e propriedades características de cada canal. O poro é formado por duas estruturas chamadas conexons justapostos em células adjacentes, estes são constituídos de hexâmeros da conexina (figura 1).

As células do coração expressam as conexinas Cx43, Cx45 e Cx40, sendo que diferentes regiões do tecido cardíaco expressam distintas quantidades e combinações destas isoformas da proteína. A principal isoforma que constitui as junções comunicantes no coração é a Cx43. Ela é expressa nos músculos atrial e ventricular, bem como na parte distal do sistema de condução His-Purkinjie (VAN KEMPEN *et al*, 1991, KANTER *et al*, 1993 e DAVIS *et al* 1994). A Cx43 também foi identificada no nódulo sinoatrial de coelho e de cão (ANUMONWO *et al*, 1992 e KWONG *et al*, 1998). A expressão da Cx40 no coração é mais restrita que a da Cx43. A Cx40 é expressa em miócitos atriais e nas fibras de Purkinjie do sistema de condução átrio-ventricular, todavia esta isoforma não foi observada nos miócitos ventriculares adultos (KANTER *et al*, 1993; GOURDIE *et al*, 1993). No coração adulto a expressão de Cx45 parece estar restrita ao sistema de condução átrio-ventricular (COPPEN *et al*, 1998).

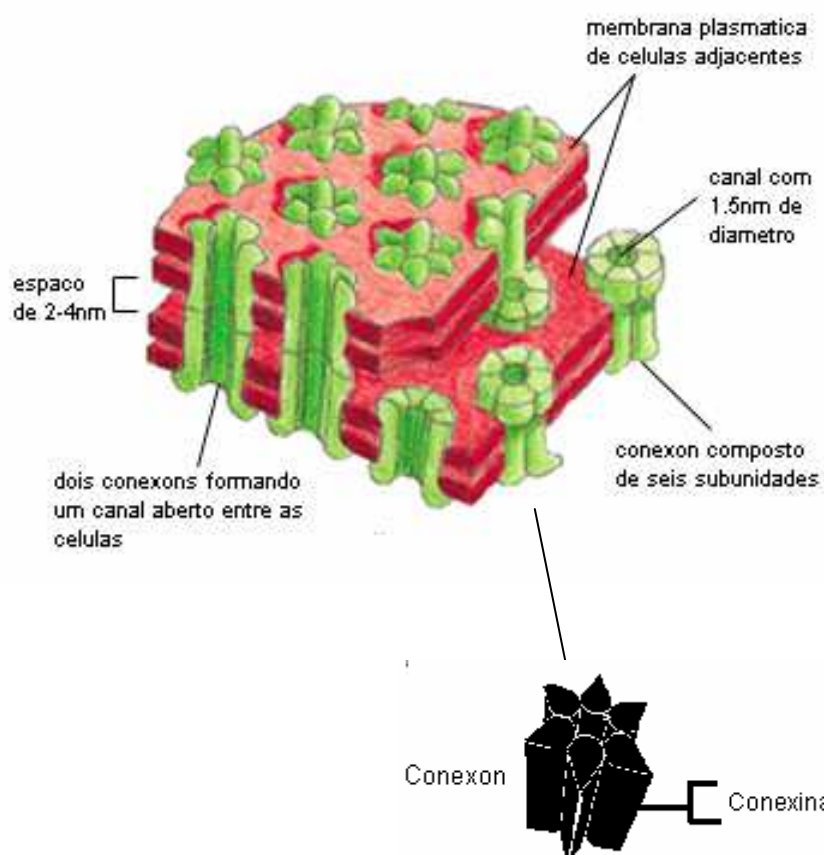


Figura 1: Esquema com modelo estrutural das junções comunicantes e do arranjo topológico das conexinas na membrana plasmática. O esquema representa a interação entre as membranas plasmáticas de duas células adjacentes. A bicamada lipídica de cada uma das células (vermelho) é penetrada por arranjos proteicos chamados conexons (verde), cada qual é formado por seis subunidades proteicas (conexinas). Dois conexons unidos formam um canal aquoso contínuo conectando as duas células adjacentes. Abaixo observamos o conexon e conexinas vistos por outro ângulo (modificado de ALBERT *et al*, 1995).

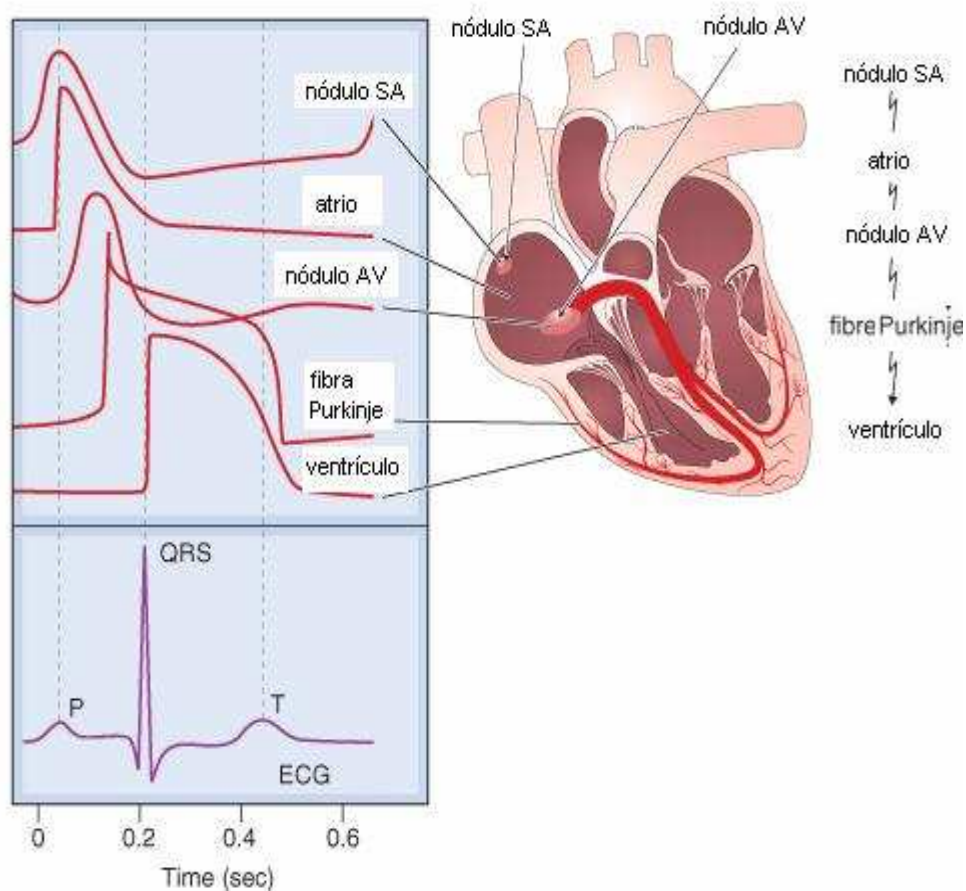
A Cx43 é uma proteína que contém resíduos passíveis de serem fosforilados, e possui várias formas com graus distintos de fosforilação. A fosforilação das conexinas é importante para o arranjo funcional do canal na membrana plasmática, assim como para a modulação de sua estabilidade e localização protéica. Assim, existe correlação entre a forma fosforilada da conexina e sua distribuição nas células (SAEZ *et al*, 1997). Os múltiplos sítios de fosforilação desta proteína são alvos para diferentes quinases e fosfatases, uma delas é a proteína quinase A (PKA). O papel da PKA na regulação das junções comunicantes ainda está em discussão, mas muitos estudos demonstram que ela medeia aumento do acoplamento juncional, principalmente em cardiomiócitos (DHEIN *et al*, 2002). Trabalho recente traz evidências de que a proteína quinase A está mais envolvida no aumento da condutância (*gating*) da Cx43, enquanto que na verdade uma outra proteína, ativada por ela, atua na maturação das proteínas. Desta maneira, quando ativada, induz acúmulo da proteína juncional na membrana (SOMEWAKA *et al*, 2005).

1.4.1.2 Propagação da atividade elétrica cardíaca

A atividade elétrica cardíaca é gerada num grupo especializado de células localizado perto da junção do átrio direito com a veia cava superior, o nódulo sinusal ou sinoatrial. Este grupo de células apresenta atividade marcapasso, ou seja, tem a capacidade de gerar espontaneamente potenciais de ação do tipo lento em sua membrana. O potencial elétrico da célula é o registro da diferença entre o potencial elétrico do lado intracelular em relação ao extracelular da membrana citoplasmática. Variações no potencial transmembrana em diferentes tipos celulares do coração estão representadas na figura 2. Em A da figura 2 observamos uma série de registros de potenciais de ação de distintas regiões do coração e a localização

destas regiões no esquema ao lado (figura 2).

O sinal elétrico aí gerado propaga-se para as regiões adjacentes, assim, há a formação de ondas concêntricas na direção para baixo e para a esquerda, o que ativa a massa contrátil atrial direita e esquerda, região cujo potencial de ação gerado é do tipo rápido. A seguir, o sinal chega à região do nódulo átrio-ventricular, situado na base do septo interatrial, que tem características similares às do nódulo sinusal. A velocidade de propagação da onda de despolarização é diminuída nesta região. Isso ocorre principalmente porque o potencial de ação destas células é do tipo lento. Essa diminuição na velocidade de propagação da atividade elétrica cardíaca proporciona um intervalo entre a ativação atrial e a ventricular, e permite a sua contração após a contração atrial, e um enchimento cardíaco mais eficiente. A seguir, o estímulo elétrico atinge uma região de contato elétrico entre átrios e ventrículos: o feixe de His, que está em continuidade com as fibras de Purkinje, e juntos constituem um sistema de condução do sinal elétrico altamente especializado. Esta região tem potencial de ação do tipo rápido e expressa as isoformas 40 e 43 de conexinas. Estas características, somadas à organização estrutural das fibras permitem a condução do sinal elétrico com alta velocidade para a massa contrátil ventricular, onde o sinal passa a propagar-se célula a célula e ocorre a ativação, quase que simultânea, dos ventrículos (figura 2).



© Elsevier Ltd. Rang et al: Pharmacology 5E www.studentconsult.com

Figura 2: Propagação da atividade elétrica no coração. **A.** Potenciais de ação de distintas regiões do coração, assinaladas ao lado. **B.** Figura esquemática de coração com corte transversal. Observe algumas regiões marcadas que estão envolvidas na ativação elétrica do coração e a seqüência de ativação entre elas (vide texto) .**C.** ECG - Eletrocardiograma em correspondência temporal com os registros intracelulares das regiões ativadas (em A). SA – sinoatrial. AV - átrio-ventricular. Modificado de Rang *et al* 2004.

O eletrocardiograma (ECG) é o registro extracelular da diferença de polaridade gerada entre diferentes pontos do coração durante a propagação desta onda de ativação. Um traçado típico do eletrocardiograma está exemplificado na letra C da figura 2. Neste traçado podemos distinguir três ondas importantes: as ondas P, QRS e T. A primeira é o registro da onda de ativação atrial. É uma onda que tem forma arredondada e baixa amplitude. Segue-se um intervalo até que se registre a próxima onda. Isto ocorre porque neste período se dá a ativação do nódulo átrio-ventricular e sistema de His-Purkinjie, que têm pequena massa para que sua atividade elétrica possa ser detectada na superfície. Quando se dá a ativação ventricular, há o registro de uma deflexão predominantemente positiva de grande amplitude, o complexo QRS, já que conta com maior massa tecido sendo ativada, e de pouca duração, dada a presença de sistema de condução do sinal elétrico, a rede de Purkinjie. Esta ativação ocorre a partir da região do endocárdio, onde terminam as fibras de Purkinjie, para o epicárdio. No ECG, após o complexo QRS, segue-se outra região isoelétrica. Neste momento, as células ventriculares cardíacas estão todas despolarizadas assim, não existe diferença de potencial elétrico entre diferentes regiões do coração para que se registre deflexão elétrica no ECG. Quando as células cardíacas começam a voltar para o potencial de repouso, isto ocorre inicialmente no epicárdio e depois no endocárdio, gerando uma diferença de potencial elétrico entre estas duas regiões, responsável pela onda T do ECG. Esta onda tem a forma arredonda de grande amplitude e de maior duração que a anterior, pois a propagação da repolarização é um processo que ocorre célula a célula. A seguir, falaremos sobre os potenciais de ação de distintas regiões cardíacas e as principais correntes iônicas envolvidas.

1.4.4.3 Potenciais de ação rápido e lento

Como descrito acima, as regiões dos nódulos sinusal e átrio-ventricular cardíacos geram potenciais de ação do tipo lento. Enquanto as demais regiões (feixe de His-Purkinje e tecidos contráteis atrial e ventricular) apresentam potenciais de ação do tipo rápido. A figura 3 nos mostra estes dois tipos de potencial de ação e cada fase de sua evolução.

Nas células com potencial do tipo rápido, um estímulo supralimiar deflagra o potencial de ação por ativação dos canais rápidos de sódio (fase 0) e a inativação da corrente I_{K1} (efluxo), observado por uma deflexão inicial de inclinação bem acentuada no registro do potencial de ação. Essa despolarização também ativa os canais de potássio transientes de efluxo, I_{to} , e de cálcio, I_{CaL} . A primeira corrente traz o potencial da membrana para valores menos positivos (fase 1). A seguir, com o aumento de I_{CaL} há um equilíbrio entre as correntes de efluxo e influxo (cálcio pelo canal e pelo trocador de sódio e cálcio Na/Ca), o que mantém o potencial da membrana mais ou menos constante, configurando um platô ou fase de repolarização lenta (fase 2). Quando os canais de cálcio são inativados, a corrente carregada por potássio (I_K , retificador retardado) excede o influxo catiônico e inicia o processo de repolarização no potencial de membrana. No final da fase 2, I_{KR} tem sua densidade de corrente aumentada. Assim, a voltagem da membrana cai para valores negativos na etapa de repolarização rápida, fase 3. I_{K1} começa a ser ativado no final da fase 3 e predomina na fase 4, quando mantém o potencial de membrana constante em valores bem negativos, próximos ao potencial de equilíbrio do potássio, potencial de repouso (fase 4).

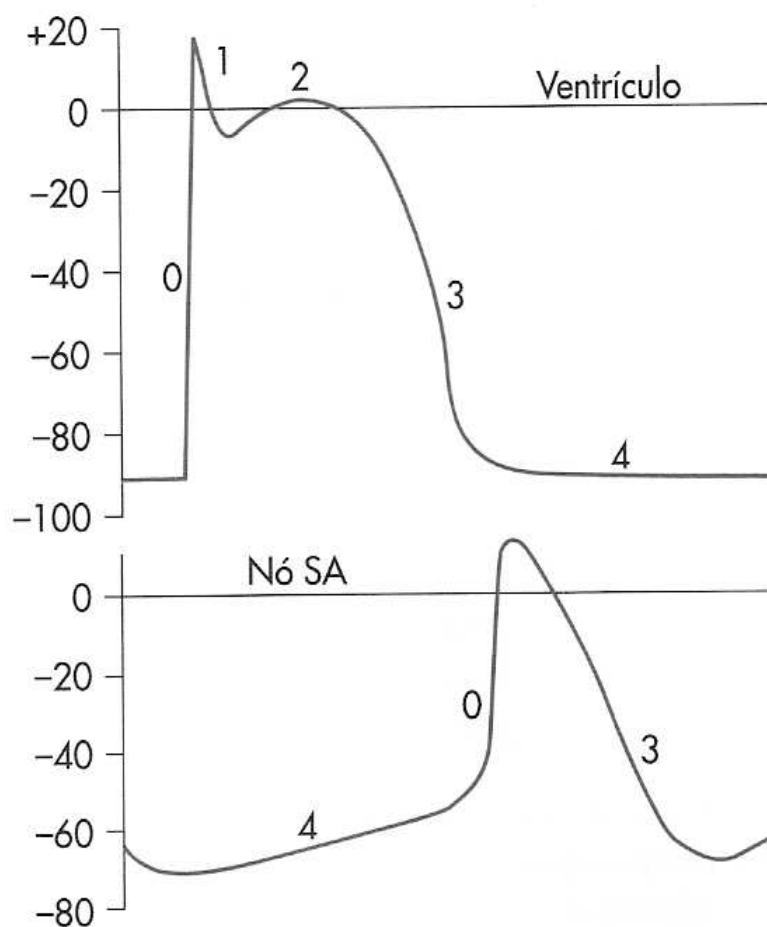


Figura 3: Potencial de ação e suas fases de ativação. Potenciais de ação típicos registrados em uma célula ventricular, rápido (**A**) e do nódulo sinusal, lento (**B**). A escala de tempo de B é o dobro da utilizada em A. Para explicações vide texto. Retirado de Berne *et al*, 2004

É importante ressaltar que existem algumas variações nas densidades destas correntes dependendo do tipo celular observado o que pode refletir em variações nas durações das fases descritas, embora as características gerais se mantenham.

A principal característica do potencial de ação do tipo lento é a fase inicial de ativação (fase 4), a despolarização diastólica lenta, onde o potencial de membrana não é estável. Isto ocorre principalmente porque estas células não expressam canais para I_{K1} e apresentam uma corrente de *background* não seletiva. A membrana não permanece em um potencial de repouso como nas células acima descritas; e o potencial diastólico máximo destas células é em torno de -65mV , voltagem em que os canais de sódio estão parcialmente inativos. O processo de desativação de canais de I_K permite que as correntes despolarizantes comecem a levar o potencial de membrana lentamente para valores menos negativos. Inicialmente se dá a ativação de I_f , carregada por sódio e potássio, e num segundo momento a ativação dos canais de cálcio tipo T e tipo L (fase 4). O segundo deles tem maior condutância e é importante na fase 0, quando o limiar de excitabilidade (-45mV) da célula é alcançado e o potencial de ação é deflagrado. A inativação destes canais diminui o influxo de íons positivos. A despolarização do potencial de membrana na fase 0, ativa os canais de potássio I_K . Este fenômeno associado à inativação de I_{CaL} levam a membrana da célula a valores negativos de potencial e configuram a fase 3 do potencial de ação.

1.4.2 Acoplamento excitação-contração

Numa célula cardíaca os níveis citoplasmáticos de cálcio se elevam de uma concentração de 10^{-7}M no repouso para 10^{-3}M no estado ativo (ALVAREZ *et al*, 1999). Estas variações de concentração do cálcio são essenciais para que a contração e o relaxamento ocorram. A concentração deste íon é extensamente regulada através de proteínas integrais da membrana citoplasmática e sarcoplasmática, dentre elas o trocador sódio e cálcio e as bombas de cálcio da membrana citoplasmática e do retículo sarcoplasmático.

Em resposta à despolarização da membrana citoplasmática os canais de cálcio tipo L se abrem e ocorre o influxo de cálcio na célula cardíaca. Este influxo permite que a concentração local de cálcio do lado intracelular da membrana citoplasmática, próximo aos canais, alcance níveis bem elevados. Este aumento na concentração de cálcio ativa o receptor de rianodina, tipo 2, que se abre e permite a saída de cálcio do principal estoque intracelular, o retículo sarcoplasmático, para o citoplasma. O retículo sarcoplasmático está em associação íntima com a membrana plasmática de células cardíacas em estrutura especializada de membrana, o túbulo T. Deste modo, este constitui o mecanismo clássico onde cálcio induz a liberação de cálcio após a entrada por canais de membrana voltagem dependente. Assim, o retículo contribui com 75% do cálcio para a contração e os canais da membrana contribuem com o restante. Este fenômeno de liberação do cálcio é graduado, e pode intensificar-se quando o retículo tem mais cálcio ou quando a entrada de cálcio pela membrana é acentuada (CALLEWAERT, 1992).

Acredita-se que a despolarização permita que ocorra uma inversão no fluxo do trocador sódio/ cálcio de forma transiente. A entrada de sódio pelos canais

rápidos de membrana promove um acúmulo destes íons na região próxima à membrana, assim ocorre a reversão do trocador e a entrada de cálcio na célula cardíaca é facilitada.

O relaxamento ocorre após o seqüestro do cálcio do citoplasma para o lúmen do retículo sarcoplasmático pela bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, a SERCA subtipo 2a. Esta captação corresponde a 75% do fluxo de cálcio que ocorre para restabelecimento dos níveis de cálcio no repouso, os restantes 25% são obtidos com a atividade da bomba de cálcio da membrana citoplasmática e do trocador sódio/cálcio. A participação da mitocôndria neste processo é muito pequena, em torno de 1%, mas pode se intensificar quando os níveis intracelulares de cálcio aumentam muito.

1.4.3 Energética da contração

O fluxo total de energia no miocárdio pode ser dividido em dois termos: a energia liberada durante o metabolismo basal e a energia do processo de excitação/ contração e relaxamento, ou seja, no estado ativo. Normalmente se avalia a energia total liberada pelo tecido/ órgão em estudo no estado ativo, a energia total, e no estado de repouso, para obtenção da energia basal. A energia total liberada menos o valor no repouso, corresponde ao valor no estado ativo.

O calor liberado pela célula durante o repouso corresponde a dois processos principais: a) controle da concentração iônica intracelular e b) energia de recuperação, que seria fruto da síntese protéica (manutenção da integridade funcional e estrutural do músculo) e da síntese de novo de ATP após a contração.

A energia liberada durante o estado ativo do músculo vem de processos: 1)

dependentes da geração de força, e 2) independentes de força gerada. O primeiro está relacionado à ciclagem de pontes actina-miosina após a quebra de ATP e conseqüente geração de força. O outro processo que ocorre após estímulo sem que seja gerada força, corresponde a ciclagem de cálcio que ocorre durante a contração muscular.

1.4.4 Modulação pelo sistema nervoso autônomo

A ativação do sistema nervoso autonômico simpático confere ao coração efeito **cronotrópico**, **dromotrópico**, **inotrópico** e **lusitrópico** positivos.

O ramo simpático do sistema nervoso autonômico inerva os nódulos cardíacos e o tecido ventricular. O principal neurotransmissor liberado pelos terminais sinápticos é a noradrenalina, reconhecida por receptores adrenérgicos majoritariamente do tipo β_1 nos cardiomiócitos. Os receptores cardíacos para os neurotransmissores do sistema nervoso autônomo são receptores transmembrana associados à proteína G.

A ligação do neurotransmissor noradrenalina em seu receptor promove a dissociação da proteína G. A subunidade α_s do complexo protéico interage com a adenilato ciclase, ativando-a e causando o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico. Este segundo mensageiro ativa a quinase A (PKA), que tem vários alvos na célula cardíaca e medeia a maior parte dos efeitos da noradrenalina. Existem sítios para fosforilação por PKA nos canais de I_f , I_{CaL} , I_{KR} e I_{Cl} .

Além da modulação por fosforilação, a NE induz seus efeitos através da interação da subunidade alfa estimulatória da proteína G com os canais de I_{CaL} e de I_f .

A ativação destes canais induz maior velocidade de despolarização diastólica lenta, parte deste efeito é obtido pela modulação de I_{CaL} (parte final da fase 4). Este aumento de corrente de influxo, que a princípio aumentaria a duração do potencial de ação, é contrabalançado pela modulação de I_{KS} e I_{Cl} , que diminuem a duração do potencial de ação e preservam a fase de enchimento diastólico. I_{Cl} tem potencial de equilíbrio em torno de -50 mV. Sua modulação na fase do platô do potencial de ação permite que a repolarização seja mais precoce e também aumenta a excitabilidade da célula cardíaca. Estas variações no potencial de ação das células marcapasso permitem um aumento na frequência cardíaca (**cronotrópico** positivo).

O aumento da condutância intercelular pela modulação das conexinas e a modulação do potencial de ação no nódulo atrioventricular (assim como nas células do nódulo sinusal) melhoram a condução atrioventricular e resultam num aumento da velocidade de propagação da atividade elétrica cardíaca, ou seja, efeito **dromotrópico** positivo.

Nas células de trabalho ventriculares, o aumento da densidade de corrente através dos canais do tipo L na membrana plasmática é percebido pelos receptores de rianodina. Estes receptores que têm sensores para o íon cálcio, sofrem mudança conformacional, permitem a saída de maior quantidade de cálcio dos estoques intracelulares (maior número de receptores atuando sincronamente e maior quantidade Ca^{2+} liberado por receptor de rianodina), e promovem uma contração acentuada, tendo efeito **inotrópico** positivo. Adicionalmente, o receptor de rianodina, um receptor para cálcio na membrana do retículo sarcoplasmático, tem sítio de fosforilação para PKA e pode ter sua atividade modulada frente a uma ativação beta-adrenérgica.

A estimulação beta-adrenérgica, e conseqüente ativação da proteína quinase

A induz a fosforilação da proteína reguladora da atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático - SERCA, a fosfolambam, localizada na membrana do retículo sarcoplasmático. Sua fosforilação permite uma maior atividade ATPásica pela SERCA e se reflete em uma captação de cálcio mais rápida, assim como o relaxamento (**lusitropismo**). Da mesma forma, a maior captação reflete-se num retículo mais carregado de cálcio e conseqüente liberação aumentada na contração seguinte, contribuindo para o efeito inotrópico positivo.

Já no ramo parassimpático do sistema nervoso autônomo, a acetilcolina é o principal neurotransmissor liberado nos terminais sinápticos. Seus efeitos nas células cardíacas são antagônicos aos efeitos do ramo simpático do sistema nervoso autônomo.

Seus principais efeitos nas células nodais são a hiperpolarização da célula e a diminuição na taxa de despolarização celular na despolarização diastólica lenta.

Outro mecanismo de ação é via modulação dos receptores acoplados à proteína G, subtipo m2. A interação do agonista com o receptor induz dissociação da proteína G trimérica que se dissocia nas subunidades alfa e beta/gama. A subunidade alfa inibitória modula negativamente a adenilato ciclase, promovendo efeitos contrários aos descritos para a noradrenalina. As outras subunidades interagem com os canais de I_{KAch} e modulam sua atividade. As subunidades beta—gama liberadas atuam diretamente nos canais de potássio (I_{KAch}), aumentando sua condutância, o que induz a hiperpolarização da membrana e diminui a duração do potencial de ação. No nó SA esta hiperpolarização se traduz na maior negatividade do potencial diastólico prévio, dificultando a deflagração de novo PA. Estes canais de potássio modulados por acetilcolina são expressos nos nódulos sinusal, átrio-ventricular e nos átrios.

Ao modular negativamente a atividade de adenilato ciclase, a acetilcolina produz efeitos inversos ao neurotransmissor noradrenalina e é capaz de diminuir a frequência cardíaca e prolongar a condução atrioventricular. Seu efeito indireto sobre a contração ventricular é pouco evidente visto que a inervação parassimpática nesta região é escassa.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Utilizando como ponto de partida os trabalhos previamente realizados em nosso laboratório, nos propomos a:

Avaliar o desempenho cardíaco durante a ativação de receptores cardíacos via interação destes com anticorpos de pacientes chagásicos crônicos.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a resposta muscarínica e adrenérgica do soro de pacientes chagásicos crônicos na função elétrica cardíaca;
2. Descrever o desempenho mecânico e energético ventriculares em presença da fração de imunoglobulinas de pacientes chagásicos com efeito beta-adrenérgico;
3. Avaliar a repolarização ventricular na presença de anticorpos do soro de pacientes chagásicos crônicos com efeito muscarínico;

2 METODOLOGIA

2.1 ESTUDO DA FUNÇÃO ELÉTRICA CARDÍACA

Para avaliar os efeitos produzidos pelo soro na função elétrica cardíaca, usamos corações de coelhos adultos isolados e perfundidos pelo método de Langendorff modificado. O protocolo experimental consistiu no registro do eletrocardiograma num período inicial de 20 a 30 min com perfusão de solução controle com ou sem antagonista dos receptores muscarínico e β -adrenérgico, atropina ou propranolol (10^{-6} M), seguido de perfusão com soro de paciente chagásico crônico diluído 1:100 na solução controle, e finalmente a lavagem com solução controle.

Através do registro contínuo do eletrocardiograma, analisamos a frequência cardíaca pela presença de ondas P, a condução átrio-ventricular pelo intervalo PR e a repolarização ventricular pelo intervalo QT.

2.2 ESTUDO DA MECÂNICA E ENERGÉTICA VENTRICULAR

Nesta etapa, estudamos o efeito sobre a função contrátil cardíaca da fração de imunoglobulinas presentes no sangue de paciente chagásico crônico com efeito β -adrenérgico. Para tal, utilizamos modelo de Langendorff modificado. Este modelo consistiu na perfusão de ventrículos isolados de ratos com solução fisiológica, a temperatura controlada de 25°C, dentro de um calorímetro (figura 4). Esta configuração nos permitiu a avaliação das variações de calor liberado pelos ventrículos.

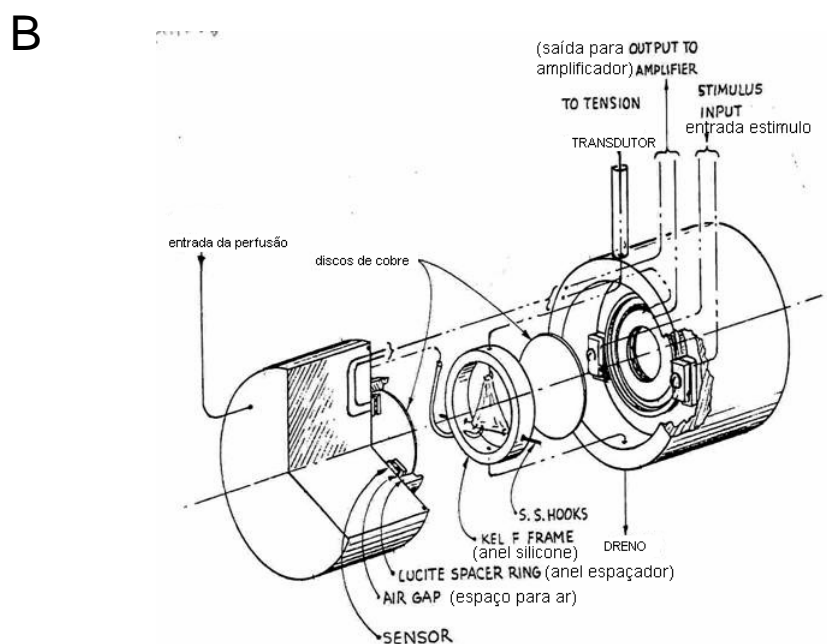
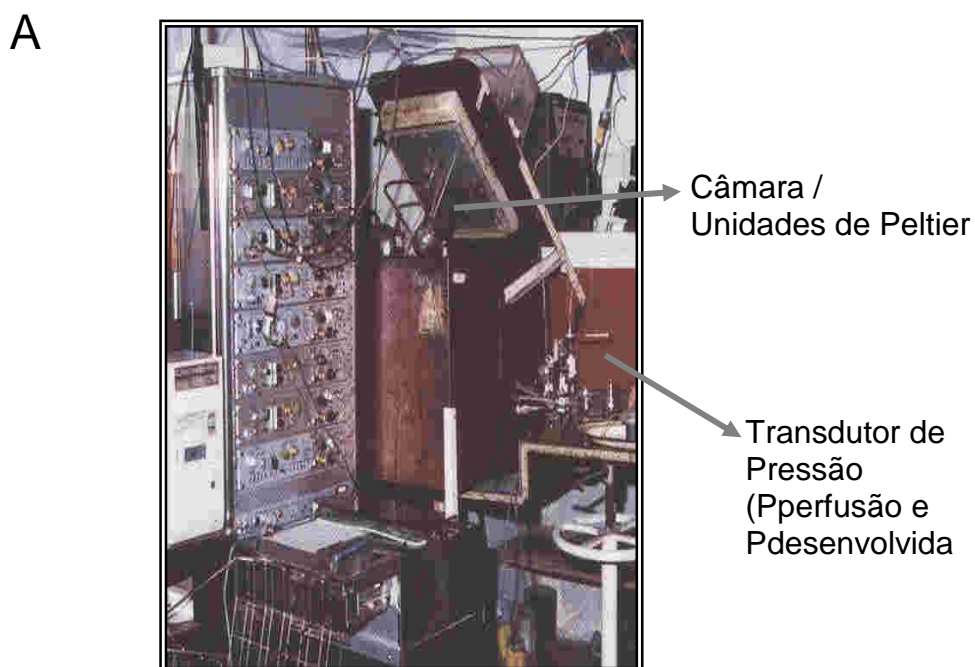


Figura 4: Modelo para estudo do desempenho cardíaco. A. Câmara de calorímetro. B. Esquema de câmara de detecção de calor composto por sensor (unidades de Peltier) separado da amostra por discos de cobre. O ventrículo fica encaixado no anel no centro da figura, onde existem saídas para o transdutor de pressão, de perfusão e para o estimulador.

Avaliamos como parâmetros do desempenho cardíaco, a pressão desenvolvida (P) e o calor liberado pelo músculo nos estados de repouso e de contração (artificialmente estimulado).

A fração de imunoglobulinas, purificada com o uso de coluna de Sepharose-proteína A, foi perfundida durante o período experimental na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ diluída em solução Krebs, cuja composição em mmol/L era: 110 NaCl, 5.5, KCl, 0.5 CaCl_2 , 1.3 MgCl_2 , 25 NaHCO_3 , 1.2 NaH_2PO_4 , e 6.0 glicose. A solução era mantida constantemente borbulhada com mistura de gás contendo 5% de CO_2 e 95% de O_2 .

Realizamos os registros dos parâmetros mecânicos e miotérmicos durante os estados ativo e de repouso estacionário com perfusão de solução controle ou perfusão de fração de imunoglobulinas (NCh /Ch) (figura 5).

Medidas mecânicas e energéticas:

Pressão desenvolvida: **P** (mN.mm)

Energia liberada pelo músculo em repouso **Hr**

Energia total liberada **Ht**

Energia total liberada por batimento **H't** = Ht / f

Freqüência de estimulação **f** = 0,16Hz

Energia estado ativo por batimento **H'a** = (Ht-Hr)/f

Economia muscular global **H't/P** máxima

Economia muscular contrátil **H'a/P** máxima

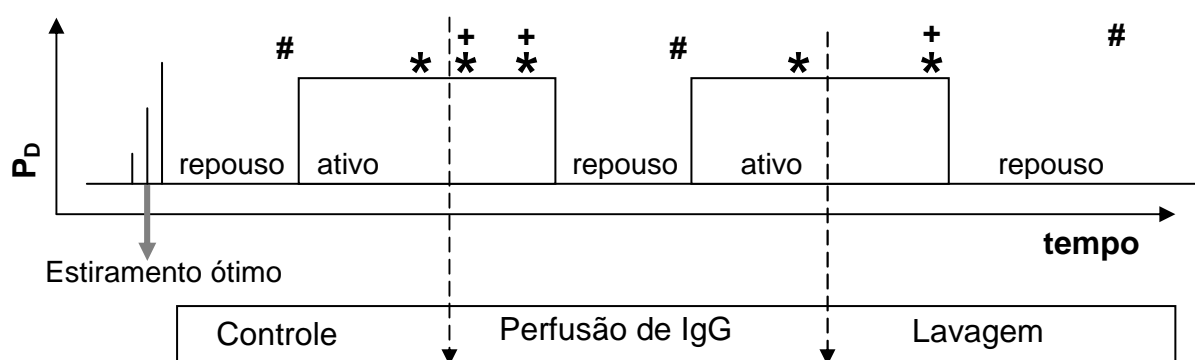


Figura 5: Gráfico esquemático de pressão desenvolvida (P_D , eixo y) por tempo (eixo x) com protocolo experimental para avaliação do desempenho cardíaco. Inicialmente, determinamos o estiramento ótimo para desenvolvimento de pressão. Segue-se então, o período de repouso. No período seguinte, coração é artificialmente estimulado, estes dois estágios constituem o período controle. A transição para os períodos seguintes é feita com o coração no estágio ativo, aí seguem-se novamente um estágio de repouso e um estimulado. Assim são feitas as medidas de pressão desenvolvida (*) e de calor de repouso (#) e calor total (+) nos momentos representados.

2.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES CHAGÁSICOS

Acompanhamos 32 pacientes chagásicos do dr. Roberto Coury Pedrosa na Clínica de Cardiomiopatias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. O diagnóstico da doença de Chagas foi realizado através da presença de anticorpos contra o *Trypanosoma cruzi* com os testes de imunofluorescência indireta e hemoaglutinação. Em caso de divergência de resultados foi realizado o teste de ELISA, utilizando o antígeno cruzipaína. Utilizamos no estudo apenas os pacientes que apresentaram sorologia negativa para doenças como rubéola, hepatite e AIDS nos testes de rotina em banco de sangue e que não apresentaram doença cardíaca de qualquer outra etiologia.

2.3.1 Avaliação eletrocardiográfica dos pacientes e parâmetros de repolarização

Avaliamos o eletrocardiograma nas 12 derivações. Não consideramos a presença de defeitos de condução ventriculares completos ou incompletos, como critério de exclusão. Definimos áreas eletricamente inativas pela presença de onda Q patológica ao exame eletrocardiográfico e defeito de condução intraventricular pela presença de bloqueio de ramo direito e/ou bloqueio fascicular anterior esquerdo.

Nesse processo de seleção, excluimos pacientes com ritmo não sinusal, bloqueio átrio-ventricular de alto grau, número de batimentos ventriculares prematuros ou supra-ventriculares maior que 30 por hora no registro de longa duração (Holter de 24 hs) caso não tivessem marcapasso implantado previamente.

No estudo da repolarização ventricular *in vivo* utilizamos como parâmetros de avaliação a dispersão do intervalo QT (**QTd**), definida como a diferença entre o maior intervalo e o menor intervalo QT medido nas 12 derivações; a duração máxima do intervalo QT (**QTmax**) definida como a mais longa duração do intervalo QT do registro eletrocardiográfico avaliado e o QT máximo corrigido (**QTcmax**) pelo intervalo RR com a fórmula de Bazett.

2.3.2 Registro ecocardiográfico

Realizamos registro do ecocardiograma bidimensional e no modo M para cada paciente. Utilizamos como parâmetros a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (LVEF, %), calculada pelo método de Simpson e, o índice do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (LVEDD, mm/m²), calculado pelo quociente do diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole pela área de superfície corporal.

2.3.3 Análise estatística

Expressamos as variáveis contínuas em média \pm erro padrão da média (SEM) e as variáveis categóricas em razões ou percentagens. Utilizamos o teste de Shapiro-Wilks para verificar a normalidade das variáveis. Comparamos as variáveis contínuas pelo teste T de Student não-pareado ou pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Realizamos comparação entre os efeitos dos soros na atividade elétrica com o teste de ANOVA (one-way analysis of variance) para medidas repetidas, com pós teste de Newman-Keuls.

Avaliamos a correlação entre a dispersão do intervalo QT observada dos

pacientes (*in vivo*) e o intervalo QT medido nos testes *in vitro* pelo coeficiente de Pearson e aplicamos o teste T de Student à correlação. Quando houve diferença significativa entre os sobreviventes ou não sobreviventes, ajustamos os grupos em um modelo de regressão logística multivariada, utilizando seleção de variáveis por *stepwise* para excluir co-variáveis e identificar preditores de morte cardíaca durante o seguimento, validando o resultado. O valor de significância considerado foi 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 O SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS DEPRIME A ELETROGÊNESE E CONDUÇÃO CARDÍACAS

Inicialmente, caracterizamos a prevalência de anticorpos com atividade funcional sobre o coração. Utilizamos a observação eletrocardiográfica de corações de coelho isolados pelo método de Langendorff modificado como modelo experimental. Estudamos a modulação exercida pelos anticorpos contra receptores cardíacos acoplados a proteína G na condução átrio-ventricular e eletrogênese cardíacas.

Observamos que dos 58 soros testados, 20 diminuíram a frequência cardíaca, 10 aumentaram e 22 não alteraram esse parâmetro (figuras 1 e 2). Dos soros de pacientes que diminuíram a FC, 12 tiveram seu efeito revertido na presença de atropina 10^{-6} M (figura 3, traçados superiores), denotando ação depressora via ativação do receptor muscarínico. Os soros que aumentaram a FC tiveram seu efeito bloqueado pelo antagonista β -adrenérgico, propranolol (figura 3, traçados inferiores). 20 dos 58 soros testados bloquearam a condução AV (figura 4, A). Destes soros, 12 induziram efeito via ativação do receptor muscarínico. A outra parcela dos soros com atividade depressora na FC e na condução AV não teve seu efeito bloqueado pelo antagonista atropina.

A modulação sobre o acoplamento intercelular pelos soros foi outro ponto avaliado pelo trabalho. Para tal, testamos soros em culturas de ventrículos de camundongos embrionários e avaliamos o efeito sobre o espalhamento de corante *Lucifer yellow* injetado nas células. Utilizamos dois soros com efeito tipo β -adrenérgico sobre a FC nos ensaios funcionais. Observamos a diminuição no grau

de acoplamento intercelular das culturas de cardiomiócitos após 24 hs de incubação com os soros diluídos.

3.2 EFEITOS MECÂNICOS E ENERGÉTICOS DE ANTICORPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS NO MIOCÁRDIO DE RATO

Testamos imunoglobulinas isoladas de paciente chagásico crônico sobre o desempenho cardíaco. Avaliamos a mecânica (pressão desenvolvida, P) e a energética cardíaca (**Hr** calor liberado no repouso, **H'a** calor liberado no estado ativo por contração, **H't** calor total liberado por cada contração muscular) na presença dessas imunoglobulinas que exibiram efeito β -adrenérgico em coração isolado de coelho.

Inicialmente, detectamos aumento na pressão desenvolvida. Esse efeito foi acompanhado por aumento na velocidade de relaxamento cardíaco e aumento no calor total liberado pelo músculo, com aumento na relação H e P, ou seja, menor eficiência na contração.

Essa alteração na pressão desenvolvida foi revertida ainda durante a perfusão da fração IgG e chegou a um novo valor de pressão, abaixo do controle. O novo estado mecânico foi acompanhado pela diminuição do calor liberado pelo músculo cardíaco no estado de repouso (**Hr_{ch}** 4.8 ± 0.9 mW/g) e manutenção dos valores de H'a (estado ativo). A energia total liberada pelo músculo no estado ativo também diminuiu. Assim, as economias global e contrátil muscular foram alteradas, com aumento da quantidade de calor liberado pelo músculo por unidade de pressão gerada, denotando piora na eficiência contrátil deste músculo.

Observamos uma diminuição na pressão desenvolvida na presença da fração

IgG de doadores normais, acompanhada por queda no calor liberado pelo músculo durante a contração (H'a), enquanto o calor total liberado pelo músculo se manteve inalterado. Assim, essa variação reversível em ambos os parâmetros, H'a e P, resultou na manutenção da economia contrátil (H'a/P) e global H't/P.

3.3 ANTICORPOS HUMANOS COM ATIVIDADE MUSCARÍNICA MODULAM A REPOLARIZAÇÃO VENTRICULAR: BASES PARA A ORIGEM DO DISTÚRBO ELÉTRICO

Avaliamos, em estudo longitudinal retrospectivo, a relação de autoanticorpos contra o receptor muscarínico com a heterogeneidade na repolarização ventricular.

Testamos o efeito direto dos anticorpos contra o receptor muscarínico na repolarização ventricular em ensaio de coração isolado de coelho (figura 2). Verificamos que a repolarização foi prolongada de maneira reversível na presença dos autoanticorpos ($p=0,002$). Este efeito foi bloqueado quando testado na presença de atropina, antagonista do receptor muscarínico.

A dispersão do intervalo QT no grupo de pacientes com anticorpo muscarínico ($75,9\pm 5,5$ ms) foi maior que no grupo que não tinha anticorpos com atividade muscarínica ($51,3\pm 4$ ms), entretanto os valores do intervalo QT corrigido e QT máximo não foram diferentes entre estes grupos (figura 1). É importante ressaltar que observamos a correlação entre a diferença na duração do intervalo QT avaliado nos ensaios *in vitro* e o grau de dispersão do intervalo QT medido no eletrocardiograma dos pacientes chagásicos, $p < 0,0003$, $r = 0,65$ (figura 3).

Ao longo de 10 anos, 10 dos 32 pacientes faleceram, 7 deles apresentavam anticorpos contra o receptor muscarínico. A análise logística multivariada *stepwise*

permitiu identificar as variáveis intervalo QT máximo corrigido ($p < 0,03$) e índice de diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ($p < 0,02$) como preditores independentes de morte cardíaca na doença de Chagas crônica.

Em suma, este trabalho mostra a associação entre a presença de anticorpos capazes de modular a repolarização *in vitro* e o aumento na dispersão da repolarização ventricular *in vivo*.

4 DISCUSSÃO

A seguir, pretendemos discutir de forma mais geral o corpo de dados encontrados nos artigos que compõe a tese. Os tópicos mais específicos de cada trabalho estão debatidos nos mesmos.

Autoanticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos interagem com a segunda alça extracelular dos receptores cardíacos β 1-adrenérgico e muscarínico subtipo m2, e assim modulam o desempenho cardíaco. Essa modulação produz mudanças elétricas, mecânicas e no metabolismo cardíaco. A ativação dos receptores muscarínicos diminuiu a frequência cardíaca, bloqueou a condução átrio-ventricular e prolongou o tempo de repolarização ventricular. Ainda, a ativação dos receptores β -adrenérgicos produziu aumento da frequência cardíaca, aumento da pressão desenvolvida e diminuição na eficiência contrátil.

Encontramos associação entre a presença de autoanticorpos no soro dos pacientes chagásicos e a existência de arritmias nos mesmos. No trabalho de Costa e colaboradores, observamos que o soro de pacientes chagásicos com arritmias complexas diminuiu a frequência cardíaca *in vitro*, em contraste com os testes de soro dos pacientes chagásicos sem arritmias complexas. De forma mais expressiva, no trabalho de Medei e colaboradores mostramos que no grupo de pacientes cujo soro ativou apenas o receptor muscarínico existe maior dispersão temporal da repolarização ventricular (MEDEI *et al*, 2006).

4.1 ORIGEM DOS AUTOANTICORPOS CONTRA RECEPTORES CARDÍACOS

A principal hipótese para explicar o surgimento dos autoanticorpos contra os receptores acoplados a proteína G é a do mimetismo molecular.

Em 1989, Levin e colaboradores descreveram que a região C-terminal da proteína ribossomal P2 β do *cruzi* era reconhecida por soros de pacientes chagásicos, mais especificamente no grupo de pacientes na fase crônica da doença cardíaca (LEVIN *et al*, 1989). Posteriormente, este grupo, identificou polipeptídeo de 13 aminoácidos como alvo desta resposta, o peptídeo R13 (LEVIN *et al* 1991).

Anticorpos purificados contra a segunda alça extracelular do receptor β 1-adrenérgico causam aumento de frequência de batimento de cardiomiócitos ventriculares em cultura. Este efeito é bloqueado por pré-incubação dos anticorpos com peptídeo P0- β (AESEE) da proteína ribossomal de *T. cruzi*, que corresponde à região de grande homologia com o receptor β 1-adrenérgico (AESDE) (Ferrari, 1997). Da mesma forma, a resposta depressora muscarínica de soro de paciente chagásico crônico foi revertida por pré-incubação dos anticorpos com peptídeo R13 de *Trypanosoma cruzi* (MASUDA *et al*, 1998). Assim, estes autores ressaltam a importância de aminoácidos com carga negativa no reconhecimento cruzado entre proteína de *T. cruzi* e receptores cardíacos acoplados a proteína G.

Há também a hipótese de que autoanticorpos contra epítomos presentes na superfície celular ou no citoplasma de células cardíacas, e que estão protegidos do sistema imune em situações fisiológicas, poderiam ser gerados após dano do miocárdio. Este dano poderia ocorrer principalmente após isquemia ou, como no caso da cardiomiopatia chagásica, infecção do miocárdio e destruição das células por parasitos (CAFORIO *et al.*, 2002, ROSE, 2001). A liberação e apresentação de antígenos do miocárdio ao sistema imune após dano das células cardíacas poderiam então, induzir uma resposta autoimune. Esse mecanismo seria responsável pelo surgimento das respostas humoral e celular que perpetuariam o reconhecimento dos autoantígenos (ERIKSSON *et al*, 2003; ROSE, 2001).

Existem evidências que apóiam a hipótese de que o surgimento de anticorpos contra receptores cardíacos acoplados a proteína G não necessitaria de resposta específica contra o *Trypanosoma cruzi*. Liu e colaboradores mostram a presença de anticorpos funcionalmente ativos contra os receptores cardíacos β 1-adrenérgico e m2 muscarínico em dois modelos distintos de indução de remodelamento cardíaco: a ligadura de aorta abdominal e o uso de adriamicina. Nos dois modelos, o aparecimento dos autoanticorpos estaria associado temporalmente à indução de alterações observadas de forma e função cardíacas (LIU *et al*, 2002). Todavia, não foi avaliado neste trabalho que região dos receptores seria o alvo da interação. Esta resposta poderia estar associada ao reconhecimento de outras regiões do receptor além da segunda alça extracelular, como a primeira alça extracelular, epítipo presente no receptor β 1-adrenérgico e descrito como alvo do sistema imune na cardiomiopatia dilatada idiopática (WALLUKAT *et al*, 1995). Além disso, há relatos da literatura do reconhecimento do receptor β 1-adrenérgico (segunda alça extracelular) por anticorpos presentes no soro de pacientes com outras cardiopatias como a hipertensiva (WALLUKAT *et al*, 2003) e em pacientes com arritmias ventriculares (CHIALE *et al* 2001). Estes dados corroboram esta hipótese, em que o dano no miocárdio seria o fator importante para o aparecimento de títulos de autoanticorpos na circulação sanguínea em contraposição à importância do parasito.

O fato de que 10% da população apresentam títulos baixos de anticorpos contra os receptores β 1-adrenérgico e m2 muscarínico contribui para tornar a presença de anticorpos no soro de pacientes cardiopatas menos significativa do ponto de vista da contribuição destes à patogênese (LIU *et al*, 1999). Todavia esta prevalência cai para apenas 1% quando avaliada a capacidade de interação com o receptor em sua conformação nativa (JAHNS *et al*, 1999).

4.2 IMPORTÂNCIA DOS PARASITOS NA PATOGÊNESE DA DOENÇA

Não podemos deixar de mencionar o papel do parasito no desenvolvimento e manutenção da miocardite e aparecimento da doença cardíaca chagásica. A detecção de parasitos na fase crônica da doença é inexpressiva. Entretanto, com o uso de técnicas cada vez mais avançadas, a presença de antígenos ou DNA do parasito é detectada no coração, e inclusive pode haver associação entre a detecção e a presença de focos de miocardite no tecido cardíaco (REIS *et al*, 1997; ELIAS *et al*, 2003; BUCKNER *et al*, 1999). Da mesma forma, Mortara e colaboradores, com o uso de microscopia confocal, mostraram a presença de formas amastigotas no coração e em outros órgãos (MORTARA *et al*, 1999).

A idéia da importância do parasito na doença cardíaca é reforçada por trabalhos que utilizam o tratamento com benzonidazole no estágio crônico da doença. Viotti observou em estudo de seguimento que no grupo de pacientes chagásicos crônicos tratados com benzonidazole havia diminuição no número de pacientes com reação imunológica positiva contra o parasito e menor número de pacientes que evoluíram o grau de disfunção cardíaca ao final do estudo (VIOTTI *et al*, 1994). Da mesma forma, houve melhora na função cardíaca de animais cronicamente infectados quando tratados com benzonidazole. Nesses animais foi demonstrada a diminuição da resposta humoral contra o parasito e interessantemente contra o epítipo da segunda alça extracelular dos receptores cardíacos β 1-adrenérgico e muscarínico (GARCIA *et al*, 2005). Talvez a persistência dos antígenos do parasito no organismo seja necessária para ativar e/ou manter de alguma forma a produção dos autoanticorpos (ANDRADE, 2000).

4.3 ESPECIFICIDADE NA INTERAÇÃO ENTRE AUTOANTICORPOS E RECEPTORES

Na década de 70, a presença de anticorpos específicos contra endotélio, vaso e interstício cardíacos foi demonstrada no soro de pacientes chagásicos (SZARFMAN *et al*, 1974). Posteriormente o mesmo grupo identificou esta resposta como resposta não específica contra antígenos cardíacos, mas uma resposta anti-idiotipo (KHOURY *et al* 1983). Por isso, existe o questionamento sobre a real especificidade no reconhecimento e ativação dos receptores cardíacos por anticorpos de pacientes chagásicos em modelos animais (KIERZENBAUM, 2005).

O efeito observado é específico e exclusivo da ativação de receptores acoplados a proteína G, pois observamos modulação na atividade elétrica dos nódulos sinusal e átrio-ventricular pelo soro de coelhos cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi* (CAMPOS DE CARVALHO *et al*, 1994) e pelo soro de pacientes chagásicos (FARIAS DE OLIVEIRA *et al*, 1997). Creditamos o efeito observado à interação das imunoglobulinas com o receptor, pois a fração do soro restante após extração de imunoglobulinas não produz qualquer alteração na frequência cardíaca (FARIAS DE OLIVEIRA *et al*, 1997). O efeito observado na corrente de cálcio tipo L foi induzido por anticorpos purificados por afinidade contra a segunda alça extracelular do receptor muscarínico (HERNANDEZ *et al*, 2003). Além disso, o efeito funcional observado na eletrogênese cardíaca foi revertido pela pré-incubação do soro com peptídeo correspondente à segunda alça extracelular do receptor muscarínico e com peptídeo de *T. cruzi* (MASUDA *et al*, 1998). Ainda, os efeitos descritos nesta tese são bloqueados na presença de antagonistas específicos para os receptores β -adrenérgico e muscarínico. Esta ativação foi demonstrada em diferentes modelos experimentais (coração isolado, ensaios de ligação ou *binding*,

cultura de cardiomiócito) e animais (coelho, porco, camundongo e rato).

4.4 ATIVAÇÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS

Soros de pacientes chagásicos crônicos modulam a frequência cardíaca, a condução átrio-ventricular e a repolarização ventricular *in vitro*. Todos estes efeitos são bloqueados na presença de atropina, antagonista do receptor muscarínico.

Borda e colaboradores descreveram, em 1991, a presença de anticorpos que modulavam o receptor muscarínico no soro de pacientes chagásicos (STERIN-BORDA *et al*, 1991). O mesmo grupo descreveu que estes anticorpos também modulam negativamente a frequência de batimentos de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos em cultura e deprimiam a contração atrial de ratos adultos (GOIN *et al*, 1994, MIJARES *et al*, 1996).

A diminuição da densidade de corrente de cálcio tipo L de cardiomiócitos ventriculares de coelho induzida por anticorpos purificados contra a segunda alça extracelular do receptor muscarínico pode explicar, em parte, a modulação na condução atrioventricular (HERNANDEZ *et al* 2003).

Todavia, este efeito sobre I_{CaL} parece não influenciar muito a frequência cardíaca. A ativação do receptor muscarínico produz a modulação direta de canais através de interação com as subunidades beta e gama da proteína g inibitória associada ao receptor. Este é o mecanismo de ação proposto para modulação de I_{KAch} após ativação do receptor muscarínico (KRAPIVINSKY *et al*, 1995). Foi descrito que IgG de pacientes chagásicos ativaram esse canal em modelo de expressão heteróloga em células CHO (HERNANDEZ *et al*, 2002).

Mudanças na condutância de canais de cálcio ou potássio podem modular a duração do potencial de ação, que por sua vez influenciam a duração do intervalo

QT. A diminuição de IcaL observada produziria, na verdade, diminuição no tempo de repolarização ventricular e não observamos modulação de Ito pelos anticorpos muscarínicos. Acreditamos que um possível alvo dos autoanticorpos contra o receptor muscarínico presentes no soro de pacientes chagásicos seriam os canais Ik (MEDEI *et al*, 2006).

A modulação dos níveis intracelulares de AMPc é trazida como mecanismo para diminuição na frequência de batimentos de cardiomiócitos em culturas e da corrente de cálcio tipo L neste tipo celular. Da mesma forma, a diminuição da força de contração atrial é trazida como efeito colinérgico através de modulação deste segundo mensageiro. (GOIN *et al*, 1994, MIJARES *et al*, 1996).

Outras vias de sinalização podem estar envolvidas nos efeitos colinérgicos descritos; são as vias de GMPc e fosfatidil-inositídeos. Assim, a diminuição na corrente de cálcio tipo L por anticorpos monoclonais contra a segunda-alça extracelular do receptor m2-muscarínico acontece através da modulação da via de sinalização de GMPc (NASCIMENTO *et al*, 2001). No segundo, caso foi observado aumento dos níveis intracelulares de fosfatidil inositídeos após interação de autoanticorpos de pacientes chagásicos em células COS7 em cultura, transfectadas com o receptor muscarínico e as subunidades alfa-q e alfa-i da proteína G (CHIALE *et al*, 2001).

Hernandez e colaboradores mostraram através de ensaios de ligação de agonista (*binding*) que anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos interagem com o receptor muscarínico de forma não competitiva (HERNANDEZ *et al*, 2003).

Considerando o reconhecimento de receptores cardíacos pelo soro de pacientes chagásicos, a resposta contra o receptor muscarínico predomina na

população chagásica estudada. Elies e colaboradores verificaram que a região da segunda alça extracelular do receptor muscarínico subtipo m2, mais especificamente o epítipo EDGE, foi reconhecida por soros de 77% dos pacientes chagásicos testados (ELIES *et al* 1996). Essa região também é reconhecida como epítipo na cardiomiopatia dilatada. Anticorpos de pacientes com cardiomiopatia quando testados em modelo de cultura de cardiomiócitos modularam a frequência de batimentos. A diminuição da frequência de batimentos observada se manteve por mais de 5 horas sem que houvesse modulação negativa do número de receptores muscarínicos expressos na membrana citoplasmática, o fenômeno de *down-regulation* (WALLUKAT *et al*, 1996). Todavia, Perez-Leiros e colaboradores, utilizando cultura de cardiomiócitos, demonstraram que a ativação contínua do receptor muscarínico por tempos prolongados induzida por autoanticorpos de pacientes chagásicos promoveu a diminuição dos níveis de receptores na membrana de cardiomiócitos (PEREZ-LEIROS *et al*, 1997).

4.5 ATIVAÇÃO DE RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS

Observamos no presente trabalho a ação agonista induzida por anticorpos contra o receptor beta-adrenérgico e conseqüente modulação da frequência cardíaca e pressão desenvolvida. A especificidade da interação é comprovada pelo bloqueio do efeito com o uso de antagonista do receptor beta-adrenérgico, propranolol.

A ativação do receptor adrenérgico promove aumento dos níveis intracelulares do segundo mensageiro intracelular, AMPc, responsável pela ativação da proteína quinase A. Essa proteína, ao ser ativada, tem distintos alvos intracelulares, dentre eles o canal de cálcio tipo L. A modulação do canal de cálcio

também acontece quando da ativação do receptor do receptor pelos autoanticorpos de pacientes chagásicos (BARCELLOS, 2001). Este seria um dos principais mecanismos que modulam a pressão desenvolvida, e acreditamos estar envolvido o efeito dos autoanticorpos contra o receptor beta-adrenérgico.

A diminuição no metabolismo basal pela fração IgG de paciente chagásico observada poderia ser atribuída à depressão na atividade da bomba de sódio e potássio. Este tipo de modulação pode ocorrer como observado no trabalho que descreve anticorpos contra este transportador na cardiomiopatia dilatada (BABA *et al*, 2002). Todavia, este é um efeito contrário à modulação exercida pelo receptor adrenérgico via fosforilação da proteína fosfolambam (DESPA *et al*, 2005).

Elies e colaboradores identificaram o epítipo AESDE na segunda alça extracelular do receptor beta1-adrenérgico como alvo da interação com imunoglobulinas de pacientes chagásicos. Foi detectada resposta contra este epítipo em 29% dos soros de pacientes chagásicos testados. Esta é uma região distinta da região reconhecida por soros de pacientes com cardiomiopatia dilatada, epítipo ARRCYND, resposta detectada em 80% dos pacientes. É interessante ressaltar que neste trabalho também foi constatada resposta contra o receptor beta2-adrenérgico no soro de 12% dos pacientes chagásicos (ELIES *et al*, 1996).

Acredita-se que a ativação dos receptores pelos anticorpos presentes no soro dos pacientes chagásicos não sofre os fenômenos de dessensibilização ou *down-regulation*. Estes soros exibem efeito na frequência cardíaca que se mantém durante aproximadamente 30 minutos de perfusão dos anticorpos nos corações isolados de coelhos (FARIAS DE OLIVEIRA *et al*, 1997). Da mesma forma, Wallukat e colaboradores comprovam ação agonista que não sofre dessensibilização no receptor beta1-adrenérgico em soro de pacientes com cardiomiopatia dilatada

(WALLUKAT *et al*, 1991).

Entretanto, Podlowisky, ao incubar cardiomiócito durante 72 horas com anticorpos com atividade agonista sobre o receptor adrenérgico, induziu dessensibilização e diminuição tanto do número de receptores na membrana, quanto dos níveis de RNAm para o receptor (PODLOWISCKY *et al*, 1998). Esta diminuição também é observada no coração de pessoas em falência cardíaca (UNGERER *et al*, 1993).

Parece que a ativação de longo prazo está associada à sinalização por calmodulina quinase, (WANG *et al*, 2004) mesma via de sinalização envolvida em apoptose (ZHU *et al*, 2003).

4.6. PAPEL DOS ANTICORPOS ANTI-RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G NA PATOLOGIA DA DOENÇA CARDÍACA

Em geral, acredita-se que a ativação do receptor muscarínico tem um papel protetor para o miocárdio. Por exemplo, a ativação vagal é capaz de prevenir o desenvolvimento de fibrilação atrial em modelo de isquemia cardíaca (VANOLI e SCHWARTZ, 1990). Assim, a ativação do receptor muscarínico pelo soro de pacientes chagásicos poderia ter um papel protetor na evolução das arritmias cardíacas observadas na doença chagásica crônica. Foi proposta recentemente na literatura a hipótese de uma resposta autoimune benéfica que poderia contrabalançar uma resposta imune ou inflamatória que causa dano (NEVO *et al* 2004).

Neste contexto, Hoebeke e colaboradores sugerem o uso de anticorpos contra o receptor muscarínico como ferramenta farmacológica nas cardiopatias. Em trabalho com camundongos imunizados contra a segunda alça extracelular do

receptor muscarínico não foram observadas alterações morfológica e funcional cardíaca, tampouco houve alteração da frequência cardíaca e da variabilidade da frequência cardíaca em camundongos imunizados com peptídeo correspondente a segunda alça extracelular do receptor muscarínico. Todavia, a avaliação da variabilidade na frequência cardíaca destes animais na presença de agonista do receptor muscarínico, carbacol, mostrou resposta cronotrópica depressora pronunciada apenas no grupo de animais imunizados. Da mesma forma, no teste *in vitro*, os anticorpos purificados de animais imunizados produziram efeito mais proeminente quando testados na presença de carbacol. Estes dados mostram que os anticorpos gerados no modelo acima descritos comportam-se como agentes alostéricos, aumentando a atividade do agonista do receptor (PETER *et al*, 2005).

Como descrito acima, existem trabalhos que sugerem que a ativação muscarínica no coração tenha um efeito protetor sobre o coração. Todavia, existem evidências também de que a ativação muscarínica de forma acentuada poderia ter papel patológico no coração.

Assim, Gimenez e colaboradores reportaram que os corações de animais imunizados com cDNA do receptor M2 muscarínico sofrem dilatação. Também foi observado aumento na densidade de receptores muscarínicos m2 na membrana, assim como o trabalho em animais cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (GIMENEZ *et al*, 2005). Todavia, Sterin-Borda ao realizar ensaios para avaliar densidade de receptores m2 na membrana de tecido cardíaco de animais também infectados cronicamente (9 semanas) observou diminuição na densidade dos receptores muscarínicos (STERIN-BORDA *et al*, 1991).

Matsui e colaboradores mostraram que coelhos imunizados com o mesmo peptídeo do receptor muscarínico não apresentavam alterações morfológicas no

coração, como a presença de infiltrado inflamatório, fibrose e hipertrofia de ventrículo (MATSUI *et al*, 1997). Isto ocorria somente quando se procedia a imunização com o peptídeo da segunda alça do receptor muscarínico e do beta1-adrenérgico juntos (MATSUI e FU, 2001).

Existe alta prevalência de anticorpos contra o receptor muscarínico em pacientes com disfunção do nódulo sinusal na doença de Chagas e em distintas cardiopatias (FERRARI *et al*, 1997; CHIALE *et al*, 2001). Do mesmo modo, del Corso e colaboradores observaram que havia maior prevalência de fibrilação atrial em grupo de pacientes com cardiomiopatia dilatada cujo soro tinha atividade agonista muscarínica. Neste trabalho foi observado *in vitro*: diminuição da frequência cardíaca em corações isolados de coelho, aumento da duração do potencial de ação no ventrículo e diminuição da corrente de cálcio tipo L por estes anticorpos (DEL CORSSO *et al*, 2004). Um mecanismo possível para explicar a associação entre a ativação muscarínica e a ocorrência de fibrilação atrial poderia ser a ativação diferenciada de $I_{K_{ACh}}$ expressa em níveis distintos nos dois átrios (SARMAST *et al*, 2003).

Redfern e colaboradores mostraram maior incidência de arritmias ventriculares complexas e morte em animais transgênicos cuja via da proteína G inibitória (G_i) foi ativada excessivamente. O trabalho indicou alteração na expressão de genes relacionados à ativação da cascata G_i após análise da expressão gênica desses animais pela técnica de microarranjo gênico de DNA de camundongo. Assim, os níveis de expressão da enzima adenilato ciclase encontravam-se aumentados, enquanto a expressão de GIRK, subunidade de $I_{K_{ACh}}$, estava diminuída. Os corações desses animais mostravam alterações compatíveis com as alterações observadas em pacientes com cardiomiopatia dilatada (REDFERN *et al*, 2000). Adicionalmente,

verificou-se diminuição da força de contração do miocárdio (60%), e diminuição das velocidades de contração e relaxamento (BAKER *et al*, 2001).

Existem várias evidências na literatura que indicam a associação entre a presença de autoanticorpos contra o receptor beta-adrenérgico e diferentes patologias no coração. Dentre eles podemos ressaltar Chiale, 2001, que mostra associação desses autoanticorpos e a presença de arritmias ventriculares em pacientes chagásicos, Iwata e colaboradores, que mostraram esses anticorpos em pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática associados à morte súbita (IWATA *et al*, 2001).

A imunização de camundongos com a região C-terminal da proteína P-ribossomal P2B de *T. cruzi* induz alterações cardíacas (taquicardia supra-ventricular e morte prematura) via ativação de receptor beta-adrenérgico (LOPEZ-BERGAMI *et al*, 2001). Em trabalho posterior, o mesmo grupo mostra que três aminoácidos do polipeptídeo R13 presente nessa proteína são importantes para esta resposta (LOPEZ-BERGAMI *et al*, 2005).

Após a caracterização da presença de autoanticorpos contra o receptor beta-adrenérgico em diferentes cardiopatias e da associação desta ocorrência com distintas patologias, alguns autores começaram a tratar pacientes com cardiomiopatia dilatada com a retirada das imunoglobulinas circulantes. Estes autores observaram melhora dos pacientes que persistiu um ano após tratamento (MÜLLER *et al*, 2000).

Jahns e colaboradores em 2004 publicaram evidências da participação direta dos autoanticorpos na gênese de cardiomiopatia. Neste trabalho foi induzida cardiopatia com hipertrofia, infiltrado inflamatório e fibrose nos corações dos animais imunizados com peptídeo da segunda alça extracelular do receptor beta-

adrenérgico. A transferência passiva destes autoanticorpos foi capaz de induzir o mesmo tipo de doença cardíaca em animais não imunizados previamente. (JAHNS *et al*, 2004).

Em conjunto, esses trabalhos indicam que anticorpos contra receptores cardíacos acoplados a proteína G poderiam agir nos pacientes chagásicos modulando a atividade elétrica cardíaca destes pacientes, e, desta forma, contribuiriam para a patogênese da cardiopatia chagásica crônica.

5 CONCLUSÕES

- Os autoanticorpos com atividade funcional muscarínica diminuíram a FC, bloquearam a condução atrioventricular e prolongaram o intervalo QT *in vitro*.
- Os autoanticorpos com efeito beta-adrenérgico aumentaram a FC e a pressão desenvolvida *in vitro*.
- Houve diminuição na quantidade de calor liberado pelo músculo em repouso (Hr) e no estado ativo (H't) por imunoglobulinas, com atividade funcional beta-adrenérgica na FC. No estado estacionário, houve queda na pressão desenvolvida pelo músculo acompanhada de piora no desempenho cardíaco global e contrátil.
- Observamos uma associação entre a presença de anticorpos funcionais contra o receptor muscarínico e a dispersão do intervalo QT nos pacientes chagásicos.
- A dispersão do intervalo QT e o índice do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo são preditores de morte de etiologia cardíaca nos pacientes chagásicos crônicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL LC, KALIL, J e CUNHA NETO, E. *Molecular mimicry between cardiac myosin and Trypanosoma cruzi antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin*. Brazilian Journal Medical Biological Research 30 (11): 1305-8, 1997.

ACQUATELLA, H. *Avances recientes en miocardiopatía chagásica*. Revista Española de Cardiología 51: 152-157, 1998.

ALBANESI FILHO, FM E GOMES FILHO, JM *A lesão apical do ventrículo esquerdo na evolução clínica da cardiopatía chagásica crônica*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 56(6): 457-63, 1991.

ALVAREZ, J, MONTERO, M e GARCIA-SANCHO. *Subcellular Ca²⁺ dynamics*. News Physiological Sciences 114: 161-168, 1999.

AMORIN, DS e MARIN-NETO, JA. *Alterações funcionais do sistema nervoso autônomo na doença de Chagas*. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2: 106-117, 1994.

ANDRADE, Z. *The canine model of Chagas' disease*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 79 (suppl): 77- , 1984.

ANDRADRE, Z. *Patologia da doença de Chagas* em Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas Brenner, Z, Andrade, ZA e Barral-Neto, M. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. RJ. pp 201-230, 2000.

ANEZ, N, CARRASCO, H, PARADA, H, CRISANTE, G, ROJAS, A, FUENMAYOR, C, GONZALEZ, N PERCOCO, G, BORGES, R, GUEVARA, P, RAMIREZ, JL. *Myocardial parasite persistence in chronic chagasic* American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 60(5):726-32, 1999.

ANUMONWO JM, WANG HZ, TRABKA-JANIK E, DUNHAM B, VEENSTRA RD, DELMAR M, JALIFE J. *Gap junctional channels in adult mammalian sinus nodal cells. Immunolocalization and electrophysiology*. Circulation Research 71(2):229-39, 1992.

BABA, A. YOSHIKAWA, T, OGAWA, S. *Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy*. Journal of American College of Cardiology Vol. 40 (6): 1143-9, 2002.

BAKER AJ, REDFERN CH, HARWOOD MD, SIMPSON PC, CONKLIN BR. Abnormal contraction caused by expression of G (i)-coupled receptor in transgenic model of dilated cardiomyopathy. American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology 280 (4): H1653-9, 2001.

BARCELLOS, L.C. Modulação da corrente de cálcio por anticorpos de pacientes chagásicos crônicos. 150pg. Orientador: Masako Oya Masuda. Dissertação (Doutorado em Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2001.

BESTETTI, RB, FREITAS, OC, MURILLO, G E OLIVEIRA, JSM. *Clinical and morphological characteristics associated with sudden cardiac death in patients with Chagas' disease*. European Heart Journal 14: 1610-1614, 1993.

BORDA, ES, PASCUAL, PM, COSSIO, M, VEGA, R, ARANA, M E STERIN-BORDA. *A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenoceptors of myocardium and modulates its activity*. Clinical Experimental Immunology 57: 679-686, 1984.

BRENNER, Z. Immune response and immunopathology in Trypanosoma cruzi infection. Em Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ed Wendel, S., Brenner, Z., Camargo, M.E., Rossi, A. São Paulo, Brasil ISTB. p13-19, 1992.

BUCKNER, WILSON e VAN VOORHIS. *Detection of live Trypanosoma cruzi in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase*. Infection and Immunity. 67 (1): 403-9, 1999.

CAFORIO AL, MAHON NJ, TONA F, MCKENNA WJ. *Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance* (review). European Journal of Heart Failure 4 (4): 411-7, 2002.

CAIERO, T, AMUCHASTEGUI, LM, MOREYRA, E, GIBSON, DG. *Abnormal left ventricular function in chronic Chagas' disease: an echocardiographic study*. International Journal of Cardiology 9: 417-24, 1983.

CALLEWAERT, G. *Excitation-coupling in mammalian cardiac cells*. Cardiovascular

Research 26: 923-32, 1992.

CAMPOS DE CARVALHO AC, MASUDA MO, TANOWITZ HB, WITTNER M, GOLDENBERG RC, SPRAY DC *Conduction defects and arrhythmias in Chagas' disease: possible role of gap junctions and humoral mechanisms*. Journal of Cardiovascular Electrophysiology 5(8): 686-98, 1994.

CARRASCO, HA, MEDINA, M, INGLESSIS, G, FUENMAYOR, A, MOLINA, C E DAVILA, D. *Right ventricular function in Chagas disease*. International Journal of Cardiology 2(3-4): 325 , 1983.

CARRASCO, HA, , L, PARADA, H, MOLINA, C, VEGAS, E, CHUECOS, R. *Ventricular arrhythmias and left ventricular myocardial function in chronic chagasic patients*. International Journal of Cardiology 28: 35-41, 1990.

CHAGAS, C. *Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotripanum cruzi n.gen., n.spi. agente etiológico da nova entidade mórbida do homem*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1: 159-218, 1909.

CHAGAS, C. *A forma cardíaca da trypanosomiase americana*. Archives Brazilian Medicine 18: 46-56, 1928. *apud PRATA, A. Evolution of the clinical and Epidemiological knowledge about Chagas Disease 90 years after its Discovery*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. (Rio de Janeiro) 94 (suppl. I): 81-88, 1999.

CHIALE, PA, FERRARI, I, MAHLER, E, VALAZZA, MA, ELIZARI, MV, ROSENBAUM, MB E LEVIN, M. *Differential Profile and Biochemical Effects of Antiautonomic Membrane Receptor Antibodies in Ventricular Arrhythmias and Sinus Node Dysfunction*. Circulation 103: 1765-1771, 2001.

COPPEN SR, DUPONT E, ROTHERY S, SEVERS NJ. *Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart*. Circulation Research 82 (2): 232-43, 1998.

COSTA, P.C.S., FORTES, F.S.A., MACHADO, A.B., ALMEIDA, N.A., OLIVARES, E.L., CABRAL, P.R., PEDROSA, GOLDENBERG, R.C., CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C. e MASUDA, M.O. *Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33: 439-446, 2000.

CUNHA-NETO, E, COELHO, v, GUILHERME, I, FIORELLI, A, STOLF, N e 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. *Journal of Clinical Investigation* 98 (8): 1709-12, 1996.

DAVILLA, DF, ROSSEL, O e BELLABARBA, GA. *Pathogenesis of chronic chagas heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation*. *International Journal of Parasitology* 32: 107-109, 2002.

DAVIS LM, KANTER HL, BEYER EC, SAFFITZ JE. *Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties*. *Journal of American College of Cardiology* 24 (4):1124-32, 1994.

DEL CORSO C, DE CARVALHO AC, MARTINO HF, VARANDA WA. *Sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy decrease I_{Ca} in cardiomyocytes isolated from rabbits*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287 (5): H1928-36, 2004.

DE SCHEERDER IK, DE BUYZERE ML, DELANGHE JR, CLEMENT DL, WIEME RJ. *Anti-myosin humoral immune response following cardiac injury*. *Autoimmunity* 4, 51-58, 1989.

DESPA, S., BOSSUYT, J., HAN, F, GINSBURG, K.S., JIA, L., KUTCHAI, H., TUCKER, A.L., BERS, D.M. *Phospholemman-Phosphorylation Mediates the Adrenergic Effects on Na/K Pump Function in Cardiac Myocytes*. *Circulation Research* 97: 252-9, 2005.

DHEIN, S, POLONTCHOUK, L, SALAMEH, A E HAEFLIGER, JA. *Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40*. *Biology of the Cell* 94 (7-8): 409-22, 2002.

DIAS JCP, SILVEIRA, AC, SCHOFIELD, CJ. *The impact of Chagas disease control in Latin America – a review*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5): 603-12. 2002.

ELIAS, F.E., VIGLIANO, C.A., LAGUENS, R.N.P., LEVIN, M.J. AND BEREK, C. *Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients wit chronic chagasic disease*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68(2), 242-247, 2003.

ELIES, R, FERRARI, I, WALLUKAT, G LEBESGUE D, CHIALE P, ELIZARI M, ROSENBAUM M, HOEBEKE J, LEVIN MJ. *Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies en patients with Chagas'*

disease. *Journal of Immunology* 157: 4203-11, 1996.

ERIKSSON, URS KURRER, M.O., SCHMITZ N., MARSCH, S.C., FONTANA, A, EUGSTER, HP, KOPF, M., *Interleukin-6–Deficient Mice Resist Development of Autoimmune Myocarditis Associated With Impaired Upregulation of Complement C3* *Circulation* 107: 320, 2003.

FACTOR SM, CHO S, WITTNER M E TANOWITZ H. *Abnormalities of the immune response in mice with chronic Trypanosoma cruzi coronary circulation in acute murine Chagas' disease.* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 34:246–253, 1985.

FARIAS DE OLIVEIRA, S, PEDROSA, R.C., NASCIMENTO, J.H., CAMPOS DE CARVALHO, AC. E MASUDA, M.O. *Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts.* *Circulation* (96) 2031- 2037, 1997.

FERRARI, I., LEVIN, MJ, WALLUKAT, G, ELIES, R, LEBESGUE, D, CHIALE, P, ELIZARI, M, ROSENBAUM, R e HOEBEKE, J. *Molecular Mimicry between the immunodominant Ribosomal Protein P0 of Trypanosoma cruzi and a functional Epitope on the Human β 1- adrenergic. Receptor.* *Journal of Experimental Medicine* 182: 59-65, 1995.

FERRARI I, LEVIN MJ, ELIZARI MV, ROSENBAUM MB, CHIALE PA. *Cholinergic autoantibodies in sinus-node dysfunction letter.* *Lancet* 350 (9073): 262-3, 1997.

FUENMAYOR, C, HIGUCHI, ML, CARRASCO, H, PARADA H, GUTIERREZ, P, AIELLO, V, PALOMINO, S. *Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T cruzi parasitic antigens.* *Acta Cardiologica* 60 (1) 33-7, 2005.

GARCIA S, RAMOS CO, SENRA JF, VILAS-BOAS F, RODRIGUES MM, CAMPOS-DE-CARVALHO AC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MB. *Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations.* *Antimicrobials Agents Chemotherapy.* 49 (4): 1521-8, 2005.

GIMENEZ LE, HERNANDEZ CC, MATTOS EC, BRANDÃO IT, OLIVIERI B, CAMPELO RP, ARAUJO-JORGE T, SILVA CL, CAMPOS DE CARVALHO AC, KURTENBACH E. *DNA immunizations with M2 muscarinic and beta1 adrenergic receptor coding plasmids impair cardiac function in mice.* *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (5): 703-14, 2005.

GIRONES, N e FRESNO, M. *Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence or both.* Trends in Parasitology 19 (1): 19-22, 2003.

GOIN, JC, BORDA, E, LEIROS, CP, STORINO, R E STERIN-BORDA, L. *Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications.* Journal of Autonomic Nervous System 47: 45-52, 1994.

GOURDIE RG, SEVERS NJ, GREEN CR, ROTHERY S, GERMROTH P, THOMPSON RP. *The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system.* Journal of Cell Science 105 (Pt 4): 985-91, 1993.

GRAUERT, MR, HOUDAYER, M E HONTEBEYRIE-JOSKOWCIZ, M. *Trypanosoma cruzi infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease.* Clinical Experimental Immunology 93 (1): 85-92, 1993.

GUERRERO, L, CARRASCO, H, PARADA, H, MOLINA, C E CHUECOS, R. *Mecânica ventricular y arritmias cardíacas em pacientes chagásicos y com miocardiopatias dilatadas primárias, seguimiento eco-eletrocardiográfico.* Arquivos Brasileiros de Cardiology 56 (6): 465-69, 1991.

HERNANDEZ, CCQ. *Anticorpos como moduladores alostéricos da função muscarínica cardíaca na fase crônica da doença de Chagas.* 140p. 2002. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2002.

HERNÁNDEZ, CCQ, BARCELLOS, LC, GIMÉNEZ, LE, CABARCAS, RAB, GARCIA, S, PEDROSA, RC, NASCIMENTO, JHM, KURTENBACH, E, MASUDA, MO E CAMPOS de CARVALHO, ACC. *Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca²⁺ currents.* Cardiovascular Research: (58): 55-65, 2003.

HIGUCHI, ML, BENVENUTI, LA, MARTINS, RM, METZER, M. *Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments.* Cardiovascular Research; 60 (1): 96-107, 2003.

IWATA M, YOSHIKAWA T, BABA A, ANZAI T, MITAMURA H, OGAWA S. *Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.* Journal of American College Cardiology 37 (2): 418-24, 2001.

JAHNS R, BOIVIN V, SIEGMUND C, INSELMANN G, LOHSE MJ, BOEGE F. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with *reduced cardiac function in chronic heart failure*. *Circulation* 99 (5): 649-54, 1999.

JAHNS, R, BOLVIN, V, HEIN, L, TRIEBEL, S, ANGERMANN, CE, ERTL, G e LOHSE, MJ. *Direct evidence for a beta1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Journal of Clinical Investigation* 113 (10) 1419-1429, 2004.

KANTER HL, LAING JG, BEYER EC, GREEN KG, SAFFITZ JE. *Multiple connexins colocalize in canine ventricular myocyte gap junctions*. *Circulation Research* 73 (2):344-50, 1993.

KIERSZENBAUM, F. *Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis*. *FEMS Immunological and Medical Microbiology* 37 (1): 1-11, 2003.

KIERSZENBAUM, F. *Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?* *TRENDS in Parasitology* 21 (11): 513-16, 2005.

KHOURY EL, DIEZ C, COSSIO, PM e ARANA RM. *Heterophil nature of EVI antibody in Trypanosoma cruzi infection*. *Clinical Immunology and Immunopathology* 27 (2): 283-8, 1983.

KRAPIVINSKY G, KRAPIVINSKY L, WICKMAN K, CLAPHAM DE. *G beta gamma binds directly to the G protein-gated K⁺ channel, I_{K_{ACh}}*. *Journal of Biological Chemistry* 270 (49): 29059-62, 1995.

KWONG KF, SCHUESSLER RB, GREEN KG, LAING JG, BEYER EC, BOINEAU JP, SAFFITZ JE *Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node*. *Circulation Research* 82 (5): 604-12, 1998.

LEON, J.S., DANIELS, M.D. TORIELLO, K.M., WANG, K. E ENGMAN D.M.A *Cardiac Myosin-Specific Autoimmune Response Is Induced by Immunization with Trypanosoma cruzi Proteins*. *Infection and Immunity* 72: 3410–3417, 2004.

LEVIN, MJ, MESRI, E, BENAROUS, R, LEVITUS, G, SCHIJMAN, A, LEVY-YEYATI, P, CHIALE, P., RUIZ, AM, KAHN, A, ROSENBAUM, MB, TORRES, H E SEGURA, E. *Identification of major Trypanosoma cruzi antigenic determinants in chronic chagas' heart disease disease*. *American Journal of Tropical Medicine* 41 (5) 530-8,

1989.

LEVIN, MJ. *Molecular mimicry and Chagas' heart disease: high anti-R13 autoantibody levels are markers of severe heart complaint*. Research in Immunology 142 (2): 157-9, 1991.

LIU HR, ZHAO RR, ZHI JM, WU BW, FU ML. *Screening of serum autoantibodies to cardiac beta1-adrenoceptors and M2-muscarinic acetylcholine receptors in 408 healthy subjects of varying ages*. Autoimmunity 29 (1): 43-51 1999.

LIU, H, ZHAO, RR, JIAO, X, WANG, Y E FU, M. *Relationship of myocardial remodeling to the genesis of serum autoantibodies to cardiac beta₁-adrenoceptors and muscarinic type 2 acetylcholine receptors in rats*. Journal of American College of Cardiology 39(11):1866-73, 2002.

LOPEZ BERGAMI P, SCAGLIONE J, LEVIN MJ. *Antibodies against the carboxyl-terminal end of the Trypanosoma cruzi ribosomal P proteins are pathogenic*. FASEB Journal 15(14):2602-12, 2001.

LOPEZ BERGAMI, P., K. A. GÓMEZ G. V. LEVY, V. GRIPPO, A. BALDI AND M. J. LEVIN. *The B1 adrenergic effects of antibodies against the C-terminal end of the ribosomal P 2 β protein of Trypanosoma cruzi associate with a specific pattern of epitope recognition*. Clinical and Experimental Immunology 142: 140–147, 2005.

MARCONDES, J. e RASSI, A. *A doença de Chagas*. Em Protozooses Humanas. Castro LP, Cunha AS e Marcondes JR. Fundo Editorial. São Paulo pp 38-72. 1994

MARIN-NETO, JA, SIMÕES, MV E SARABANDA, AVL. *Cardiopatia Chagásica*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 72 (3) 247-263, 1999.

MARIN-NETO, JA, SIMÕES, MV E SARABANDA, AVL *Forma Crônica cardíaca em Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Brenner, Z, Andrade, ZA e Barral-Neto, M. Segunda Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. RJ. pp 266-296. 2000.

MASUDA, MO, LEVIN, M, FARIAS DE OLIVEIRA, SF, COSTA, PCS, BERGAMI, PL, ALMEIDA, NAS, PEDROSA, RC, FERRARI, I, HOEBEKE, J e CAMPOS DE CARVALHO, AC. *Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by Trypanosoma cruzi antigens*. FASEB Journal, 12:1551-8, 1998.

MATSUI S, FU MLX, KATSUDA S, HAYASED, M., YAMAGUCHI, N., TERAOKA, K., KURIHARA, T., TAKEKOSHI, N., MURAKAMI, E., HOEBEKE, M. E HJALMARSON Å. *Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29: 641–655, 1997.

MATSUI, S e FU, ML. Prevention of experimental autoimmune cardiomyopathy in rabbits by receptor blockers. Autoimmunity 34 (3): 217-220, 2001.

MAZULLO, EC E CHUIT, R Risk of death due to Chronic Chagasic Cardiopathy Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94 (suppl I): 317-20, 1999.

MEDEI, E., PEDROSA, RC, BARBOSA, PRB COSTA, PC, HERNÁNDEZ, CC, CHAVES, EA, LINHARES, V, MASUDA, MO, NASCIMENTO, JHM, CAMPOS DE CARVALHO, AC. Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. International Journal of Cardiology *in press*.

MIJARES, A., VERDOT, L., PEINEAU, N., VRAY, B., HOEBEKE, J., AND 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*. Molecular and Cellular Biochemistry 163-164: 107–112, 1996.

MONCAYO, A Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98 (5): 577-9. 2003.

MORRIS SA, TANOWITZ HB, WITTNER M, BILEZIKIAN JP. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. Circulation 82: 1900–1909, 1990

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*. Parasitology Research 85 (10): 800-8, 1999.

MÜLLER, 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 101: 385, 2000.

NASCIMENTO JH, 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. *American Journal of Physiology - Cellular Physiology*. 281 (4): C1251-8, 2001.

NEVO, U., GOLDING, I., NEUMANN, A. U., SCHWARTZ, M., AND AKSELROD, S. *Autoimmunity as an immune defense against degenerative processes: a primary mathematical model illustrating the bright side of autoimmunity*. *Journal of Theoretical Biology* 227, 583–592, 2004.

OLIVEIRA, JSM, OLIVEIRA, JAM, FREDERIGUE JR, U E LIMA FILHO, EC. *Apical aneurism of Chagas' disease*. *British Heart Journal* 46: 432-437, 1981.

OLIVEIRA, JSM. *A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy*. *American Heart Journal* 110 (5): 1092-1098, 1985.

PARADA, H, CARRASCO, A AÑEZ, N FUENMAYOR C, INGLESSIS, I. *Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study*. *International Journal of Cardiology* 60: 49-54, 1997.

PEREZ-LEIROS, C, STERIN-BORDA, L, BORDA, E, GOIN, JC e HOSEY, MM. *Desensitisation and sequestration of M2 muscarinic acetylcholine receptors by autoantibodies from patients with chagasic disease*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 12989-93, 1997.

PETER JC, TUGLER J, EFTEKHARI P, MAURICE D, HOEBEKE J, ROEGEL JC. *Effects on heart rate of an anti-M2 acetylcholine receptor immune response in mice*. *FASEB Journal* 19 (8): 943-9, 2005.

PODLOWSKI S, LUTHER HP, 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* 98 (22): 2470-6, 1998.

PONTES-DE-CARVALHO L, SANTANA CC, SOARES MB, OLIVEIRA GG, CUNHANE TO E, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. *Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens*. *Journal of Autoimmunity* 18 (2): 131-8, 2002.

RASSI A, AMATO NETO V, RASSI GG, AMATO VS, RASSI JUNIOR A, LUQUETTI AO, RASSI SG. *A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37 (6): 485-9, 2004.

REDFERN, C., DEGTYAREV, M.Y., KWA, A.T., SALOMONIS, N., COTTE, N., NANEVICZ, T, FIDELMAN, N., DESAI, K, VRANIZAN, K., LEE, E.K., COWARD, P., SHAH, N., WARRINGTON, J.A., FISHMAN, G., BERNSTEIN, D., BAKER, A.J. e CONKLIN, B.R. *Conditional expression of a G_i-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy*. Proceedings of National Academy of Sciences of USA 97 (9): 4826–4831, 2000.

REIS MM, HIGUCHI MDE L, BENVENUTI LA, AIELLO VD, GUTIERREZ PS, BELLOTTI G, PILEGGI F. *An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial Trypanosoma cruzi antigens*. Clin Immunol Immunopathol; 83 (2): 165-72, 1997.

RIBEIRO, ALP E ROCHA, MOC. *Forma indeterminada da doença de Chagas. pp246-265. Em: Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Em: Brenner, Z, Andrade, ZA, e Barral-Neto, M. Segunda edição. Editora Guanabara Koogan. 2000.

ROSE, RR. *Infection, mimics, and autoimmune disease*. The Journal of Clinical Investigation 107 (8): 943-4. 2001.

ROSENBAUM, MB. *Chagasic cardiomyopathy*. Progress in Cardiovascular Disease 7: 199-225, 1964.

ROSSI MA, GONÇALVES S, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. *Experimental Trypanosoma cruzi cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis*. American Journal of Pathology; 114: 209–216, 1984.

ROSSI MA e PERES LC. *Effects of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy*. American Heart Journal; 124: 700, 1992.

ROSSI MA e SOUZA AC. *Is apoptosis a mechanism of cell death of cardiomyocytes in chronic chagasic myocarditis?* International Journal of Cardiology. 68 (3): 325-31, 1999.

SAEZ JC, NAIRN AC, CZERNIK AJ, FISHMAN GI, SPRAY DC, HERTZBERG EL. *Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte*

gap junctions. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 29(8):2131-45, 1997.

SARMAST, F., KOLLI, A., ZAITSEV, A., PARISIAN, K., DHAMOON, A.S., GUHA, P.K., WARREN, M., ANUMONWO, J.M.B., TAFFET, S.M., BERENFELD O. e JALIFE J. *Cholinergic atrial fibrillation: I gradients determine unequal K, Ach left / right atrial frequencies and rotor dynamics*. Cardiovascular Research 59: 863–873, 2003.

SAVIO-GALIMBERTI E, DOS SANTOS COSTA P, CAMPOS DE CARVALHO AC, PONCE-HORNOS JE. *Mechanical and energetic effects of chronic chagasic patients' antibodies on rat myocardium*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 287(3): H1239-45, 2004.

SAEZ JC, NAIRN AC, CZERNIK AJ, FISHMAN GI, SPRAY DC, HERTZBERG EL. *Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29 (8): 2131-45, 1997.

SILVEIRA, A.C. e VINHAES, M. *Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31 (supl II): 15-60, 1998.

SOMEKAWA S, FUKUHARA S, NAKAOKA Y, FUJITA H, SAITO Y, MOCHIZUKI N. *Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes*. Circulation Research 97(7):655-62, 2005.

STERIN-BORDA, L, LEIROS, CP, WALD, M, CREMANSCHI, G E BORDA, E. *Antibodies to β 1 and β 2-adrenoceptor in Chagas' disease*. Clinical and Experimental Immunology 74: 349-354, 1988.

STERIN-BORDA, L, GORELIK, G e BORDA, E. *Chagasic immunoglobulins binding with cardiac muscarinic cholinergic receptors modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals*. Clinical Immunology and Immunopathology. 61: 387-97, 1991.

SZARFMAN A, COSSIO PM, DIEZ C, ARANA RM, SADUN E. *Antibodies against endocardium, vascular structures, and interstitium of striated muscle that cross-react with *T. cruzi* and *T. rhodesiense**. Journal of Parasitology. 60 (6):1024, 1974.

TOSTES, S JR, BERTOLUCCI ROCHA-RODRIGUES, D, DE ARAUJO PEREIRA, B, RODRIGUES, V JR. *Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas'*

disease. *International Journal of Cardiology* 99(2): 233-7, 2005.

UNGERER M, BÖHM M, ELCE JS, ERDMANN E, LOHSE MJ. *Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β_1 -adrenergic receptor in the failing human heart.* *Circulation* 87: 454–463, 1993.

VAN KEMPEN MJ, FROMAGET C, GROS D, MOORMAN AF, LAMERS WH. *Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart.* *Circulation Research* 68 (6): 1638-51, 1991

VANOLI E e SCHWARTZ PJ. *Sympathetic--parasympathetic interaction and sudden death.* *Basic Research in Cardiology* 85 (Suppl 1): 305-21, 1990.

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.* *American Heart Journal* 127: 151–162, 1994.

WALLUKAT G, MORWINSKI R, KOWAL K, FÖRSTER A, BOEWER V, WOLLENBERGER A. *Autoantibodies against the β -adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: β -adrenergic agonism without desensitization.* *European Heart Journal* 12 (suppl D): 178–181, 1991.

WALLUKAT G, WOLLENBERGER A, MORWINSKY, R E ATSCHNER HF. *Anti beta1-adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops.* *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27(1):397-406, 1995.

WALLUKAT G, FU ML, MAGNUSSON Y, HJALMARSON A, HOEBEKE J, WOLLENBERGER A. *Agonistic effects of anti-peptide antibodies and autoantibodies directed against adrenergic and cholinergic receptors: absence of desensitization.* *Blood Press Supplement* 3: 31-6, 1996.

WALLUKAT, G, NISSEN, E, MORWINSKI, R e MÜLLER, J. *Autoantibodies against beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy.* *Herz* 25 (3): 261-6, 2000.

WALLUKAT, G., PODLOWSKI, S., NISSEN, E., MORWINSKI, R., CSONKA, C., TOSAKI, A. e BLASIG, I.E. *Functional and structural characterization of anti- β 1-adrenoceptor autoantibodies of spontaneously hypertensive rats.* *Molecular and Cellular Biochemistry* 251 (1-2): 67 – 75, 2003.

WANG W, ZHU W, WANG S, YANG D, CROW MT, XIAO RP, CHENG H. *Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway*. *Circulation Research* 95 (8): 798-806, 2004.

WHO (1991) Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, WHO Technical Report Series N° 811, 95 p.

WHO (World Healthy Organization). *Chagas disease* *Nature Reviews* 1: 14-15, 2003.

ZHU WZ, WANG SQ, CHAKIR K, YANG D, ZHANG T, BROWN JH, DEVIC E, KOBILKA BK, CHENG H, XIAO RP. *Linkage of β 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II*. *Journal of Clinical Investigation* 111: 617–625, 2003.

ANEXOS

Anexo 1

Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction

P.C.S. Costa , F.S.A. Fortes, A.B. Machado, N.A.C. Almeida, E.L. Olivares, P.R.

Cabral, R.C. Pedrosa, .C. Goldenberg, A.C. Campos-de-Carvalho and M.O. Masuda.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33: 439-446, 2000.

Anexo 2

Mechanical and energetic effects of chronic chagasic patients' antibodies on rat myocardium. Savio-Galimberti E, **Dos Santos Costa P**, Campos De Carvalho AC, Ponce-Hornos JE. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 287(3): H1239-45, 2004.

Anexo 3

Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. Medei, E., Pedrosa, RC, Benchimol, PRB, **Costa, PC**, Hernández, CCQ, Chaves, EA, Linhares, V, Masuda, MO, Nascimento, JH, Campos de Carvalho, ACC. International Journal of Cardiology *in press*.

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](#)