

JOÃO MARCOS BEMFICA BARBOSA FERREIRA

**Avaliação do metabolismo e atividade inflamatória
nas diversas formas evolutivas da doença de Chagas:
correlação com disfunção autonômica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Fernandes

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa-Ferreira, João Marcos Bemfica

Avaliação do metabolismo e atividade inflamatória nas diversas formas evolutivas da doença de Chagas : correlação com disfunção autonômica / João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Fábio Fernandes.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Metabolismo 3.Adiponectina 4.Leptina
5.Insulina 6.Resistência a insulina 7.Inflamação 8.Interleucina-6 9.Fator de necrose
tumoral alfa 10.Sistema nervoso autônomo 11.Cardiomiopatia chagásica

USP/FM/DBD-276/13

Ensinanças da dúvida

“Tive um chão (mas já faz tempo)
todo feito de certezas
tão duras como lajedos.

Agora (o tempo é que fez)
tenho um caminho de barro
umedecido de dúvidas.

Mas nele (devagar vou)
me cresce funda a certeza
de que vale a pena o amor”

Thiago de Mello

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTA TESE

A minha amada esposa Paula Rita, por ter possibilitado a conclusão desta tese com seu amor de esposa e mãe, por estar presente em todos os momentos de minha ausência cuidando de nossos filhos e por me fazer feliz.

A meus pais Janete e João, pelo amor incondicional, pelos exemplos e dedicação durante toda minha vida.

A meus filhos Marcos e João Roberto, por me fazerem renascer a cada dia e por serem a inspiração de minha vida.

A meus irmãos João Márcio e Maria Ely, pela amizade, companheirismo e ajuda.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof. Dr. Fábio Fernandes por ter permitido a realização desta tese apesar de todas as dificuldades, pelo estímulo sempre presente, por seus ensinamentos, compreensão e, sobretudo, sua amizade que torna mais fácil a superação dos obstáculos.

Ao Diretor da Unidade de Miocardiopatias, Prof. Dr. Charles Mady, pelos seus ensinamentos e estímulo.

Aos médicos da Unidade de Miocardiopatias Professores Drs. Barbara Ianni, Felix Ramires, Vera Salemi, Edmundo Arteaga e Luciano Nastari, por todo apoio e ensinamentos.

Ao colega de pós-graduação André Dabarian pelo apoio e amizade.

À enfermeira Paula Buck por sua atenção e ajuda.

A Lúcia por todo seu trabalho na elaboração do projeto e acompanhamento junto à fonte financiadora FAPESP.

A Rosely pela ajuda, compreensão e retaguarda em todos os momentos desta tese, tornando possível sua realização.

À equipe do laboratório da Unidade de Miocardiopatias Adriana, Fernanda, Keila e Orlando, pela ajuda no armazenamento e dosagem laboratorial.

À equipe do Laboratório Central do InCor, pela coleta dos exames.

À equipe da Unidade de Hipertensão, Prof. Dr. Heno Lopes, por sua ajuda desde a construção do projeto e pela realização dos exames de bioimpedância. À Dra. Juliana Gil, pela realização dos exames de bioimpedância. Ao Prof. Dr. Luiz Bortolotto e Dra. Valéria Hong, pela realização dos exames de Doppler de carótidas.

À equipe da Unidade de Arritmias representada pela Prof. Dra. Denise Hachul, pela realização dos testes de inclinação.

Ao Prof. Dr. Cesar Grupi, pela realização dos exames de Holter e por seus importantes ensinamentos.

À equipe do Holter representada por Dedé, Andréia e Carlos, por todo seu apoio na realização dos exames.

À equipe da Pós-graduação Neusa, Juliana, Tatiane e Eva, pela ajuda e orientação.

A minha sogra Rita Maria, sogro Paulo Roberto e cunhados Rita Lorena e Paulo Alexandre, pela ajuda, especialmente ao cuidar de meus filhos.

A meu Professor de Cardiologia na graduação e atual chefe Dr. José Wilson de Souza Cavalcante, pela amizade, ensinamentos e apoio incondicional tornando possível a conclusão desta tese.

Ao meu orientador de iniciação científica Dr. Aristóteles Alencar por sua amizade, por ter me dado os primeiros ensinamentos da pesquisa científica e por continuar me ensinando até hoje.

Aos pacientes que, com muitas dificuldades, realizaram os exames previstos.

Ao Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP), instituição que sempre considerarei como parte de minha vida e que me recebeu de braços abertos desde a residência médica.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento deste projeto.

E por fim, a Deus que tudo proporcionou.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	14
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
3.1	População do estudo	17
3.2	Critérios de inclusão	17
3.3	Critérios de exclusão.....	17
3.4	Casuística	18
3.5	Procedimentos.....	19
3.5.1	Seleção dos pacientes.....	19
3.5.2	Avaliação clínica.....	19
3.5.3	Medidas antropométricas	20
3.5.4	Ecocardiograma transtorácico.....	21
3.5.5	Dosagens sanguíneas	22
3.5.6	Ultrassonografia das artérias carótidas	24
3.5.7	Avaliação do sistema nervoso autônomo.....	24
3.6	Análise estatística	28
4	RESULTADOS	30
4.1	Características clínicas da população estudada	31
4.2	Medidas antropométricas	33
4.3	Ecocardiograma transtorácico.....	34
4.4	Perfil lipídico e glicemia de jejum	36
4.5	Parâmetros metabólicos e inflamatórios	36
4.6	Ultrassonografia das artérias carótidas	40
4.7	Avaliação do sistema nervoso autônomo.....	40
4.7.1	Análise do Holter 24 horas	40
4.7.2	Teste de inclinação postural.....	42
4.8	Correlações	44
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	66
7	ANEXOS	68
8	REFERÊNCIAS.....	73

LISTAS

Abreviaturas

AF	Alta frequência
ANOVA	Análise de variância
ASDNN	Média dos desvios-padrão dos intervalos RR normais a cada 5 minutos
BF	Baixa frequência
CCC	Cardiopatía chagásica crônica
DAC	Doença arterial coronária
DC	Doença de Chagas
DDVE	Diâmetro diastólico ventricular esquerdo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
E' lateral	Velocidade diastólica precoce no anel mitral lateral
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Teste de imunoabsorção ligado a enzima
EMIC	Espessura médio-intimal da carótida
FC	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de ejeção ventricular esquerda
FI	Forma indeterminada
GC	Grupo controle

HOMA-IR	Resistência a insulina pelo modelo de avaliação da homeostase
I-123	Iodo-123
IC	Insuficiência cardíaca
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
IDMVD	Índice de desempenho miocárdico do ventrículo direito
IDMVE	Índice de desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo
Log	Transformado logaritmicamente
mm	milímetros
ms	milissegundos
ms ²	milissegundos ao quadrado
m/seg	metros por segundo
mg/dL	miligramas por decilitro
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
pNN50	Porcentagem dos ciclos adjacentes com diferenças de duração acima de 50 ms
Relação BF/AF	Relação entre o componente de baixa frequência e de alta frequência
Relação E/E'	Relação entre a onda E do fluxo mitral com a onda E do anel mitral
RMSSD	Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças dos intervalos RR adjacentes
S' mitral	Velocidade sistólica do anel mitral lateral
SDANN	Desvio padrão das médias dos intervalos RR em intervalos de cinco minutos

SDNN	Desvio padrão médio de todos os intervalos RR normais
SNA	Sistema nervoso autônomo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
un	Unidades normalizadas
VAEi	Volume atrial esquerdo indexado
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca

Tabelas

Tabela 1 -	Características clínicas da população estudada	31
Tabela 2 -	Medidas antropométricas	33
Tabela 3 -	Medidas obtidas no ecocardiograma transtorácico	35
Tabela 4 -	Medidas de glicemia e perfil lipídico	36
Tabela 5 -	Medidas dos parâmetros metabólicos	39
Tabela 6 -	Medidas das citocinas inflamatórias	39
Tabela 7 -	Índices de análise do SNA no Holter 24 horas	41
Tabela 8 -	Índices de análise do SNA no teste de inclinação postural.....	43
Tabela 9 -	Correlações significativas da adiponectina com índices de análise do SNA e medidas ecocardiográficas	45
Tabela 10 -	Determinantes da adiponectina (log) na análise multivariada	46
Tabela 11 -	Correlações significativas da interleucina-6 com índices de análise do SNA e medidas ecocardiográficas	49
Tabela 12 -	Determinantes da interleucina-6 (log) na análise multivariada	50

Gráficos

Gráfico 1 -	Gráfico de box-plot dos valores obtidos na dosagem de insulina nos quatro grupos.....	37
Gráfico 2 -	Gráfico de box-plot dos valores de HOMA-IR nos quatro grupos.....	37
Gráfico 3 -	Gráfico de box-plot dos valores obtidos na dosagem de leptina nos quatro grupos.....	38
Gráfico 4 -	Gráfico de box-plot dos valores obtidos na dosagem de adiponectina nos quatro grupos	38
Gráfico 5 -	Gráfico de dispersão dos valores de adiponectina e componente AF (un) no teste de inclinação postural (posição ortostática).....	47
Gráfico 6 -	Gráfico de dispersão dos valores de adiponectina e componente BF (un) no teste de inclinação (posição ortostática).....	47

RESUMO

Barbosa-Ferreira JMB. *Avaliação do metabolismo e atividade inflamatória nas diversas formas evolutivas da doença de Chagas: correlação com disfunção autonômica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 90p.

INTRODUÇÃO: A cardiopatia chagásica crônica (CCC) apresenta características específicas, tais como: disfunção autonômica e atividade inflamatória exacerbada. Esta fisiopatologia sugere que alguns parâmetros metabólicos podem estar alterados em pacientes chagásicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros metabólicos e inflamatórios nas diversas formas evolutivas de doença de Chagas e sua correlação com medidas de avaliação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

MÉTODOS: Foram avaliados 60 indivíduos divididos em 4 grupos (n=15): Grupo controle (GC), Grupo FI - forma indeterminada, Grupo ECG- cardiopatia chagásica com alteração eletrocardiográfica sem disfunção ventricular e Grupo IC - cardiopatia chagásica com disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Todos os grupos foram pareados de acordo com sexo, idade e índice de massa corporal. Os pacientes realizaram dosagens sanguíneas de insulina, leptina, adiponectina, interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) pelo método de ELISA. O SNA foi avaliado através da variabilidade da frequência cardíaca no holter 24 horas e no teste de inclinação postural. Os valores de RMSSD, pNN50 e do componente alta frequência (AF) foram utilizados como estimativa da atividade parassimpática. Os valores do componente de baixa frequência (BF) estimaram a atividade simpática. A análise estatística foi feita utilizando-se a ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos, o coeficiente de Spearman para a análise das correlações e a regressão linear múltipla para a análise multivariada.

RESULTADOS: A leptina e insulina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos [Leptina: GC=3,42 (7,43); FI=3,03 (6,53); ECG=5,56 (6,2); IC=2,86 (2,67) ng/ml; p=0,626. Insulina: GC=3,41 (1,98); FI=4,31 (2,85); ECG=4,30 (3,06); IC=4,58 (2,88) ng/ml; p=0,901] A adiponectina apresentou níveis maiores nos grupos ECG e IC [GC=4766,5 (5529,5); FI= 4003,5 (2482,5); ECG= 8376,5 (8388,5); IC= 8798 (4188) ng/ml; p<0,001]. IL-6 e TNF- α foram maiores no Grupo IC [IL-6: GC=1,85 (6,41); FI=1,58 (1,91); ECG=1,0 (1,57); IC= 31,44 (72,19) pg/ml; p=0,001. TNF- α : GC=22,57 (88,2); FI=19,31 (33,16); ECG=12,45 (3,07); IC=75,15 (278,57) pg/ml; p=0,04]. A insulina, leptina e TNF- α não apresentaram correlações significativas com medidas de avaliação do SNA. A adiponectina apresentou correlação positiva com o componente AF (r= 0,336; p= 0,009) e correlação negativa com o componente BF (r= -0,336; p= 0,009). A interleucina-6 apresentou correlação positiva com o componente AF (r= 0,419; p=0,004) e correlação negativa com o componente BF (r= -0,393; p= 0,007). Porém, na análise multivariada apenas a adiponectina apresentou correlação significativa com medidas de função do SNA.

CONCLUSÃO: A adiponectina foi maior nos grupos ECG e IC. A IL-6 e o TNF- α foram maiores no grupo IC. O aumento dos níveis de adiponectina esteve associado a diminuição da atividade simpática e predomínio da atividade parassimpática.

Descritores: 1. Doença de Chagas 2. Metabolismo 3. Adiponectina 4. Leptina 5. Insulina 6. Resistência a insulina 7. Inflamação 8. Interleucina-6 9. Fator de necrose tumoral alfa 10. Sistema Nervoso Autônomo 11. Cardiomiopatia chagásica

SUMMARY

Barbosa-Ferreira JMB. *Evaluation of metabolism and inflammatory activity in different forms of Chagas' disease: correlation with autonomic dysfunction* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013. 90p.

BACKGROUND: Chagas disease (CD) has specific characteristics such as autonomic dysfunction and increased inflammatory activity. This pathophysiology suggests that metabolic parameters can be altered in patients with CD. The aim of this study was to evaluate the metabolic and inflammatory parameters in different forms of CD and their correlation with Autonomic Nervous System (ANS) measures. **METHODS:** We evaluated 60 subjects divided into 4 groups (n=15): control group (CG), group IF (indeterminate form); group ECG (ECG abnormalities and normal left ventricular function in echocardiogram) and HF group (heart failure with left ventricular dysfunction). All groups were matched for age, sex and body mass index. The patients underwent insulin, adiponectin, leptin, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) measurements by ELISA. The Autonomic Nervous System was assessed by heart rate variability in 24-hour Holter and tilt test. RMSSD, pNN50 and High Frequency (HF) component values were used to estimate parasympathetic activity and low frequency (LF) components were used to estimate sympathetic activity. Statistical analyses were performed using ANOVA or Kruskal-Wallis tests to compare groups. Spearman coefficient was used for correlation analysis and linear regression for multivariate analysis. **RESULTS:** No significant differences were observed in leptin and insulin levels between groups. [Leptin: CG=3.42 (7.43); IF=3.03 (6.53); ECG=5.56 (6.2); HF=2.86 (2.67) ng/ml; p=0.626. Insulin: CG=3.41 (1.98); IF=4.31 (2.85); ECG=4.30 (3.06); HF=4.58 (2.88) ng/ml; p=0.901]. Adiponectin was higher in ECG and HF groups. [CG=4766.5 (.5529.5); IF= 4003.5 (2482.5); ECG= 8376.5 (8388.5); HF= 8798 (4188) ng/ml; p<0.001]. IL-6 and TNF- α were higher in HF group. [IL-6: CG=1.85 (6.41); IF=1.58 (1.91); ECG=1.0 (1.57); HF= 31.44 (72.19) pg/ml; p=0.001. TNF- α : CG=22.57 (88.2); IF=19.31 (33.16); ECG=12.45 (3.07); HF=75.15 (278.57) pg/ml; p=0.04]. Insulin, leptin and TNF- α did not correlate with autonomic dysfunction. Adiponectin correlated positively with HF component (r=0.336; p= 0.009) and inversely with LF component (r= -0.336; p=0.009). IL-6 correlated positively with HF component (r= 0.419; p=0.004) and inversely with LF component (r= -0.393; p= 0.007). However, in multivariate analysis only adiponectin correlated significantly with ANS measures. **CONCLUSION:** Adiponectin levels were higher in ECG and HF groups. IL-6 and TNF- α were higher in HF group. Higher levels of adiponectin were associated with reduced sympathetic activity and predominance of parasympathetic activity.

Descriptors: 1. Chagas disease 2. Metabolism 3. Adiponectin 4. Leptin 5. Insulin 6. Insulin resistance 7. Inflammation 8. Interleukin-6 9. Tumor necrosis factor-alpha 10. Autonomic nervous system 11. Chagas Cardiomyopathy.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), também chamada tripanossomíase americana, é uma antroponose causada por um protozoário flagelado, denominado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). As últimas estimativas da Organização Panamericana de Saúde indicam que, na América Latina, existem cerca de 8 milhões de pessoas portadoras de DC e que ocorrem cerca de 50 mil casos novos por ano. Desde 1990, iniciativas regionais têm reduzido substancialmente o número de novas infecções na América Latina. No entanto, a DC ainda representa um grave problema de saúde pública. No Brasil, ainda existem, aproximadamente, 1,9 milhão de pessoas infectadas e cerca de 570 mil apresentam cardiopatia^{1,2}. A cardiopatia chagásica correspondeu a 20% dos casos de insuficiência cardíaca, classe funcional III ou IV, em pesquisa realizada em hospital terciário de atendimento cardiológico no Brasil³. Além disto, algumas regiões específicas, como por exemplo a região Amazônica, ainda vem apresentando aumento no número de casos diagnosticados, tanto agudos como crônicos⁴. Por outro lado, por conta da intensificação do fluxo migratório, a DC vem também aumentando sua importância em países não endêmicos, tais como: Estados Unidos da América, Canadá, alguns países da Europa, Japão e Austrália. Nos Estados Unidos da América, estima-se que 300 mil imigrantes legais podem ser portadores da doença. A Espanha tem a segunda maior prevalência com cerca de 40 a 60 mil imigrantes infectados⁵.

A história natural da doença resume-se em fase aguda e crônica. Na fase aguda, a infecção gera quadro de miocardite com marcante presença do *T. cruzi* no miocárdio e intenso infiltrado inflamatório formado predominantemente por células

T CD8+ e CD4+. Observa-se também a presença de macrófagos ativados e lesão direta dos miócitos, por vezes, com reposição por fibras de colágeno⁶.

Nessa fase, manifestações clínicas ocorrem em menos de 10% dos casos, sobretudo em crianças, podendo surgir quadro de insuficiência cardíaca (IC). O parasitismo intenso observado na fase aguda é controlado pela resposta imune contra o *T. cruzi* levando à forma crônica com baixo parasitismo⁷.

A fase crônica inicia-se após 4 a 8 semanas de infecção, quando a parasitemia cai, e os sintomas da fase aguda desaparecem. Na fase crônica, cerca de 70% dos indivíduos não apresentam sintomas, e os exames complementares de rotina não demonstram alterações. Esta fase é conhecida como forma indeterminada (FI)⁸. Os 30% restantes situam-se na forma crônica digestiva e/ou cardíaca, e um terço desses pacientes pode evoluir para a forma de cardiopatia grave⁷. O acometimento cardíaco na fase crônica inclui amplo espectro de manifestações, que vão desde a presença de anormalidades detectadas apenas em exames complementares, até formas graves, como a insuficiência cardíaca ou a morte súbita⁹.

A progressão para a disfunção miocárdica representa a principal causa de morbidade e mortalidade. Além disso, alguns trabalhos sugerem que a insuficiência cardíaca de etiologia chagásica apresenta pior prognóstico, quando comparada a de outras etiologias, tais como: a doença isquêmica e a cardiomiopatia dilatada idiopática¹⁰.

Portanto, as investigações em relação à etiopatogenia e à fisiopatologia do desenvolvimento e progressão da cardiopatia chagásica são importantes na proposta de novas terapêuticas, na tentativa de minimizar esta morbimortalidade.

Os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na cardiopatia chagásica são: disfunção microvascular, acometimento do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) , agressão direta pelo parasita e lesão miocárdica mediada pelo sistema imune ¹¹.

Em modelos animais, a disfunção microvascular foi demonstrada durante a fase septicêmica da doença, com lesão endotelial e da microcirculação. Esta lesão é caracterizada por edema, pontos de descontinuidade celular e focos de vasculite ¹². As mesmas alterações anatômicas são observadas em pacientes chagásicos ¹³. A disfunção microvascular não parece ser um mecanismo independente na patogenia da cardiopatia chagásica crônica (CCC), porém pode contribuir para potencializar a agressão inflamatória ao miocárdio ¹¹.

Com relação ao acometimento do SNA, existem inúmeras evidências de que a DC associa-se a lesões em estruturas neurais relacionadas sobretudo ao sistema parassimpático, mas também ao sistema simpático. No trato gastrointestinal, as lesões do sistema parassimpático são fundamentais para o desenvolvimento das dilatações (megas) e disfunções dos órgãos ¹⁴.

Estudos iniciados por Köberle, na década de 1950, trouxeram um novo conceito para a patologia da DC. Estudos anatomopatológicos feitos pela padronização da técnica de contagem neuronal em pacientes falecidos na fase crônica da doença registraram redução numérica das células nervosas parassimpáticas. Com esses dados, Köberle introduziu o conceito de que a CCC é decorrente da lesão primária na inervação parassimpática, sendo considerada uma “cardiopatia parassimpaticopriva” ¹⁵.

Posteriormente, na década de 1970, Alcântara conseguiu demonstrar em estudo necroscópico a agressão ao sistema nervoso simpático de natureza chagásica. Havia uma denervação da ordem de 36,8% nos gânglios cervicotorácicos direitos e esquerdos dos indivíduos chagásicos e, em contrapartida, a denervação parassimpática encontrada era de 52% ¹⁵. Alterações no sistema nervoso simpático também foram demonstradas *in vivo* pelo estudo da captação segmentar de metaiodobenzilguanidina marcada com Iodo-123 (I-123), que demonstrou distúrbios na inervação simpática cardíaca anatômica e/ou funcional. Esses distúrbios foram encontrados ainda na forma indeterminada e mostraram-se mais intenso em pacientes com CCC e disfunção ventricular ¹⁶.

Diversos mecanismos vêm sendo propostos para explicar a lesão do SNA na doença de Chagas. Ainda é controverso se este acometimento é primário e irreversível, relacionado à perda neuronal, ou se é um fenômeno secundário e reversível, decorrente da ativação de mecanismos inflamatórios e autoimunes. A perda neuronal ocorre predominantemente durante a fase aguda com a participação de três mecanismos: parasitismo direto dos neurônios, degeneração causada por inflamação periganglionar e reação autoimune antineuronal ¹¹. Por outro lado, foi registrada a presença de anticorpos circulantes contra componentes de fibras nervosas e de neurônios de pacientes com DC. Os anticorpos contra receptores vagais (muscarínicos) e simpáticos (beta-adrenérgicos) funcionariam como agonistas, podendo induzir dessensibilização e *down regulation*, levando ao progressivo e, possivelmente, reversível bloqueio desses receptores ¹⁷.

Consistentemente com as alterações demonstradas em estudos morfológicos, vários testes fisiológicos e farmacológicos demonstraram comprometimento da

regulação autonômica cardíaca em pacientes chagásicos. Estes testes mostraram alterações autonômicas, tanto do ramo parassimpático como do simpático, com comprometimento mesmo nas fases precoces sem a presença de disfunção ventricular¹⁸. Entre os testes mais utilizados para a avaliação do SNA, destacam-se as injeções de atropina, metacolina e fenilefrina, exercícios isométricos, testes de inclinação postural, imersão facial, manobra de Valsalva, arritmia sinusal respiratória e Holter 24 horas com análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)¹¹.

A análise da VFC vem sendo utilizada, tanto para a detecção da presença de disfunção autonômica como para a avaliação do balanço simpaticovagal. Este método analisa as oscilações no intervalo entre batimentos cardíacos consecutivos, assim como oscilações entre frequências cardíacas instantâneas consecutivas¹⁹. Esta análise pode ser feita em períodos curtos, tais como: 2, 5 ou 15 minutos (geralmente associada a testes provocativos, tais como: manobras respiratórias, provas farmacológicas ou testes posturais) ou períodos longos, como no Holter 24 horas²⁰.

São obtidos índices por métodos lineares no domínio do tempo e da frequência. Os índices mais utilizados no domínio do tempo são: desvio-padrão médio de todos os intervalos RR normais (SDNN), desvio-padrão das médias dos intervalos RR em intervalos de 5 minutos (SDANN), raiz quadrada da média do quadrado das diferenças dos intervalos RR adjacentes (RMSSD) e porcentagem dos ciclos adjacentes com diferenças de duração acima de 50 ms (pNN50)²⁰. Outro método linear é o domínio da frequência, sendo a densidade do poder espectral a mais empregada atualmente. Esta análise decompõe a VFC em componentes oscilatórios fundamentais, tais como: componente de alta frequência (AF), com variação de 0,15 a 0,4 Hz, que corresponde à modulação respiratória, sendo um

indicador da atuação do nervo vago sobre o coração; componente de baixa frequência (BF), com variação de 0,04 a 0,15 Hz, que é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração com predominância do simpático e componentes de muito baixa e ultrabaixa frequência cuja explicação fisiológica não está bem estabelecida e parecem estar relacionados ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, à termorregulação e ao tônus vasomotor, sendo menos utilizados na prática clínica. Para obtenção dos índices espectrais, o tacograma de frequência sofre processamento matemático por meio de algoritmos, tais como a transformação rápida de Fourier ou modelos autorregressivos. Os índices utilizados no domínio da frequência podem ser descritos em valores absolutos, sendo expressos em milissegundos ao quadrado (ms^2) ou em unidades normalizadas (un), representando o valor de cada um desses componentes em relação ao poder total ^{19,20}.

A detecção da disautonomia no contexto da CCC é importante pela sua contribuição para o desencadeamento de arritmias complexas, inclusive de morte súbita. Além disso, a disfunção autonômica tem potencial para influenciar outras vias metabólicas e inflamatórias presentes na fisiopatologia da CCC ¹¹.

Outro mecanismo fisiopatológico para a CCC é a lesão direta pelo parasita. Esta agressão miocárdica vem sendo observada em modelos experimentais e em resultados de biópsias. Em modelo experimental, observou-se que a carga parasitária na fase aguda correlacionou-se com o infiltrado inflamatório, e a degeneração de fibras cardíacas na fase crônica ²¹. A presença do parasita ou de seu DNA no tecido cardíaco de pacientes infectados, embora escassa, é relevante para a persistência da resposta inflamatória durante a fase crônica. Estudos realizados com biópsia endomiocárdica demonstram que a persistência do parasita em pacientes com CCC é

associada com miocardite de alto grau, e esta miocardite é associada com disfunção ventricular^{22,23}.

A atividade inflamatória desempenha um papel fundamental, como um mecanismo fisiopatológico para a CCC; sendo considerada, inclusive, como principal mecanismo responsável pela agressão miocárdica e pela disfunção ventricular na DC¹¹. A ausência de correlação entre o parasitismo no tecido cardíaco e a intensidade da atividade inflamatória sugere que o processo de autoimunidade tem grande importância nesta resposta imune²⁴. Observou-se que antígenos do *T. cruzi* (por exemplo, a proteína B13) são homólogos a proteínas do coração (sobretudo a miosina), provocando uma reação cruzada que sensibiliza os linfócitos T CD4+. Estes linfócitos ativados iniciam uma reação do tipo hipersensibilidade tardia no tecido cardíaco por meio da produção de citocinas inflamatórias^{25,26}. Estudos em tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica identificaram a presença de citocinas inflamatórias tais como: interferon, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-2, interleucina-4 e interleucina-6 (IL-6)²⁷. No sangue periférico, também foi demonstrado que a infecção crônica induz um desvio da resposta imunológica para um perfil pró-inflamatório com produção de citocinas do tipo TH1. Além disso, ocorre supressão de citocinas com atividade anti-inflamatória do tipo TH2, como interleucinas 4 e 10²⁸⁻³⁰. Mocelin et al. encontraram níveis séricos elevados de citocinas inflamatórias como interleucina-6 e TNF- α no grupo de pacientes com CCC, quando comparados com pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática. Estes marcadores também se correlacionaram com pior prognóstico³¹.

Os mecanismos fisiopatológicos descritos podem ter influência mútua entre eles. Em outras situações fisiológicas ou patológicas, a atividade inflamatória pode

ser regulada pela função autonômica por meio do chamado “reflexo inflamatório”. Este mecanismo consiste na inibição, por parte do nervo vago, da atividade dos macrófagos e da liberação de citocinas ³². Na doença de Chagas, quando existe disfunção autonômica, o mecanismo inibitório pode ser perdido, exacerbando a atividade inflamatória. Esta “neuroimunomodulação” pode ser importante na fisiopatologia da DC ³³.

Além disso, em outros processos patológicos como, por exemplo, a síndrome metabólica e a obesidade, a função do SNA e a atividade inflamatória sistêmica influenciam alguns marcadores metabólicos tais como a resistência à insulina e as diversas adipocitocinas ³⁴. Isto sugere que alguns desses parâmetros metabólicos podem ser alterados também nos pacientes chagásicos.

O tecido adiposo exerce importante ação endócrina e imune por meio da produção de mediadores bioativos denominados adipocitocinas. Existem mais de 50 adipocitocinas descritas, sendo produzidas sobretudo pelos adipócitos. A maior parte das adipocitocinas secretadas pelo tecido adiposo corresponde à adiponectina e à leptina ³⁵.

A adiponectina está envolvida em múltiplos processos biológicos, tendo sua síntese regulada por diferentes fatores. Sua secreção é influenciada pela atividade do SNA, por citocinas inflamatórias, por peptídeos natriuréticos e pela composição corporal. Seus níveis séricos diminuem na obesidade e aumentam na caquexia. A adiponectina possui efeitos benéficos de atividade anti-inflamatória, antiaterogênica e de diminuição da resistência à insulina ³⁶⁻³⁸. No entanto, o papel da adiponectina na doença cardiovascular ainda é controverso. Estudos prévios têm demonstrado que a

adiponectina está paradoxalmente aumentada em pacientes com insuficiência cardíaca (IC), inclusive predizendo a morbidade e a mortalidade ^{39,40}.

A leptina tem sua secreção aumentada por mediadores, tais como: citocinas inflamatórias, insulina, glicose, estrogênios e glicocorticoides. Seus efeitos incluem: aumento da atividade pró-inflamatória, da atividade pró-trombótica, proliferação neointimal, disfunção endotelial e indução de resistência à insulina ^{37,38}. Sua relação com o SNA simpático é de duas vias, com o aumento da secreção de leptina levando ao aumento da atividade simpática e a atividade simpática inibindo a síntese de leptina ^{41,42}. Os níveis séricos de leptina em pacientes com IC apresentam resultados conflitantes em estudos prévios. Schulze et al. realizaram estudo em pacientes com IC avançada, demonstrando altos níveis de leptina ⁴³. Por outro lado, Filippatos et al. observaram níveis diminuídos de leptina em pacientes com IC e caquexia cardíaca ⁴⁴. Fernandes et al. (2007) estudaram os níveis de leptina nas diferentes formas da doença de Chagas e encontraram níveis menores em pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica que em pacientes com outras formas de DC ou do grupo controle. Especula-se que a disfunção autonômica, presente na insuficiência cardíaca de etiologia chagásica, provoque a diminuição na produção de leptina ou que ocorra um aumento na degradação da leptina ⁴⁵.

As adipocitocinas parecem também ser importantes mediadores da resposta inflamatória durante infecções ⁴⁶. O *T. cruzi* apresenta tropismo pelo tecido adiposo. Em 1995, Andrade et al. realizaram estudo em modelos animais com imunohistoquímica e microscopia eletrônica, demonstrando que os adipócitos podem ser infectados por *T. cruzi*; podendo servir, inclusive, como reservatório para possíveis reativações da doença ⁴⁷. Coombs et al. (2005), realizando estudo em ratos infectados

na fase aguda de doença de Chagas, demonstraram que os adipócitos infectados com *T. cruzi* exibem mudanças na secreção de adipocitocinas. Houve diminuição dos níveis de adiponectina e leptina e aumento nos níveis de interleucina-6 e TNF- α ⁴⁸. Outro estudo realizado por Nagajyothi et al. (2008) demonstrou aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina-6 e TNF- α em cultura de adipócitos infectados com *T. cruzi* ⁴⁹. Recentemente, Ferreira et al. demonstraram a persistência do *T. cruzi* em adipócitos de humanos com cardiopatia chagásica crônica.⁵⁰ As alterações na função dos adipócitos causadas pela infecção chagásica podem contribuir para a fisiopatologia da cardiopatia chagásica ^{51,52}.

Existem poucos estudos sobre outros parâmetros metabólicos na DC com resultados conflitantes. Com relação ao metabolismo da glicose, há evidências de acometimento pancreático em pacientes com DC aguda e crônica, com aumento no tamanho e número de ilhotas pancreáticas, infiltrado inflamatório, fibrose e despopulação neuronal pancreática ⁵³⁻⁵⁵. Alguns estudos demonstram resposta diminuída de insulinemia à sobrecarga de glicose, tanto oral como venosa, sugerindo secreção reduzida de insulina causada por denervação autonômica ou injúria pancreática ⁵⁶⁻⁵⁸. Santos et al. (1999) relataram maior frequência de Diabetes mellitus e hiperglicemia em mulheres com cardiopatia chagásica comparadas com controles, forma digestiva e forma indeterminada. Como explicação sugeriram atividade simpática excessiva decorrente de denervação parassimpática e/ou hipoinsulinemia decorrente de comprometimento funcional e anatômico do pâncreas ⁵⁹. Outros estudos não demonstraram maior prevalência de Diabetes mellitus ou alterações em teste de tolerância oral à glicose em chagásicos ^{57,60}.

Sabe-se que os diferentes mediadores metabólicos e inflamatórios exercem papel fundamental na etiopatogenia da aterosclerose ^{35,37}. No entanto, pouco se conhece a respeito da importância desses mediadores na gênese da aterosclerose em pacientes chagásicos.

Com relação ao diagnóstico de aterosclerose em autópsias de pacientes com DC, Lopes et al. (1995), estudando corações necropsiados de chagásicos e não chagásicos, não demonstraram diferenças quanto à frequência de infarto do miocárdio ou doença aterosclerótica coronariana ⁶¹. Por outro lado, Oliveira et al. (2007) relataram menor frequência de aterosclerose de aorta e espessamento valvar mitral em autópsias de idosos com cardiopatia chagásica crônica, quando comparados com idosos sem doença de Chagas ⁶².

Pouco se conhece a respeito da presença de marcadores subclínicos de aterosclerose em pacientes chagásicos. A aterosclerose subclínica pode ser detectada por métodos não invasivos, tais como: a medida da espessura médio-intimal da carótida (EMIC) através da ultrassonografia modo bidimensional ou a determinação da calcificação arterial pela angiotomografia coronária. A medida da EMIC apresenta vantagens por apresentar baixo custo e por não utilizar radiação ionizante ⁶³. Estudo recente avaliando a presença de doença arterial coronária (DAC) em pacientes chagásicos através da angiotomografia coronária demonstrou menor frequência de DAC, obstrutiva ou não, em pacientes chagásicos, quando comparados ao grupo controle ⁶⁴.

Em resumo, alguns aspectos da fisiopatologia da CCC ainda são desconhecidos. A CCC apresenta características específicas tais como: denervação cardíaca, atividade inflamatória exacerbada e anormalidades neuro-hormonais que a

diferem das outras cardiopatias. Esta fisiopatologia peculiar sugere que alguns parâmetros metabólicos podem estar alterados em pacientes chagásicos. Nesses pacientes, existem poucos estudos com medidas das diversas adipocitocinas e com avaliação de seu papel na inter-relação entre disfunção autonômica, metabolismo e inflamação. A associação entre parâmetros metabólicos, citocinas inflamatórias e disfunção autonômica em pacientes com DC ainda é controversa, por ser uma nova área de pesquisa a ser explorada. Esta associação pode ser importante na fisiopatologia da CCC e seu melhor entendimento poderá abrir novas perspectivas no estudo da doença.

2 OBJETIVO

- Avaliação do metabolismo e da atividade inflamatória e sua correlação com medidas de função do sistema nervoso autônomo nas diversas formas evolutivas da doença de Chagas.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

- Pacientes com diagnóstico de doença de Chagas atendidos no ambulatório da Unidade Clínica de Miocardiopatias do Instituto do Coração (InCor) da Universidade de São Paulo.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Sorologia positiva para doença de Chagas em dois métodos diferentes: imunofluorescência indireta e método de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)
- Idade entre 18 anos e 55 anos
- Ambos os gêneros
- Índice de massa corporal (IMC) normal, ou seja, entre 18,5 e 25 kg/m²

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Tabagismo
- Doença valvar cardíaca moderada ou grave
- Hipertensão arterial (pressão arterial sistólica > 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica > 90 mmHg)

-
- Diabetes mellitus (glicemia de jejum \geq 126 mg/dl ou glicemia pós-prandial de duas horas $>$ 200 mg/dl após teste de tolerância oral à glicose)
 - Uso de estatinas
 - Fibrilação atrial
 - Bloqueio atrioventricular avançado
 - Uso de marca-passo
 - Tireoidopatias
 - Doença pulmonar obstrutiva crônica
 - Insuficiência cardíaca classe funcional III ou IV pela *New York Heart Association* (NYHA)

3.4 CASUÍSTICA

- Foram avaliados sessenta indivíduos divididos em quatro grupos com 15 indivíduos cada. Todos os grupos foram pareados entre si, de acordo com o gênero e a idade (intervalo máximo de 5 anos).
- Grupo controle (GC): Pessoas saudáveis, com sorologia negativa para doença de Chagas.
- Grupo com forma indeterminada (Grupo FI): Pacientes com sorologia positiva para DC, assintomáticos, com eletrocardiograma, radiografia de tórax, ecocardiograma e estudos contrastados de esôfago e cólon normais.
- Grupo com alterações eletrocardiográficas e função ventricular normal (Grupo ECG): Pacientes com sorologia positiva para DC e alterações eletrocardiográficas, tais como: bloqueio divisional anterosuperior, bloqueio de

ramo direito, bloqueio de ramo esquerdo, extrassístoles ventriculares, taquicardia ventricular não sustentada ou alterações difusas do segmento ST; com fração de ejeção acima de 55% e sem insuficiência cardíaca

- Grupo com insuficiência cardíaca e disfunção sistólica ventricular esquerda (Grupo IC): Pacientes com sorologia positiva para DC e fração de ejeção < 40% pelo método de Simpson ao ecocardiograma transtorácico.

3.5 PROCEDIMENTOS

3.5.1 Seleção dos pacientes

- Com base em uma lista de 561 pacientes com diagnóstico de doença de Chagas da Unidade Clínica de Miocardiopatias do InCor, foi feita a análise do prontuário eletrônico e posterior contato telefônico para avaliação dos critérios de inclusão e exclusão. Os indivíduos do grupo controle foram selecionados baseados em uma lista de 123 doadores do banco de sangue do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo com sorologia negativa para doença de Chagas.
- Foram selecionados 71 indivíduos que preenchiam os critérios, e estes foram convidados a comparecer ao InCor para avaliação clínica.

3.5.2 Avaliação clínica

- A avaliação clínica foi feita com anamnese, exame físico e eletrocardiograma para reavaliação dos critérios de inclusão e exclusão. Durante a avaliação clínica,

foram excluídos cinco indivíduos que apresentavam critérios de exclusão, restando 66 indivíduos.

- Aqueles que preencheram os critérios de inclusão e exclusão foram convidados a participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foi preenchido em duas vias, assinadas pelo paciente ou por seu responsável legal, sendo uma via entregue ao paciente e a outra arquivada no prontuário. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0124/09.
- Durante a realização do estudo, seis indivíduos foram excluídos por não terem realizado todos os exames (um evoluiu com bloqueio atrioventricular total com necessidade de implante de marca-passo, um evoluiu com descompensação da IC e quatro não compareceram para a continuidade do estudo). Portanto, o estudo completo foi realizado com sessenta indivíduos.

3.5.3 Medidas antropométricas

- Todos os indivíduos foram submetidos a medidas antropométricas, tais como: peso, altura, índice de massa corporal e medida da circunferência abdominal. Foi realizada também a bioimpedância elétrica, utilizando-se o aparelho BIA 450 (Byodynamics, Seattle, Estados Unidos da América). Foram medidas a massa gorda, massa magra e água corporal total.

3.5.4 Ecocardiograma transtorácico

- Foi realizado ecocardiograma transtorácico bidimensional complementado com modo-M, Doppler pulsátil, tecidual e colorido, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia ⁶⁵, utilizando-se aparelho da marca Acuson, modelo Sequoia. Foram feitas medidas das cavidades cardíacas e avaliação das funções sistólica e diastólica ventriculares.

As cavidades medidas foram: diâmetro diastólico ventricular esquerdo (DDVE), diâmetro diastólico ventricular direito (DDVD) e volume atrial esquerdo indexado pela superfície corpórea (VAEi). A função sistólica ventricular foi avaliada pela fração de ejeção ventricular esquerda pelo método de Simpson (FEVE), pela velocidade sistólica do anel mitral lateral (S' lateral) e pela velocidade sistólica do anel tricúspide (S' tricúspide). A função diastólica ventricular esquerda foi avaliada pela relação entre a onda E do fluxo mitral com a onda E do anel mitral ao Doppler tecidual (Relação E/E') e pela velocidade diastólica do anel mitral lateral (E' lateral)^{65,66}.

O cálculo do índice de desempenho miocárdico dos ventrículos esquerdo e direito (IDM VE e IDM VD) que avalia a função global ventricular (combinação de função sistólica e diastólica) foi realizado. Este índice, também conhecido por “índice de Tei”, foi calculado pela equação: $IDM = \text{Tempo de contração isovolumétrica} + \text{Tempo de relaxamento isovolumétrico} / \text{Tempo de ejeção}$ ⁶⁷.

3.5.5 Dosagens sanguíneas

- Os parâmetros metabólicos estudados foram: leptina, adiponectina, insulina e índice de resistência à insulina pelo modelo de avaliação da homeostase (HOMA-IR). Os parâmetros inflamatórios estudados foram: interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa. Além disto foram dosados o perfil lipídico e a glicemia em jejum.
- Foram coletados 10 ml de sangue venoso por punção em membro superior, após jejum de 12 horas
- O sangue foi centrifugado e o soro armazenado a -70°C , para posterior realização das análises.
- As dosagens foram feitas, seguindo-se as seguintes metodologias:
 - I) Insulina: Método de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) com kit da marca Millipore (St. Charles, Missouri, USA). A sensibilidade do kit foi de $1\ \mu\text{U/ml}$ e o intervalo de referência de 31 a $65\ \mu\text{U/ml}$. As dosagens foram feitas em duplicata, com coeficiente de variação de 4,3%
 - II) Leptina: Método de ELISA com kit da marca Millipore (St. Charles, Missouri, USA). A sensibilidade do kit foi de $0,78\ \text{ng/ml}$ e o intervalo de referência de 12,9 a $26,8\ \text{ng/ml}$. As dosagens foram feitas em duplicata, com coeficiente de variação de 7,3%.
 - III) Adiponectina: Método de ELISA com kit da marca Millipore (St. Charles, Missouri, USA). A sensibilidade do kit foi de $100\ \text{ng/ml}$ e o intervalo de referência de 7.000 a $14.500\ \text{ng/ml}$. As dosagens foram feitas em duplicata, com coeficiente de variação de 3,1%.

-
- IV) Interleucina-6: Método de ELISA com kit da marca USCNK (Life Science Inc. Wuhan, China). A sensibilidade do kit foi de 5,6 pg/ml e o intervalo de referência de 75 a 175 pg/ml. As dosagens foram feitas em duplicata, com coeficiente de variação de 10,3%.
- V) Fator de necrose tumoral-alfa: Método de ELISA com kit da marca USCNK (Life Science Inc. Wuhan, China). A sensibilidade do kit foi de 5,9 ng/ml e o intervalo de referência de 150 a 350 pg/ml. As dosagens foram feitas em duplicata, com coeficiente de variação de 6,4%.
- VI) Glicose: Método enzimático e automatizado, denominado GLUC, utilizado no sistema de química clínica Dimension® (Siemens Health Care Diagnostics Inc., Newark, USA). O intervalo de referência foi de 0 a 500 mg/dl.
- VII) Colesterol total: Método enzimático e automatizado, denominado CHOL, utilizado no sistema de química clínica Dimension® (Siemens Health Care Diagnostics Inc., Newark, USA). O intervalo de referência foi de 50 a 600 mg/dl.
- VIII) HDL-colesterol: Método enzimático e automatizado, denominado AHDL, utilizado no sistema de química clínica Dimension® (Siemens Health Care Diagnostics Inc., Newark, USA). O intervalo de referência foi de 3 a 150 mg/dl.
- IX) Triglicerídeos: Método enzimático e automatizado, denominado TGL, utilizado no sistema de química clínica Dimension® (Siemens Health Care Diagnostics Inc., Newark, USA). O intervalo de referência foi de 15 a 1000 mg/dl.

- X) LDL-colesterol: Como todas as amostras apresentaram dosagem de triglicerídeos menor que 350 mg/dl, o LDL-colesterol foi calculado pela fórmula de Friedewald ($\text{LDL-Colesterol} = \text{Colesterol total} - \text{HDL colesterol} - \text{Triglicerídeos} / 5$).
- XI) A resistência à insulina foi estimada pelo modelo de avaliação da homeostase (HOMA-IR). O HOMA-IR foi calculado pela fórmula: $[(\text{glicose em jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia em jejum [} \mu\text{U/ml]}) / 22,5]$.

3.5.6 Ultrassonografias da artérias carótidas

- A ultrassonografia com modo B das artérias carótidas para medida da espessura médio-intimal foi realizada com o objetivo da detecção de aterosclerose subclínica. Foi utilizado o sistema ultrassonográfico pulsátil tipo “echotracking” denominado Wall-Track System2, com frequência de 7,5 MHz. A medida foi realizada na artéria carótida comum direita, em seu segmento distal, 1 cm antes da bifurcação, seguindo-se as orientações da Sociedade Americana de Ecocardiografia ⁶⁸.

3.5.7 Avaliação do Sistema Nervoso Autônomo

- A avaliação da função do Sistema Nervoso Autônomo foi realizada pelo Holter 24 horas e teste de inclinação postural (tilt test). Os pacientes foram orientados a não fazer uso de substâncias estimulantes, como café, chás, refrigerantes e bebidas alcoólicas no dia anterior e no dia dos exames.

A) Holter 24 horas

- O Holter 24 horas foi realizado com gravador da marca GE e os exames foram interpretados com o software MARS 7000 (GE Healthcare, North Grandview, Waukesha, USA). Foi realizada medida da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência (com transformação rápida de Fourier). A análise da variabilidade da frequência cardíaca foi feita apenas quando, pelo menos, 18 horas de traçado de boa qualidade e, pelo menos, 85% dos batimentos sinusais estavam presentes.

Os parâmetros avaliados foram:

Domínio do Tempo:

- I) Desvio padrão médio de todos os intervalos RR normais (SDNN)
- II) Desvio padrão das médias dos intervalos RR em intervalos de 5 minutos (SDANN)
- III) Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças dos intervalos RR adjacentes (RMSSD)
- IV) Porcentagem dos ciclos adjacentes com diferenças de duração acima de 50 ms (pNN50)

Domínio da Frequência:

- I) Componente de baixa frequência (BF): em valores absolutos (ms^2) e unidades normalizadas
- II) Componente de alta frequência (AF): em valores absolutos (ms^2) e unidades normalizadas
- III) Relação BF/AF

B) Teste da inclinação postural

- O teste de inclinação postural (tilt test) foi realizado com a seguinte metodologia:
 - Jejum oral por, pelo menos, 6 horas para sólidos e 4 horas para líquidos;
 - Período de repouso de 20 minutos em decúbito dorsal horizontal;
 - Elevação passiva da maca em 10 a 15 segundos para inclinação a 70 graus;
 - Exposição à postura ortostática por 20 minutos ou o tempo tolerado pelo paciente;
 - Monitorização contínua da frequência cardíaca e da pressão arterial batimento a batimento.

- No teste de inclinação postural, foi avaliada a variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência (com transformação rápida de Fourier). Foram feitas as medidas dos componentes em baixa e alta frequência (em valores absolutos e unidades normalizadas) e da relação BF/AF. Para isto, foi utilizado o sistema “Task Force Monitor” (CNSystems Medizintechnik GmbH, Graz, Áustria). Foram avaliados os 5 minutos imediatamente anteriores (posição supina) e os 5 minutos imediatamente posteriores à inclinação (posição ortostática).

- A média dos componentes espectrais obtidos nos períodos de tempo estabelecidos foi calculada. Os ciclos cardíacos com variação maior que 25% em relação a um precedente foram excluídos, como forma de abolir as alterações consequentes às extrassístoles ventriculares e supraventriculares. Apenas os traçados com, pelo menos, 85% de batimentos sinusais foram avaliados.

C) Interpretação dos parâmetros de avaliação do sistema nervoso autônomo

Os parâmetros, tais como: SDNN e SDANN foram utilizados para a avaliação da variabilidade global da frequência cardíaca (combinação de atividade parassimpática e simpática).

Os valores de pNN50, RMSSD e os componente de alta frequência (AF) em valores absolutos foram utilizados como estimativa da atividade parassimpática.

Os valores do componente de baixa frequência (BF) em valores absolutos foram utilizados como estimativa da atividade simpática.

Os componentes de baixa e alta frequência (em unidades normalizadas) e a relação BF/AF foram utilizados como estimativa do balanço simpaticovagal. O aumento do componente BF (em unidades normalizadas) e da relação BF/AF foram interpretados como um predomínio da atividade simpática. O aumento do componente AF (em unidades normalizadas) e uma redução da relação BF/AF foram interpretados como um predomínio da atividade parassimpática²⁰.

Para o cálculo dos componentes em baixa e alta frequência em unidades normalizadas (un), foi utilizada a seguinte fórmula:

- Componente BF ou AF em valores absolutos/ (poder espectral total – componente de muito baixa frequência) x 100

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado, tendo como base um estudo prévio que observou níveis de leptina maiores em um grupo controle do que no grupo com miocardiopatia chagásica e insuficiência cardíaca.⁴⁴ Para se encontrar diferenças de 6,5 unidades com desvio-padrão de 5 unidades ao nível de significância de 5% e poder de 80%, necessita-se de, no mínimo, 14 casos em cada grupo.

Inicialmente, todas as variáveis numéricas foram descritas, quando apropriadas, com medianas, intervalos interquartis, médias e desvios-padrão. As variáveis categóricas foram descritas em valores absolutos e percentuais.

Em cada variável, foi realizado o seguinte procedimento de análise para comparação de grupos independentes:

- utilizou-se a ANOVA usual, caso as suposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias tivessem sido observadas;
- caso a suposição de normalidade dos resíduos ou de homogeneidade das variâncias não tivesse sido observada, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.
- havendo evidências de diferença em, pelo menos, um grupo, utilizou-se o teste não-paramétrico de Tukey ou teste de Tukey para as comparações.

Para o estudo das correlações entre variáveis numéricas, foi usado o coeficiente de correlação de Spearman. Foram feitas análises das correlações de cada um dos parâmetros metabólicos e inflamatórios (leptina, adiponectina, insulina, HOMA-IR, interleucina-6 e TNF- α) com as medidas de avaliação do SNA. A análise das correlações foi realizada com a junção dos dados de todos os 60 indivíduos.

Além disso, para posterior inclusão de outras variáveis na análise multivariada, foram avaliadas também as correlações dos parâmetros metabólicos e inflamatórios entre si e com as medidas antropométricas e ecocardiográficas ⁶⁹.

A análise multivariada foi realizada por meio de modelos de regressão linear múltipla em que foram incluídas as variáveis que apresentaram correlação significativa com os parâmetros metabólicos e inflamatórios. As variáveis dependentes com distribuição assimétrica foram transformadas logaritmicamente antes da regressão ⁷⁰.

O nível de significância adotado para os testes foi de 5% ($\alpha = 0,05$), e os pacotes estatísticos utilizados foram o *SPSS* for Windows, versão 19.0 (*SPSS* Inc., Chicago, Illinois) e o software R, versão 2.15.2 (R development Core Team 2012).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Em cada grupo houve uma proporção de dez homens (66,6%) e cinco mulheres (33,3%). A idade variou entre 28 e 55 anos. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação à média de idade e frequência cardíaca (FC). A pressão arterial tanto sistólica (PAS) como diastólica (PAD) foi menor no grupo IC em relação aos outros três grupos.

As características clínicas estão descritas nos dados da Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas da população estudada

	Grupo controle	Grupo FI	Grupo ECG	Grupo IC	Valor de p
Idade (anos)	43,80 (± 7,43)	42,33 (± 7,30)	43,20 (± 6,14)	42,67 (± 6,72)	0,942
FC (bpm)	74,93 (± 7,00)	73,47 (± 9,20)	73,33 (± 8,20)	69,47 (± 10,91)	0,604
PAS (mmHg)	122,67 (± 7,04)	120,67 (± 9,61)	121,33 (± 9,90)	101,33 (± 9,90)*	<0,001
PAD (mmHg)	70,00 (± 7,56)	72,67 (± 7,99)	74,00 (± 7,37)	62,67 (± 5,94)*	0,001

Valores expressos em média (± DP) * p<0,001 em relação ao Grupo controle, FI e ECG
FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial distólica

Com relação à classe funcional de acordo com a New York Heart Association, 11 pacientes do grupo IC encontravam-se em classe funcional II. Os demais quatro pacientes, em classe funcional I.

Com relação ao uso de medicações, dois indivíduos do grupo ECG utilizavam como única droga a amiodarona. Nenhuma outra droga era usada pelos demais pacientes do grupo ECG e pelos indivíduos dos grupos controle e FI.

As drogas utilizadas pelos indivíduos do grupo IC foram as seguintes: amiodarona em três pacientes (20%), betabloqueadores em 15 pacientes (100%), inibidores da enzima conversora de angiotensina em 13 pacientes (86,6%), bloqueadores do receptor de angiotensina em dois pacientes (13,3%), furosemida em nove pacientes (60%), espironolactona em 11 pacientes (73,3%) e digoxina em um paciente (6,6%).

4.2 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

O peso, a circunferência abdominal e o índice de massa corporal (IMC) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos.

A água corporal total, quando medida em valores absolutos, foi igual nos quatro grupos; porém, quando se considerou a relação entre a água corporal total e o peso, os valores foram maiores no grupo IC.

A massa gorda, tanto em valores absolutos como em porcentagem, foi menor no grupo IC, com significância estatística para os valores absolutos. A massa magra, em valores absolutos e em porcentagem, não apresentou diferenças significativas entre os grupos, porém com tendência a uma maior porcentagem de massa magra no grupo IC.

Os dados antropométricos estão descritos nos dados da Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas antropométricas

Medidas	Grupo Controle	Grupo FI	Grupo ECG	Grupo IC	Valor de p
Peso (kg)	70,4 (± 8,5)	68,1 (± 10,0)	67,8 (± 8,5)	65,8 (± 8,8)	0,595
IMC (kg/m ²)	23,9 (± 1,2)	23,9 (± 1,3)	23,7 (± 1,2)	23,2 (± 1,5)	0,602
Circ. Abd. (cm)	83,1 (± 7,4)	85,5 (± 5,3)	84,0 (± 6,4)	82,4 (± 8,1)	0,634
Água corp. total (l)	39,9 (± 6,2)	37,3 (± 7,2)	38,1 (± 7,6)	40,9 (± 6,2)	0,460
ACT/peso(l/kg)	54,0 (± 6,4)	56,8 (± 6,9)	56,1 (± 9,3)	61,9 (± 4,7)*	0,009
Massa gorda (kg)	15,7 (± 4,4)	14,5 (± 5,8)	14,3 (± 6,2)	10,5 (± 3,3)*	0,015
Massa gorda (%)	22,9 (± 5,5)	20,7 (± 8,1)	21,4 (± 9,2)	16,1 (± 5,0)	0,071
Massa magra (kg)	52,8 (± 9,1)	55,8 (± 9,1)	53,5 (± 10,5)	55,3 (± 8,7)	0,798
Massa magra (%)	77,0 (± 5,5)	79,2 (± 8,1)	78,5 (± 9,2)	83,8 (± 5,0)	0,072

Valores expressos em média (± DP)

* p<0,05 em relação ao grupo controle

IMC: índice de massa corporal; Circ. Abd: circunferência abdominal; ACT: água corporal total; kg: quilogramas, %: porcentagem

4.3 ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCICO

A fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) foi menor no grupo IC em relação aos outros três grupos, e o diâmetro diastólico ventricular esquerdo (DDVE) foi maior no grupo IC que nos outros três grupos. O diâmetro diastólico ventricular direito (DDVD) foi maior no grupo IC, porém, sem significância estatística.

Com relação aos parâmetros de função diastólica, volume atrial esquerdo indexado (VAEi) e relação E/E', o grupo IC apresentou valores maiores em relação aos outros três grupos.

Os Índices de Desempenho Miocárdico de VE e VD (IDMVE e IDMVD) foram maiores no grupo IC que nos outros três grupos, não havendo diferença entre os grupos FI, ECG e controle.

A avaliação por meio do Doppler tecidual demonstrou, além das alterações do grupo IC, algumas alterações do grupo ECG em relação ao controle.

As velocidades sistólica do anel mitral lateral (S' mitral) e diastólica precoce no anel mitral lateral (E' lateral) foram menores nos grupos IC e ECG em relação ao controle. A velocidade sistólica do anel tricúspide (S' tricúspide) foi menor no grupo IC em relação aos outros três grupos, não havendo diferença entre os grupos FI, ECG e controle.

As medidas obtidas no ecocardiograma transtorácico estão descritas nos dados da Tabela 3.

Tabela 3 - Medidas obtidas no ecocardiograma transtorácico

Medidas	Controle	FI	ECG	IC	Valor de p
FEVE (%)	74,67 (± 4,61)	74,87 (± 6,02)	69,40 (± 8,97)	30,20 (± 5,76)*	0,049
DDVE (mm)	46,93 (± 5,60)	48,93 (± 3,95)	51,33 (± 4,43)	64,53 (± 6,10)*	< 0,001
DDVD (mm)	16,27 (± 2,37)	16,27 (± 2,76)	16,67 (± 1,76)	18,33 (± 2,55)	0,065
VAE i (ml/m ²)	17,47 (± 4,16)	16,27 (± 5,16)	21,35 (± 8,71)	39,28(± 18,94)*	0,020
Rel E/E'	4,74 (± 1,41)	5,21 (± 1,09)	6,15 (± 2,68)	9,38 (± 2,3)*	< 0,001
IDM VE	0,39 (± 0,12)	0,47 (± 0,15)	0,46 (± 0,10)	0,86 (± 0,26)*	< 0,001
IDM VD	0,32 (± 0,11)	0,31 (± 0,09)	0,36 (± 0,16)	0,55 (± 0,29)*	0,012
S' mitral (m/seg)	0,11 (± 0,02)	0,10 (± 0,03)	0,09 (± 0,01)*	0,06 (± 0,01)*	0,011
E' lateral (m/seg)	0,18 (± 0,04)	0,16 (± 0,03)	0,14 (± 0,03)*	0,10 (± 0,02)*	< 0,001
S' tricúspide (m/seg)	0,17 (± 0,03)	0,14 (± 0,03)	0,14 (± 0,02)	0,11 (± 0,03)*	<0,001

Valores expressos em média (± DP)

* p <0,05 em relação ao grupo controle

FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda, DDVE: diâmetro diastólico ventricular esquerdo; DDVD: diâmetro diastólico ventricular direito; mm: milímetros; VAEi: volume atrial esquerdo indexado; Rel E/E': relação entre a onda E do fluxo mitral com a onda E do anel mitral; IDMVE: índice de desempenho miocárdico ventricular esquerdo; IDMVD: índice de desempenho miocárdico ventricular direito; S' mitral: velocidade sistólica do anel mitral lateral; E' lateral: Velocidade diastólica precoce no anel mitral lateral; S' tricúspide: velocidade sistólica do anel tricúspide; m/seg: metros por segundo.

4.4 PERFIL LIPÍDICO E GLICEMIA DE JEJUM

Não houve diferenças entre os grupos com relação à dosagem de glicemia, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicerídeos (Tabela 4).

Tabela 4 - Medidas de glicemia e perfil lipídico

Medidas	Grupo controle	Grupo FI	Grupo ECG	Grupo IC	Valor de p
Glicose (mg/dl)	93,47 (± 14,41)	91,07 (± 9,04)	93,80 (± 6,07)	93,80 (± 8,18)	0,589
Colesterol total (mg/dl)	190,00 (± 28,03)	186,10 (± 46,83)	190,60 (± 31,09)	193,70 (± 38,85)	0,956
LDL-colesterol (mg/dl)	116,60 (± 25,14)	114,20 (± 42,00)	119,80 (± 25,03)	123,10 (± 34,38)	0,689
HDL-colesterol (mg/dl)	53,07 (± 17,05)	48,47 (± 1,84)	45,67 (± 8,76)	49,53 (± 9,30)	0,571
Triglicerídeos (mg/dl)	101,30 (± 69,56)	112,4 (± 63,61)	125,8 (± 68,89)	105,3 (± 81,80)	0,395

Valores expressos em média (± DP)

* p < 0,05 em relação ao grupo controle

4.5 PARÂMETROS METABÓLICOS E INFLAMATÓRIOS

As dosagens de insulina (Gráfico 1), HOMA-IR (Gráfico 2) e leptina (Gráfico 3) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. A dosagem de adiponectina foi maior nos grupos ECG e IC que nos grupos FI e controle (Gráfico 4).

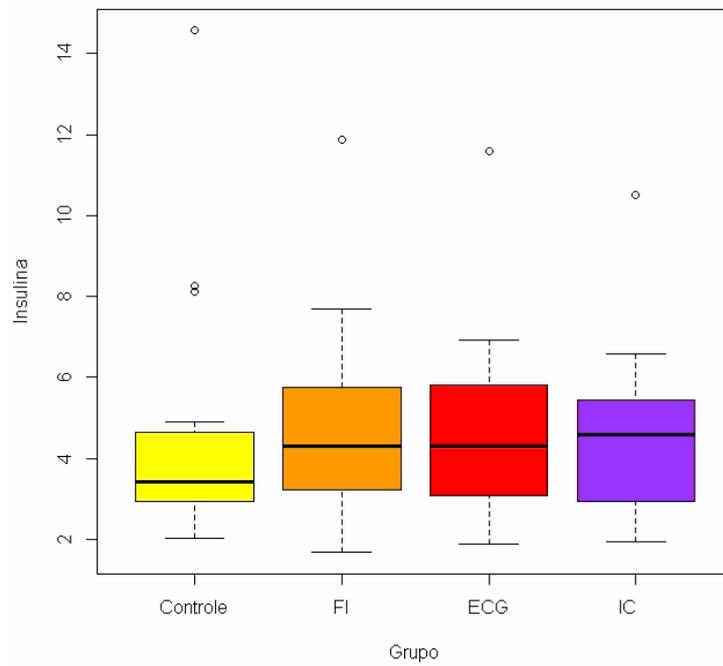


Gráfico 1 - Gráfico de box-plot dos valores obtidos na dosagem de insulina nos quatro grupos

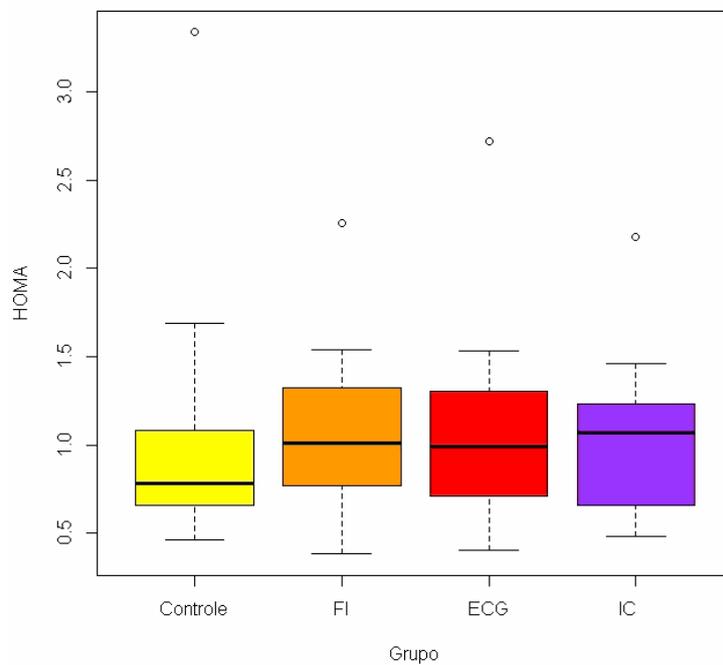


Gráfico 2 - Gráfico de box-plot dos valores de HOMA-IR nos quatro grupos

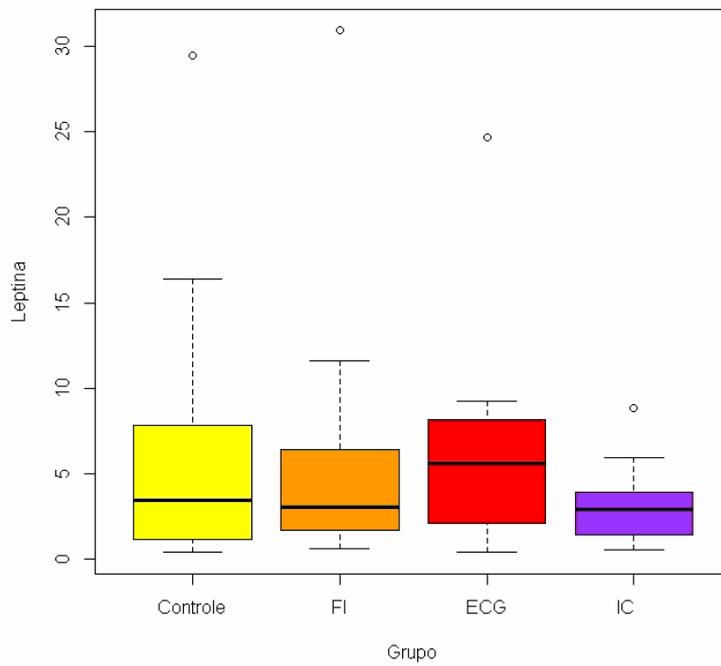


Gráfico 3 - Gráfico de box-plot dos valores obtidos na dosagem de leptina nos quatro grupos

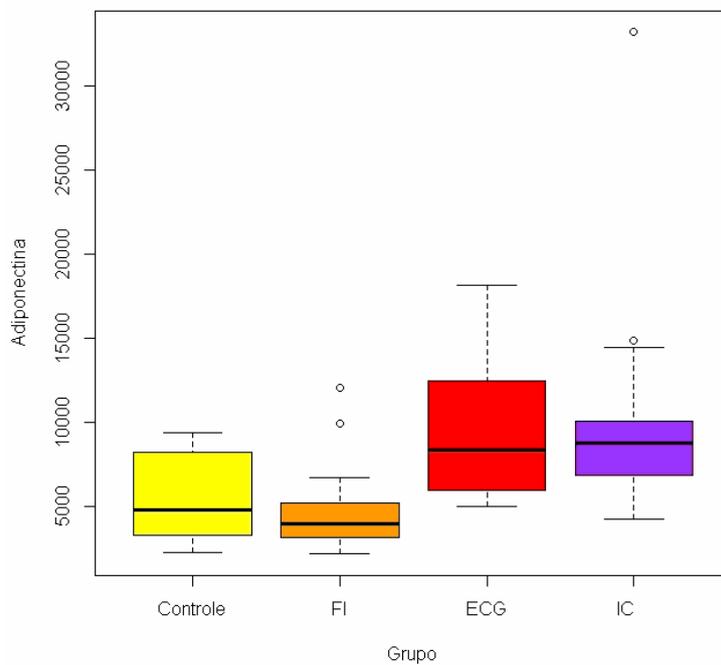


Gráfico 4 - Gráfico de box-plot dos valores obtidos na dosagem adiponectina nos quatro grupos

As medidas dos parâmetros metabólicos estão resumidas nos dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Medidas dos parâmetros metabólicos

Medidas	Grupo controle	Grupo FI	Grupo ECG	Grupo IC	Valor de p
Insulina (µU/ml)	3,41 (1,98)	4,31 (2,85)	4,30 (3,06)	4,58 (2,88)	0,901
HOMA-IR	0,78 (0,46)	1,01 (0,62)	0,99 (0,64)	1,07 (0,62)	0,933
Leptina (ng/ml)	3,42 (7,43)	3,03 (6,53)	5,56 (6,20)	2,86 (2,67)	0,626
Adiponectina (ng/ml)	4766,50 (5529,50)	4003,50 (2482,50)	8376,50 (8388,50)*	8798,00 (4188,00)*	<0,001

Valores expressos em mediana (intervalo interquartil) *p< 0,05 em relação ao grupo controle
HOMA-IR: Resistência a insulina pelo modelo de avaliação da homeostase

As dosagens de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa foram maiores no grupo IC em relação aos outros três grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos controle, FI e ECG. As dosagens das citocinas inflamatórias estão descritas nos dados da Tabela 6.

Tabela 6 - Medidas das citocinas inflamatórias

Medidas	Grupo controle	Grupo FI	Grupo ECG	Grupo IC	Valor de p
Interleucina-6 (pg/ml)	1,85 (6,41)	1,58 (1,91)	1,00 (1,57)	31,44 (72,19)*	0,001
TNF-α (pg/ml)	22,57 (88,20)	19,31 (33,16)	12,45 (3,07)	75,15 (278,57)*	0,040

Valores expressos em mediana (intervalo interquartil) *p< 0,05 em relação ao grupo controle
TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa

4.6 ULTRASSONOGRAFIA DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS

Não houve diferença significativa entre os grupos para a espessura médio-intimal da artéria carótida (GC= $0,62 \pm 0,09$; Grupo FI= $0,67 \pm 0,15$; Grupo ECG= $0,63 \pm 0,10$; Grupo IC= $0,64 \pm 0,11$ mm; $p=0,673$).

4.7 AVALIAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

4.7.1 Análise do Holter 24 horas

Com relação aos parâmetros de avaliação global, os índices SDNN e SDANN não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Os índices de avaliação da atividade parassimpática, tais como: RMSSD, pNN50 e componente AF em valores absolutos foram menores no grupo FI que no grupo controle. O componente BF em valores absolutos (estimativa da atividade simpática) foi menor no grupo IC, quando comparado ao grupo controle.

A avaliação do balanço simpaticovagal demonstrou redução do componente AF em unidades normalizadas, aumento do componente BF em unidades normalizadas e aumento da relação BF/AF no grupo FI em relação ao grupo controle. Estes parâmetros sugerem diminuição da atividade parassimpática e predomínio da atividade simpática na forma indeterminada.

Os dados referentes no Holter 24 horas estão descritos nos dados da Tabela 7.

Tabela 7 - Índices de análise do SNA no Holter 24 horas

Índice	Grupo controle	Grupo FI	Grupo ECG	Grupo IC	Valor de p
SDNN (ms)	138,0 (25,0)	118,0 (44,0)	131,0 (59,0)	124,0 (28,0)	0,274
SDANN (ms)	117,0 (16,0)	109,0 (43,0)	117,0 (50,0)	108,0 (35,0)	0,442
RMSSD (ms)	31,0 (11,0)	20,0 (7,0)*	21,0 (11,0)	22,0 (15,0)	0,046
pNN50 (%)	8,4 (8,1)	1,8 (3,6)*	2,0 (6,8)	3,0 (8,6)	0,021
BF (ms ²)	678,0 (524,7)	422,3 (316,7)	324,3 (442,0)	284,9* (316,6)	0,007
AF (ms ²)	170,0 (161,5)	63,5* (56,6)	94,4 (153,1)	58,8 (181,6)	0,008
BF (un)	75,6 (15,2)	86,2* (7,1)	81,6 (26,5)	75,0 (30,0)	0,022
AF (un)	24,3 (15,2)	13,7* (7,1)	18,3 (19,9)	24,9 (30,0)	0,016
Relação BF/AF	3,1 (3,3)	6,2* (3,0)	4,4 (5,8)	3,0 (4,2)	0,028

Valores expressos em mediana (intervalo interquartil) * p < 0,05 em relação ao grupo controle
 ms: milissegundos; SDNN: Desvio padrão médio de todos os intervalos RR; SDANN: Desvio padrão das médias dos intervalos RR em intervalos de 5 minutos; ASDNN: Média dos desvios-padrão dos intervalos RR normais a cada 5 minutos; RMSSD: Raiz quadrada das diferenças sucessivas da duração dos ciclos normais medidos; pNN50: Porcentagem dos ciclos sucessivos com diferenças de duração acima de 50 ms; un: unidades normalizadas; BF: baixa frequência; AF: alta frequência

4.7.2 Teste de inclinação postural

Na posição supina, o componente AF em valores absolutos foi menor nos grupos ECG e FI, e o componente BF em valores absolutos foi menor nos três grupos de doença de Chagas em relação ao controle. Na posição ortostática, os valores absolutos do componente BF foram menores nos três grupos de doença de Chagas, e o componente AF em valores absolutos foi menor no grupo FI, quando comparado ao controle.

Na avaliação do balanço simpaticovagal, tanto na posição supina como na posição ortostática, o componente AF em unidades normalizadas foi maior no grupo IC em relação aos outros três grupos. A relação BF/AF e o componente BF em unidades normalizadas foram menores no grupo IC quando comparados aos outros três grupos. Estes parâmetros sugerem diminuição da atividade simpática e predomínio da atividade parassimpática no grupo IC.

Os dados referentes ao teste de inclinação postural estão descritos nos dados da Tabela 8.

Tabela 8 - Índices de análise do SNA no teste de inclinação postural (posição supina)

Índice	Grupo controle	Grupo FI	Grupo ECG	Grupo IC	Valor de p
Posição supina					
BF (ms ²)	560,71 (364,42)	264,61* (450,93)	104,75* (68,47)	178,46* (557,54)	0,001
AF (ms ²)	326,89 (178,71)	73,64* (157,00)	72,60* (280,00)	362,60 (1005,11)	< 0,001
BF (un)	68,74 (12,35)	70,78 (21,18)	63,19 (18,26)	27,68* (37,57)	0,022
AF (un)	31,01 (11,61)	29,21 (21,18)	36,80 (18,26)	72,31* (39,36)	0,023
Relação BF/AF	2,19 (1,36)	2,42 (2,42)	1,71 (1,10)	0,38* (1,10)	< 0,001
Posição ortostática					
BF (ms ²)	666,73 (1018,90)	213,24* (262,26)	260,53* (356,76)	84,65* (394,67)	0,009
AF (ms ²)	154,75 (157,22)	39,18* (77,01)	98,02 (94,55)	329,95 (612,96)	< 0,001
BF (un)	83,21 (14,21)	82,37 (11,50)	77,80 (28,16)	35,97* (42,26)	0,007
AF (un)	16,78 (14,21)	17,62 (11,50)	22,19 (28,16)	64,02* (42,26)	0,006
Relação BF/AF	4,95 (4,13)	4,67 (5,72)	3,50 (2,89)	0,56* (1,34)	0,019

Valores expressos em mediana (intervalo interquartil) * p < 0,05 em relação ao grupo controle
ms²: milissegundos ao quadrado; un: unidades normalizadas; BF: baixa frequência; AF: alta frequência

4.8 CORRELAÇÕES

A leptina apresentou correlação positiva apenas com a insulina ($r=0,319$; $p=0,013$) e com o HOMA-IR ($r= 0,338$; $p=0,008$). Não foram encontradas correlações significativas entre a leptina ou a insulina com medidas de avaliação do SNA.

A adiponectina apresentou correlações significativas com medidas de avaliação do SNA e medidas ecocardiográficas. Houve correlação positiva com um parâmetro de avaliação do ramo parassimpático: o componente AF em unidades normalizadas no teste de inclinação postural em posição ortostática. As correlações negativas da adiponectina com medidas do SNA foram com parâmetros que estimam a atividade simpática, tais como: o componente BF em valores absolutos no Holter, componente BF em valores absolutos no teste de inclinação postural em posição supina, componente BF em unidades normalizadas no teste de inclinação postural em posição ortostática e a relação BF/AF no teste de inclinação postural em posição ortostática.

As medidas ecocardiográficas que apresentaram correlação positiva com adiponectina foram: diâmetro diastólico ventricular esquerdo, relação E/E' e volume atrial esquerdo indexado. As correlações negativas da adiponectina com medidas ecocardiográficas foram: fração de ejeção ventricular esquerda e velocidade sistólica do anel mitral (S' mitral). Os valores das correlações significativas da adiponectina estão descritos nos dados da Tabela 9.

Tabela 9 - Correlações significativas da adiponectina com índices de análise do SNA e medidas ecocardiográficas

Variável	r	Valor de p
Componente AF (un) no teste de inclinação postural (ortostático)	0,336	0,009
Componente BF (ms ²) no holter	- 0,279	0,031
Componente BF (ms ²) no teste de inclinação postural (supina)	- 0,298	0,021
Componente BF (un) no teste de inclinação postural (ortostático)	- 0,336	0,009
Relação BF/AF no teste de inclinação postural (ortostático)	- 0,336	0,009
DDVE	0,319	0,013
Rel E/E'	0,281	0,03
VAE i	0,389	0,002
FEVE	- 0,398	0,002
S' mitral	- 0,297	0,021

AF: alta frequência; BF: baixa frequência; ms²: milissegundos ao quadrado; un: unidades normalizadas; DDVE: diâmetro diastólico ventricular esquerdo; Rel E/E': relação entre a onda E do fluxo mitral com a onda E do anel mitral; VAE i: volume atrial esquerdo indexado; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda; S' mitral: velocidade sistólica do anel mitral lateral

Na análise multivariada, apenas as medidas dos componentes AF e BF em unidades normalizadas no teste de inclinação postural (posição ortostática) tiveram efeito significativo nos níveis de adiponectina (transformados logaritmicamente). Os dados referentes à análise multivariada estão descritos nos dados da Tabela 10.

Tabela 10 - Determinantes da adiponectina (log) na análise multivariada

Variável	Coefficiente β	Valor de p
Componente AF (un) no teste de inclinação postural (ortostático)	0,0981589	<0,001
Componente BF (ms ²) no holter	-0,0001527	0,553
Componente BF (ms ²) no teste de inclinação postural (supina)	-0,0003767	0,149
Componente BF (un) no teste de inclinação postural (ortostático)	-0,1051116	<0,001
Relação BF/AF no teste de inclinação postural (ortostático)	-0,0386192	0,233
DDVE	-0,0086331	0,605
Rel E/E'	-0,0266207	0,601
Vol AE ind	0,0118354	0,123
FEVE	-0,0089773	0,246
S' mitral	-2,7817518	0,529

AF: alta frequência; BF: baixa frequência; ms²: milissegundos ao quadrado; un: unidades normalizadas; DDVE: diâmetro diastólico ventricular esquerdo; Rel E/E': relação entre a onda E do fluxo mitral com a onda E do anel mitral; VAE i: volume atrial esquerdo indexado; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda; S' mitral: velocidade sistólica do anel mitral lateral

Os dados referentes à adiponectina sugerem que, quanto menor a atividade simpática e maior a atividade parassimpática, maiores foram os níveis de adiponectina na amostra estudada. Os Gráficos 5 e 6 representam os gráficos de dispersão para as correlações da adiponectina com medidas de avaliação do SNA.

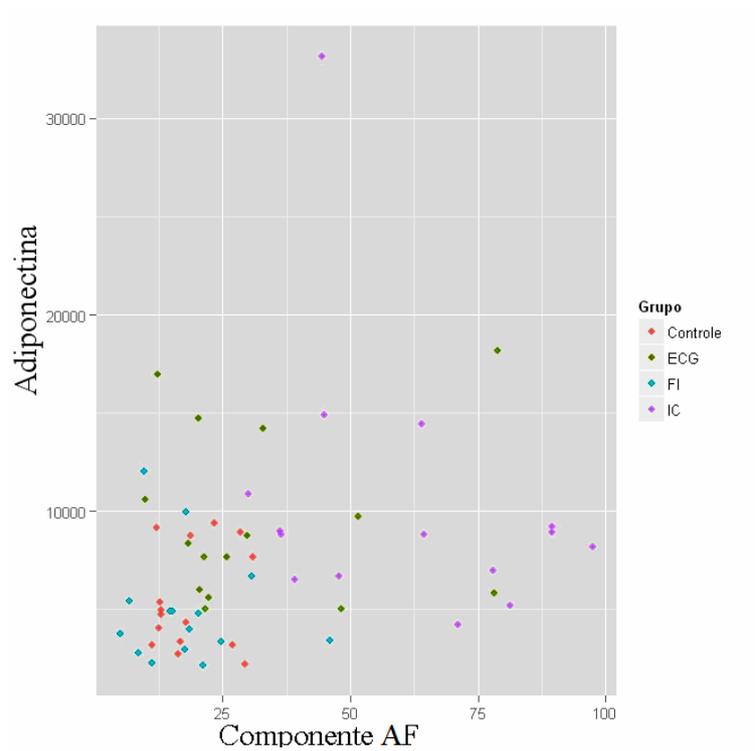


Gráfico 5 - Gráfico de dispersão dos valores de adiponectina e componente AF (un) no teste de inclinação postural (posição ortostática)

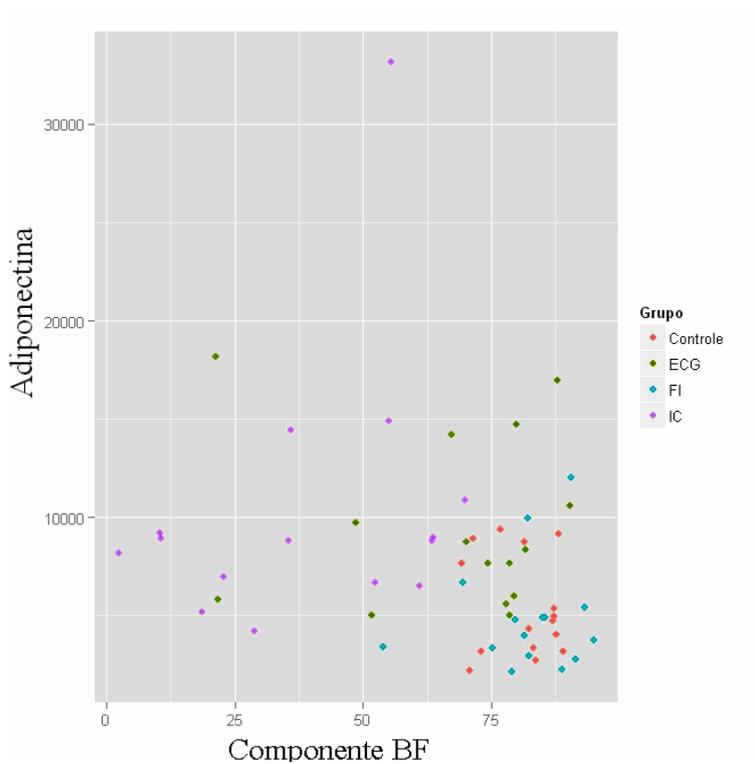


Gráfico 6 - Gráfico de dispersão dos valores de adiponectina e componente BF (un) no teste de inclinação postural (posição ortostática)

O TNF- α apresentou correlação negativa apenas com a massa gorda em valores absolutos ($r=-0,465$; $p=0,022$) e em porcentagem ($r=0,512$; $p=0,011$).

A interleucina-6 apresentou correlações significativas com medidas de avaliação do SNA e medidas ecocardiográficas.

As medidas de avaliação do SNA que mostraram correlação positiva com a interleucina-6 foram parâmetros de avaliação do ramo parassimpático, tais como: componente AF em unidades normalizadas no teste de inclinação postural em posição supina e ortostática. A interleucina-6 apresentou correlação negativa com parâmetros que estimam a atividade simpática, tais como: componente BF em unidades normalizadas no teste de inclinação postural em posição supina e ortostática, relação BF/AF no teste de inclinação postural em posição supina e ortostática e componente BF em valores absolutos no teste de inclinação postural em posição ortostática.

As medidas ecocardiográficas que apresentaram correlação positiva com interleucina-6 foram: diâmetro diastólico ventricular esquerdo, volume atrial esquerdo indexado e índice de desempenho miocárdico do VE. As correlações negativas da interleucina-6 com medidas ecocardiográficas foram: fração de ejeção ventricular esquerda, velocidade diastólica precoce no anel mitral lateral (E' lateral) e velocidade sistólica do anel mitral lateral (S' mitral). Os valores das correlações significativas da interleucina-6 estão descritos nos dados da Tabela 11.

Tabela 11 - Correlações significativas da interleucina-6 com índices de análise do SNA e medidas ecocardiográficas

Variável	r	Valor de p
Componente AF (un) no teste de inclinação postural (supina)	0,419	0,004
Componente AF (un) no teste de inclinação postural(ortostático)	0,334	0,023
Componente BF (un) no teste de inclinação postural (supina)	-0,393	0,007
Componente BF (un) no teste de inclinação postural (ortostático)	-0,334	0,023
Relação BF/AF no teste de inclinação postural (supina)	-0,396	0,007
Relação BF/AF no teste de inclinação postural (ortostático)	-0,334	0,023
Componente BF (ms ²) no teste de inclinação postural (ortostático)	-0,327	0,027
DDVE	0,404	0,005
VAE i	0,319	0,031
IDM VE	0,320	0,030
FEVE	-0,608	<0,001
E' lateral	-0,333	0,024
S' mitral	-0,476	0,001

AF: alta frequência; BF: baixa frequência; ms²: milissegundos ao quadrado; un: unidades normalizadas; DDVE: diâmetro diastólico ventricular esquerdo; VAE i: volume atrial esquerdo indexado; IDMVE: índice de desempenho miocárdico ventricular esquerdo; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda; E' lateral: Velocidade diastólica precoce no anel mitral lateral; S' mitral: velocidade sistólica do anel mitral lateral

Na análise multivariada, nenhuma variável apresentou efeito significativo nos níveis de interleucina-6 (transformados logaritmicamente)

Os dados referentes à análise multivariada estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Determinantes da interleucina-6 (log) na análise multivariada

Variável	Coefficiente β	Valor de p
Componente AF (un) no teste de inclinação postural (supina)	3,283	0,476
Componente AF (un) no teste de inclinação postural (ortostático)	-4,303	0,478
Componente BF (un) no teste de inclinação postural (supina)	1,097	0,810
Componente BF (un) no teste de inclinação postural (ortostático)	-4,524	0,441
Relação BF/AF no teste de inclinação postural (supina)	-2,319	0,953
Relação BF/AF no teste de inclinação postural (ortostático)	1,002	0,332
Componente BF (ms ²) no teste de inclinação postural (ortostático)	-9,316	0,859
DDVE	7,744	0,116
Volume atrial esquerdo indexado	-1,582	0,376
IDM VE	-9,052	0,477
FEVE	-2,865	0,154
E' lateral	9,286	0,147
S' mitral	5,868	0,607

AF: alta frequência; BF: baixa frequência; ms²: milissegundos ao quadrado; un: unidades normalizadas; DDVE: diâmetro diastólico ventricular esquerdo; VAE i: volume atrial esquerdo indexado; IDMVE: índice de desempenho miocárdico ventricular esquerdo; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda; E' lateral: Velocidade diastólica precoce no anel mitral lateral; S' mitral: velocidade sistólica do anel mitral lateral

5 DISCUSSÃO

O delineamento deste estudo foi realizado com o objetivo de tentar diminuir os possíveis fatores de confusão entre os grupos. Para isto, foram excluídos os pacientes com doenças que apresentam alterações metabólicas e/ou inflamatórias, tais como: obesidade, hipertensão arterial, Diabetes mellitus e tabagismo; além de parear os integrantes de todos os grupos, de acordo com o gênero e idade. Optou-se também por limitar a idade até 55 anos para evitar a influência de faixas etárias mais avançadas no resultados dos exames. Com isto, acreditamos que os grupos foram homogêneos entre si. Os pacientes em IC classe funcional III ou IV foram excluídos por apresentarem limitações clínicas à realização dos exames (sobretudo o teste de inclinação postural).

Com relação ao metabolismo, os níveis de glicemia, lipídeos sanguíneos, insulina, HOMA-IR e leptina não demonstraram diferenças significativas entre os grupos. Apenas para a adiponectina houve diferenças, com os grupos ECG e IC apresentando níveis maiores em relação aos grupos FI e controle.

Os dados referentes à dosagem de glicose são discordantes dos apresentados por Santos et al. que demonstraram maior frequência de Diabetes mellitus e hiperglicemia em pacientes com cardiopatia chagásica. No entanto, este estudo foi retrospectivo e apenas um terço das pacientes possuía a documentação do estado nutricional, fator que pode ter influenciado os resultados⁵⁹. Por outro lado, Guariento et al. não demonstraram diferenças nos níveis de glicemia em jejum e no teste de tolerância oral à glicose em pacientes chagásicos comparados a um grupo controle⁵⁸.

Geraix et al. encontraram uma prevalência de hiperglicemia em 12% e dislipidemia em 74% de pacientes chagásicos, porém, sem comparação com grupo controle ⁶⁰.

Com relação à insulina, a maioria dos estudos demonstra diminuição de seus níveis ou comprometimento de sua função em pacientes chagásicos. Guariento et al. demonstraram menor resposta de insulina à sobrecarga oral de glicose, sugerindo secreção diminuída ou sensibilidade aumentada à insulina ⁵⁷. Outro estudo demonstrou resposta diminuída de insulina à sobrecarga venosa de glicose, sugerindo um estado hipoinsulinêmico nos chagásicos por denervação ou injúria pancreática ⁵⁶. Em 2012, Silva et al. publicaram estudo com teste de tolerância a insulina e observaram que os pacientes chagásicos apresentavam menor resposta hemodinâmica de aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca que o grupo controle. Esta resposta diminuída sugere que a denervação simpática encontrada na DC compromete a resposta à ação da insulina ⁷¹. Nagajyothi et al. (2013), em modelo animal, demonstraram secreção reduzida de insulina na fase aguda da DC, persistindo até a fase crônica, provavelmente, por inflamação pancreática e disfunção das células β do pâncreas ⁷².

Em nosso estudo, não foram evidenciadas diferenças significativas nos níveis de insulina ou no índice HOMA-IR entre os grupos. Vale lembrar que pacientes com insuficiência cardíaca de outras etiologias apresentam níveis aumentados de insulina e de resistência insulínica ^{73,74}. Portanto, a ausência de diferenças significativas de insulina e HOMA-IR encontradas no grupo com IC de etiologia chagásica de nosso estudo poderia indicar a presença de um fator protetor à resistência insulínica ou a fatores que interfiram na secreção e/ou ação da insulina na DC. Outros estudos são

necessários para se comparar os níveis de insulina e resistência insulínica em pacientes com IC de etiologia chagásica e não chagásica.

Com relação à leptina, os dados dos estudos prévios são discordantes quanto a seus níveis em pacientes com insuficiência cardíaca. Alguns estudos demonstraram níveis aumentados, sobretudo em classes funcionais mais avançadas,^{43,74} e outros estudos demonstraram níveis diminuídos, principalmente em pacientes com caquexia^{44,75}. Em pacientes chagásicos, Fernandes et al. encontraram níveis diminuídos em pacientes com IC quando comparados com o grupo controle e outras formas de DC⁴⁵.

No presente estudo, vale ressaltar que os níveis de leptina foram menores no grupo IC em relação aos outros três grupos, porém esta diferença não apresentou significância estatística. Um aspecto a ser lembrado é a associação existente entre a caquexia e a diminuição dos níveis de leptina. Nosso estudo não avaliou o diagnóstico de caquexia, pois foi feito em uma única avaliação, e o principal critério para o diagnóstico de caquexia cardíaca é a variação do peso em um determinado período de tempo, visto em avaliações seriadas⁷⁶. No entanto, os pacientes do grupo IC de nosso estudo, embora apresentassem peso e IMC semelhantes aos outros grupos, mostraram massa gorda menor, o que pode explicar os menores níveis de leptina no grupo IC. Apesar disso, ainda são necessários mais estudos para se avaliar o comportamento dos níveis de leptina em pacientes chagásicos, comparando-os com outras etiologias de IC e estudando seus fatores determinantes.

A leptina apresentou correlação positiva apenas com a insulina e o índice HOMA-IR, sem associação com nenhum parâmetro de avaliação do SNA em nosso estudo. Apesar de alguns estudos, sobretudo em animais, demonstrarem que a leptina

é fortemente influenciada pelo SNA; nosso estudo e outras avaliações em humanos não conseguiram demonstrar esta associação ⁷⁷. A insulina também não mostrou associações significativas com nenhuma medida do SNA, apresentando correlação significativa apenas com a leptina. A associação entre a atividade simpática e a resistência a insulina já é bem estabelecida (achado não encontrado em nosso estudo)³⁴. A associação entre a leptina e a insulina já foi demonstrada em outros estudos ^{73,74}.

Os níveis de adiponectina foram avaliados em modelos animais de infecção aguda pelo *T. cruzi*. Estes estudos demonstram diminuição dos níveis de adiponectina, provavelmente, secundária ao perfil pró-inflamatório causado pela infecção ou à interferência na síntese de adipocitocinas causada pela presença do parasita nos adipócitos ^{48,49,78,79}. No entanto, os dados são escassos com relação aos níveis de adiponectina na fase crônica da DC em humanos.

Na insuficiência cardíaca, independente da etiologia, a adiponectina apresenta comportamento bifásico, com níveis diminuídos na IC diastólica e aumentados na IC sistólica ⁸⁰. Sam et al. demonstraram que a hipoadiponectinemia exacerba a hipertrofia ventricular esquerda e a IC diastólica em modelos animais ⁸¹. Em humanos, foi descrita associação entre níveis diminuídos de adiponectina e piora de parâmetros de avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo, tanto no ecocardiograma como no cateterismo cardíaco ^{82,83}. Na IC sistólica, os níveis séricos de adiponectina estão aumentados, funcionando inclusive como preditores de morbidade e mortalidade ^{39,40}. Estudos prévios relacionam a hiperadiponectinemia com maior severidade da IC e demonstram sua diminuição com o tratamento ^{84,85}.

Em nosso estudo, foram encontrados níveis aumentados de adiponectina nos grupos IC e ECG, contrastando com os níveis diminuídos verificados nos estudos com modelos de infecção chagásica aguda em animais. O aumento da adiponectina no grupo IC pode ser explicado pela presença de disfunção sistólica, ressaltando-se ainda o fato de que este grupo apresentou massa gorda menor, o que também pode aumentar os níveis de adiponectina⁸⁶.

No entanto, devemos chamar a atenção para o aumento da adiponectina no grupo ECG. Este grupo não apresentava diminuição da FEVE ou quadro clínico de IC e apresentava peso, IMC e massa gorda semelhantes aos grupos FI e controle. Estes dados sugerem que os níveis de adiponectina estão aumentados mesmo na fase inicial da cardiopatia chagásica crônica e poderiam funcionar como um marcador precoce de gravidade. Além disto, a análise dos fatores determinantes para o aumento da adiponectina nesse grupo pode ser importante para o estudo da fisiopatologia da CCC.

Vários são os mecanismos propostos para o aumento da adiponectina na IC sistólica de qualquer etiologia. Os pacientes com caquexia cardíaca apresentam níveis de adiponectinemia maiores que os pacientes com IC sistólica sem caquexia. Ainda não está claro se o aumento de adiponectina nesses pacientes é causa ou efeito da caquexia^{86,87}. Bobbert et al. demonstraram que pacientes com cardiomiopatia inflamatória apresentam níveis maiores de adiponectina que pacientes com cardiomiopatia não inflamatória e, entre os pacientes com cardiomiopatia inflamatória, aqueles que possuíam maiores níveis de adiponectina apresentavam melhor evolução. Estes dados sugerem que o aumento de adiponectina poderia funcionar como um mecanismo de compensação pela sua ação anti-inflamatória⁸⁸.

Outros mecanismos propostos para o aumento da adiponectina na IC sistólica são: um efeito compensatório para a resistência a insulina encontrada na IC ou um mecanismo de resistência à ação da adiponectina ⁸⁹.

Além disto, foi descrito também um sistema cardíaco de produção local de adiponectina que pode estar desregulado na cardiomiopatia dilatada. A apoptose dos cardiomiócitos é um importante mecanismo de morte celular e de disfunção miocárdica. A adiponectina produzida localmente atua como um fator de prevenção à apoptose cardíaca. Portanto, o aumento da secreção de adiponectina no coração de pacientes com IC pode ser explicado como um mecanismo de proteção contra a apoptose ^{90,91}. Especificamente na DC, foi descrita apoptose de cardiomiócitos e de células do tecido adiposo epicárdico em animais na fase crônica ⁹². Portanto, o aumento dos níveis séricos de adiponectina pode refletir um mecanismo compensatório de proteção. Outro fator a ser considerado nos pacientes chagásicos é a persistência do *T. cruzi* no tecido adiposo de pacientes na fase crônica demonstrada em estudo recente, o que poderia influenciar a secreção de adiponectina pelos adipócitos ⁵⁰.

No entanto, entre as variáveis avaliadas em nosso estudo, o fator mais importante para o aumento da adiponectina foi a função do SNA. Houve correlação negativa com índices de avaliação do ramo simpático e correlação positiva com índices de avaliação do ramo parassimpático, ou seja, quanto menor a atividade simpática e maior a atividade parassimpática, maiores foram os níveis de adiponectina. Houve também correlação da adiponectina com medidas ecocardiográficas de função ventricular esquerda (tanto sistólica como diastólica). De modo geral, quanto maior a disfunção cardíaca sistólica e/ou diastólica, maiores

foram os níveis de adiponectina. Mas, na análise multivariada, apenas a correlação da adiponectina com medidas de avaliação do SNA permaneceu significativa.

De maneira oposta a nossos resultados, outros estudos, ao demonstrarem uma redução dos níveis de adiponectina com o uso de betabloqueadores em pacientes com IC, sugerem que a ativação simpática poderia aumentar os níveis de adiponectina e que os betabloqueadores inibiriam esta ação^{93,94,95}. No entanto, devemos lembrar que esta redução dos níveis de adiponectina poderia ser explicada também por uma maior compensação da IC com o tratamento⁸⁴.

Outros estudos demonstraram a mesma associação inversa entre a adiponectina e a atividade simpática encontrada em nosso estudo. Estudos em animais e humanos, com exposição ao frio como forma de ativar o sistema nervoso simpático, demonstraram redução dos níveis de adiponectina^{96,97}. Também já foi relatada associação entre hipoadiponectinemia e hiperatividade simpática em pacientes com Diabetes mellitus e apneia obstrutiva do sono^{98,99,100,101}.

A relação causa-efeito desta associação ainda não está bem estabelecida. Um estudo realizado por Tanida et al. demonstrou que a infusão intravenosa de adiponectina reduziu a atividade do nervo simpático renal em modelos animais¹⁰². Por outro lado, estudos realizados com uso de agonistas β -adrenérgicos *in vitro* e *in vivo* demonstraram redução da expressão e secreção de adiponectina por meio de um efeito inibitório direto sobre os adipócitos^{103,104}.

O tecido adiposo possui inervação predominantemente do sistema nervoso simpático^{105,106}. Em nosso estudo, utilizando a doença de Chagas como modelo de acometimento do SNA, podemos supor que o acometimento periférico do sistema nervoso simpático poderia levar à redução da atividade simpática no tecido adiposo e

aumentar a secreção de adiponectina. Este mecanismo pode ser explicado de duas formas. Por um lado, o acometimento do sistema simpático poderia levar à perda do efeito inibitório direto do tônus adrenérgico sobre a expressão e secreção da adiponectina pelos adipócitos ^{103,104}. Por outro lado, a principal ação do sistema nervoso simpático no tecido adiposo é o estímulo à lipólise com maior produção de ácidos graxos livres ^{105,106}. O acúmulo de ácidos graxos livres no tecido adiposo reduz a secreção de adiponectina. Portanto, a redução da atividade simpática no tecido adiposo poderia reduzir a produção de ácidos graxos livres, levando a um aumento nos níveis de adiponectina ^{107,108}.

Além disto, existem estudos sugerindo que a adiponectina aumentada no quadro de IC pode ser, pelo menos em parte, proveniente do tecido adiposo cardíaco ^{90,91}. Acreditamos que a redução da atividade simpática cardíaca poderia ser um dos fatores de aumento na secreção de adiponectina pelo coração. Novos estudos são necessários para se avaliar a fisiopatologia da ação do sistema nervoso simpático sobre a secreção da adiponectina e para melhor definir sua relação de causa e efeito.

Com relação à atividade inflamatória, nossos dados estão em concordância com a maioria dos estudos prévios que demonstraram aumento dos níveis de citocinas inflamatórias nos pacientes com cardiopatia chagásica. As principais citocinas encontradas em níveis aumentados na cardiopatia chagásica são: interferon, TNF- α e interleucina-6 ^{29,31}. Outro estudo demonstrou níveis aumentados de TNF- α mesmo em pacientes com a forma indeterminada quando comparados com o grupo controle, achado não encontrado no presente estudo ¹⁰⁹.

A única associação significativa encontrada para o TNF- α em nosso estudo foi uma correlação negativa com a massa gorda, ou seja, quanto maiores os níveis de

TNF- α , menor foi a massa gorda. Esta associação reforça a importância do TNF- α na etiopatogenia da caquexia cardíaca ⁷⁶.

A interleucina-6 apresentou correlações significativas com medidas de avaliação do SNA e medidas ecocardiográficas. As correlações foram semelhantes às da adiponectina, tais como: correlação negativa com índices de avaliação do ramo simpático e correlação positiva com índices de avaliação do ramo parassimpático, ou seja, quanto menor a atividade simpática e maior a atividade parassimpática, maiores foram os níveis de IL-6. Houve também correlação da interleucina-6 com medidas ecocardiográficas de função ventricular esquerda (tanto sistólica como diastólica). De uma forma geral, quanto maior a disfunção cardíaca sistólica e diastólica, maiores foram os níveis de IL-6.

A correlação positiva da IL-6 com a atividade parassimpática, encontrada em nosso estudo, é contraditória ao chamado “reflexo inflamatório”, no qual a ativação do sistema nervoso parassimpático inibe a produção de citocinas inflamatórias ³². Estudo publicado por Llaguno et al., em 2011, avaliou a relação entre citocinas inflamatórias e índices de variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com DC. Foi observada relação inversa entre parâmetros globais de VFC e os níveis de citocinas inflamatórias, sugerindo ação inibitória do sistema parassimpático sobre a resposta inflamatória ¹¹⁰.

No entanto, Elenkov et al. descreveram a ação do sistema nervoso simpático também inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias do tipo TH1. ¹¹¹ A IL-6, especificamente, teve sua produção diminuída pela ação de catecolaminas em estudo desenvolvido em animais ¹¹². Em nossa casuística, podemos supor que a redução da atividade simpática ocasione a perda da inibição da produção de IL-6 levando a

aumento de seus níveis séricos. No entanto, outros estudos demonstraram ação contrária das catecolaminas sobre a IL-6, com o aumento da atividade simpática associado com aumento na produção desta citocina ¹¹³.

Portanto, os dados referentes à associação da atividade do SNA com a IL-6 aparentemente não são conclusivos. Vale lembrar que, na análise multivariada realizada em nosso estudo, nenhuma variável estudada permaneceu significativa como determinante independente dos níveis de IL-6; sugerindo que outros fatores podem ser mais importantes. Estes dados reforçam a necessidade de novos estudos para a avaliação da associação entre as citocinas inflamatórias e a atividade do sistema nervoso autônomo na DC.

Como os diferentes parâmetros metabólicos e inflamatórios avaliados em nosso estudo têm importante papel na etiopatogenia da aterosclerose ^{35,37}, optamos por avaliar a presença de aterosclerose subclínica nas diferentes formas de doença de Chagas.

A aterosclerose subclínica, avaliada em nosso estudo pela espessura médio-intimal da carótida, não apresentou diferenças entre os grupos. Outros métodos também não evidenciaram a presença de aterosclerose manifesta em pacientes chagásicos. Inclusive, em estudo recente que utilizou angiotomografia das coronárias, foi evidenciada menor frequência de doença arterial coronária (DAC) em pacientes chagásicos comparados com o grupo controle. No entanto, os pacientes que foram selecionados como controle não foram obtidos da população geral, mas de um grupo que realizou angiotomografia coronária como estratificação de risco. Esta característica pode ter elevado a frequência de DAC no grupo controle, pois estes

pacientes podem ter tido outro motivo não considerado no pareamento para realizar o exame, como, por exemplo, história familiar de DAC⁶⁴.

Os parâmetros metabólicos e inflamatórios estudados foram correlacionados com medidas de avaliação do sistema nervoso autônomo (SNA). Os achados de nosso estudo demonstraram a presença de disautonomia em todas as formas de doença de Chagas. De forma geral, houve um maior acometimento da ramo parassimpático no grupo FI, um maior acometimento do ramo simpático no grupo IC e um acometimento balanceado no grupo ECG.

Isto porque houve predomínio de parâmetros reduzidos na avaliação do ramo parassimpático no grupo FI, tais como: pNN50, RMSSD, componente AF no Holter (valores absolutos e unidades normalizadas) e componente AF no teste de inclinação (valores absolutos em posições supina e ortostática). O único parâmetro de avaliação simpática reduzido de forma significativa no grupo FI foi o componente BF no teste de inclinação postural (valores absolutos em posições supina e ortostática).

No grupo IC, não houve redução significativa de nenhum parâmetro de avaliação parassimpática. Praticamente todos os parâmetros de avaliação com predominância do ramo simpático encontravam-se diminuídos (componente BF em valores absolutos no Holter 24 horas e componente BF em valores absolutos e unidades normalizadas no teste de inclinação postural em posições supina e ortostática).

O grupo ECG apresentou redução do componente AF no teste de inclinação postural (valores absolutos em posição ortostática) e do componente BF no teste de inclinação postural (valores absolutos em posições supina e ortostática).

A relação BF/AF no holter 24 horas encontrava-se aumentada no grupo FI (sugestiva de predomínio da atividade simpática). A relação BF/AF no teste de inclinação postural, tanto em posição supina como em ortostática, encontrava-se diminuída no grupo IC (sugestiva de predomínio da atividade parassimpática). Nenhum parâmetro de avaliação simpaticovagal (componentes AF e BF em unidades normalizadas ou relação BF/AF) encontrava-se alterado no grupo ECG, tanto no holter 24 horas como no teste de inclinação postural. Este dado sugere acometimento balanceado dos ramos simpático e parassimpático no grupo ECG.

Alguns autores acreditam que o acometimento do SNA ocorre apenas nas fases mais tardias de cardiopatia, e é secundário à disfunção ventricular.¹¹⁴ No entanto, várias publicações demonstraram resultados semelhantes a nosso estudo, com acometimento sobretudo do ramo parassimpático em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas^{18,115,116}.

Com relação ao acometimento do ramo simpático, em geral, nas formas mais avançadas da cardiopatia chagásica, os dados são mais controversos. Em pacientes com insuficiência cardíaca de qualquer etiologia, é bem estabelecido o aumento da atividade simpática periférica, medida pelo aumento da concentração plasmática ou urinária de noradrenalina e pelo aumento da atividade no nervo simpático muscular periférico¹¹⁷. Na avaliação da atividade simpática cardíaca em pacientes com IC de qualquer etiologia, é comum o achado de concentração diminuída de noradrenalina no tecido miocárdico, provavelmente por alteração na captação e diminuição do armazenamento neuronal¹¹⁸. Estas alterações levam a perda de terminações nervosas adrenérgicas miocárdicas na IC^{119,120}. A análise da variabilidade da frequência cardíaca nos pacientes com IC demonstra diminuição do poder total e do componente

de baixa frequência. Estes achados sugerem diminuição da resposta cardíaca à estimulação adrenérgica por dessensibilização dos receptores e/ou comprometimento da transdução do sinal pós-receptor ¹²¹.

Na cardiopatia chagásica, alguns estudos demonstraram diminuição dos níveis plasmáticos ou urinários de noradrenalina em pacientes com IC, sugerindo diminuição da atividade simpática periférica ^{122,123}. No entanto, outro estudo, que avaliou a atividade do nervo simpático muscular, demonstrou aumento da ativação simpática no grupo com miocardiopatia chagásica similar aos grupos com miocardiopatia isquêmica e idiopática. Os autores sugeriram que ocorre aumento da atividade simpática periférica como consequência da disfunção ventricular sem interferência da etiologia chagásica ¹²⁴.

Em nosso estudo, avaliamos a atividade simpática cardíaca por meio da análise da variabilidade da frequência cardíaca. Observamos comprometimento do sistema nervoso simpático mesmo na ausência de disfunção ventricular, com acometimento ainda mais intenso em pacientes com insuficiência cardíaca. Vale lembrar que optamos por não suspender o uso das medicações prescritas e todos os pacientes do grupo IC estavam em uso de betabloqueador, o que pode aumentar a modulação vagal cardíaca e diminuir a atividade simpática ¹²⁵. No entanto, outros estudos demonstraram resultados semelhantes aos nossos. Simões et al. estudaram o sistema nervoso simpático cardíaco com a análise das terminações nervosas simpáticas por meio da captação de metaiodobenzilguanidina marcada com I-123. Estes autores observaram acometimento da inervação simpática já em pacientes com a forma indeterminada e acometimento ainda mais intenso em pacientes com cardiomiopatia chagásica e disfunção ventricular ¹⁶. Nastari et al. compararam a

concentração de noradrenalina miocárdica em pacientes com cardiopatia chagásica e doença arterial coronária (DAC) com e sem disfunção ventricular. Nos pacientes com disfunção ventricular, os autores observaram que os níveis de noradrenalina miocárdica na cardiopatia chagásica estavam diminuídos de modo similar nos pacientes com DAC. Mas, em pacientes sem disfunção ventricular, os pacientes com doença de Chagas apresentaram concentração de noradrenalina miocárdica mais baixa, quando comparada àquela encontrada em pacientes com doença arterial coronariana. Estes dados sugerem denervação simpática precoce em pacientes com cardiomiopatia chagásica ¹¹⁸.

Portanto, acreditamos que as alterações no SNA encontradas em nosso estudo são significativas e podem influenciar os parâmetros metabólicos e inflamatórios estudados.

Algumas limitações deste estudo devem ser discutidas. A não suspensão das medicações utilizadas pelos pacientes, sobretudo os betabloqueadores, pode ter influenciado alguns resultados. No entanto, optamos pela manutenção de todos os medicamentos utilizados por questões éticas. A ausência da avaliação evolutiva dos pacientes quanto ao diagnóstico de caquexia pode ter omitido algumas informações importantes da associação da caquexia cardíaca com os parâmetros metabólicos e inflamatórios estudados. Além disso, a exclusão de pacientes com IC em classes funcionais mais avançadas (III e IV) pode ter impedido o surgimento de alterações mais evidentes no metabolismo, sistema inflamatório e função autonômica.

6 CONCLUSÕES

- 1- Os níveis de adiponectina foram maiores nos pacientes com cardiopatia chagásica e disfunção ventricular e nos pacientes com cardiopatia chagásica e alterações eletrocardiográficas com função sistólica ventricular esquerda preservada em repouso;
- 2- Os níveis das citocinas inflamatórias (TNF- α e interleucina-6) foram maiores nos pacientes com cardiopatia chagásica e disfunção ventricular; e
- 3- A adiponectina apresentou correlação positiva com a atividade parassimpática e negativa com a atividade simpática.

7 ANEXOS

ANEXO A

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL:

1- NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO : () MASC () FEM

DATA DE NASCIMENTO:.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APT:.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD ()

2- RESPONSÁVEL LEGAL:.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: () MASC () FEM

DATA NASCIMENTO:.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APT:.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD ()

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

1- TÍTULO: MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS NAS DIVERSAS
FORMAS EVOLUTIVAS DA DOENÇA DE CHAGAS

2- PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fábio Fernandes - CRM: 75.097

UNIDADE: Unidade Clínica de Miocardiopatias

PESQUISADOR EXECUTANTE: João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira

3- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4- DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses

1 – Desenho do estudo e objetivos:

O objetivo deste estudo é estudar alterações em diversos exames realizados nas diferentes formas da Doença de Chagas.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Serão realizados exames de sangue, ultrassom das artérias carótidas (artérias do pescoço), ecocardiograma (ultrassom do coração), holter (gravação dos batimentos cardíacos por 24 horas) e teste de inclinação em uma maca. Todos os exames são rotineiros e servem para avaliar as condições gerais dos pacientes com doença de Chagas.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

- Serão coletados 10 ml de sangue da veia para se realizar exames sanguíneos, com seringas descartáveis obedecendo-se todas as normas de limpeza para se evitar contaminação.
- Para melhor avaliação diagnóstica serão realizados exames como raio X de tórax, eletrocardiograma e ecocardiograma do coração.
- Será realizado doppler das artérias carótidas que consiste em uso de transdutor (aparelho) de ultrassom na região do pescoço para avaliação destas artérias.
- Será realizado exame de Holter que consiste em gravação dos batimentos cardíacos durante 24 horas através de eletrodos colados na pele.
- Será realizado exame de Teste de inclinação em maca que consiste em permanecer deitado em maca por cerca de 20 minutos com avaliação contínua de pressão e frequência cardíaca. Após este tempo a maca é levantada cerca de 60 a 70 graus com suporte para os pés e cinto de segurança. Durante todo o exame o paciente é monitorizado com a presença de médico experiente na realização deste tipo de exame.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

O doppler de carótidas pode causar discreto desconforto no pescoço no momento do exame.

O holter pode causar coceira nos locais da pele onde são colados os eletrodos, em pessoas alérgicas.

O ecocardiograma pode causar discreta dor no local da realização do exame

O coleta de sangue para exame pode causar discreta dor pela picada

O teste de inclinação pode causar tonteira e desmaio durante a realização do exame, sendo tratado imediatamente por médico experiente e na maioria dos pacientes com melhora logo após voltar para a posição deitada.

5 – Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante. Porém os resultados desta pesquisa poderão possibilitar uma melhor forma de tratamento para Doença de Chagas

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Não existem procedimentos alternativos aos exames descritos acima

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Fábio Fernandes, que pode ser encontrado na Unidade Clínica de Miocardiopatias – Instituto do Coração – Av. Dr. Enéas C. Aguiar, 44 – CEP: 05403-900, andar AB, Telefone: (11) 3069-5057; FAX (11) 3069-5346. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

ANEXO B

BIX 3217/08/133

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/05/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0124/09**, intitulado: "**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS NAS DIVERSAS FORMAS EVOLUTIVAS DA DOENÇA DE CHAGAS**" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Fabio Fernandes**

Pesquisador (a) Executante: **João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira**

CAPPesq, 06 de Maio de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
08/05/09
Eloaine

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

8 REFERÊNCIAS

1. Organização Panamericana de Saúde. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. Montevideo, Uruguai: OPAS; 2006.
2. Organização Mundial de Saúde. Research priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Genebra, Suíça: OMS; 2012.
3. Freitas HF, Chizzola PR, Paes AT, Lima ACP, Mansur AJ. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2005;102:239-247.
4. Coura JR, Junqueira, ACV. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:145-154.
5. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica.* 2010;115:22-7.
6. Lannes-Vieira J. Trypanosoma cruzi-elicited CD8+ T Cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:299-304.
7. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:92-100.
8. Ianni BM, Arteaga E, Frimm CC, Barretto ACO, Mady C. Chagas' heart disease: Evolutive evaluation of eletrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. *Arq Bras Cardiol;* 2001;77: 59-62.

9. Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AVL. Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol.* 1999;72:247-62.
10. Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Belloti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 90: 3098-102.
11. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas Heart Disease. *Circulation.* 2007; 115: 1109-23.
12. Factor SM, Cho S, Wittner M, Tanowitz H. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:246-53.
13. Marin-Neto JA, Marzullo P, Marcassa C, Gallo L Jr, Maciel BC, Bellina CRL, Abbate A. Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thalium-201 scintigraphy. *Am J Cardiol.* 1992;69:780-4.
14. Da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furnes JB, Reis DA. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves and glial cells. *Hum Pathol.* 2007;38:1256-64.
15. Cunha AB. A doença de chagas e o envolvimento do Sistema Nervoso Autônomo. *Rev Port Cardiol.* 2003;22:813-24.
16. Simões MV, Pintya AO, Bromberg-Marin G, Sarabanda AV, Antloga CM, Pazin-Filho A, Maciel BC, Marin-Neto JA. Relation of regional sympathetic denervation and myocardial perfusion disturbance to wall motion impairment in Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2000;86:975-81.
17. Sterin-Borda L, Borda E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:273-80.

18. Ribeiro ALP, Moraes RS, Ribeiro JP, Ferlin EI, Torres RM, Oliveira E, Rocha MOC. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J*. 2001;141:260-5.
19. Vanderlei LCM, Pastre CM, Hoshi RA, Carvalho TD, Godoy MF. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;24:205-17.
20. European Society of Cardiology. Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological, interpretation and clinical use. *Circulation*. 1996; 93:1043-65.
21. Marinho CR, D'Imperio Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*. 1999;67:308-18.
22. Higuchi ML, Benvenuti LA, Reis MM, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res*. 2003;60:96-107
23. Benvenuti LA, Roggerio A, Freitas HF, Mansur AJ, Fiorelli A, Higuchi ML. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102:481-487.
24. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KH, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006;39: 41-54.

25. Cunha-Neto, Duranti M, Gruber A, Zingales B, Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci. 1995;92: 3541-45.
26. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease: Identification of cardiac myosin- B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 1996;98:1709-12.
27. Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA. 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 Immunopath. 1997;83:165-72.
28. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, Bacal F, Carrara D, Ianni B, Mady C, Kalil J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res. 1998; 31: 133-137.
29. Abel LCJ, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas' disease Cardiomyopathy patients display an increased IFN response to *Trypanosoma cruzi* infection. Journal of Autoimmunity. 2001; 17: 99-108.
30. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LM, Rocha MOC, Martins-Filho AO, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun. 2003; 71:1185-93.

-
31. Mocelin AM, Issa VS, Bacal F, Guimarães GV, Cunha E, Bocchi EA. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Failure*. 2005;7:869-73.
 32. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002;420:853-9.
 33. Machado MPR, Silva VJD. Autonomic neuroimmunomodulation in chagasic cardiomyopathy. *Exp Physiol*. 2012;97:1151-60.
 34. Lopes HF, Egam BM. Desequilíbrio autonômico e Síndrome Metabólica: Parceiros patológicos em pandemia global emergente. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87: 538-47.
 35. Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva MER. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrom, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53:145-50.
 36. Antoniadis C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Stefanadis C. Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. *Obesity reviews*. 2009;10:269-79.
 37. Guzik TJ, Mangalat D, Korbout R. Adipocytokines- Novel link between inflammation and vascular function ? *J Physiol and Pharmacol*. 2006;57:505-28.
 38. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. *Circulation Res*. 2005;96:939-49.
 39. George J, Patal S, Wexler D, Sharabi Y, Pelg E, Kamari Y, Grossman E, Sheps D, Keren G, Roth A. Circulating adiponectin concentrations in patients with congestive heart failure. *Heart*. 2006;92:1420-4.

-
40. Dieplinger B, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T. Prognostic value of increased adiponectin plasma concentrations in patients with acute destabilized heart failure. *Clin Biochem.* 2009;42:1190-3.
 41. Trayhurn P, Duncan JS, Hoggard N, Rayner DV. Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc Nutr Soc.* 1998;57: 413-9.
 42. Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci.* 1998;1:445-50.
 43. Schulze PC, Kratzch J, Linke A, Schoene N, Adams V, Gielen S et al. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2003;5:33-40.
 44. Filippatos GS, Tsilias K, Venetsanou K, Karambinos E, Manolatos D, Kranidis A, Antonelis J, Kardaras F, Anthopoulos L, Baltopoulos G. Leptin serum levels in cachectic heart failure patients. Relationship with tumor necrosis factor-alpha system. *Int J Cardiol.* 2000;76: 117-22.
 45. Fernandes F, Dantas S, Ianni BM, Ramires FJA, Buck P, Salemi VMC, Lopes HF, Mady C. Leptin levels in different forms of Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:1631-6.
 46. Desrusseaux MS, Nagajyothi F, Trujillo ME, Tanowitz HB, Scherer PE. Adipocyte, adipose tissue and infectious disease. *Infect Immun.* 2007;3:1066-78.
 47. Andrade ZA, Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995;90: 521-2.

48. Coombs TP, Mukherjee Salmeida CJG, Jelicks LA, Schubert W, Lin Y, Jayabalan DS, Zhao D, Braunstein VL, Landskroner-Eiger S, Cordero A, Factor SM, Weiss LM, Lisanti MP, Tanowitz HB, Scherer PE. The adipocyte as an important target cell for infection with *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem .2005;280:24085-94.
49. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Thiruvur N, Weiss LM, Braunstein VL, Albanese C, Teixeira MM, Almeida CJ, Lisanti MP, Scherer PE, Tanowitz HB. *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. Obesity. 2008; 16: 1992-1997.
50. Ferreira AVM, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, Andrade LO, Nagajyothi F, Scherer PE, Teixeira MM, Tanowitz HB. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. Microbes and Infectious. 2011;13:1002-5.
51. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Weiss LM, Chua S, Albanese C, Machado FS, Esper L, Lisanti MP, Teixeira MM, Scherer PE, Tanowitz HB. Chagas disease , adipose tissue and the metabolic syndrome. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 (suppl I):1-7.
52. Tanowitz HB, Jelicks LA, Machado FS, Esper L, Qi X, Desruisseaux MS, Chua SC, Scherer P, Nagajyothi F. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. Adv Parasitol. 2011;76:235-50.
53. Rocha A, Oliveira LCM, Alves RS, Lopes ER. Despopulação neuronal pancreática em chagásicos crônicos. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31:43-9.
54. Saldanha JC, Santos VM, Reis MA, Cunha DF, Teixeira VPA. Morphologic and morphometric evaluation of pancreatic islets in chronic Chagas' Disease. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo. 2001;56:131-8.

55. Santos VM, Lima MA, Cabrine-Santos M, Marquez DS, Pereira GA, Lages-Silva E, Ramirez LE. Functional and histopathological study of the pancreas in hamsters (*Mesocricetus Auratus*) infected and reinfected with *Trypanosoma Cruzi*. Parasitol Res. 2004;94:125-33.
56. Oliveira LCM, Juliano Y, Novo NF, Neves MM. Blood glucose and insulin response to intravenous glucose by patients with chronic Chagas' Disease and alcoholism. Braz J Med Biol Res. 1993;26:1187-90.
57. Guariento ME, Saad MJA, Muscelli EOA, Gontijo JAR. Heterogeneous insulin response to an oral glucose load by patients with indeterminate clinical form of Chagas' Disease . Braz J Med Biol Res. 1993;26:491-5.
58. Guariento ME, Muscelli EOA, Gontijo JAR. Chronotropic and blood pressure response to oral glucose load in Chagas Disease. São Paulo Med J. 1994;112:602-6.
59. Santos VM, Cunha SFC, Teixeira VPA, Monteiro JP, Santos JAM, Santos TAM, Santos LAM, Cunha DF. Frequência de diabetes mellitus e hiperglicemia em mulheres chagásicas e não-chagásicas. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32:489-96.
60. Geraix J, Ardisson LP, Marcondes-Machado J, Pereira PCM. Clinical and nutritional profile of individuals with Chagas Disease. Braz J Infect Dis. 2007;11:411-4.
61. Lopes ER, Mesquita PM, Mesquita LFV, Chapadeiro E, Aterosclerose coronariana e infarto agudo do miocárdio em chagásicos crônicos. Arq Bras Cardiol. 1995;65:143-145.
62. Oliveira FA, Teixeira VPA, Lino Junior RSL, Vinaud MC, Reis MA. Aspectos macroscópicos da Cardiopatia Chagásica Crônica no envelhecimento. Arq Bras Cardiol. 2007;88:486-90.

-
63. Santos RD, Nasir K. Insights into atherosclerosis from invasive and non-invasive imaging studies: should we treat subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;205:349-356.
 64. Cardoso SJM. Avaliação de aterosclerose coronária em pacientes com doença de Chagas por tomografia computadorizada de múltiplos detectores [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.
 65. American Society of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards Committee and the Chamber quantification writing group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18:1440-63.
 66. American Society of Echocardiography. Recommendations for use of echocardiography in clinical trials: A report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards Committee and the Task Force on echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17:1086-119.
 67. Tei C, Ling LH, Hodge DO, Bailey KR, Oh JK, Rodeheffer RJ, Tajik AJ, Seward JB. New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a single and reproducible measure of cardiac function- a study in normal and dilated cardiomyopathy. *J Cardiol*. 1995;2:357-66.
 68. American Society of Echocardiography. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-media thickness task force endorsed by the Society for Vascular medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008;21:93-108.

-
69. Bussab WO, Morettin P. Estatística básica. 7ª edição. São Paulo: Saraiva; 2011.
 70. Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Análise multivariada de dados. 5ª edição. Porto Alegre: Bookman; 2006.
 71. Silva CC, Santos CAM, Mostarda C, Krieger EM, Lopes HF. Pressão arterial, respostas metabólicas e autonômicas à insulina e infusão de Intralipid em pacientes chagásicos. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98:225-33.
 72. Nagajyothi F, Kuliawat R, Kusminski CM, Machado FS, Desruisseaux MS, Zhao D, Schwartz GJ, Huang H, Albanese C, Lisanti MP, Singh R, Li F, Weiss LM, Factor SM, Pessin JE, Scherer PE, Tanowitz HB. Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. *Am J Pathol.* 2013;182:886-94.
 73. Schulze PC, Biolo A, Gopal D, Shahzad K, Balog J, Fish M, Siwik D, Colucci WS. Dynamics in insulin resistance and plasma levels of adipokines in patients with acute decompensated and chronic stable heart failure. *J Cardiac Fail.* 2011;17:1004-11.
 74. Leyva F, Anker SD, Egerer K, Stevenson JC, Kox WJ, Coats AJS. Hyperleptinaemia in chronic heart failure: relationships with insulin. *Eur Heart J.* 1998;19:1547-51.
 75. Murdoch DR, Rooney E, Dargie HJ, Shapiro D, Morton JJ, McMurray JJV. Inappropriately low plasma leptin concentration in the cachexia associated with chronic heart failure. *Heart.* 1999;82:352-6.
 76. Freeman LM. The pathophysiology of cardiac cachexia. *Curr Opin Palliat Care.* 2009;3:276-81.

-
77. Boer-Martins L, Figueiredo VN, Demacq C, Martins LC, Faria ACP, Moraes CH, Moreno Jr H. Leptina e aldosterona na atividade simpática na hipertensão resistente, com ou sem diabetes tipo 2. *Arq Bras Cardiol.* 2012;99:642-8.
 78. Nagajyothi F, Zhao D, Machado FS, Weiss LM, Scwartz GJ, Desruisseaux MS, Zhao Y, Factor SM, Huang H, Albanese C, Teixeira MM, Scherer PE, Chua Jr SC, Tanowitz HB. Crucial role of the leptin receptor in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis.* 2010;202:1104-13.
 79. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS, Upadhya R, Zhao D, Schwartz GJ, Teixeira MM, Albanese C, Lisanti MP, Chua Jr SC, Weiss LM, Scherer PE, Tanowitz HB. Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *J Infect Dis.* 2012;205:830-40.
 80. Fu M, Zhou J, Qian J, Jin X, Zhu H, Zhong C, Fu M, Zou Y, Ge J. Adiponectin through its biphasic serum is a useful biomarker during transition from diastolic dysfunction to systolic dysfunction- an experimental study. *Lipids Health Dis.* 2012;11:106-15.
 81. Sam F, Duhaney TS, Sato K, Wilson RM, Ohashi K, Sono-Romanelli S, Higuchi A, De Silva DS, Qin F, Walsh K, Ouchi N. Adipnectin deficiency, diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Endocrinology.* 2010;151:322-31.
 82. Negi SI, Jeong E, Shukrullah I, Raicu M, Dudley Jr SC. Association of low plasma adiponectin with early diastolic dysfunction. *Congest Heart Fail.* 2012;18:187-91.
 83. Fukuta H, Ohte N, Wakami K, Goto T, Tani T, Kimura G. Relation of plasma levels of adiponectin to left ventricular diastolic dysfunction in patients undergoing cardiac catheterization for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2011;108:1081-5.

-
84. Nakamura T, Funayama H, Kubo N, Yasu T, Kawakami M, Saito M, Momomura S, Ishikawa S. Association of hyperadiponectinemia with severity of ventricular dysfunction in congestive heart failure. *Circ J*. 2006;70:1557-62.
 85. Matsumoto M, Lee-Kawabata M, Tsujino T, Naito Y, Ezumi A, Sakoda T, Ohyanagi M, Shimomura I, Masuyama T. Decrease in serum adiponectin levels in response to treatment predicts good prognosis in acute decompensated heart failure. *J Clin Hypertens*. 2010;12:900-4.
 86. McEntegart MB, Awede B, Petrie MC, Sattar N, Dunn FG, Macfarlane NG, McMurray JJV. Increase in serum adiponectin concentration in patients with heart failure and cachexia: relationship with leptin, other cytokines, and B-type natriuretic peptide. *Eur Heart J*. 2007;28:829-35.
 87. Araújo JP, Lourenço P, Rocha-Gonçalves F, Ferreira A, Bettencourt P. Adiponectin is increased in cardiac cachexia irrespective of body mass index. *Eur J Heart Fail*. 2009;11:567-72.
 88. Bobbert P, Scheibenbogen C, Jenke A, Kania G, Wilk S, Krohn S, Stehr J, Kuehl U, Rauch U, Eriksson U, Schultheiss HP, Poller W, Skurk C. Adiponectin expression in patients with inflammatory cardiomyopathy indicates favourable outcome and inflammation control. *Eur Heart J*. 2011;32:1134-47.
 89. Berendoncks AMV, Conraads VM. Functional adiponectin resistance and exercise intolerance in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2011;8:113-22.
 90. Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W. Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2008;29:1168-80.

-
91. Takano H, Obata J, Kodama Y, Kitta Y, Nakamura T, Mende A, Kawabata K, Saito Y, Fujioka D, Kobayashi T, Yano T, sano K, Kugiyama K. Adipnectin is released from the heart in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2009;132:221-6.
 92. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Paico H, Yauri V, Angulo N, Ccopa F, Bern C. Cell death and serum markers of collagen metabolism during cardiac remodeling in *Cavia porcellus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *PloS Negl Trop Dis.* 2013;7:e1996.
 93. Yamagi M, Tsutamoto T, Tanaka T, Kawahara C, Nishiyama K, Yamamaoto T, Fujii M, Horie M. Effect of carvedilol on plasma adiponectin concentration in patients with chronic heart failure. *Circ J.* 2009;73:1067-73.
 94. Biolo A, Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sonoda M, Waish K, Sam F. Determinants of adiponectin levels in patients with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol.* 2010;105:1147-52.
 95. Berendoncks AMV, Beckers P, Hoymans VY, Possemiers N, Coenen S, Elseviers MM, Vrints CJ, Conraads VM. Beta-blockers modify the prognostic value of adiponectin in chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2011;150:296-300.
 96. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Sasano H, Oka Y. Cold exposure supresses serum adiponectin levels through sympathetic nerve activation in mice. *Obesity.* 2006;14:1132-41.
 97. Iwen KA, Wenzel ET, Ott V, Perwitz N, Wellhöner P, Lehnert H, Dodt C, Klein J. Cold-induced alteration of adipokine profile in humans. *Metabolism.* 2011;60:430-7.

-
98. Wakabayashi S, Aso Y. Adiponectin concentrations in sera from patients with type 2 diabetes are negatively associated with sympathovagal balance as evaluated by power spectral analysis of heart rate variation. *Diabetes Care*. 2004;27:2392-7.
 99. Takahashi N, Anan F, Nakagawa M, Yufu K, Shinohara T, Tsubone T, Goto K, Masaki T, Katsragi I, Tanaka K, Kakuma T, Hara M, Saikawa T, Yoshimatsu. Hypoadiponectinemia in type 2 diabetes mellitus in men is associated with overactivity as evaluated by cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Metabolism*. 2007;56:919-24.
 100. Lieb DC, Parson HK, Mamikunian G, Vinik AI. Cardiac autonomic imbalance in newly diagnosed and established diabetes is associated with markers of adipose tissue inflammation. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:1-7.
 101. Lam JC, Xu A, Tam S, Khong PI, Yao TJ, Lam DC, Lai AY, Lam B, Lam KS, Mary SM. Hypoadiponectinemia is related to sympathetic activation and severity of obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2008;31:1721-7.
 102. Tanida MT, Shen J, Horii Y, Matsuda M, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I, Sawai H, Fukuda Y, Matsuzawa Y, Nagai K. Effects of adiponectin on the renal sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *Exp Biol Med*. 2007;232:390-7.
 103. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by β -adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS*. 2001;507:142-6.
 104. Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y, Brichard SM. Pre- and post-translational negative effect of β -adrenoreceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J*. 2002;367:677-85.

-
105. Bartness TJ, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J Lipid Res.* 2007;48:1655-72.
 106. Bartness TJ, Shrestha YB, Vaughan CH, Schwartz GJ, Song CK. Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;318-343.
 107. Karki S, Chakrabarti P, Huang G, Huang H, Farmer SR, Kandror KV. The multi-level action of fatty acids on adiponectin production by fat cells. *PLoS One.* 2011;6:e28146.
 108. Moro C, Klimcakova E, Lolmede K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, Bouloumie A, Galitzky J, Arner P, Langin D. Atrial natriuretic peptides inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia.* 2007;50:1038-47.
 109. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of Tumor Necrosis Factor- α in asymptomatic/ "indeterminated" and Chagas Disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:407-11.
 110. Llaguno M, Pertili LA, Silva MV, Bunazar P, Reges AM, Faleiros AC, Lages-Silva E, Rodrigues Jr V, Silva VJ, Correia-Filho D. The relationship between heart rate variability and serum cytokines in chronic chagasic patients with persistent parasitemia. *PACE.* 2011;34:724-35.
 111. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10:359-368.

-
112. Straub RH, Rauch L, Rauh L, Pongratz G. Sympathetic inhibition of IL-6, IFN- γ , and KC/CXCL1 and sympathetic stimulation of TGF- β in spleen of early arthritic mice. *Brain Behav Immun*. 2011;25:1707-15.
 113. Turpeinen AK, Vanninen E, Magga J, Tuomainen P, Kuusisto J, Sipola P, Punnonen K, Vuolteenaho O, Peuhkurinen K. Cardiac sympathetic activity is associated with inflammation and neurohumoral activation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2009;29:414-9.
 114. Dávila DF, Inglessis G, Mazzei CA, Dávila M. Chagas' heart disease and the autonomic nervous system. *Int J Cardiol*. 1998;66:123-127.
 115. Oliveira E, Ribeiro ALP, Silva FA, Torres RM, Rocha MOC. The Valsalva maneuver in Chagas disease patients without cardiopathy. *Int J Cardiol*. 2002;82:49-54.
 116. Molina RBG, Matsubara BB, Hueb JC, Zanati SG, Meira DA, Cassolato JL, Paiva SAR, Zornoff LAM. Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease. *Int J Cardiol*. 2006;113:188-193.
 117. Pepper GS, Lee RW. Sympathetic activation in heart failure and its treatment with β -blockade. *Arch Intern Med*. 1999;159:225-34.
 118. Nastari L, Ramires FJA, Salemi VMC, Ianni BM, Fernandes F, Strunz CM, Arteaga E, Mady C. Ativação adrenérgica intramiocárdica na cardiomiopatia chagásica e doença arterial coronariana. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96:99-106.
 119. Himura Y, Felten SY, Kashiki M, Lewandowski TJ, Dedehanty JM, Liang CS. Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. *Circulation*. 1993;88:1299-309.

120. Machado CRS, Camargos ERS, Guerra LB, Moreira MCV. Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. *Hum Pathol.* 2000;31:3-10.
121. Kingwell BA, Thompson JM, Kaye DM, McPherson GA, Jennings GL, Esler MD. Heart rate spectral analysis, cardiac norepinephrine spillover, and muscle sympathetic nerve activity during human sympathetic nervous activation and failure. *Circulation.* 1994;90:234-40.
122. Iosa D, De Quattro V, De-Ping LD, Elkayam L, Palmero II. Plasma norepinephrine in Chagas' cardioneuromyopathy: a marker of progressive dysautonomia. *Am Heart J.* 1989;117:882-7.
123. Cunha AB, Cunha DM, Pedrosa RC, Flaminia F, Silva AJR, Saad EA, Kopiler DA. Norepinefrina e variabilidade da frequência cardíaca: marcadores de disautonomia na cardiopatia chagásica crônica. *Rev Port Cardiol.* 2003;22:29-52.
124. Negrão CE, Santos AC, Rondon UM, Franco FG, Ianni BM, Rochitte CE, Braga AMFW, Oliveira Jr MT, Mady C, Barretto ACP, Middlekauff HR. Muscle sympathetic nerve activity in patients with Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 2009;137:252-9.
125. Vaile JC, Fletcher J, Al-Ani M, Ross HF, Littler WA, Coote JH, Townend JN. Use of opposing reflex stimuli and heart rate variability to examine the effects of lipophilic and hydrophilic β -blockers on human cardiac vagal control. *Clin Sci.* 1999;97:585-93.