

O Etanercepte Induz QRS de Baixa Tensão e Disfunção Autonômica em Camundongos com Doença de Chagas Experimental

Etanercept Induces Low QRS Voltage and Autonomic Dysfunction in Mice with Experimental Chagas Disease

Héctor Rodríguez-Angulo¹, Oscar García², Endher Castillo², Edward Cardenas², Juan Marques³, Alfredo Mijares¹

Instituto Venezuelano de Investigações Científicas (IVIC) - Centro de Biofísica e Bioquímica¹, Caracas, Venezuela; Universidade Centro Ocidental "Lisandro Alvarado" - Decanato de Ciências de la Saúde², Barquisimeto, Venezuela; Serviço de Cardiologia, Instituto de Medicina Tropical - Universidade Central da Venezuela³, Venezuela

Resumo

Fundamento: A doença de Chagas é uma doença parasitária tropical causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. A cardiomiopatia chagásica é caracterizada por distúrbios na regulação autonômica e na condução do potencial de ação nas fases aguda e crônica da infecção. Embora o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tenha sido associado à cardiomiopatia em modelos experimentais e em pacientes com doença de Chagas, outros relatos sugerem que o TNF- α pode exercer ações antiparasitárias durante a fase aguda da infecção.

Objetivos: Este estudo teve como objetivo determinar os efeitos de um blocker TNF- α solúvel, o etanercepte, em parâmetros eletrocardiográficos na fase aguda da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*.

Métodos: Foram feitos eletrocardiogramas em camundongos infectados não tratados e camundongos infectados que foram tratados com etanercepte 7 dias após a infecção. Os parâmetros de variabilidade onda do eletrocardiograma e frequência cardíaca foram determinados utilizando o Chart para Windows.

Resultados: O tratamento com etanercepte resultou em uma baixa tensão do complexo QRS e uma redução da variabilidade da frequência cardíaca em comparação com a ausência de tratamento. No entanto, os camundongos tratados apresentaram um atraso na queda da curva de sobrevivência durante a fase aguda.

Conclusão: Os resultados deste estudo sugerem que, embora o tratamento com etanercepte promova a sobrevivência em camundongos infectados com uma linhagem virulenta de *T. cruzi*, o bloqueio do TNF- α gera um complexo de baixa tensão e disfunção autonômica durante a fase aguda da infecção. Esses resultados indicam que a mortalidade durante a fase aguda pode ser atribuída a uma resposta inflamatória sistêmica, em vez da disfunção cardíaca. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(3):205-210)

Palavras-chave: Camundongos; Doença de Chagas; Imunoglobulina G / efeitos adversos; Sistema Nervoso; Etanercepte.

Abstract

Background: Chagas disease is a tropical parasitic disease caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. Chagasic cardiomyopathy is characterized by disorders of autonomic regulation and action potential conduction in the acute and chronic phases of infection. Although tumor necrosis factor alpha (TNF- α) has been linked to cardiomyopathy in experimental models and in patients with Chagas disease, other reports suggest that TNF- α may exert anti-parasitic actions during the acute phase of infection.

Objectives: This study aimed to determine the effects of a soluble TNF- α agonist, etanercept, on electrocardiographic parameters in the acute phase of experimental infection with *Trypanosoma cruzi*.

Methods: Electrocardiograms were obtained from untreated infected mice and infected mice who were treated with etanercept 7 days after infection. ECG wave and heart rate variability parameters were determined using Chart for Windows.

Results: Etanercept treatment resulted in a low QRS voltage and decreased heart rate variability compared with no treatment. However, the treated mice exhibited a delay in the fall of the survival curve during the acute phase.

Conclusion: The results of this study suggest that although etanercept treatment promotes survival in mice infected with a virulent *T. cruzi* strain, TNF- α blockade generates a low voltage complex and autonomic dysfunction during the acute phase of infection. These findings indicate that mortality during the acute phase can be attributed to a systemic inflammatory response rather than cardiac dysfunction. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(3):205-210)

Keywords: Mice; Chagas Disease; Immunoglobulin G / adverse effects; Nervous System; Etanercept.

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

Correspondência: Alfredo Mijares •
Carretera Panamericana, Km 11, Alto de Pipe. CEP 1020A, Caracas, Venezuela.
E-mail: amijares@ivic.gob.ve, mijaresa@gmail.com
Artigo recebido em 10/11/12; revisado em 20/12/12; aceito em 21/02/13.

DOI: 10.5935/abc.20130149

Abreviações

- TNF- α** : Fator de necrose tumoral alfa
CC: Cardiomiopatia chagásica
TNFR: Receptor de TNF
VFC: Variabilidade da frequência cardíaca
ECCG: Eletrocardiografia
SDNN: Desvio padrão dos intervalos R – R
IFN- γ : Interferon gama

Introdução

A cardiomiopatia Chagásica (CC) é uma das consequências mais devastadoras da doença de Chagas, infecção intracelular causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e está intimamente relacionada à mortalidade na fase crônica da infecção¹. A CC aflige cerca de 10 a 30% dos pacientes infectados, e é caracterizada pela dilatação de ambos os ventrículos, aneurisma apical e distúrbios de condução como bloqueio do ramo direito e bloqueio atrioventricular². O papel dos mediadores inflamatórios na evolução da CC permanece controverso³.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, linfócitos B e T e outras linhagens celulares, tais como células endoteliais, neurônios e cardiomiócitos. Ela é produzida em resposta a estímulos inflamatórios e infecciosos⁴, e é inicialmente sintetizada como uma molécula transmembrana, clivada por uma metaloprotease conversora do TNF- α (TACE ou ADAM17), e secretada como um monômero agrupado para formar trímeros biologicamente ativos⁵. O TNF- α se liga a receptores específicos de membrana (receptores de TNF - TNFRs), que são o p55TNFR (TNFR1) e o p75TNFR (TNFR2), ativando as vias de sinalização do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)⁶. O etanercepte (Enbrel®) é uma proteína de fusão dimérica que compreende a porção de ligação ao ligando extracelular do 75-kDa TNFR humano (p75) ligada à porção Fc da IgG1 humana⁴.

O TNF- α tem sido associado à evolução da CC. Lula e cols relataram altos níveis séricos de ligantes de TNF em pacientes com disfunção cardíaca sem arritmias associadas⁷. Outros relatos demonstraram que a sinalização mediada por TNF / TNFR1 promove miocardite por estimular a infiltração de células CD8⁺⁸. Sabe-se que o bloqueio TNF- α diminuiu a CC em modelos experimentais^{8,9}. No entanto, tem sido reportado o agravamento da disfunção ventricular na doença de Chagas crônica experimental causada por bloqueio do TNF- α com etanercepte¹⁰. Portanto, o papel do TNF- α na fisiopatologia da CC permanece obscuro. Além disso, há pouca informação sobre o papel das citocinas pró-inflamatórias na integridade da condução do potencial de ação cardíaco na doença de Chagas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos do etanercepte nos parâmetros ecocardiográficos durante a fase aguda da infecção induzida por um tipo selvagem de linhagem virulenta de *T. cruzi* em camundongos experimentais.

Métodos

Cuidados com os animais

Camundongos machos NMRI (linhagem IVIC) pesando 30 g foram alojados em gaiolas transparentes medindo 40 × 25 × 15 cm (cinco camundongos por gaiola) colocadas em uma sala com temperatura e umidade controladas e ciclo de luz claro/escuro de 12h/12h. Todos os camundongos tinham livre acesso a comida e água e foram habituados a essas condições durante uma semana. Todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com o Manual de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (*Care and Use Handbook of Laboratory Animals*) publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*US National Institute of Health* - publicação NIH No. 85-23, revisada em 1996).

Depois da habituação, eram administrados nos camundongos 100 μ L de injeções intraperitoneais com 1000 tripomastigotas derivados de cultura de células Vero por grama. O inóculo era um isolado selvagem venezuelano de *T. cruzi*. Atualmente essa linhagem está sendo caracterizada por biologia molecular no nosso laboratório. O isolado foi obtido de uma amostra de *Panstrongylus geniculatus* capturada de uma comunidade rural no estado de Miranda, e foi mantido por passagens sucessivas em células Vero. Camundongos infectados e não infectados foram alojados em gaiolas separadas dentro do ambiente controlado.

Tratamento com Etanercepte

Os camundongos infectados foram divididos em um grupo não tratado (n = 9) e um grupo tratado (n = 13). Uma dose única de etanercepte foi administrada por via intraperitoneal (0,83 mg / kg) 7 dias após a infecção, utilizando uma agulha hipodérmica de calibre 27,5. O volume máximo de injeção foi de 100 μ L.

Registros eletrocardiográficos e análise de dados

Os camundongos foram previamente anestesiados com 40 mg / kg de tiopental (sal de sódio) por via intraperitoneal. O Eletrocardiograma (ECG) foi realizado utilizando um sistema bipolar no qual os eletrodos foram colocados por via subcutânea na cartilagem xifóide (eletrodo positivo), no ombro direito (negativo), e no ombro esquerdo (referência). Os eletrodos foram conectados a um amplificador BioAmp (AD Instruments®, Bella Vista, Austrália) e foram digitalizados através de um conversor A / D PowerLab 8SP (AD Instruments®). Os registros digitais foram analisados com o *software Chart* para Windows versão 7.3.1 (AD Instruments®). Os eventos foram registrados a 4 K / s, e foram filtrados a 60 Hz. Os registros eletrocardiográficos foram obtidos por cinco minutos antes da infecção (saudável) e em 7 e 14 dias após a infecção (antes e após o tratamento, respectivamente).

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi determinada utilizando o módulo HRV do Chart para Windows. Cada registro foi cuidadosamente revisto e os complexos QRS foram classificados como complexos normais, artefatos ou batimentos ventriculares prematuros para criar uma série temporal e calcular os intervalos R-R

e o desvio padrão do intervalo R-R (SDNN). Além disso, os intervalos P-R, QRS e QTc e as amplitudes P e R foram calculados usando o módulo de análise ecocardiográfica do Chart para Windows, usando um complexo QRS murino normal de 10 ms como referência. O intervalo QT foi ajustado para a frequência cardíaca usando o método de Bazett¹¹. Além disso, a morfologia das ondas do ECG foi avaliada qualitativamente usando como referência registros de ECG obtidos do mesmo animal quando ele estava saudável. Finalmente, a amplitude e a inclinação da onda T foram calculadas utilizando a Análise de Pico do Chart (v7) ®. O limiar de detecção do pico foi ajustado para um aumento de 5% nos valores de referência da tensão¹¹.

Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão, e foram comparados usando o teste t de Student pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As curvas de sobrevivência foram comparadas usando o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Todas as análises foram realizadas utilizando o Prism5 ® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

Resultados

A sobrevida foi determinada durante a fase experimental aguda tanto no grupo tratado quanto no grupo não tratado. Como mostra a Figura 1, o grupo tratado apresentou um aumento significativo na sobrevida quando comparado ao grupo não tratado. A sobrevida começou a decrescer rapidamente 20 dias após a infecção no grupo tratado e 11 dias após a infecção no grupo não tratado.

Para avaliar a função cardíaca durante a fase aguda, os registros eletrocardiográficos foram obtidos antes da infecção e 14 dias após a infecção (depois do tratamento). A Figura 2A

mostra que a tensão no complexo QRS e nas ondas P foi significativamente menor no grupo tratado do que no grupo não tratado (Tabela 1). Além disso, o grupo tratado mostrou uma tendência não significativa de aumento nos intervalos P-R e R-R (Tabela 1, Figura 2B). Os valores para os demais parâmetros mensurados são apresentados na Tabela 1.

Por fim, nós observamos que a dispersão no gráfico de Poincaré 14 dias após a infecção foi menor para os animais tratados do que para os animais não tratados (Figura 3). A VFC representa uma comparação entre um dado valor do intervalo R-R e o intervalo R-R sucessivo, que é uma avaliação indireta da regulação autonômica cardíaca. A disfunção autonômica é refletida na alteração na capacidade de regulação da frequência cardíaca em resposta às variações fisiológicas e patológicas. Neste estudo, observou-se uma diminuição na SDNN, conforme apresentado na Tabela 1.

Discussão

O papel do TNF- α no controle da infecção por *T. cruzi* e as alterações patológicas que ocorrem durante a CC têm sido motivo de discussões nos últimos anos. Inicialmente, acreditava-se que o TNF- α e o IFN- γ estavam relacionados com a ativação de macrófagos e a resistência à infecção em camundongos que foram experimentalmente infectados com *T. cruzi*^{12,13}. No entanto, estudos posteriores estabeleceram que, embora o TNF- α desempenhe um papel protetor durante a fase inicial da infecção, níveis elevados dessa substância promovem a caquexia e aumentam a mortalidade durante a fase aguda da infecção¹⁴. Desse ponto de vista, o bloqueio do TNF- α melhora a miocardite experimental aguda⁸. Na fase crônica, o bloqueio do TNF- α com infliximab diminui o dano histopatológico em ratos infectados experimentalmente⁹. Alternativamente, altos

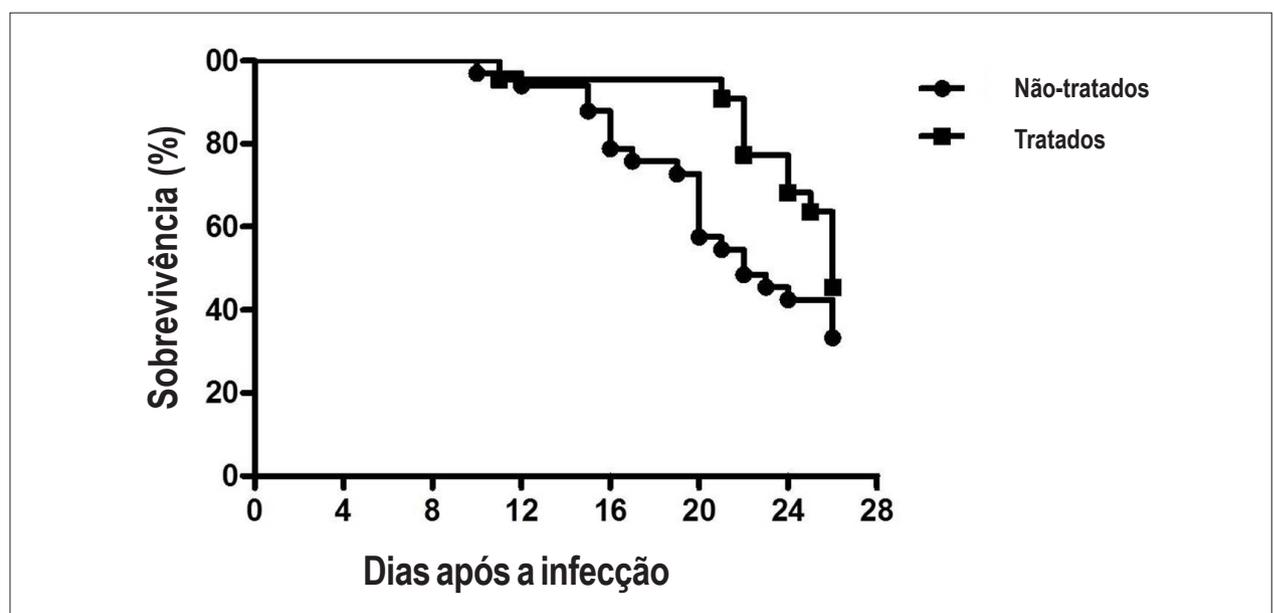


Figura 1 - Taxas de sobrevivência dos grupos tratado (quadrados preenchidos, $n = 8$) e não tratado (círculos preenchidos, $n = 8$). O valor p obtido pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon foi de 0,0477 (significância estatística, $p < 0,05$).

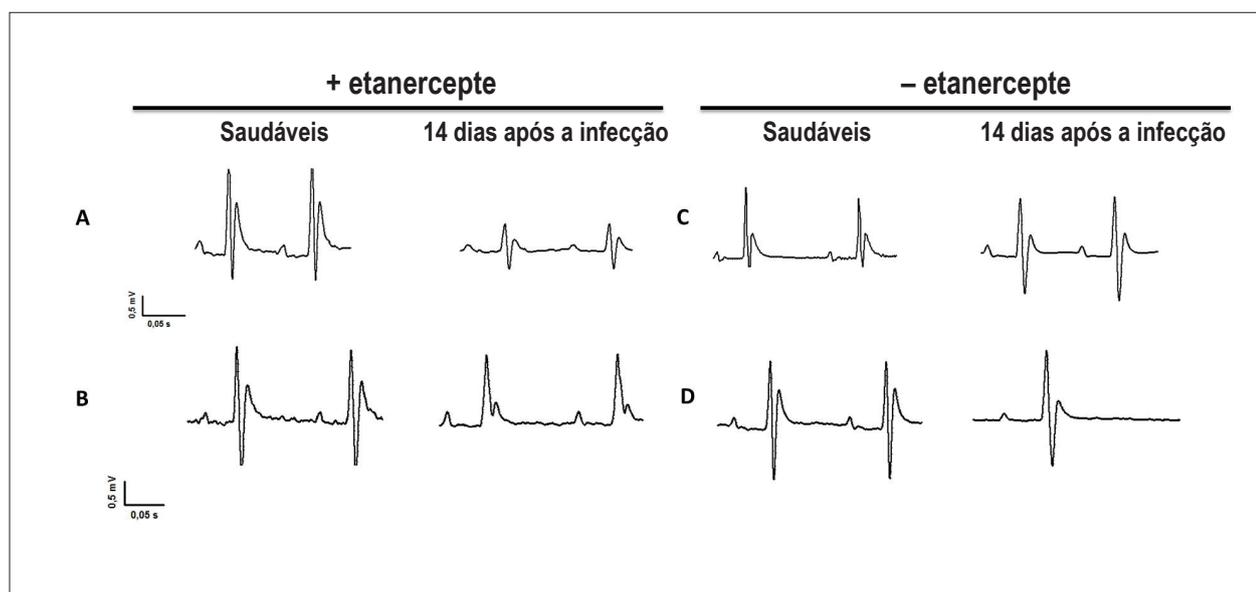


Figura 2 - Registros eletrocardiográficos para os grupos tratado (+ etanercepte, painel à esquerda) e não tratado (- etanercepte, painel à direita). Cada registro identificado por letras (A - D) corresponde a animais diferentes. Cada painel mostra registros pareados obtidos antes da infecção (saudável) e 14 dias após a infecção (infectado).

Tabela 1 - Parâmetros eletrocardiográficos

	Não tratados	Tratados	Valor de p
Intervalo P-R	1,097 ± 0,05828	1,101 ± 0,03453	0,9441
Intervalo QTc	1,149 ± 0,1081	1,038 ± 0,03163	0,3529
Amplitude de P	1,171 ± 0,1714	0,7593 ± 0,09617	0,0381
Amplitude de R	0,8724 ± 0,05804	0,6322 ± 0,07338	0,0275
Amplitude de T	0,8455 ± 0,1585	0,6901 ± 0,1182	0,4398
Inclinação de T	0,9740 ± 0,1701	0,6904 ± 0,1397	0,2361
SDNN	1,268 ± 0,3947	0,4315 ± 0,1016	0,0170

As médias representam a razão entre os valores obtidos 14 dias após a infecção e os valores obtidos antes da infecção. Resultados significativos estão indicados em negrito.

níveis séricos de TNF- α têm se mostrado relacionados com a CC crônica¹⁵. Entretanto, outros autores demonstraram que o tratamento com etanercepte durante a fase crônica promove disfunção ventricular. Portanto, a controvérsia a respeito do papel do TNF- α na fisiopatologia da CC permanece não resolvida¹⁰. Complexos QRS de baixa tensão têm sido relacionados à miocardite aguda em pacientes com doença de Chagas¹⁶. Da mesma forma, nossos resultados sugerem que o bloqueio do TNF- α pode estar associado a uma deterioração da condução ventricular. Outro fato interessante é que os nossos resultados mostraram um aumento da taxa de sobrevivência no grupo tratado (Figura 1), sugerindo que as alterações no ECG não têm um valor preditivo durante a fase aguda. Portanto, embora piore os indicadores eletrocardiográficos de miocardite, o TNF- α aumenta as taxas de sobrevivência. Alguns autores relataram que a infecção aguda com linhagens Venezuelanas de tipo selvagem em um modelo de camundongo geraram

uma resposta inflamatória generalizada, particularmente no sistema nervoso central¹⁷. Podemos supor que a inflamação sistêmica relacionada ao TNF- α desempenha um papel chave na mortalidade aguda em modelos experimentais. Os resultados obtidos pelo nosso grupo (resultados não publicados) indicam que o tratamento com etanercepte diminui a alodínia associada à inflamação visceral e melhora a condição geral de camundongos infectados com a mesma linhagem selvagem utilizada no presente estudo. Com base nesses resultados, podemos afirmar que a resposta regional ao TNF- α (no coração e nas vísceras abdominais) pode variar durante a fase aguda da infecção.

Por fim, nós observamos uma diminuição dos parâmetros de VFC dos animais tratados com etanercepte (Figura 3). A diminuição da VFC seria caracterizada pela disfunção autonômica e ventricular em pacientes com doença de Chagas¹⁸. Llaguno e cols.¹⁹ demonstraram disfunção

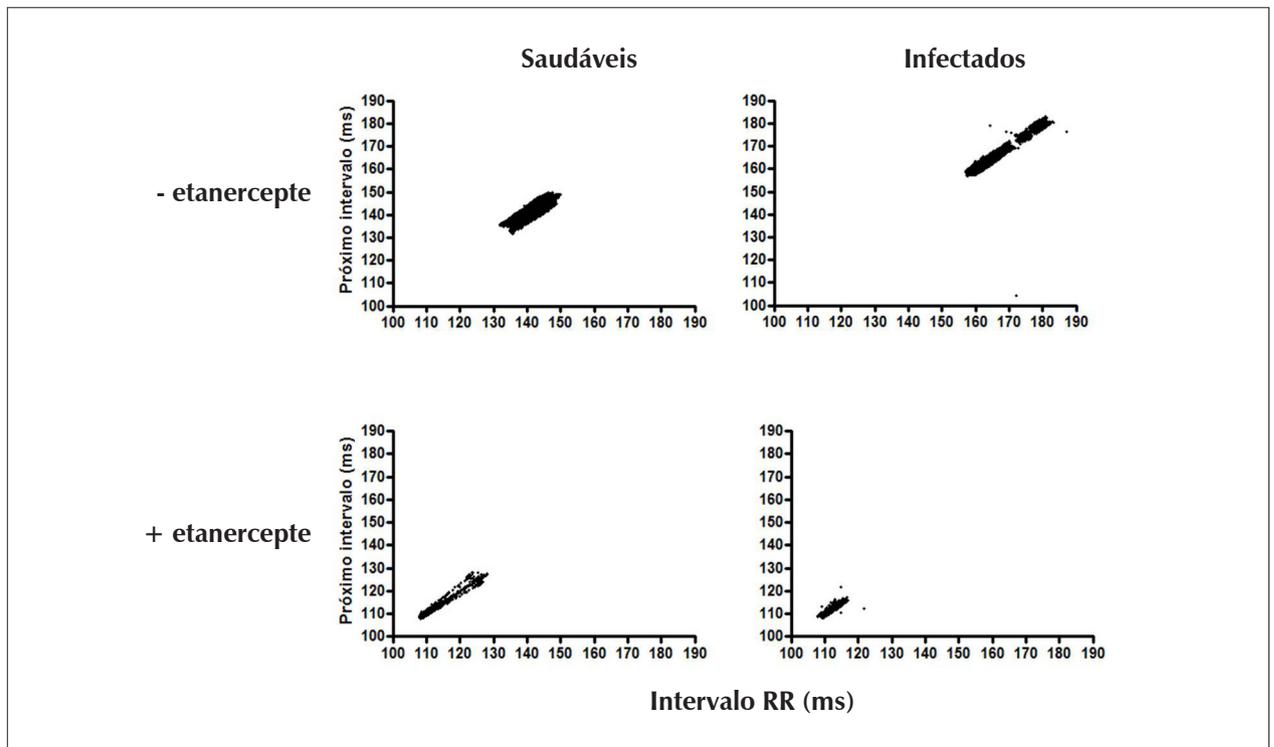


Figura 3 - Gráficos de Poincaré que mostram a variabilidade do intervalo R-R durante um registro inteiro de uma eletrocardiografia. Os painéis superiores e inferiores mostram registros pareados obtidos do grupo não tratado (- etanercepte) e do grupo tratado (+ etanercepte), respectivamente.

autônoma em pacientes com doença de Chagas crônica e de alto risco cardiovascular, mas não conseguiram relacionar essa condição com os níveis séricos de citocinas¹⁹. Nossos resultados sugerem que o bloqueio do TNF- α induz uma disfunção autônoma durante a fase aguda da infecção em camundongos com doença de Chagas, e que a função cardiovascular piora após o tratamento. Por outro lado, Yu e cols.²⁰ relataram que a administração de etanercepte em cães submetidos a uma ligadura coronariana poderia diminuir a taquiarritmia ventricular e a necrose do miocárdio através de processos relacionados à dessensibilização β -adrenérgica mediada pela proteína quinase²⁰. Na doença de Chagas, no entanto, tem sido demonstrado que autoanticorpos dirigidos contra receptores adrenérgicos β_1 durante a fase aguda da infecção são capazes de ativar os canais de cálcio do tipo L, em um processo independente de dessensibilização^{21,22}. Além disso, Chung e cols.²³ demonstraram que citocinas liberadas pelas células inflamatórias inibem a estimulação adrenérgica causada por agonistas específicos, induzindo o acúmulo de AMPc devido à interrupção da sinalização através do sarcolema²³.

Como conclusão, esses resultados sugerem que, apesar da deterioração dos parâmetros ecocardiográficos, o bloqueio do TNF- α induz um aumento na sobrevivência, abrindo uma discussão sobre a possibilidade de uma mortalidade na infecção experimental estar relacionada a

uma resposta inflamatória sistêmica induzida por TNF- α ao invés de piorar a função cardíaca. Outros estudos em diferentes modelos animais serão necessários para validar os resultados obtidos, principalmente no que diz respeito à taxa de sobrevivência, e descartar o fato de que a mortalidade ocorre principalmente por acaso e não pelos efeitos diretos do tratamento. Até onde sabemos, este é o primeiro relato que associa o bloqueio do TNF- α à miocardite caracterizada por alterações eletrocardiográficas e disfunção autônoma durante a fase aguda da infecção em camundongos com doença de Chagas experimental. No entanto, ainda não está claro se existe um equilíbrio frágil entre o controle da replicação do parasito e a preservação da função cardíaca. Esses resultados também ressaltam a necessidade de avaliar o possível papel terapêutico do bloqueio do TNF- α durante as fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Análise e interpretação dos dados: Rodríguez-Ângulo H, Mijares A; Obtenção de dados: Rodríguez-Ângulo H, García O, Castillo E, Cárdenas E; Análise estatística: Rodríguez-Ângulo H; Redação do manuscrito: Rodríguez-Ângulo H, Marques J, Mijares A; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Marques J, Mijares A.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(2 supl.3):1-47.
2. Elizari MV. Arrhythmias associated with Chagas' heart disease. *Card Electrophysiol Rev.* 2002;6(1-2):115-9.
3. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003;60(1):96-107.
4. Kollias G, Sfrikakis PP. TNF pathophysiology: molecular and cellular mechanisms. Basel (Switzerland). Karger; 2010. p. 1-26.
5. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997;385(6618):729-33.
6. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45-65.
7. Lula JF, Rocha MO, Nunes Mdo C, Ribeiro AL, Teixeira MM, Bahia MT, et al. Plasma concentrations of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and FasLigand/CD95L in patients with Chagas cardiomyopathy correlate with left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(9):825-31.
8. Kroll-Palhares K, Silvério JC, Silva AA, Michailowsky V, Marino AP, Silva NM, et al. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(4):375-85.
9. Pérez AR, Fontanella GH, Nocito AL, Revelli S, Bottasso OA. Short treatment with the tumour necrosis factor-alpha blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of *Trypanosoma cruzi* reactivation. *Clin Exp Immunol.* 2009;157(2):291-9.
10. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Russo M, Fonseca SC, et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1104-13.
11. Bazett HC. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart.* 1920;7:353-70.
12. Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol.* 1992;22(2):301-7.
13. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 1995;63(12):4862-7.
14. Truyens C, Torrico F, Lucas R, De Baetselier P, Buurman WA, Carlier Y. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 1999;67(11):5579-86.
15. Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, et al. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 2007;101(2):123-32.
16. Pinto AY, Valente SA, Valente Vda C, Ferreira Junior AC, Coura JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(6):602-14.
17. Morocoima A, Socorro G, Avila R, Hernández A, Merchán S, Ortiz D, et al. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism in the central nervous system of albino mice. *Parasitol Res.* 2012;111(5):2099-107..
18. Molina RB, Matsubara BB, Hueb JC, Zanati SG, Meira DA, Cassolato JL, et al. Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2006;113(2):188-93.
19. Llaguno M, Pertili LA, da Silva MV, Bunazar P, Reges AM, Faleiros AC, et al. The relationship between heart rate variability and serum cytokines in chronic chagasic patients with persistent parasitemia. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2011;34(6):724-35.
20. Yu X, Patterson E, Huang S, Garrett MW, Kem DC. Tumor necrosis factor alpha, rapid ventricular tachyarrhythmias, and infarct size in canine models of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(2):153-9.
21. Mijares A, Verdol L, Peineau N, Vray B, Hoebeke J, Argibay J. Antibodies from *Trypanosoma cruzi* infected mice recognize the second extracellular loop of the beta 1-adrenergic and M2-muscarinic receptors and regulate calcium channels in isolated cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 1996;163-164:107-12.
22. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation.* 1994;89(6):2760-7.
23. Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG. Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction. *Circ Res.* 1990;67(3):753-63.