

## Disfunção Endotelial Venosa em Pacientes com Doença de Chagas sem Insuficiência Cardíaca

### *Venous Endothelial Dysfunction in Chagas' Disease Patients without Heart Failure*

Rodrigo Della Méa Plentz<sup>1,4</sup>, Maria Claudia Irigoyen<sup>2</sup>, Andreia Simone Muller<sup>1,4</sup>, Dulce Elena Casarini<sup>1</sup>, Marcelo Custodio Rubira<sup>2</sup>, Heitor Moreno Junior<sup>3</sup>, Charles Mady<sup>2</sup>, Bárbara Maria Ianni<sup>2</sup>, Eduardo Moacir Krieger<sup>2</sup>, Fernanda Consolim-Colombo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo, <sup>2</sup>Instituto do Coração do Hospital das Clínicas – FMUSP, <sup>3</sup>Universidade Estadual de Campinas e <sup>4</sup>Universidade de Cruz Alta - São Paulo, SP - Campinas, SP - Cruz Alta, RS

#### OBJETIVO

Analisar a função endotelial venosa em pacientes chagásicos sem insuficiência cardíaca.

#### MÉTODOS

O grupo Chagas (G1) foi composto por quatorze mulheres e dois homens com idade de  $46 \pm 2,7$  anos, e o grupo controle (G0), por sete mulheres e um homem, pareados em idade, peso, altura. A Técnica de Complacência da Veia Dorsal da Mão foi utilizada para avaliação da função endotelial venosa. Foram infundidas doses crescentes de fenilefrina para se obter pré-constricção de 70% do basal; a seguir, foram administradas acetilcolina e nitroprussiato de sódio para avaliar as respostas de venodilatação, respectivamente, dependentes e independentes do endotélio.

#### RESULTADOS

Não houve variação entre os valores hemodinâmicos nos grupos durante o experimento. A dose média de fenilefrina necessária para pré-constricção da veia foi significativamente maior no G1 ( $1116 \pm 668,2$  ng/ml), comparada à do G0 ( $103 \pm 28$  ng/ml)  $p = 0,05$ . A resposta de venodilatação máxima dependente do endotélio foi significativamente menor no grupo G1 ( $65,5 \pm 8\%$ ), comparada à do G0 ( $137 \pm 20\%$ )  $p = 0,009$ . Não houve diferença nas respostas de venodilatação independente do endotélio entre os grupos.

#### CONCLUSÃO

Pacientes com doença de Chagas sem insuficiência cardíaca apresentam disfunção endotelial venosa.

#### PALAVRAS-CHAVE

Endotélio, doença de Chagas, sistema venoso, doença cardiovascular.

#### OBJECTIVE

To analyze the venous endothelial function in Chagas' disease patients without heart failure.

#### METHODS

The Chagas' disease Group (G1) was composed by 14 women and 2 men aged  $46 \pm 2,7$  and the Control Group (G0) by 7 women and 1 man matched by age, weight and height. Dorsal Hand Vein Compliance Technique was used to evaluate the venous endothelial function. Crescent doses of phenylephrine were infused to get a 70% pre-constriction of the vein; after that, acetylcholine and sodium nitroprusside were respectively administrated to analyze the endothelium-dependent and -independent venodilation.

#### RESULTS

No significant systemic hemodynamic changes were observed in both groups during the experiment. The necessary phenylephrine dose to reach 70% pre-constriction of the vein was significantly higher in the G1 ( $1116 \pm 668,2$  ng/ml) compared to G0 ( $103 \pm 28$  ng/ml)  $p = 0,05$ . The endothelium-dependent venous dilation was significantly lower in G1 ( $65,5 \pm 8\%$ ) compared to G0 ( $137 \pm 20\%$ )  $p = 0,009$ . No difference was observed in the endothelium-independent venous dilatation between groups.

#### CONCLUSION

Patients with Chagas' disease without heart failure presented venous endothelial dysfunction.

#### KEY WORDS

Endothelium, Chagas' disease, system venous, cardiovascular disease.

**Correspondência:** Rodrigo Della Méa Plentz • Rua João Manoel, 1352 - 9810-5170 - Cruz Alta, RS  
E-mail: roplentz@yahoo.com.br Recebido em 25/07/05 • Aceito em 08/12/05

A doença de Chagas é ainda considerada um importante problema de saúde pública. Estima-se que cerca de quatro a seis milhões de brasileiros sejam acometidos pela doença. É uma moléstia crônica debilitante e que provoca incapacidade precoce, sendo uma das principais causas de aposentadoria precoce em nosso meio<sup>1,2</sup>. Diante da considerável gravidade clínica de sua evolução e sua notória importância socioeconômica, a doença de Chagas vem sendo alvo do estudo de inúmeros e valiosos pesquisadores, visando melhor caracterizar a enfermidade<sup>3-9</sup>.

Está bem estabelecido que a doença de Chagas se caracteriza por uma enorme heterogeneidade quanto à agressão miocárdica. Ainda que se conheçam importantes aspectos fisiopatológicos relacionados à instalação e progressão da cardiopatia chagásica, diversos fatores necessitam ser mais bem compreendidos. Vários trabalhos demonstraram, em chagásicos sem insuficiência cardíaca, a presença de lesões na inervação do coração, e outros evidenciaram déficits no controle autonômico da frequência cardíaca e pressão arterial<sup>9-12</sup>. Trabalhos mais recentes demonstraram que o controle reflexo da reatividade vascular periférica também está comprometida em pacientes chagásicos, com função ventricular preservada<sup>9,12</sup>.

Temos que considerar que o controle do tônus e da reatividade periféricos depende não somente do controle neural, como também de uma adequada função das células endoteliais. A disfunção endotelial tem sido proposta como um dos mecanismos do início, manutenção e progressão de várias doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, aterosclerose e a insuficiência cardíaca<sup>13-15</sup>.

Durante o curso da infecção da doença de Chagas os parasitas têm sido observados no endotélio microvascular da aorta e da coronária antes que a parasitemia seja detectada<sup>10,16,17</sup>. Cultura de células endoteliais infectadas com *T. cruzi* mostram alterações complexas em mecanismos que são críticos na manutenção da função vascular normal<sup>18-20</sup>. Nesse sentido, a disfunção das células endoteliais das coronárias tem sido apontada como um dos primeiros mecanismos, possivelmente relacionados à lesão do miocárdio, observada em pacientes com doença de Chagas.

A avaliação da função endotelial por meio da dosagem de substâncias produzidas pelo endotélio e de marcadores inflamatórios sugere a presença de disfunção endotelial em chagásicos com função ventricular preservada<sup>21-24</sup>.

Existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram a função endotelial periférica em portadores de doença de Chagas por meio da análise da vasodilatação dependente do endotélio. Dois estudos realizados em pacientes chagásicos sem insuficiência cardíaca são controversos quanto à presença ou não de disfunção endotelial no território arterial periférico (artéria braquial)<sup>4,5</sup> e não existem relatos da presença ou não de disfunção endotelial no território venoso de pacientes com doença de Chagas.

O objetivo do presente trabalho é investigar a presença ou não de disfunção endotelial venosa em paciente chagásico, com função ventricular preservada.

## MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp e do Instituto do Coração - InCor (Protocolo 0425/02).

Os indivíduos com doença de Chagas foram selecionados entre os pacientes do ambulatório da Unidade de Cardiomiopatia do Instituto do Coração (InCor), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de fevereiro de 2003 a fevereiro de 2005. A avaliação da função endotelial foi realizada no Laboratório de Investigação Clínica da Unidade de Hipertensão do InCor. Todos os participantes da pesquisa foram informados a respeito da natureza do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os pacientes classificados como chagásicos apresentavam sorologia positiva para doença de Chagas (hemaglutinação e imunofluorescência indireta) e eram procedentes de zona endêmica da doença. Foram selecionados dezesseis pacientes que preenchessem os seguintes critérios de inclusão: ausência de sintomas relacionados à manifestação cardíaca ou gastrointestinal da doença de Chagas ou de qualquer outra doença; não estivessem em uso de medicação; exame clínico normal; função ventricular esquerda acima de 60% de fração de ejeção no exame de ecocardiograma Doppler (método de Teichholz e cols.<sup>25</sup>); valores de hemograma e de exames bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos séricos dentro da normalidade).

Dos dezesseis pacientes chagásicos, oito apresentaram eletrocardiograma normal e oito, eletrocardiograma alterado: bloqueio de ramo direito, bradicardia e/ou bloqueio da divisão ântero-superior do ramo esquerdo (código de Minnesota modificado para cardiopatia chagásica<sup>26</sup>).

Para a avaliação da função endotelial venosa foi utilizada a Técnica de Complacência da Veia do Dorso da Mão (Dorsal Hand Vein)<sup>27-30</sup>, na qual, durante toda avaliação, os indivíduos permaneceram na posição supina com um dos antebraços em um suporte cômodo, formando um ângulo de 30 graus em relação à horizontal. Uma agulha 23G (*butterfly*) foi inserida em uma veia do dorso da mão e solução fisiológica foi infundida por uma bomba de infusão Harvard (Harvard Apparatus Inc. South Natick, Mass) durante 30 minutos a 0,3 ml/min, para possibilitar a recuperação do tono venoso local, após a venoconstrição causada pela inserção da agulha na veia.

O transdutor capaz de detectar pequenos deslocamentos lineares (TDLV, Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ) foi colocado sobre a superfície dorsal da mão e fixado firmemente à pele com fita adesiva. O pino metálico, que desliza através do transdutor, teve uma de suas extremidades colocadas sobre um ponto da veia a ser

estudada a menos de 1 cm da ponta da agulha utilizada para infusões de agentes.

O deslocamento vertical do pino de acordo com o grau de dilatação ou constrição da veia gerou um sinal no transdutor, que foi amplificado e registrado em papel milimetrado.

Medições do calibre da veia foram realizadas após insuflação de um manguito de esfigmomanômetro a 40 mmHg colocado no mesmo braço. As variações no calibre da veia foram calculadas pela diferença percentual a partir do posicionamento do pino metálico e registro gráfico foi gerado antes e depois da insuflação do manguito.

Após a infusão de soro fisiológico, foi realizada a infusão de doses crescentes de fenilefrina para obterem-se 70% de constrição (VC70%). Utilizaram-se doses crescentes de fenilefrina (75 a 25.000 ng/ml), com duração da infusão de sete minutos para cada dose. Uma vez atingida a venoconstrição desejada, estabelecendo-se assim uma linha de base para avaliação da resposta vascular venosa, a dose de fenilefrina foi mantida e, continuamente, infundida durante o estudo.

Para avaliação da resposta de venodilatação dependente do endotélio foi realizada a infusão de sete doses crescentes de acetilcolina (ACh) (3,6 a 3.600 ng/ml), na velocidade de infusão de 0,3 ml/min, e no tempo de três minutos para cada dose. A resposta máxima de venodilatação e as doses relacionadas a esse efeito foram comparadas entre os grupos.

Terminada essa fase, aguardou-se um período de 30 minutos para o completo desaparecimento do efeito da acetilcolina. A seguir, três doses crescentes (156 a 3.125 ng/ml) de nitroprussiato de sódio (NTS) foram infundidas, com uma velocidade de infusão de 0,3 ml/min, três minutos cada dose, sob a mesma condição de pré-constrição utilizada anteriormente (VC70). A resposta máxima de venodilatação e as doses relacionadas a esse efeito foram comparadas entre os grupos.

## RESULTADOS

*Características demográficas dos grupos controles e chagásicos* - Com relação a idade, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC) não houve diferenças significativas entre os grupos controle (G0) e chagásico (G1). Além disso, os valores de IMC estavam dentro da faixa considerada ideal.

Com relação ao sexo, a distribuição foi igual entre os grupos de 12,5% homens e 77,5% mulheres no grupo controle (G0) e chagásico (G1).

Os valores de glicemia de jejum, colesterol total, triglicérides, hemoglobina e hematócrito não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos.

Ambos os grupos alcançaram um valor semelhante de pré-constrição venosa, ao redor de 70%, que é considerado adequado para os testes posteriores. Entretanto, houve diferença significativa entre os grupos em relação às doses de fenilefrina necessárias para se obter a venoconstrição desejada. Foram utilizadas doses significativamente maiores de fenilefrina para que o chagásico obtivesse o grau de venoconstrição necessário, quando comparado ao grupo controle.

Em resposta à infusão de acetilcolina, observamos que os pacientes chagásicos apresentaram valores de venodilatação máxima significativamente menor que os do grupo controle, com uma redução de dilatação ao redor de 50%. A média das doses de acetilcolina relacionadas à máxima venodilatação não foi diferente entre os grupos.

Quanto à venodilatação máxima, em resposta à infusão de nitroprussiato de sódio (que avalia a dilatação independente do endotélio), não observamos diferenças significativas entre os grupos controle e chagásico, nem quanto às doses do agente utilizadas.

## DISCUSSÃO

O principal achado do nosso trabalho foi a demonstração

**Tabela 1 – Características demográficas e bioquímicas dos grupos estudados: grupo controle (0) e chagásico (1)**

	Grupo 0 (n = 8)	Grupo 1 (n = 16)	p < 0,05
Idade (anos)	43 ± 4,5	46 ± 2,7	ns
Sexo	1M/7F	2M/14F	ns
Peso (kg)	65,3 ± 3,4	63,3 ± 2,3	ns
Altura (m)	1,66 ± 0,02	1,63 ± 0,01	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23,5 ± 0,8	24 ± 0,7	ns
PA sistólica (mmHg)	115,8 ± 4,6	122,8 ± 6,53	ns
PA diastólica (mmHg)	73,5 ± 3,4	76 ± 4,2	ns
Glicemia jejum (mg/dl)	89 ± 1	97,2 ± 2,8	ns
Colesterol total (mg/dl)	209,2 ± 10	201,4 ± 3,2	ns
Triglicérides (mg/dl)	101,1 ± 25,5	121,6 ± 25	ns
Hemoglobina (g/100ml)	13,4 ± 0,29	13,1 ± 0,3	ns

*Os valores representam a média ± erro padrão, teste "t" Student, ns = não significante; IMC - Índice de massa corpórea*

**Tabela 2 – Média das respostas máximas e das doses utilizadas de fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio dos grupos estudados: grupo controle (0) e chagásico (1)**

	Grupo 0 (n = 8)	Grupo 1 (n = 16)	p
VC70%	68,5 ± 4,5	76,8 ± 2,4	0,15
Doses para VC70% com fenilefrina	103 ± 28	1116 ± 668 **	0,05
VD máx. com Acetil.	137 ± 20	65,5 ± 8 **	0,009
Doses para VDMáx. com Acetil. (ng/ml)	1980 ± 390	2092 ± 366	0,85
VDMáx. com NTS	169 ± 25,5	163 ± 19	0,83
Doses para VDMáx. com NTS (ng/ml)	1425 ± 436	1004 ± 223	0,39

*Os valores representam a média ± erro padrão; VC = venoconstrição; VDMáx. = venodilatação máxima; Fenil. = fenilefrina; Acetil. = acetilcolina; NTS = nitroprussiato de sódio*

de que pacientes com doenças de Chagas sem insuficiência cardíaca apresentam redução significativa da venodilatação máxima, em resposta à infusão de acetilcolina, associada a uma resposta normal de venodilatação máxima ao nitroprussiato de sódio. Em conjunto, esses dados apontam para a existência de uma disfunção endotelial no território venoso de pacientes chagásicos, com função ventricular preservada.

Outro dado que merece destaque foi a observação de que pacientes chagásicos necessitaram de doses significativamente maiores de fenilefrina para a obtenção da venoconstrição, sugerindo uma menor sensibilidade dos receptores alfa-adrenérgicos no território venoso desse grupo de pacientes.

As células endoteliais produzem o mais potente vasodilatador já descoberto, o óxido nítrico (ON), que foi descrito por Furchgott e Zawadzki em 1980 e identificado como uma substância não-prostanóide, lábil e difusível, mediadora do relaxamento dependente do endotélio. A formação do ON pelo endotélio desempenha um papel crítico na manutenção do balanço entre vasoconstrição e vasodilatação, no processo de homeostase arterial e venosa<sup>31</sup>.

Existem inúmeros trabalhos, descrevendo alterações nas respostas de vasodilatação da veia do dorso da mão, após infusão local de acetilcolina ou bradicinina em pacientes com fator de risco cardiovascular, que reconhecidamente afetam o endotélio arterial<sup>27-30</sup>. Além disso, tratamentos que melhoram a função endotelial no lado arterial também melhoram a função endotelial no território venoso<sup>29</sup>. Estudar o endotélio venoso nos permite entender melhor o processo de regulação da circulação, bem como verificar o efeito de tratamentos na modulação da regulação periférica.

O sistema venoso representa, funcionalmente, um importante papel na homeostase do sistema circulatório, e alterações nesse sistema podem levar ao comprometimento do retorno venoso, como da circulação em geral, uma vez que o ajuste vascular terá potencial implicação na regulação da função cardíaca, bem como na evolução da síndrome de insuficiência cardíaca<sup>32</sup>. Até o presente momento, nenhum trabalho havia detectado alterações no sistema venoso periférico em pacientes

com doença de Chagas e, em especial, nas respostas endoteliais venosas.

Recentes trabalhos têm demonstrado o aumento nos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina dez (IL -10), mediadores citotóxicos endoteliais, em pacientes assintomáticos com doença de Chagas, sugerindo que uma produção prolongada desses fatores pode estar relacionada à progressão das miocardiopatias nesses pacientes<sup>21-23</sup>. Também têm sido encontrados em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos anticorpos circulantes anti-receptores colinérgicos<sup>33-36</sup>. Considerando esses achados e suas repercussões sobre a modulação do tônus vascular podemos especular uma possível relação entre eles e os resultados em nosso trabalho, uma vez que esses fatores podem levar à disfunção endotelial.

Estudos experimentais abordando a distribuição e as diferentes respostas a agentes farmacológicos são fundamentais para o entendimento da fisiopatologia do sistema venoso. Neste estudo demonstramos que a sensibilidade alfa-adrenérgica avaliada pela infusão de fenilefrina estava diminuída nos pacientes chagásicos, quando comparados ao grupo controle. Com relação à distribuição de receptores e resposta venosa à administração de agentes adrenérgicos, um conjunto de observações comparando a ação da noradrenalina (agonista  $\alpha$  não-seletivo), da fenilefrina (agonista  $\alpha$ -1) e do azepevole (agonista  $\alpha$ -2) demonstrou que todos os agentes induziram resposta vasoconstritora, sugerindo que as veias expressam todos os tipos de receptores  $\alpha$ . Como a resposta à fenilefrina foi a mais marcada, o autor sugeriu que a distribuição dos receptores  $\alpha$ -1 fosse predominante nas veias<sup>37</sup>. Em humanos com doença de Chagas, a inervação simpática avaliada por meio de cintilografia radiossotópica para o coração encontra-se diminuída conforme relato do trabalho de Simões e cols.<sup>38</sup>. A inervação simpática periférica, estudada de forma indireta por meio de dosagens de catecolaminas ou por variação da pressão arterial, sugere alterações na função simpática<sup>39</sup>. Dados anteriores do nosso grupo, estudando uma população de chagásicos semelhantes à deste estudo, mostraram uma resposta aumentada no quimiorreflexo periférico<sup>9</sup>, sugerindo estar alterada

a resposta simpática periférica nesses pacientes. Essa alteração da atividade simpática pode estar relacionada com uma redução da sensibilidade aos agonistas adrenérgicos, conforme observado neste estudo.

Com base em nossos achados, podemos concluir que

a sensibilidade alfa-adrenérgica venosa está diminuída, e que a resposta endotelial mediada pelos receptores muscarínicos encontra-se diminuída, caracterizando disfunção endotelial venosa nos pacientes com doença de Chagas, com função ventricular preservada.

## REFERÊNCIAS

- Schmunis GA, American Trypanosomiasis as a public health problem. In: Pan American Health Organization (ed.) Chagas' Disease and the nervous system. Washington, DC: Pan American Organization; 1994: 3-29.
- Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AV. Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 1999; 72: 247-80.
- Mady C, Barreto AC, Stolf N, Lopes EA, Dauar D, Wajngarten M, et al. Biopsia miocárdica na forma indeterminada da doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol.* 1981; 36: 387-90.
- Consolim-Colombo FM, Lopes HF, Rosetto EA, et al. Endothelial function is preserved in Chagas' heart disease patients without heart failure. *Endothelium.* 2004; 11 (5-6): 241-6.
- Guzman, Juan C, Leon, Hernando, Casa S, Juan P, et al. Disfunción autonómica y vascular en la fase asintomática de la enfermedad de Chagas. *Rev Colomb Cardiol.* 2004; 11 (2): 105-13.
- Leiby DA, Rentas FJ, Nelson KE, et al. Evidence of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) among patients undergoing cardiac surgery. *Circulation.* 2000; 102 (24): 2978-82.
- Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 5: 577-91.
- Ramos SG, Rossi MA. Microcirculation and Chagas' disease: hypothesis and recent results. *Inst Med Trop São Paulo.* 1999; 41 (2): 123-9.
- Soares Barreto-Filho JA, Consolim-Colombo FM, Ferreira Lopes H, Martins Sobrinho CR, Guerra-Riccio GM, Krieger EM. Dysregulation of peripheral and central chemoreflex responses in Chagas' heart disease patients without heart failure. *Circulation.* 2000; 104 (15): 1792-8.
- Rossi MA, Ramos SG. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. *Am Heart J.* 1996; 132 (1): 207-10.
- Ianni BM, Arteaga E, Frim CC, Pereira C, Barreto AC, Mady C. Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 77: 59-62.
- Consolim-Colombo FM, Filho JA, Lopes HF, Sobrinho CR, Otto ME, Riccio GM, Mady C, Krieger EM. Decreased cardiopulmonary baroreflex sensitivity in Chagas' heart disease. *Hypertension.* 2000; 36 (6): 1035-9.
- Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34: 631-8.
- Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target.* *Mol Cell Cardiol.* 1999; 31: 51-0.
- Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000; 101 (16): 1899-6.
- Rossi MA. Aortic endothelial cell changes in the acute septicemic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats: scanning and transmission electron microscopic study. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 57 (3): 321-7.
- Camargos ER, Machado CR, Teixeira Jr AL, Rocha LL, Ferreira AJ, Almeida AP, Barton M, Teixeira MM. Role of endothelin during experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Clin Sci (Lond).* 2002; 103 (suppl 48): 64S-67S.
- Morris SA, Tanowitz H, Makman M, Hatcher VB, Bilezikian JP. *Trypanosoma cruzi*: alteration of cAMP metabolism following infection of human endothelial cell. *Exp Parasit.* 1992; 74 (1): 69-6.
- Sunnemark D, Frostegard J, Orn A, Harris RA. Cellular and cytokine characterization of vascular inflammation in CBA/J mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 1998; 48 (5): 480-4.
- Tanowitz HB, Wittner M, Morris SA, et al. The putative mechanistic basis for the modulatory role of endothelin-1 in the altered vascular tone induced by *Trypanosoma cruzi*. *Endothelium.* 1999; 6 (3):217-0.
- Cardoni RL, Garcia MM, De Rissio AM. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2004; 90 (1): 65-2.
- Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in symptomatic "indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98 (3): 407-1.
- Malvezi AD, Cecchini R, de Souza F, Tadokoro CE, Rizzo LV, Pinge-Filho P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004; 41 (1): 69-7.
- Silva JS, Machado FS, Martins GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci.* 2003; s314-25.
- Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlation in the presence or absence of a synergy. *Am J Cardiol.* 1976; 37 (1): 7-11.
- Junqueira Júnior LF; Discriminação entre as manifestações eletrocardiográficas normais, anormais e "borderline" na doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1992; (Supl III) 25: 83.
- Chalon S, Bedarida GV, Moreno H Jr, Tejera B, Urae A, Hoffman BB, Blaschke TF. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves venous endothelial dysfunction in chronic smokers. *Clin Pharmacol Ther.* 1999; 65: 295-3.
- Moreno Jr H, Chalon S, Urae A, Tangphao O, Abiose AK, Hoffman BB, Blaschke TF. Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. *Am J Physiol.* 1998; 275: H1040-5.
- Sousa MG, Yugar-Toledo JC, Rubira M, et al. Ascorbic acid improves impaired venous and arterial endothelium-dependent dilation in smokers. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26 (4): 447-2.
- Tangphao O, Chalon S, Moreno H, Jr, Hoffman BB, Blaschke TF. Pharmacokinetics of L-arginine during chronic administration to patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 1999; 96: 199-7.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-6.
- Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000; 190: 244-54.

33. Costa PC, Fortes FS, Machado AB, et al. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33 (4): 439-46.
34. Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, et al. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J.* 1998;12 (14):1551-8.
35. Ogawa S, Yoshikawa T. Autoantibodies: emerging upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33 (10): 1761-3.
36. Pedrosa RC. Contribuição ao estudo da etiopatogenia do distúrbio de condução e da eletrogênese na cardiopatia chagásica crônica: efeitos de anticorpos IgG de pacientes chagásicos crônicos na eletrogênese e no sistema de condução do coração isolado de mamíferos. Rio de Janeiro, 1998. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
37. Schulte KL, Laber E, Meyer-Sabellek WA, Distler A, Gotzen R. Specific alpha-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in human veins and interaction with the calcium entry blockers nifedipine and diltiazem. *J Hypertens (Suppl).* 1985; S239-41.
38. 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 (9): 975-81.
39. Davila DF, Bellabarba G, Hernandez L, Calmon G, Torres A, Donis JH, Barboza JS, Lemorvan C, Gonzalez JG. Plasma norepinephrine, myocardial damage and left ventricular systolic function in Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 1995; 24 52 (2): 145-51.