



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**EFEITO DO CARVEDILOL E MONITORAMENTO DE  
TERAPIAS ANTIOXIDANTES AO LONGO DE 7 ANOS EM  
PACIENTES CARDIOPATAS CHAGÁSICOS CRÔNICOS**

**DOUTORADO**

**Patrícia Budni**

**Florianópolis  
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Patrícia Budni

**EFEITO DO CARVEDILOL E MONITORAMENTO DE  
TERAPIAS ANTIOXIDANTES AO LONGO DE 7 ANOS EM  
PACIENTES CARDIOPATAS CHAGÁSICOS CRÔNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Coury Pedrosa

Área de Concentração: Análises Clínicas

Florianópolis  
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

B927e Budni, Patrícia

Efeito do carvedilol e monitoramento de terapias antioxidantes ao longo de 7 anos em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos [tese] / Patrícia Budni ; orientador, Danilo Wilhelm Filho. - Florianópolis, SC, 2011.

212 p.: il., grafs., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Coração - Doenças. 3. Estresse Oxidativo. 4. Vitamina E. 5. Chagas, Doença de. I. Wilhelm Filho, Danilo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

**“Efeito do carvedilol e monitoramento de terapias  
antioxidantes ao longo de 7 anos em pacientes  
cardiopatas chagásicos crônicos”**

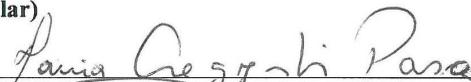
**POR**

**Patrícia Budni**

**Tese julgada e aprovada em sua  
forma final pela Orientadora e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutores:**

**Banca Examinadora:**

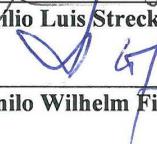
  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC – Membro  
Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Membro  
Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Celso Spada (UFSC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (UNESC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Emilio Luis Streck (UNESC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho (UFSC – Orientadora)**

**Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC**

Florianópolis, 23 de novembro de 2011.



*Dedico esta tese ao meu esposo  
Odilon de Souza Júnior e ao meu  
filho Bernardo Budni de Souza,  
que me mostraram que ser feliz  
não é apenas comemorar o sucesso  
e ter júbilo nos aplausos, mas é  
aprender com as lições dos  
fracassos e encontrar alegria no  
anonimato. Amor é o que sinto por  
você, e é o que eu aprendi com  
meus pais.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força que me concedeu em vencer as intempéries que ocorreram nesta fase importante da minha vida.

Agradeço à minha mãe grandiosa Antônia (Dete), pela força, dedicação e amor, para sempre pelo meu pai, nos momentos em que ele mais precisou antes de partir e começar a escrever sua nova história.

Agradeço ao meu pai, Jorge Budni, que me deixou o maior legado que foi o de ser sempre feliz e de nunca deixar de sorrir e acreditar nos sonhos, pois o dia de amanhã a ninguém pertence.

Não posso deixar de agradecer ao meu marido, Odilon, a quem dedico esta tese, que soube conduzir e organizar nossas vidas nos momentos mais incertos.

Ao meu orientador e amigo, professor Danilo Wilhelm Filho, pela confiança, por acreditar em mim, pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

Ao meu co-orientador Roberto Coury Pedrosa, da UFRJ pela atenção, aprendizado e amizade.

Agradeço as colegas Carine Ribeiro e Mirelli Farias, ao meu fiel companheiro Eduardo Parisoto (Bene), e aos meus grandes amigos Eduardo Dalmarco e sua esposa Juliana.

Sou grata ao meu amigo Manuel Rosa de Oliveira Lino, estatístico, que carinhosamente me atendeu em sua sala todas as vezes que precisei de sua ajuda.

Agradeço ao pessoal do laboratório, às meninas lindas Pati Backes, Vivith Rizelio, Thaís Garlet e Aninha Maria Berté Moratelli, pela ajuda prestada nas análises.

Um agradecimento muito carinhoso aos pacientes e toda equipe técnica do HUCFF, que sem sua gentil contribuição este trabalho jamais teria sido concluído.

Agradeço à UFSC, pelo conhecimento que adquiri, pela pessoa melhor que busquei ser, pelas pessoas que passaram pela minha vida nesta época, e por seus ensinamentos.

Agradeço à empresa farmacêutica EMS, que gentilmente cedeu as vitaminas e o fármaco carvedilol para realização deste trabalho.

Meu muito Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização deste projeto.



Eu fico com a pureza da resposta das crianças  
É a vida, é bonita, e é bonita  
Viver e não ter a vergonha de ser feliz  
Cantar e cantar e cantar  
A beleza de ser um eterno aprendiz  
Eu sei que a vida devia ser bem melhor e será  
Mas isso não impede que eu repita  
É bonita, é bonita, e é bonita  
E a vida  
E a vida o que e diga lá meu irmão  
Ela é a batida de um coração  
Ela é uma doce ilusão  
E a vida  
Ela é maravilhosa ou é sofrimento  
Ela é alegria ou lamento  
O que é o que é, meu irmão  
Há quem fale que a vida da gente  
É um nada no mundo  
É uma gota, é um tempo  
Que nem dá um segundo  
Há quem fale que a vida é um divino  
Mistério profundo  
Que é o sopro do criador  
Numa atitude repleta de amor  
Você diz que é luta e prazer  
Ele diz que a vida é viver  
Ela diz que a melhor é morrer  
Pois amada não é  
E o verbo é sofrer  
Eu só sei que confio na moça  
Na moça eu ponho a força da fé  
Somos nós que fazemos a vida  
Como der ou puder ou quiser  
Sempre desejada  
Por mais que esteja errada  
Ninguém quer a morte  
Só saúde e sorte  
E a pergunta roda  
E a cabeça agita  
Eu fico com a pureza da resposta das crianças  
(Gonzaguinha)

*Para meu pai...e o que é a vida!*  
(Jorge Budni – in memoriam)



BUDNI, Patrícia. Efeito do carvedilol e monitoramento de terapias antioxidantes ao longo de 7 anos em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos. 192 p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

## RESUMO

**Introdução:** A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é considerada a causa mais comum de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) com arritmias e morte súbita em adultos jovens nas áreas endêmicas. A progressão da severidade da CCC está associada ao aumento do dano oxidativo, conforme já demonstrado em trabalhos anteriores de nosso laboratório. **Objetivos:** **a)** Verificar o efeito antioxidante do carvedilol isoladamente, na dose de 37,5 mg/dia, e na sua associação às vitaminas antioxidantes E e C, nas doses diárias de 800 UI e 500 mg, respectivamente, ambas intervenções administradas por 6 meses; **b)** Verificar a eventual persistência da atenuação no quadro sistêmico de estresse oxidativo e do processo inflamatório após as sucessivas suplementações ao longo de 7 anos de monitoramento. **Materiais e Métodos:** Os pacientes foram classificados e divididos em quatro grupos, de acordo com a classificação clínica e hemodinâmica de *Los Andes* modificada, em grupos IA (n=10); IB (n=20); II (n=8) e III (n=4). Foram determinados os marcadores de estresse oxidativo, como as substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonilada (PC), além das atividades da superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST), níveis de glutatona reduzida (GSH) e vitaminas E, e marcadores inflamatórios, como adenosina deaminase (ADA), mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (\*NO). **a)** Todas essas variáveis foram determinados no sangue dos pacientes, antes e após a terapia por 6 meses com carvedilol isoladamente, e após suplementação combinada das vitaminas antioxidantes e carvedilol por 6 meses. As comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo e inflamatórias dentro dos diferentes grupos e entre os diferentes tratamentos aplicados, foram realizadas através da Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey–Kramer, utilizando o método dos modelos lineares generalizados para medidas repetidas,

admitindo um nível mínimo de significância de  $p < 0,05$ . **b)** O resultado destas análises foi monitorado ao longo de 7 anos de sucessivas intervenções. Para análise estatística do monitoramento foi realizado um estudo transversal, por um método de associação para variáveis quantitativas. **Resultados: a)** Após 6 meses de intervenção com carvedilol a atividade da SOD diminuiu em todos os grupos: IA, IB, II e III; a GST diminuiu nos grupos: IA, IB e II; a GPx diminuiu apenas nos grupos: IA e IB; a CAT aumentou nos grupos IA e IB; houve diminuição dos níveis de GSH em todos os grupos: IA, IB, II e III e PC nos grupos IA, IB, II e III; os níveis de vitamina E e TBARS permaneceram inalterados em todos os grupos; dos marcadores inflamatórios, apenas o  $\bullet$ NO aumentou no grupo IA. Após a adição de vitaminas E e C à terapia de carvedilol, observou-se: um perfil semelhante nas enzimas SOD, GST e GPx (diminuição em todos os grupos, apenas nos grupos IA, IB e II, apenas nos grupos IA e IB, respectivamente); diminuição da atividade da GR nos grupos IA e IB, e manutenção da atividade da CAT; os níveis de GSH diminuíram em todos os grupos: IA, IB, II e III, enquanto os níveis de TBARS diminuíram apenas nos grupos IA e IB; os níveis de PC mantiveram-se diminuídos, porém aumentados em todos os grupos, quando comparados com a intervenção do carvedilol; a vitamina E aumentou em todos os grupos após a suplementação: IA, IB, II e III; houve diminuição dos níveis de  $\bullet$ NO no grupo IA e aumento de MPO nos grupos IB e II enquanto que a ADA aumentou apenas em IA. **b)** Nos 7 anos de acompanhamento destes pacientes, observou-se uma progressiva diminuição nos níveis de TBARS e PC, com uma concomitante diminuição nos níveis de GSH. SOD e GPx, após seguidas suplementações, diminuíram suas atividades, sendo mais expressivas após administração do carvedilol e quando o fármaco foi associado às vitaminas E e C. A atividade da GR manteve-se constante a partir do ano de 2008a, com tendência à queda semelhante àquela observada nas demais enzimas. A atividade da GST, a partir de 2008b, manteve-se diminuída até 2010b. A atividade da CAT teve seu maior aumento no ano de 2008c, após suplementação vitamínica e manteve-se praticamente inalterada no decurso do estudo. Os níveis de vitamina E aumentaram após as suplementações, mantendo-se estáveis ao longo dos 7 anos. MPO e  $\bullet$ NO mostraram um perfil de aumento discreto, enquanto que a ADA permaneceu inalterada após os 7 anos de intervenção. **Conclusões: a)** O carvedilol foi efetivo em manter diminuída a maioria das enzimas antioxidantes e os marcadores de dano (TBARS e PC), e

aparentemente, exibiu efeito sinérgico com as vitaminas E e C em atenuar o estresse oxidativo sistêmico. **b)** Os 7 anos de sucessivas intervenções com antioxidantes foram eficazes em manter o poder redutor no sangue de pacientes chagásicos com CCC. Aparentemente, o insulto oxidativo associado à cronicidade da doença cardíaca de Chagas, foi atenuado após cada intervenção antioxidante, e este efeito mostrou relativa persistência entre os intervalos das diferentes intervenções antioxidantes.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, Cardiopatia Chagásica Crônica, Carvedilol, Vitaminas E e C, Antioxidantes.



BUDNI, Patrícia. Effect of carvedilol and monitoring of antioxidant therapy over 7 years in patients with chronic chagasic cardiomyopathy. 2011. 192 p. Thesis (Doctorate in Pharmacy) – Postgraduate Program of Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronic Chagas Cardiac (CCC) disease is considered the most common cause of congestive heart failure (CHF) with arrhythmias and sudden death in young adults in endemic areas. The progression of CCC is associated with increased oxidative damage as has been demonstrated in previous studies from our laboratory. **Objectives:** **a)** To verify the antioxidant effect of carvedilol alone at a dose of 37.5 mg / day and its association with the antioxidant vitamins E and C at daily doses of 800 IU and 500 mg, respectively, both interventions administered for 6 months; **b)** To verify the possible persistence of attenuation of systemic oxidative stress and inflammatory process after successive supplementations over 7 years of monitoring. **Materials and methods:** Patients were classified into four groups according to clinical and hemodynamic Los Andes changed in groups IA (n = 10), IB (n = 20), II (n = 8 ) and III (n = 4). Oxidative stress markers were measured such as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl (PC), as well as the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST), together with levels of reduced glutathione (GSH), vitamin E, and the inflammatory markers adenosine deaminase (ADA), myeloperoxidase (MPO) and nitric oxide ( $\text{*NO}$ ). **a)** All these variables were determined in blood before and after carvedilol therapy, and after supplementation of antioxidant vitamins E and C and carvedilol, for 6 months. Statistical comparisons of oxidative stress and inflammatory responses in the different groups and between different treatments were performed using analysis of variance (ANOVA), complemented by the Tukey-Kramer test, using the method of generalized linear models for repeated measures, assuming a minimum level of significance of  $p \leq 0.05$ . **b)** These variables were also monitored over 7 years of sequential interventions, which were analysed by a cross-sectional study, a method of association for quantitative variables. **Results:** **a)** The results revealed that after 6 months of carvedilol intervention, SOD activity decreased in all groups, IA, IB, II and III; GST decreased in groups IA, IB and II; GPx decreased in

groups IA and IB; CAT increased in groups IA and IB, GSH levels decreased in all groups IA, IB, II and III, PC levels also decreased in IA group, IB, II and III; levels of vitamin E and TBARS remained unchanged in all groups after treatment with carvedilol, while •NO levels increased only in group IA. After the supplementation of vitamins E and C plus carvedilol, a similar profile for SOD, GST and GPx was observed (decreased activity in all groups, only in groups IA, IB and II, only in groups IA and IB, respectively); GR activity decreased in groups IA and IB, while activity CAT remained unchanged. GSH levels decreased in all groups: IA, IB, II and III, while levels of TBARS decreased only in groups IA and IB; PC levels also remained decreased but were increased in all groups compared to the intervention with carvedilol; vitamin E levels increased in all groups after supplementation: IA, IB, II and III; •NO decreased in IA group and MPO increased in groups IB and II, while ADA showed increases only in IA. **b)** In the period of seven years of monitoring, a progressive decrease in the levels of TBARS and PC were detected with a concomitant decrease in GSH levels. SOD and GPx after supplementation decreased their activities, being more expressive when carvedilol was administered associated with vitamins E and C. GR activity remained constant and after 2008 showed a downward trend similar to those observed in the other enzymes. GST showed a decreased profile from 2008 to 2010. CAT activity showed an increase in 2008(c) after vitamin supplementation and remained thereafter essentially unchanged. Levels of vitamin E increased after each supplementation remaining relatively stable over the seven years. MPO and •NO levels showed a small increased during 7 years of intervention, while ADA activity remained unchanged. **Conclusion:** **a)** carvedilol was able to keep most of the antioxidant enzymes and markers of damage (TBARS and PC), at relatively low levels, and was also effective through the combination with vitamins E and C in attenuating the systemic oxidative stress. **b)** Seven years of successive antioxidant interventions, were effective in maintaining the reducing power in the blood of patients with CCC. Apparently, the oxidative insult associated with CCC was attenuated after each antioxidant intervention, and this effect showed a relative persistence among the intervals of the different antioxidant interventions.

**Key words:** Chagas' disease, Chagas' Heart Disease, Carvedilol, Vitamins E and C, Antioxidants.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica de doenças negligenciadas.....	32
Figura 2: Áreas endêmicas da doença de Chagas.....	33
Figura 3: Espécies de triatomíneos responsáveis pela transmissão do <i>T. cruzi</i> .....	34
Figura 4: Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> .....	36
Figura 5: Edema palpebral unilateral e linfadenopatia pré-auricular....	38
Figura 6: Curso da doença de Chagas.....	39
Figura 7: Fisiopatologia da CCC.....	42
Figura 8: Vias de produção das ERO/ERN.....	49
Figura 9: Ação <i>scavenger</i> do ácido ascórbico na regeneração da vitamina E.....	57
Figura 10: Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis.....	59
Figura 11: Estrutura química do $\alpha$ -tocoferol ( $C_{29}H_{50}O_2$ ).....	60
Figura 12: Reações <i>scavenger</i> do $\alpha$ -tocoferol.....	63
Figura 13: Etapas da glutatona na regeneração de vitamina E e C.....	67
Figura 14: Estrutura química do carvedilol.....	68
Figura 15: Fluxograma das etapas envolvidas neste projeto.....	73
Figura 16: Fluxograma com a seleção e o fluxo dos participantes em cada etapa do estudo.....	100
Figura 17: Níveis de TBARS em plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	103
Figura 18: Níveis de PC em plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	104
Figura 19: Atividade da SOD em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	105

Figura 20: Atividade da GPx em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	106
Figura 21: Atividade da CAT em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	107
Figura 22: Atividade da GST em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	108
Figura 23: Atividade da GR em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	109
Figura 24: Níveis de GSH em sangue total de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	110
Figura 25: Níveis de Vitamina E em plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	111
Figura 26: Atividade da ADA no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	113

Figura 27: Nível de $\bullet$ NO no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	114
Figura 28: Atividade da MPO no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de <i>Los Andes</i> modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).....	115
Figura 29: Níveis de TBARS em plasma de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	117
Figura 30: Níveis de PC em plasma de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	118
Figura 31 Atividade da SOD em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	119
Figura 32: Atividade da GPx em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	120
Figura 33: Atividade da CAT em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	121
Figura 34: Atividade da GST em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	122
Figura 35: Atividade da GR em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	123
Figura 36: Níveis de GSH em sangue total de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	125
Figura 37: Níveis de Vitamina E em plasma de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	126
Figura 38: Atividade da ADA no soro de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 2 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	127

Figura 39: Níveis de $\bullet$ NO no soro de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	128
Figura 40: Atividade da MPO no soro de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.....	129

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mudanças de parâmetros epidemiológicos pela interrupção da transmissão da doença.....	33
Tabela 2: Características biométricas e demográficas dos 42 pacientes chagásicos iniciais classificados nos quatro grupos de comprometimento miocárdio.....	101
Tabela 3: Dados referentes à radiologia, eletrocardiograma e ecocardiograma.....	102
Tabela 4: Comparação dentro do mesmo grupo dos níveis de GSH, TBARS, PC, Vitamina E e •NO e atividades da MPO e ADA, no sangue de pacientes chagásicos em três tempos diferentes de tratamento.....	211
Tabela 5: Comparação dentro do mesmo grupo das enzimas antioxidantes no sangue de pacientes chagásicos em três tempos diferentes de tratamento.....	212



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina deaminase
AV	Átrio-ventricular
AVC	Acidente vascular cerebral
BCRD	Bloqueio completo do ramo direito
BZN	Benznidazol
CARV	Carvedilol
CAT	Catalase
CCC	Cardiopatía chagásica crônica
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DCV	Doença cardiovascular
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPTA	Ácido dietilenotriaminopentacético
DIC	Doença isquêmica do coração
ECG	Eletrcardiograma
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
EV	Extra-sístole ventricular
FE	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HBAE	Hemibloqueio anterior esquerdo
4-HNE	4-hidroxi-2-noneal
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HI	Hemaglutinação Indireta
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HOCL	Ácido hipocloroso
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
ICT	Índice cardio-torácico
IDdfVE	Índice diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
IECA	Inibidores da enzima conversora de angotensina
IFI	Imunofluorescência Indireta

IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
KCN	Cianeto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPO	Lipoperoxidação
LO $\bullet$	Radical alcoxil
LOO $\bullet$	Radical peroxil
MDA	Malondialdeído
MnSOD	Superóxido dismutase-mangânes
MPO	Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
NO $_3^-$	Nitrato
NO $_2^-$	Nitrito
$\bullet$ NO	Óxido nítrico
iNOS	NO sintase induzível
ONOO $^-$	Peroxinitrito
O $_2^{\bullet-}$	Radical ânion superóxido
$\bullet$ OH	Radical hidroxila
$^1$ O $_2$	Oxigênio singlete
$^3$ O $_2$	Oxigênio molecular
PC	Proteína carbonilada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PG	Prostaglandina
RL	Radical livre
RO $\bullet$	Radical alcoxil
ROO $\bullet$	Radical peroxil
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
SOD	Superóxido dismutase
SVS	Sistema de Vigilância Sanitária
$\alpha$ -TTP	Proteína hepática transportadora de $\alpha$ -tocoferol
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TDR	Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
t-BuOOH	2-terc butilperoxi-2-metilpropano
TG	Triglicerídeo
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio estimulante da tireóide

TVNS	Taquicardia ventricular não sustentada
UI	Unidade internacional
VE	Ventrículo esquerdo



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	31
1.1 DOENÇA DE CHAGAS - HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA....	31
1.2 ETIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	34
1.3 CICLO BIOLÓGICO DO <i>TRYPANOSSOMA CRUZI</i> ( <i>T. CRUZI</i> ).....	35
1.4 VIAS DE TRANSMISSÃO.....	37
1.5 ASPECTOS CLÍNICOS.....	37
1.6 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO.....	39
1.7 HISTÓRICO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA (CCC).....	40
1.7.1 Mecanismos propostos para explicar a evolução da CCC.....	41
1.7.2 Classificação da CCC.....	44
1.7.3 Manifestações e Avaliação clínica da CCC.....	45
1.7.4 Tratamento na CCC.....	45
1.8 ESTRESSE OXIDATIVO.....	46
1.8.1 Radicais Livres (RL) e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN).....	46
1.8.2 Fontes de ERO e ERN.....	48
1.8.3 Estresse oxidativo, Doença de Chagas e Inflamação.....	54
1.9 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	56
1.9.1 Vitaminas E e C – Propriedades e Suplementação.....	56
1.9.2 Carvedilol.....	67
<b>2.0 JUSTIFICATIVA DO PROJETO</b> .....	71
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	75
3.1 OBJETIVO GERAL.....	75
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	77
4.1 ESTRATIFICAÇÃO DA AMOSTRA – INTERVENÇÃO: CARVEDILOL E VITAMINAS E/C.....	77
4.1.1 Delineamento do estudo.....	77
4.1.2 Seleção de pacientes.....	77
4.1.3 Diagnóstico sorológico da doença de Chagas.....	79
4.1.4 Classificação da CCC segundo Los Andes modificada por Xavier.....	79

<b>4.1.5 Protocolo de Avaliação.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1.6 Aspectos Bioéticos.....</b>	<b>84</b>
<b>4.1.7 Conflitos de Interesse.....</b>	<b>84</b>
<b>4.1.8 Protocolo Experimental.....</b>	<b>84</b>
<b>4.1.9 Fármaco e Vitaminas.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1.10 Equipamentos.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1.11 Reagentes.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.2 Proteína carbonilada (PC).....</b>	<b>86</b>
<b>4.3 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.3.1 Superóxido dismutase (SOD).....</b>	<b>87</b>
<b>4.3.2 Glutaciona peroxidase (GPx).....</b>	<b>87</b>
<b>4.3.3 Catalase (CAT).....</b>	<b>88</b>
<b>4.3.4 Glutaciona redutase (GR).....</b>	<b>88</b>
<b>4.3.5 Glutaciona S-transferase (GST).....</b>	<b>88</b>
<b>4.4 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>4.4.1 Glutaciona reduzida (GSH).....</b>	<b>89</b>
<b>4.4.2 Vitamina E.....</b>	<b>89</b>
<b>4.4.3 Vitamina C.....</b>	<b>90</b>
<b>4.5 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....</b>	<b>90</b>
<b>4.5.1 Determinação de Adenosina Deaminase (ADA).....</b>	<b>90</b>
<b>4.5.2 Determinação da Mieloperoxidase (MPO).....</b>	<b>91</b>
<b>4.5.3 Análise quantitativa do óxido nítrico (*NO) pelo nitrito/nitrato.....</b>	<b>91</b>
<b>4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>92</b>
<b>4.7 ESTRATIFICAÇÃO DA AMOSTRA - MONITORAMENTO DE 7 ANOS DE INTERVENÇÃO ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>92</b>
<b>4.7.1 Delineamento do estudo.....</b>	<b>92</b>
<b>4.7.2 Seleção de pacientes.....</b>	<b>92</b>
<b>4.7.3 Diagnóstico sorológico da doença de Chagas.....</b>	<b>94</b>
<b>4.7.4 Protocolo de Avaliação.....</b>	<b>94</b>
<b>4.7.5 Aspectos Bioéticos.....</b>	<b>96</b>
<b>4.7.6 Conflitos de Interesse.....</b>	<b>97</b>
<b>4.7.7 Protocolo Experimental.....</b>	<b>97</b>
<b>4.7.8 Equipamentos.....</b>	<b>98</b>
<b>4.7.9 Reagentes.....</b>	<b>98</b>
<b>4.7.10 Análise estatística.....</b>	<b>98</b>

<b>5 RESULTADOS</b> .....	99
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA ESTUDADA.....	99
5.2 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO OXIDATIVO.....	102
<b>5.2.1 Lipoperoxidação Tecidual – Determinação de TBARS</b> .....	102
<b>5.2.2 Proteína Carbonilada (PC)</b> .....	103
5.3 DETERMINAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	104
<b>5.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)</b> .....	104
<b>5.3.2 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)</b> .....	105
<b>5.3.3 Atividade da Catalase (CAT)</b> .....	106
<b>5.3.4 Atividade da Glutathiona transferase (GST)</b> .....	107
<b>5.3.5 Atividade da Glutathiona redutase (GR)</b> .....	108
5.4 DETERMINAÇÕES DOS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS E NUTRICIONAIS.....	109
<b>5.4.1 Concentrações de Pequenos Tióis Não-Protéicos (GSH)</b> .....	109
<b>5.4.2 Concentração de vitamina E</b> .....	110
<b>5.4.3 Concentração de vitamina C</b> .....	112
5.5 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS... ..	112
<b>5.5.1 Atividade da Adenosina Deaminase (ADA)</b> .....	112
<b>5.5.2 Concentração de Óxido Nítrico (<math>\cdot\text{NO}</math>)</b> .....	113
<b>5.5.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)</b> .....	114
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA ESTUDADA.....	115
5.2 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO OXIDATIVO.....	116
<b>5.2.1 Determinação dos Níveis de Lipoperoxidação Tecidual – TBARS</b> .....	116
<b>5.2.2 Determinação da Concentração de Proteína Carbonilada (PC)</b> .....	117
5.3 DETERMINAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	118
<b>5.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)</b> .....	118
<b>5.3.2 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)</b> .....	119
<b>5.3.3 Atividade da Catalase (CAT)</b> .....	120
<b>5.3.4 Atividade da Glutathiona transferase (GST)</b> .....	120
<b>5.3.5 Atividade da Glutathiona redutase (GR)</b> .....	122
5.4 DETERMINAÇÕES DOS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS E NUTRICIONAIS.....	124
<b>5.4.1 Concentrações de Pequenos Tióis Não-Protéicos (GSH)</b> .....	124
<b>5.4.2 Concentração de vitamina E</b> .....	125

<b>5.5 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS...</b>	<b>127</b>
<b>5.5.1 Atividade da Adenosina Deaminase (ADA).....</b>	<b>127</b>
<b>5.5.2 Concentração de Óxido Nítrico (*NO).....</b>	<b>127</b>
<b>5.5.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....</b>	<b>128</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>155</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>157</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>159</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>190</b>
Apêndice 1: Programa Cardio/Chagas /HU-UFRJ.....	193
Apêndice 2: Ficha de Acompanhamento Nutricional do Programa Cardio/Chagas /HU-UFRJ.....	199
Apêndice 3: Protocolo de Aprovação no Comitê de Ética (053/07)....	201
Apêndice 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	202
Apêndice 5: Tabela 4 - Comparação dentro do mesmo grupo dos níveis de GSH, TBARS, PC, Vitamina E e *NO e atividades da MPO e ADA, no sangue de pacientes chagásicos em três tempos diferentes de tratamento.....	211
Apêndice 6: Tabela 5 - Comparação dentro do mesmo grupo das enzimas antioxidantes no sangue de pacientes chagásicos em três tempos diferentes de tratamento.....	212

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE CHAGAS - HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

As doenças infecciosas parasitárias afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas do planeta e representam uma crescente ameaça mundial, sendo um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres e são frequentemente chamadas de doenças negligenciadas, doenças órfãs ou doenças tropicais (DIAS e DESSOY, 2009).

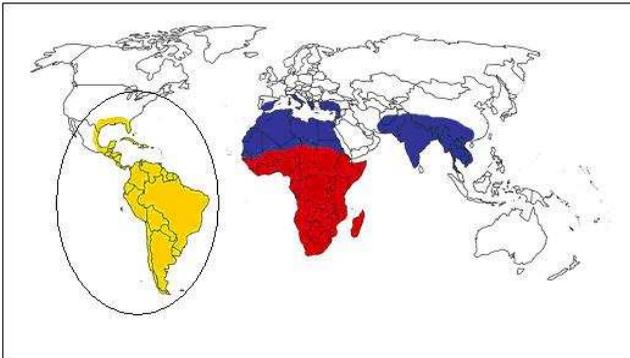
A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, permanece como uma importante endemia em países latino-americanos, constituindo um relevante problema de saúde pública em quinze deles (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005). Descoberta em abril de 1909 pelo médico sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1878-1934), pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz e membro da Academia Brasileira de Ciências, no momento em que havia sido convocado a controlar a malária que impedia o progresso da Estrada de Ferro Central do Brasil. No ano anterior, Chagas já havia sido capaz de identificar seu agente causal, o protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), e o inseto transmissor, conhecido como barbeiro. A descoberta desta tríade por Chagas (agente causal - inseto transmissor - doença) constitui um marco na história da ciência e da saúde brasileira (DIAS e DESSOY, 2009).

Estima-se que após 100 anos de sua descoberta, entre oito e quinze milhões de pessoas estejam infectadas no continente, das quais aproximadamente dois a três milhões são brasileiros (SOBRINHO et al., 2009) (figura 1). Os dados epidemiológicos nos mostram que no início de 1980, o número estimado de infectados era de 16 a 18 milhões, com uma incidência anual de 300.000 casos. Já em 2007, os valores citados foram 8 milhões de infectados com 50.000 novos casos por ano e 14.000 mortes relacionadas a complicações da doença (DEVELOUX et al., 2009).

A distribuição geográfica dos vetores triatomíneos abrange uma área localizada entre 300 e 3000m acima do nível do mar e entre 42 graus norte e 40 graus a sul. Conseqüentemente, a área de risco de infecção estende-se desde o sul dos EUA até o sul da Argentina. No entanto, a principal área endêmica da doença de Chagas abrange mais de

20 países da América Central e do Sul, do México até o norte da Argentina (figura 2) (MUÑOZ-SARAVIA, et al., 2010). A Europa é colonizada por diferentes subfamílias de triatomíneos, incluindo espécies da subfamília Triatominae. Entre estes, *Triatoma rubrofasciata* é conhecido por ser um portador de *T. cruzi* na América Latina. No entanto, não há indicação de transmissão de *T. cruzi* por triatomíneos na Europa. Várias espécies de pulgas, moscas, percevejos, mosquitos e piolhos têm sido sugeridos como possíveis candidatos a transmissão de *T. cruzi* (MUÑOZ-SARAVIA, et al., 2010).

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica de doenças negligenciadas.



A área circulada em destaque se refere à região de endemia da doença de Chagas.

Fonte: Disponível em: <http://biotechnology.com.br/revista>.

Acesso em 19 abril de 2011.



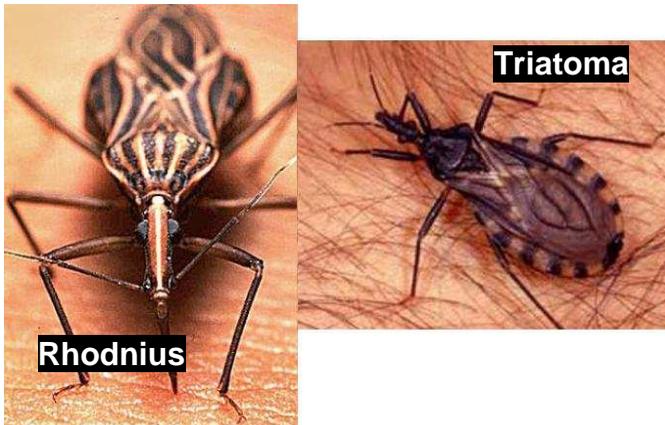
Entretanto, segundo dados da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, entre 2005 e 2007, somente no estado do Pará, cerca de 220 novos casos surgiram de doença de Chagas com 8 óbitos confirmados (SVS-MS, 2008). Coincidentemente o palco da descoberta da doença, o Estado de Minas Gerais, é considerado um dos Estados brasileiros com maior prevalência da endemia chagásica (WHO, 2009).

## 1.2 ETIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença é causada pelo protozoário flagelar *T. cruzi* pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae gênero *Tripanosoma*.

Os triatomíneos, conhecidos popularmente como “barbeiros”, são os vetores da doença e duas espécies, dentre uma centena, são predominantemente responsáveis pela transmissão intradomiciliar em humanos: o *Triatoma infestans* e o *Rhodnius prolixus*, na América do Sul e na América Central/México, respectivamente (figura 3) (SILVEIRA et al., 2000).

Figura 3: Espécies de triatomíneos responsáveis pela transmissão do *T. cruzi*.



Fonte: Disponível em: <<http://www.sciencedaily.com/> <http://cbme.USP.br>>. Acesso em: 19 de abril de 2011.

Ambos os sexos de triatomíneos, feminino e masculino são capazes de transmitir *T. cruzi* ao longo das suas vidas (até 2 anos). Além dos seres humanos, mais de 100 mamíferos, incluindo cães, gatos, ratos, preguiças, gambás, tatus e morcegos, são conhecidos por serem reservatórios do parasito (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2010). Devido ao canibalismo entre os triatomíneos, *T. cruzi* também pode ser transmitido em todas as populações de triatomíneos. Em contraste, aves e répteis não possuem o *T. cruzi* (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2010).

A doença de Chagas é uma zoonose transmitida na natureza dentro de um contexto ecológico, geograficamente bem definido, onde reservatórios e vetores, infectados pelo *T. cruzi*, mesmo na ausência de seres humanos, perpetuam o ciclo (SILVEIRA et al., 2000).

### 1.3 CICLO BIOLÓGICO DO *TRYPANOSSOMA CRUZI* (*T. CRUZI*)

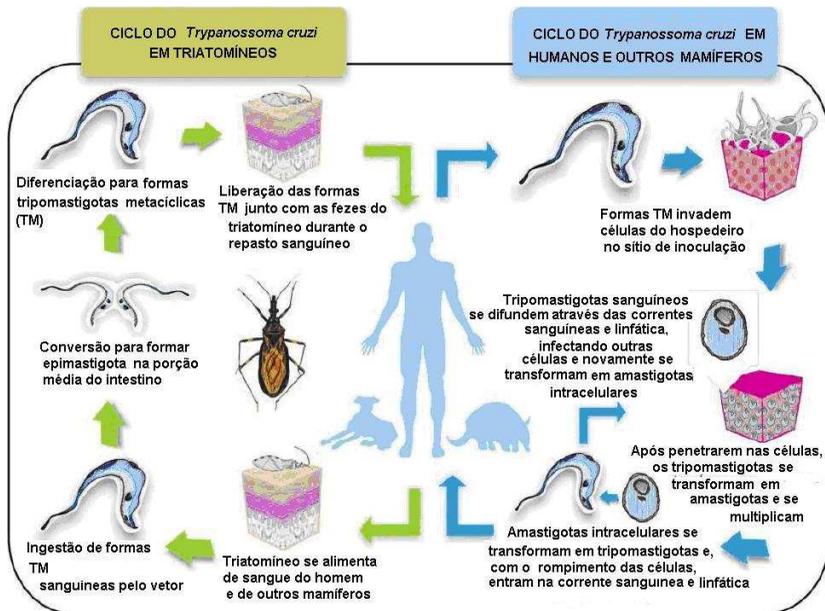
O *T. cruzi* utiliza-se de dois hospedeiros em seu ciclo evolutivo: o invertebrado (triatomíneo hematófago) e o vertebrado (mamíferos, incluindo o homem), e apresenta-se em distintas formas.

Experimentalmente, o ciclo biológico completo do *T. cruzi* dentro do vetor leva 30 a 60 dias após a ingestão sanguínea. No inseto, o parasito desenvolve-se na luz do intestino; algumas horas após a ingestão do sangue infectado iniciando a diferenciação das formas tripomastigotas para epimastigotas, que se multiplica por divisão binária. Estas se dirigem para o intestino posterior do inseto, onde sofrem novo processo de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos que, no momento da picada no hospedeiro mamífero, são eliminados junto com as fezes. Existem diferenças tanto na susceptibilidade dos vetores, quanto nas diferenças biológicas na infectibilidade, patogenicidade e parasitemia entre as diferentes cepas de *T. cruzi*. Em recente revisão taxonômica foram definidos seis genótipos, distribuídos no continente americano (CARRANZA et al., 2009).

Através do sítio de inoculação, os tripomastigotas invadem os macrófagos e tecidos, transformando-se em amastigotas, os quais também se multiplicam por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. Após vários ciclos de divisão, os parasitas sofrem diferenciação para tripomastigotas, que são liberados após ruptura da célula, podendo invadir células vizinhas ou serem levados para outros tecidos pela corrente sanguínea (figura 4).

A variedade de células que funcionam como um reservatório do parasito é grande, incluindo macrófagos do sistema fagocítico mononuclear, fibroblastos, células epiteliais, células musculares e neurônios, sendo claro o tropismo por células musculares e neurônios. Das células musculares, as do coração e do esqueleto, bem como células musculares lisas são afetados em um grau similar. Esse tropismo preferencial parece estar associado tanto às características intrínsecas das células invadidas, como ao tipo de cepa do parasito. Classicamente, admite-se que apenas a forma tripomastigota invade células não-fagocíticas (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2010).

Figura 4: Ciclo biológico do *T. cruzi*.



Fonte: Disponível em: <<http://miriamsalles.info/wp/?p=3512>>. Acesso em: 19 de abril de 2011.

## 1.4 VIAS DE TRANSMISSÃO

Nas últimas décadas a migração rural para a urbana em muitas áreas endêmicas, resultante de modelos político-econômicos urbanizadores e industriais, têm carreado enormes contingentes de chagásicos para a periferia das grandes cidades, pressionados pela deficiência de trabalho na zona rural, como estratégia de sobrevivência. A doença é mais prevalente em áreas com pior qualidade de moradia (habitações de madeira e terra), onde o vetor tem se adaptado ao ambiente doméstico e peri-doméstico tornando a infecção, via natural, significativa (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2010).

Mecanismos de transmissão tais como transplacentário, transfusional, digestivo, acidental e através de órgãos transplantados também têm sido descritos, exceto a transmissão vetorial, somente a transmissão por transfusão sanguínea tem importância epidemiológica. A transmissão transfusional do *T. cruzi*, tem sido objeto de preocupação em áreas onde doadores de sangue podem estar infectados, mesmo em países não-endêmicos, sendo considerado um dos mais relevantes aspectos para o controle da doença.

Felizmente, segundo o *Weekly Epidemiological Record* da WHO (1997), uma comissão internacional foi formada para iniciar um processo de certificação da eliminação do vetor e da transmissão transfusional da doença de Chagas no Brasil. Como resultado deste processo de certificação, em 2006 a Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) declarou o Brasil livre da transmissão da doença de Chagas pela principal espécie vetora, o *Triatoma infestans* (LANNES, Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas>. Acesso em: 19 de abril de 2011).

## 1.5 ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção chagásica em humanos é caracterizada por duas fases distintas, a fase aguda e a crônica. A fase aguda assintomática da doença ocorre principalmente em adultos, não sendo valorizada pelo paciente e dura cerca de 2 meses. Um sinal típico muitas vezes ignorado é o chagoma, uma infecção local caracterizada por edema em torno da picada do barbeiro. Se a via de entrada do parasito for através da conjuntiva ocular, os pacientes apresentam após 4-12 dias, um sintoma mais típico chamado de sinal de Romanã (TORRICO et al., 2005), que

compreende conjuntivite, edema palpebral unilateral e linfadenopatia pré-auricular (Figura 5).

Figura 5: Edema palpebral unilateral e linfadenopatia pré-auricular.



Fonte: Disponível em: < <http://www.relampa.org.br>.  
Acesso em 19 de abril de 2011.

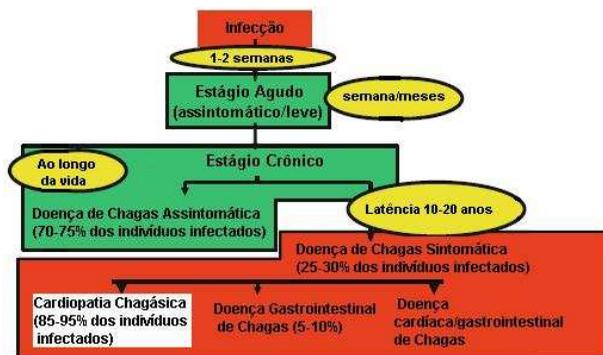
Essa fase aguda assintomática, por estar relacionada com a carga parasitária, pode não ser clinicamente identificada, respondendo de forma diferente conforme o número e tipo de cepas inoculadas. Quando se manifesta, apresenta quadro febril e outras manifestações clínicas fugazes (DIAS, 1993). Contudo, a fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças, na primeira década de vida, podendo levar à morte devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca e/ou meningite (DIAS, 1993).

À medida que os níveis de parasitemia e as lesões inflamatórias da fase aguda diminuem, uma miocardite focal instala-se durante a fase crônica da doença, podendo em muitos casos evoluir com a destruição das fibras cardíacas e aumento da fibrose (ROSSI, 1991). A maioria dos casos agudos não-tratados evolui para a chamada forma indeterminada da doença de Chagas, definida pela presença de infecção, confirmado através de exame sorológico ou exames parasitológicos, e a ausência de sintomas e de alterações eletrocardiográficas e radiológicas (compreendendo coração, esôfago, cólon) (BIOLO et al., 2010).

O resultado do controle incompleto parasitário é decorrência da persistência do parasito ao longo da vida e, portanto, os pacientes evoluem para infecções crônicas. Isto pode ser demonstrado pela positividade com anticorpo anti-*T. cruzi* e usando técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção do parasito em amostras de tecido do paciente (ÁVILA et al., 1991; KIRCHHOFF et al., 1996). Apesar da carga parasitária permanente, a fase assintomática da doença de Chagas crônica pode ser diferenciada da fase sintomática.

Os pacientes com a forma indeterminada constituem a maioria das pessoas infectadas em áreas endêmicas, e cerca de 70% desses pacientes podem persistir nesta situação clínica para sempre. Pacientes classificados como possuindo a forma indeterminada da doença tem um prognóstico excelente, e as mortes devido à infecção, são raras. A transição para forma cardíaca geralmente ocorre de forma lenta, progressiva e irreversível, ocorrendo em 2 a 3% dos pacientes a cada ano (RIBEIRO e ROCHA, 1998). A figura 6 ilustra o tempo de curso da doença de Chagas:

Figura 6: Curso da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de MUÑOZ-SARAVIA et al. (2010).

## 1.6 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* é usualmente estabelecido pela detecção do parasito através de testes parasitológicos, durante a infecção aguda, ou por imunodiagnóstico, através da detecção de anticorpos circulantes contra antígenos de *T. cruzi*, na fase crônica da

doença, pois a concentração de parasitas circulantes, nesta fase, é muito baixa (M.S, 2005). Dois testes paralelos devem ser realizados: um teste com alta sensibilidade: ELISA, utilizando antígeno total do parasito e suas frações semipurificadas; imunofluorescência indireta (IFI) ou ainda hemaglutinação indireta (HI), em combinação com um teste altamente específico, utilizando antígenos recombinantes específicos de *T. cruzi* (M.S, 2005). Se os resultados não forem conclusivos, ou seja, um resultado positivo e um resultado negativo, as amostras devem ser retestadas e, caso ainda não sejam conclusivos, as amostras devem ser enviadas para laboratórios de referência e serem testadas usando a PCR ou métodos de Western Blott. Estudos recentes mostraram resultados promissores em técnicas de PCR padronizada e matrizes para a detecção de várias proteínas recombinantes, aumentando a precisão e confiabilidade no diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi* (DEBORGGRAEVE et al., 2009).

### 1.7 HISTÓRICO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA (CCC)

A CCC é considerada a causa mais comum de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) com arritmias e morte súbita em adultos jovens nas áreas endêmicas, e calcula-se que ocorram aproximadamente 50 mil mortes a cada ano nestas áreas (WEN et al., 2004; LÓPEZ et al., 2006).

Quando o *T. cruzi* infecta um ser humano, tendo passado pelo vetor transmissor e pelo seu reservatório silvestre, este indivíduo torna-se contaminado, não necessariamente doente, mas infectado, pois tanto na fase de infecção aguda como na fase crônica, não apresenta sintomas clínicos na maioria dos casos (ARAÚJO-JORGE e de CASTRO, 2000).

Uma vez no indivíduo infectado, sendo o *T. cruzi* um protozoário de desenvolvimento obrigatoriamente intracelular, irá buscar as células do hospedeiro para invadi-las e se multiplicar. O parasito irá “driblar” os mecanismos de resistência da imunidade inata, “buscar” o melhor ambiente celular para seu desenvolvimento e “se utilizar” de sistemas fisiológicos do indivíduo infectado, para “subvertê-los” a seu favor (URBINA, 2010). Começa então uma corrida do parasito pela garantia do estabelecimento da infecção, e do indivíduo infectado pelo controle da carga parasitária. A resultante mais freqüente dessa competição é o equilíbrio, pois cerca de 65-70 % dos indivíduos infectados mantêm-se na forma crônica indeterminada, ou seja, assintomática, porém com manutenção da infecção. A resultante menos freqüente é o

estabelecimento da doença de Chagas crônica sintomática, majoritariamente expressa pela CCC, em cerca de 30 % dos indivíduos crônicos infectados (DIAS e COURA, 1997).

As diferentes apresentações clínicas vão ser determinadas (1) pela intensidade inicial do parasitismo (DIAS e DESSOY, 2009); (2) pela intensidade da resposta inflamatória, que deve ser suficiente para controlar a infecção, mas não exagerada para lesar o próprio indivíduo infectado (BIOLO et al., 2010); e (3) pela montagem e evolução da resposta imune do hospedeiro, função de sua constituição genética, sexo, idade, raça, base nutricional, entre outros fatores (TAFURI, 1999). Estes eventos, que envolvem processos e sistemas fisiológicos, ocorrem no organismo do indivíduo infectado sem que ele se dê conta disso.

### **1.7.1 Mecanismos propostos para explicar a evolução da CCC**

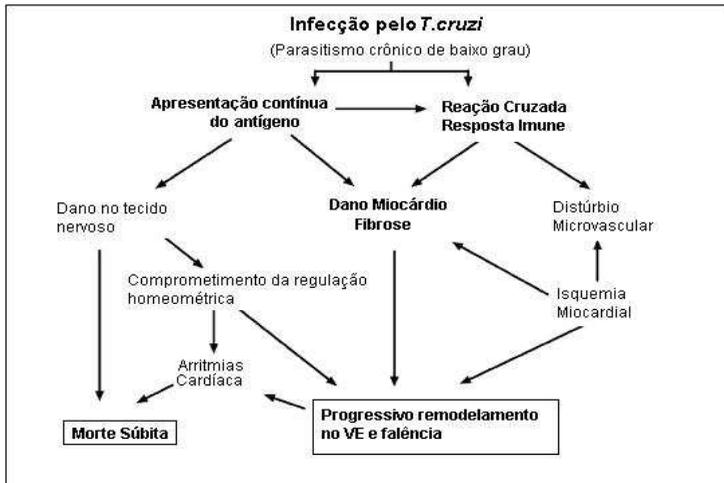
A história natural da CCC começa quando ocorre a destruição de fibras miocárdicas pelo processo inflamatório e a sua substituição por tecido fibroso, atinge um limite crítico, obrigando os ventrículos a remodelar-se frente à perda gradativa dos elementos contráteis (GUIMARÃES, 1997). Uma inflamação crônica (miocardite) progressiva e fibrosante é o substrato morfológico fundamental dos mecanismos patogênicos responsáveis pela miocardite. Os três folhetos cardíacos e o sistema de condução ficam comprometidos na doença de Chagas (ANDRADE, 1991), e inúmeros achados na doença experimental e humana sugerem o envolvimento de linfócitos T na formação da lesão chagásica, associado à presença do parasito e/ou seus antígenos. O remodelamento ventricular ocorre de duas maneiras: inicialmente, ocorre hipertrofia das fibras íntegras e, posteriormente, dilatação da cavidade ventricular (GUIMARÃES, 1997).

Essa hipertrofia extrínseca restaura temporariamente o volume sistólico já comprometido, mas a dinâmica do processo leva à dilatação cardíaca crescente, com perda progressiva da capacidade de ejeção ventricular em virtude da evolução da miocardite e da sobrecarga mecânica. Nos estágios mais avançados, além do componente sistólico, também se intensifica um componente de restrição diastólica, devido à grande dilatação e ao enrijecimento pela fibrose (remodelamento cardíaco). Contribuem ainda para o agravamento da cardiopatia, as arritmias ventriculares complexas, o tromboembolismo pulmonar repetido e a insuficiência das válvulas mitral e tricúspide (GUIMARÃES, 1997).

Para explicar a destruição de cardiomiócitos e a fibrose progressiva, quatro hipóteses principais encontram suporte anatomopatológico em pacientes e em modelos experimentais: (1) destruição direta pela persistência do *T. cruzi*; (2) reações auto-imunes (humorais e/ou celulares) com destruição de células ganglionares e lesões do sistema de condução no coração; (3) hipótese neurogênica e (4) o comprometimento microvascular (microespasmos, microtrombos, disfunção de células endoteliais e aumento de atividade plaquetária) (ROSSI, 1995; BIOLO et al., 2010).

O desenvolvimento da miocardite depende de processos focais de necrose celular sucessiva e progressiva, que levam a uma fibrose miocárdica reativa e reparativa com hipertrofia de cardiomiócitos adjacentes. Essa necrose poderia ser iniciada e perpetuada por fatores imunes e/ou alterações isquêmicas da microcirculação (ROSSI, 1995; SANTOS et al., 2011) (figura 7).

Figura 7: Fisiopatologia da CCC.



Os dois principais mecanismos de lesão: persistência do parasito e a resposta imunológica que causam lesão miocárdica e fibrose com remodelamento progressivo e falência. Sigla: VE, ventrículo esquerdo.

Fonte: BIOLO et al. (2010) (Adaptado de MARIN-NETO et al., 2007).

Outro fato que vem chamando à atenção dos pesquisadores, é que a progressão da severidade da cardiopatia chagásica está associada ao aumento no dano oxidativo particularmente às proteínas, lipídios cardíacos e, principalmente às mitocôndrias (WEN e GARG, 2004; de OLIVEIRA et al., 2007). Vários estudos têm sugerido que alterações na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, principalmente complexo I (NADH-ubiquinona oxiredutase) e III (Ubiquinol-citocromo c redutase), estejam relacionadas com a geração de ERO e ERN, no coração de pacientes chagásicos e contribuam para o dano oxidativo (WEN e GARG, 2004). Um aumento na razão de formação de ERO e ERN com declínio dos mecanismos antioxidantes tem sido sugerido como um dos principais responsáveis pelo acúmulo de dano oxidativo no coração de pacientes chagásicos (WEN et al., 2004; de OLIVEIRA et al., 2007; MAÇAO et al., 2007).

A ativação de células T consiste o tipo predominante de células em lesões inflamatórias da CCC (REIS et al., 1993). Além disso, a presença de citocinas pré e pró-inflamatórias (IL-4, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) tem sido encontrada no sangue periférico de pacientes com a forma indeterminada e na forma cardíaca da doença de Chagas, induzidas pela membrana lipídica do *T. cruzi* (DUTRA et al., 1997; FERREIRA et al., 2003). Citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na geração da forma induzida de óxido nítrico sintetase (iNOS) com contínua produção de radical óxido nítrico ( $\cdot$ NO) nos tecidos (GAZZINELLI et al., 1996). Há evidências de que a excessiva produção de  $\cdot$ NO podem levar a conseqüências patológicas no hospedeiro (PÉREZ-FUENTES et al., 2003). O  $\cdot$ NO pode regular diretamente a propriedade contrátil das células musculares e levar à depressão da função cardíaca e dano ao miocárdio (MACHADO et al., 2000). Evidências experimentais identificaram que citocinas pró-inflamatórias geradas por ativação das células do sistema imune induzem um aumento na geração de  $\cdot$ NO em miócitos isolados de ratos ou que a remessa de  $\cdot$ NO proveniente da iNOS cardíaca poderia participar da patogênese da doença cardíaca de Chagas em animais experimentais (HUANG et al., 1999). Entretanto, o mecanismo com que a iNOS é induzida pelo *T. cruzi* em miócitos cardíacos, permanece incerto, mas uma possibilidade é que produtos secretados pelo próprio parasito ativem diretamente essa indução (MACHADO et al., 2000).

De qualquer modo, um número significativo de estudos disponíveis na literatura apóia a hipótese de que a resposta imune amplificada pelo processo inflamatório e desencadeada de forma

consistente seja pela persistência do parasito ou pela resposta do hospedeiro aos auto-antígenos, desempenhe um papel no desenvolvimento e progressão na CCC (ZACKS et al., 2005; BIOLO et al., 2010).

### 1.7.2 Classificação da CCC

Vários sistemas de classificação foram desenvolvidos na cardiopatia chagásica. As classificações de Kuschnir e de *Los Andes* são freqüentemente usadas em estudos longitudinais (KUSCHNIR et al., 1985; CARRASCO et al., 1990; BENCHIMOL BARBOSA, 2007). Devido à diversidade de apresentações clínicas, fica um tanto difícil chegar-se a um consenso sobre a melhor forma de estratificação de risco na CCC (STORINO, 1994).

O presente trabalho adotou a classificação de *Los Andes* modificada, a qual descreve da seguinte forma os diferentes graus de comprometimento (BERN et al., 2007):

Grupo I: Pacientes com sorologia positiva, assintomáticos e sem evidências clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de cardiopatia. De acordo com os achados do ecocardiograma (ECG) (ventriculograma), estes pacientes foram subdivididos por sua vez, nos subgrupos IA e IB. No subgrupo IA se agruparam os pacientes com ventriculograma normal, classificados como casos de “infecção chagásica sem lesões cardíacas”. No subgrupo IB foram incluídos aqueles chagásicos com evidências de assinergia em um ou mais segmentos do ventrículo esquerdo (usualmente no ápice e região ínfero-lateral esquerda). Estes pacientes foram classificados como portadores de cardiopatia crônica na fase “incipiente”.

Grupo II: Pacientes com sorologia positiva, assintomático ou não, com anormalidades no ECG convencional de repouso. Estas foram usualmente extra-sístoles ventriculares e/ou distúrbios na condução átrio-ventricular (AV) ou intraventriculares, excetuando os bloqueios incompletos do ramo direito e esquerdo, bloqueio AV de 1º grau e as alterações inespecíficas da repolarização ventricular. Este grupo foi classificado como “chagásicos com o ECG anormal e sem insuficiência cardíaca”.

Grupo III: Pacientes com sorologia positiva e evidência passada ou presente de insuficiência cardíaca congestiva, classificados como “em fase de insuficiência miocárdica”.

Deve ser salientado que, em determinado grupo de pacientes, independentemente da forma rigorosa como a classificação é feita, notáveis diferenças individuais entre os componentes do mesmo grupo clínico são encontradas. Portanto, a doença de Chagas é uma entidade notável não só pela sua variedade clínica, mas também por sua variabilidade individual.

### **1.7.3 Manifestações e Avaliação clínica da CCC**

A apresentação clínica mais importante da doença de Chagas é a CCC e compreende uma gama de manifestações, incluindo insuficiência cardíaca (IC), arritmias, bloqueios cardíacos, tromboembolismo e morte súbita (ROCHA et al., 2003).

O quadro clínico geralmente varia muito de acordo com o grau de lesão miocárdica, e a maioria dos pacientes apresentam uma forma leve da doença cardíaca, freqüentemente caracterizada apenas pela presença de anormalidades assintomáticas no ECG ou outros exames complementares. Considerando que a presença de anormalidades no ECG é a característica mais prevalente de CCC e que tem um significado definitivo no prognóstico, um Consenso Brasileiro definiu que ocorre a Cardiopatia Chagásica quando “há presença de alterações eletrocardiográficas típicas e um resultado de sorologia positiva para *T. cruzi*, independentemente da presença de sintomas” (BIOLO et al., 2010).

O mecanismo mais freqüente de morte na CCC é a morte súbita cardíaca e ocorre geralmente em pacientes com doença mais grave como a IC, embora raramente possa ocorrer em pacientes previamente assintomáticos (RASSI JR et al., 2001; STERNICK et al., 2006). O acidente vascular cerebral (AVC) pode ser sua primeira manifestação, e a doença de Chagas tem sido considerada uma causa frequentemente não reconhecida de AVC, e deve ser incluída no diagnóstico diferencial em pacientes de origem latino-americana (CAROD-ARTAL et al., 2003).

### **1.7.4 Tratamento na CCC**

O foco principal no tratamento da CCC depende do tratamento das 3 principais síndromes que ocorrem nesta fase: IC, arritmias e tromboembolismo. Há, no entanto, as características relacionadas à clínica da doença de Chagas que merecem atenção especial para levar as

abordagens terapêuticas. Tradicionais estratégias terapêuticas para a IC tais como uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e beta-bloqueadores, são provavelmente tão importantes na CCC como em outras síndromes de IC. No entanto, há poucas estratégias enfocando especificamente a cardiopatia na doença de Chagas.

Uma série de incertezas cerca o contexto do transplante de pacientes com CCC, sendo as mais importantes, o medo de reativação da infestação parasitária, maiores graus de rejeição, e a ocorrência de infecções pós-transplante. Os dados de receptores chagásicos transplantados indicam que a reativação do *T. cruzi*, pós transplante, pode ocorrer em até 90% dos pacientes, porém como o tratamento de reativação do *T. cruzi* pode ser facilmente conseguido usando Benznidazol (BZN) e alopurinol, a mortalidade observada com estes raros episódios é baixa, cerca de 0,7% (BOCCHI e FIORELLI, 2001). Em certas partes do mundo, a CCC é a principal referência para transplante e, no Brasil, é a terceira indicação para o transplante cardíaco (BOCCHI e FIORELLI, 2001; PARRA et al., 2008).

## 1.8 ESTRESSE OXIDATIVO

### 1.8.1 Radicais Livres (RL) e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN)

Os RL podem ser definidos como fragmentos moleculares ou moléculas contendo um ou mais elétron desemparelhado. A presença de elétrons desemparelhados normalmente confere um considerável grau de reatividade de um radical livre. Este radical, derivado do oxigênio ou nitrogênio, representa a classe mais importante de tais espécies geradas em organismos (VALKO et al., 2004).

As causas das propriedades tóxicas do oxigênio eram obscuras antes da publicação da teoria do radical livre de Gerschman e da toxicidade de oxigênio, em 1954, que estabeleceu que a toxicidade de oxigênio era devido a formas parcialmente reduzidas de oxigênio (GERSCHMAN et al., 1954). Logo em seguida, Denham Harman hipotetizou que as ERO poderiam ser formadas como subprodutos de reações enzimáticas *in vivo*. Em 1956, descobriu ser RL uma “caixa de pandora” que podia ser responsável por danos celulares, mutagênese, câncer, processos degenerativos e envelhecimento (HARMAN, 1956).

A segunda publicação importante envolvendo a pesquisa de radicais livres em sistemas biológicos foi realizada em 1969, quando McCord e Fridovich descobriram a função da enzima superóxido dismutase (SOD) e, portanto, forneceu evidência convincente sobre a importância dos RL em sistemas biológicos (McCord e Fridovich, 1969). Na década de 90, surgem os primeiros registros descrevendo o efeito benéfico das ERO, inaugurando a terceira fase da descoberta dos RL (Halliwell e Gutteridge, 2006).

O delicado balanço envolvendo a regulação do estado redox e o chamado estresse oxidativo (Sies et al., 1993) presente em diversas doenças humanas, vem caracterizando sua importância clínica e biológica nas três últimas décadas (Halliwell e Gutteridge, 2006).

As ERO são principalmente produtos do metabolismo celular normal. As ERO e ERN são bem conhecidas por possuírem papel duplo, como espécies deletérias e benéficas, uma vez que podem ser prejudiciais ou benéficas para os sistemas biológicos que utilizam oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2006).

Os efeitos benéficos das ERO envolvem papel fisiológico na resposta celular à anoxia, como por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos e na função de um número de sistemas sinalizadores celulares. Um exemplo de sua ação benéfica é na diferenciação celular onde as ERO são indutores de resposta mitogênica (Halliwell e Gutteridge, 2006).

Em contraste, em grandes concentrações, as ERO e ERN podem mediar danos às estruturas celulares, incluindo lipídios e membranas, proteínas e ácido nucléico, o chamado estresse oxidativo ou estresse nitrosativo (Halliwell e Gutteridge, 2006). O efeito deletério das ERO e ERN é balanceado por ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e ainda por antioxidantes nutricionais (Halliwell, 1996; Valko et al., 2004; Poli et al., 2004).

O estresse oxidativo tem sido implicado em uma série de doenças humanas, assim como no processo de envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 2006). O delicado equilíbrio entre efeitos benéficos e nocivos das ERO é um aspecto importante a ser considerado nos organismos realizado através de mecanismos chamados de "regulação redox". O processo de "regulação redox" protege os organismos do estresse oxidativo e mantém a "homeostase redox", através de uma fina regulação (Valko et al., 2007).

### 1.8.2 Fontes de ERO e ERN

O principal mecanismo de geração das ERO é a redução parcial do oxigênio à água na respiração mitocondrial, com a formação de ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). As ERO podem ser produzidas em ambas as situações, endógena e exogenamente. As fontes endógenas principais das ERO incluem a respiração mitocondrial, metabolismo sistema microsomal citocromo P-450, peroxissomas e ativação de células inflamatórias entre outras (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001).

Em condições fisiológicas, a produção das ERO é estimada em aproximadamente 2% do total de oxigênio que é utilizado pelo organismo (CHANCE et al., 1979; BOVERIS, 1984; SIES e CADENAS, 1985). A mitocôndria gera aproximadamente 2-3 nmol de  $O_2^{\bullet-}$ /minuto por miligrama de proteína, no entanto, é difícil detectar a sua ocorrência intacta, muito provavelmente em consequência da presença da grande atividade da SOD (BOVERIS e CHANCE, 1973, VALKO et al., 2006). Por serem consideradas como principal local de geração das ERO, as mitocôndrias são grandemente enriquecidas com antioxidantes, incluindo glutathiona reduzida (GSH) e enzimas como a SOD e a glutathiona peroxidase (GPx) que estão presentes nas membranas da mitocôndria para minimizar o estresse oxidativo nesta organela (CADENAS e DAVIES, 2000).

Além da mitocôndria, existem outras fontes celulares do  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ , por exemplo, no metabolismo da enzima xantina oxidase (XO), uma enzima versátil que é amplamente distribuída entre as organelas e que catalisa a reação de hipoxantina à xantina e xantina a ácido úrico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006; SUGAMURA e KEANEY, 2011). Em ambos os passos, o oxigênio molecular é reduzido, formando o  $O_2^{\bullet-}$  no primeiro passo, e  $H_2O_2$  no segundo passo. Podemos ainda considerar como potencial fonte endógena geradora das ERO, os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Macrófagos ativados iniciam um aumento na absorção de oxigênio que dará origem a uma série de ERO, incluindo  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet NO$  e  $H_2O_2$  (CONNER e GRISHAM, 1996).

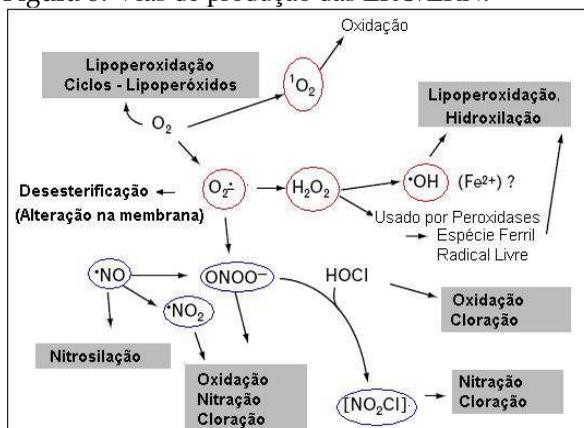
Além do oxigênio, o nitrogênio também participa da geração de espécies reativas, em especial  $\bullet NO$ , cujo precursor é a *L*-arginina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Como representante da classe de ERN, o  $\bullet NO$  não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical  $O_2^{\bullet-}$  gerando peroxinitrito

(ONOO<sup>-</sup>), que pode então, sofrer reações secundárias, formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e as bases de DNA, em particular a guanina (BARREIROS et al., 2006). Já foi demonstrada a ação do <sup>•</sup>NO, quando em altas concentrações sanguíneas, via formação de peroxinitrito, na nitração de proteínas, podendo auxiliar no combate ao *T. cruzi*, mas concomitantemente, provocando dano ao miocárdio de pacientes chagásicos crônicos (NAVILIAT et al., 2005).

O radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é a primeira ERO a ser formada pela redução univalente do estado triplete do oxigênio molecular (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) (BOVERIS e CHANCE, 1973; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Isoladamente, esse radical é pouco reativo e, portanto, não é altamente citotóxico. Porém, os efeitos deletérios vêm da habilidade deste em gerar radicais secundários, extremamente tóxicos como o radical <sup>•</sup>OH (CAMPOS e YOSHIDA, 2004). A produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ocorre principalmente dentro da mitocôndria de uma célula (BOVERIS e CHANCE, 1973; CADENAS e SIES, 1998). Este processo é mediado pela NADH oxidase e XO, ou não-enzimaticamente por componentes reativos redox como as semi-ubiquinonas, componentes das mitocôndrias na cadeia de transporte de elétrons. A enzima SOD converte o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> enzimaticamente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e exerce sua função conjuntamente com as enzimas que removem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como a catalase (CAT) e GPx (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Em tecidos biológicos o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> também pode ser convertido não-enzimaticamente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (STEINBECK et al., 1993) (figura 8).

Figura 8: Vias de produção das ERO/ERN.



Fonte: Adaptado Lemineur et al. (2006).

A geração de vários RL está intimamente ligada à participação de metais redox-ativos. O estado redox da célula é em grande parte relacionado a um par redox de ferro (algumas vezes cobre), e é mantido dentro dos estritos limites fisiológicos. Tem sido sugerido que a regulação de ferro assegura que não haverá ferro livre, no entanto, um excesso de  $O_2^{\bullet-}$  libera ferro livre vindo de moléculas que continham ferro. Essa liberação do ferro pelo  $O_2^{\bullet-}$  tem sido demonstrada nas enzimas da família das hidrolases-liases, que contêm ferro no seu centro ativo (VALKO et al., 2006). A liberação de Fe (II) pode participar da reação de Fenton, gerando o radical,  $^{\bullet}OH$  altamente reativo, segundo reação 1, abaixo:

## Reação 1



O radical  $O_2^{\bullet-}$  também participa da reação de Haber-Weiss, segundo a reação 2:

## Reação 2



Essa reação combina uma reação de Fenton com redução do Fe (III) pelo  $O_2^{\bullet-}$ , produzindo Fe (II) e oxigênio, conforme a reação 3:

## Reação 3



O radical hidroperoxil ( $\text{HOO}^*$ ) é a forma protonada do radical superóxido, isto é, possui o próton hidrogênio e, não tem maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas que o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (HALLIWELL, 1989).

A molécula  $\text{H}_2\text{O}_2$  não tem um elétron desemparelhado e por isso não é considerada uma espécie radicalar assim como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro. Por esse motivo, há uma tendência atual de se chamar o conjunto de substâncias envolvidas nessas reações de “espécies reativas de oxigênio” ao invés de “radicais livres do oxigênio” (CAMPOS e YOSHIDA, 2004). Sua toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O  $^*\text{OH}$  é altamente reativo com tempo de meia-vida em soluções aquosas, menor do que  $10^{-9}$ s (CHANCE et al., 1979). Desta forma, quando produzido *in vivo*, reage perto do seu local de geração, podendo ser gerado por vários mecanismos. Além disso, o  $^*\text{OH}$  pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FRIDOVICH, 1986; CAMPO e YOSHIDA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

A produção mais realista *in vivo* do radical  $^*\text{OH}$ , pela reação de Fenton, ocorre quando o metal de transição envolvido na reação, são ou o ferro, o cobre, o cobalto ou outros metais específicos. Embora a reação de Fenton seja conhecida por ocorrer *in vitro*, seu significado em condições fisiológicas acima das normais, não está bem definido, observando principalmente a insignificante disponibilidade de ferro livre para catalisar a reação, pois são seqüestrados por várias proteínas ligadoras de ferro (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001; KAKHLON e CABANTCHIK, 2002; VALKO et al., 2006).

Além das ERO, destaca-se a participação das ERN decorrentes de processos biológicos, dentre elas, o óxido nítrico ( $^*\text{NO}$ ), antigamente conhecido como fator relaxante muscular (BARREIROS et al., 2006). É uma pequena molécula que contém um elétron desemparelhado no orbital antiligante  $2\text{II}^*y$ , e é, portanto, considerado um radical. É gerado em tecidos biológicos por sintases específicas do óxido nítrico (NOSs), que metabolizam arginina em citrulina com a formação de  $^*\text{NO}$  (GHAFOURIFAR e CADENAS, 2005). É um radical reativo, mas que

atua fisiologicamente como uma importante molécula de sinalização biológica em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso e a regulação imune (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

A superprodução de ERN é chamada de estresse nitrosativo, e isso pode ocorrer quando a geração destas em um sistema excede a do sistema capaz de neutralizá-las. O estresse nitrosativo pode levar a reações de nitrosilação, alterando a estrutura das proteínas e, assim, inibir a sua função normal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Células do sistema imune produzem  $O_2^{\bullet -}$  e  $^{\bullet}NO$  através do *burst* oxidativo desencadeado durante o processo inflamatório. Sob essas condições, podem reagir entre si para produzir quantidades significativas de uma molécula muito mais oxidativamente ativa, o  $ONOO^-$  (peroxinitrito), que é um agente oxidante poderoso que pode causar a fragmentação do DNA, oxidação lipídica e nitroxidação de proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006; VALKO et al., 2007).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica (LPO), que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (FRIDOVICH, 1974; MELLO-FILHO et al., 1984; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (SIES e CADENAS, 1985; HERSHKO, 1989). Nem sempre os processos de LPO são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

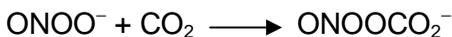
O término da LPO ocorre quando os radicais alcoxil ( $LO^{\bullet}$ ) e peroxil ( $LOO^{\bullet}$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios, ou quando a reação em cadeia é interrompida por antioxidantes lipossolúveis, como a vitamina E, presente nas membranas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). A LPO pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos  $LO^{\bullet}$  e  $LOO^{\bullet}$ , que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação.

Além dos danos à membrana lipídica, mecanismos envolvendo a oxidação de proteínas pelas ERO foram elucidados por estudos em que aminoácidos, peptídeos simples e proteínas, expostos à radiação acima das condições normais, formaram  $\cdot\text{OH}$  ou uma mistura de  $\cdot\text{OH}$  mais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (STADTMAN, 2004).

O dano causado às proteínas, catalisado por metal de transição, envolve perda dos resíduos de histidina, introdução do grupo carbonil, e formação de um centro radicalar na proteína alquil ( $\text{R}\cdot$ ), alcóxil ( $\text{RO}\cdot$ ) e alquilperóxil ( $\text{ROO}\cdot$ ) (DAVIES e DELSIGNORE, 1987). Tendo em vista o fato de que grupos carbonil de proteínas são gerados por diversos mecanismos, e um número de métodos altamente sensíveis tem sido desenvolvido para a determinação destes grupos carbonil de proteínas oxidadas, a concentração de grupos carbonil é uma boa medida de oxidação de proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Conforme já descrito, o  $\cdot\text{NO}$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  formando o  $\text{ONOO}^-$  altamente tóxico, que é hábil para nitrosilar os grupos sulfidrilas dos resíduos de cisteínas, triptofano, tirosina e os resíduos sulfóxido da metionina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001). Contudo, o processo de modificação das proteínas pelo  $\text{ONOO}^-$  é fortemente inibido pela concentração fisiológica de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), pois o peroxinitrito é conhecido por reagir rapidamente com este para formar  $\text{ONOOCO}_2^-$  (peroxicarbonato nitroso), como mostra a reação 4, um oxidante forte que reage com guanina no DNA para formar uma variedade de produtos de oxidação e nitração, tais 2'-desoxi-8 oxoguanosina, (DONG et al., 2006). Alternativamente, a reação de  $\cdot\text{NO}$  e  $\text{O}_2$  leva à formação de  $\text{N}_2\text{O}_3$ , um agente nitrosante. A presença de ambos os  $\text{ONOOCO}_2^-$  e  $\text{N}_2\text{O}_3$  nos locais de inflamação possuem papéis de dano oxidativo ao DNA e nitrosativo na toxicologia genética de inflamação (DONG et al., 2006).

#### Reação 4



A oxidação de proteínas por ERO e ERN está associada à formação de uma variedade de ligações cruzadas intraproteínas, como por exemplo, a substituição de grupo aminolisina por um grupo carbonil de uma proteína oxidada, por interação de dois carbonos centrais obtidos

pela abstração do hidrogênio mediada pelo  $\bullet\text{OH}$ , entre outras alterações (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

O acúmulo em organismos vivos destes produtos de oxidação, tanto em membranas lipídicas como em proteínas, está diretamente ligado ao aumento dos níveis de produção de ERO e/ou ERN, juntamente com um desequilíbrio da capacidade das defesas antioxidante do organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

### 1.8.3 Estresse oxidativo, Doença de Chagas e Inflamação

Apesar de relativamente recente, nota-se um acúmulo crescente de evidências experimentais e clínicas que apontam um estado gradativo de ativação imuno-inflamatória em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) (CANDIA et al., 2007). Níveis elevados de diversas citocinas são encontrados na circulação e no músculo cardíaco de indivíduos com IC, correlacionando-se, invariavelmente, com o grau de gravidade da doença e agindo na disfunção endotelial, no estresse oxidativo, na indução de anemia, na apoptose miocitária e na perda gradativa de massa muscular esquelética. (CANDIA et al., 2007).

A doença de Chagas caracteriza-se por uma heterogeneidade quanto à agressão miocárdica, e ainda que se conheçam importantes aspectos fisiopatológicos relacionados à instalação e progressão da cardiopatia chagásica, diversos fatores necessitam ser mais bem compreendidos (PLENTZ et al., 2006).

A resposta imune contra o *T. cruzi*, após a infecção inicial, é capaz de controlar o parasita, como evidenciado pela eventual resolução da parasitemia aguda. Estas respostas imunes podem contribuir para a patologia através de um ou mais mecanismos gerais, um processo de destruição auto-imune do tecido cardíaco do hospedeiro (hipótese auto-imune) ou através de mediadores específicos da resposta imune ao *T. cruzi* aos seus componentes antigênicos que persistem nos tecidos (hipótese de persistência do parasita) (ZACKS et al., 2005).

O estresse oxidativo é geralmente visto como um mecanismo de defesa de proteção utilizado pelo hospedeiro para controle de infecções parasitárias. Há, no entanto, a evidência crescente que o estresse oxidativo possa contribuir na patologia da doença cardíaca de Chagas. A injúria celular mediada pela invasão do patógeno ou replicação e reações imunes citotóxicas mediadas por reações citotóxicas, são fontes comuns de ERO na etiologia infecciosa. A infecção por *T. cruzi* promove citocinas inflamatórias, produção de  $\bullet\text{NO}$  e *burst* oxidativo, que, apesar de essenciais para controlar a parasitemia aguda, podem ter efeitos

tóxicos sobre os componentes celulares do hospedeiro e ser de significado patológico na cardiopatia chagásica crônica (ZACKS et al., 2005).

Recentes trabalhos têm demonstrado o aumento nos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 10 (IL -10), mediadores citotóxicos endoteliais, em pacientes assintomáticos com doença de Chagas, sugerindo que uma produção prolongada a estes fatores poderia estar relacionada à progressão das cardiopatias nesses pacientes (FERREIRA et al., 2003; CARDONI et al., 2004). A infecção pelo *T. cruzi* induz a produção de quantidades significativas de TNF- $\alpha$  e citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL)-1, IL-6 e IL-12 (ALMEIDA et al., 2000). Pacientes chagásicos crônicos assintomáticos ou na fase sintomática, com ou sem disfunção ventricular esquerda, apresentam aumento da produção de IL-12 induzida por IFN- $\gamma$  (ABEL et al., 2001).

A ação das citocinas sobre o sistema cardiovascular está bem assentada em bases experimentais que mostram promoção de inflamação, disfunção endotelial, coagulação intravascular, desacoplamento do estímulo beta-adrenérgico, geração de ERO, perda gradativa de massa muscular e intolerância ao exercício, entre outros efeitos (TORRE-AMIONE, 2005).

De modo análogo ao que ocorre na cardiomiopatia idiopática, os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL10 estão elevados de forma discreta na fase indeterminada da cardiopatia chagásica, alcançando níveis crescentes em indivíduos com doença cardíaca sintomática (LEON et al., 2004). Na miocardite aguda pelo *T. cruzi*, o principal mecanismo implicado parece ser uma agressão auto-imune direta contra as cadeias de miosina, em razão do mimetismo de epítopes do parasito (LEON et al., 2004). Na cardiopatia chagásica crônica, há evidências de uma resposta imune citotóxica aberrante persistente a antígenos do *T. cruzi*, que se relaciona com a progressão da doença (dos REIS et al., 2005).

Uma melhor compreensão dos eventos inflamatórios, realizada através da determinação de marcadores inflamatórios como atividade da enzima mieloperoxidase e adenosina deaminase e também os níveis de óxido nítrico, todos envolvidos na patogênese da doença crônica de Chagas, poderão possibilitar o surgimento de novas abordagens que permitam o seu monitoramento e a introdução de novos agentes terapêuticos capazes de retardar ou impedir sua progressão.

## 1.9 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os efeitos das ERO e ERN são balanceados pela ação de antioxidantes impedindo ou reparando sua ação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Um bom antioxidante deve ter as seguintes características: especificidade no seqüestro de RL, ser quelante de metais catalisadores de reação redox e promotores de reações de oxidação, interagir com outros antioxidantes, ser rapidamente absorvível, ter uma concentração nos tecidos e líquidos corpóreos em níveis fisiológicos e trabalhar em ambos os domínios, aquoso e lipídico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Os mais importantes antioxidantes enzimáticos envolvem a: SOD, CAT, GPx, glutationa redutase (GR), tireodoxina (TRX) entre outros, enquanto entre os principais antioxidantes não-enzimáticos endógenos estão a glutationa, ácido úrico e estradiol, entre outros, e como antioxidantes exógenos existem as vitaminas E e C, os carotenóides, os polifenóis, entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

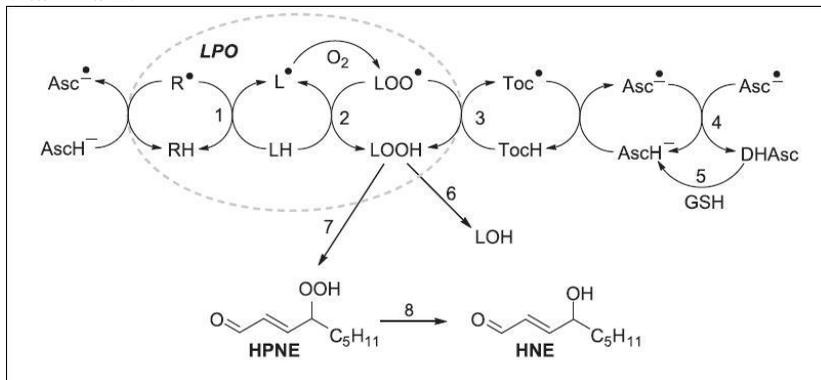
Apesar de controvérsia na literatura específica, notadamente nos trabalhos de meta-análise, o  $\alpha$ -tocoferol tem sido mostrado como agente cardioprotetor numa variedade de modelos animais (YUE et al., 1999). Em estudo com hamsters na fase final de cardiopatia, o conteúdo de vitamina E foi diminuído em 30-50% e a oxidação das proteínas aumentada em até 2 vezes, enquanto a administração de vitamina E restaurou os níveis de GSH e remeteu para valores de referência a oxidação protéica (LI et al., 1998). O risco de doença coronariana foi de aproximadamente 40% menor em homens e mulheres que fizeram suplementação com  $\alpha$ -tocoferol, quando comparados à dieta sem suplementação (STAMPFER et al., 1993). Um progressivo aumento dos danos provocados pelas ERO e depleção das reservas de antioxidantes junto com a evolução da insuficiência cardíaca também ficou evidenciado (YUE et al., 1999; MAÇAO et al., 2007).

### 1.9.1 Vitaminas E e C – Propriedades e Suplementação

O ácido ascórbico, ou vitamina C, tem dois grupos hidroxila ionizáveis e, portanto, é um diácido ( $\text{AscH}_2$ ) (figura 9). Em pH fisiológico, 99,9% da vitamina C está presente na forma protonada como ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ), e em proporções muito pequenas como  $\text{AscH}_2$  (0,05%) e  $\text{Asc}^{2-}$  (0,004%) (figura 9). O  $\text{AscH}^-$  é particularmente efetivo

em sequestrar  $O_2^{\bullet-}$ ; e também está envolvido na proteção contra danos oxidativos provenientes dos  $ONOO^-$  (WAMHOLTZ et al., 2002).

Figura 9: Ação *scavenger* do ácido ascórbico na regeneração da vitamina E.



Fonte: TRABER e STEVENS (2011).

A propriedade antioxidante da vitamina C, mesmo com seu baixo poder redutor, provém da sua forma protonada,  $AscH^-$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Ele age como doador e reage com radical para formar um radical livre tricarbonil ascorbato ( $AscH^\bullet$ ). Esse radical  $AscH^\bullet$  não é protonado, mas está presente na forma de semideidroascorbato ( $Asc^\bullet$ ), um fraco radical que é considerado terminal, e os seus níveis indicam o grau de estresse oxidativo nos sistemas biológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001; CUZZORCREA et al., 2004; KASPAROVA et al., 2005). A vitamina C atua como um doador de hidrogênio para inverter a oxidação e, portanto, é denominado um antioxidante, que pode inativar os radicais livres antes que eles promovam danos às proteínas ou lipídios (RICCIONI et al., 2007). É também um potenciador fisiologicamente relevante da eficácia da vitamina E, por regenerá-la após reação de oxidação sofrida pela mesma, constituindo seu principal papel antioxidante (di MASCIO et al., 1991).

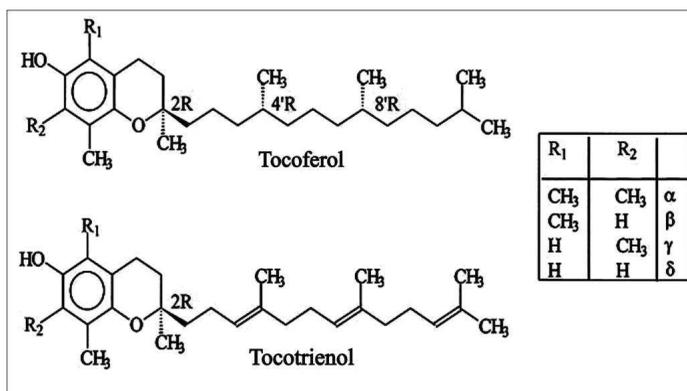
A suplementação de vitamina C pode fornecer benefícios de saúde além da prevenção de escorbuto (AGUIRRE e MAY, 2008). A recomendação atual de vitamina C presente na dieta, que seja suficiente para prevenir o escorbuto em adultos, seria 75 mg/dia para mulheres e 90 mg/dia para os homens (TRABER e STEVENS, 2011). Carr e Frei

(1999) propuseram que a dose recomendada na dieta para reduzir o risco de doença cardiovascular e câncer seria ajustada para 120 mg/dia. Eles embasaram suas conclusões em dados de estudos de *coorte* prospectivos, estudos caso-controle, e estudos transversais sobre a relação entre ingestão de vitamina C, as concentrações plasmáticas de vitamina C, e desfechos clínicos relacionados à doença cardiovascular e câncer. Doses mais elevadas de vitamina C (500 mg/dia), poderiam ser necessárias para obter vasodilatação e a consequente redução da pressão arterial (GOKCE, et al., 1999).

Outro antioxidante nutricional de grande importância é a vitamina E, descoberta em 1922 por Evans e Bishop, como um fator dietético necessário para a reprodução em ratos e sendo a substância ativa isolada em 1936. O termo genérico “vitamina E” é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferóis e tocotrienóis (BURTON e INGOLD, 1989; di MASCIO et al., 1989; SIES et al., 1993). Várias fontes de alimento são reconhecidas por conter uma quantidade significativa de vitamina E. A maioria das nozes e sementes como amêndoas, amendoim e girassol contêm quantidades elevadas de vitamina E, enquanto que legumes são fontes pobres (SAREMI e ARORA, 2010). Também como fontes naturais de vitamina E existem os óleos vegetais, como o óleo de semente de cártamo, que contém quase exclusivamente  $\alpha$ -tocoferol (59,3 mg/g de óleo), o óleo de soja é rico em  $\gamma$ ,  $\delta$ , e  $\alpha$ -tocoferol (62,4; 20,4; 11,0mg/g de óleo, respectivamente), e o óleo de palma contém tocotrienol (17,2 mg/g de óleo), além de  $\alpha$ -tocoferol (18,3 mg/ g de óleo) (SINGH et al., 2005). A dose diária mínima recomendada de vitamina E para um adulto de tamanho médio é de 15 mg (SAREMI e ARORA, 2010). As recomendações relativamente às doses de vitamina E constituem uma dificuldade, já que a vitamina E existe em muitas formas. Dois isômeros sintéticos de alfa-tocoferol, tais como acetato e derivados succinato são comumente usados em suplementos vitamínicos (SAREMI e ARORA, 2010). As recomendações são em miligramas de alfa-tocoferol. Esta substância pode ser proveniente da vitamina E natural (chamado de d-alfa-tocoferol) ou vitamina sintética E (chamado também all-rac ou dl-alfa-tocoferol). No entanto, grande parte do alfa-tocoferol presente na vitamina E sintética, está na sua forma inativa e, por esta razão, deve-se usar o dobro da dose para obter o mesmo efeito (BURTON et al., 1998; MONSEN, 2000). As doses de vitamina E são comumente listadas nos rótulos dos medicamentos como unidades internacionais (UI). Uma UI de vitamina E natural é igual a 0,67 mg de alfa-tocoferol, já uma UI de

vitamina sintética é igual a 0,45 mg de alfa-tocoferol (BURTON et al., 1998; MONSEN, 2000). A dose terapêutica ideal de vitamina E ainda não foi estabelecida. A maioria dos estudos utiliza entre 50 e 800 UI/dia, e alguns utilizam doses ainda maiores. Isso seria cerca de 50 a 800 mg de vitamina sintética E (dl-alfa-tocoferol) ou 25 a 400 mg de vitamina E natural (d-alfa-tocoferol ou mista) (MONSEN, 2000). Todos os tocoferóis devem ser considerados como derivados do tocol. O estereoisômero natural de  $\alpha$ -tocoferol é (2R, 4'R, 8'R) ( $\alpha$ -tocoferol ou RRR- $\alpha$ -tocoferol (figura 10) (BURTON e INGOLD, 1989; di MASCIO et al. 1989; SIES et al., 1993).

Figura 10: Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis.

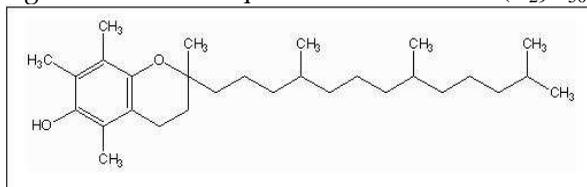


Fonte: GUINAZ et al. (2009).

Tanto tocoferóis como tocotrienóis ocorrem em uma variedade de isômeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel cromanol 1,4 (GUINAZ et al., 2009). Os tocoferóis possuem um 4', 8', 12'-trimetiltrideciltol como cadeia lateral e tocotrienóis diferem pela presença de ligações duplas nas posições da cadeia lateral 3', 7' e 11' (Figura 10) (WANG e QUINN, 1999; TRABER e ATKINSON, 2007). A estrutura do tocol indica que existem três centros de assimetria, que são em C2, C4'e C8'. Os tocotrienóis possuem apenas um centro de assimetria no C2, além de locais de isomeria geométrica em C3 e C7. Assim, um número de estereoisômeros do tocol e tocotrienol pode existir (BURTON e INGOLD, 1989; di MASCIO et al., 1989; SIES et al., 1993).

A forma que responde por cerca de 90% da atividade da vitamina E nos tecidos é o  $\alpha$ -tocoferol, um 2,5,7,8 tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil) cromanol-6 (figura 11) (BURTON e INGOLD, 1989; di MASCIO et al., 1989; SIES et al., 1993 ; RICCIONE et al., 2007; GUINAZ et al., 2009).

Figura 11: Estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol ( $C_{29}H_{50}O_2$ ).



Fonte: [http://www.netdrugs.info/dci/vitamina\\_02.shtml](http://www.netdrugs.info/dci/vitamina_02.shtml)

A vitamina E é transportada por todo o corpo como um componente das lipoproteínas plasmáticas. A lipoproteína que transporta a maior parte da vitamina E é a fração LDL (lipoproteínas de baixa densidade), embora outras frações de lipoproteínas contenham alguma vitamina E. A LDL contém entre 6 e 12 moléculas de  $\alpha$ -tocoferol e menores quantidades de  $\gamma$ -tocoferol, que podem ser facilmente modificados pela ingestão ou suplementação oral (SIES et al., 1993; STOCKER e BOWRY, 1996; SINGH et al., 2005).

A biodisponibilidade das diferentes formas de vitamina E é altamente diferenciada. Por exemplo, em humanos, embora a quantidade de  $\gamma$ -tocoferol na dieta seja maior do que de  $\alpha$ -tocoferol, sua concentração plasmática é de apenas 10% da concentração deste, que é a forma mais abundante no plasma. Uma vez ingerido, todas as formas de vitamina E são absorvidas pelas células intestinais e liberado para a circulação em quilomícrons (SINGH et al., 2005).

A meia-vida plasmática de RRR- $\alpha$ -tocoferol (forma natural) é de 48 a 60 horas, enquanto que a SRR- $\alpha$ -tocoferol (forma sintética) é de apenas 15 horas (TRABER e STEVENS, 2011). Não há dados definitivos em seres humanos com relação à quantidade de  $\alpha$ -tocoferol que seja absorvida. Estudos em humanos nas décadas de 60 e 70, usando  $\alpha$ -tocoferol radioativo, relataram a absorção da vitamina E fracionada em indivíduos normais variando entre de 55 a 79% do total (MACMAHON e NEALE, 1970). Entretanto, estudos mais recentes

usando  $\alpha$ -tocoferol marcado com deutério, a absorção em humanos foi de apenas 33% (BRUNO et al., 2006), sendo atualmente o valor aceito.

Proteínas de ligação de tocoferol parecem estar envolvidas no transporte e metabolismo de  $\alpha$ -tocoferol em tecidos. Várias proteínas de ligação de tocoferol foram isoladas do citosol de tecidos de mamíferos e caracterizadas e uma proteína hepática de  $30 \pm 35$  kDa foi identificada e seqüenciada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Uma proteína semelhante, que se liga especificamente ao  $\alpha$ -tocoferol (proteína hepática de transferência de  $\alpha$ -tocoferol, chamada de  $\alpha$ -TTP), foi isolada apenas no citosol do fígado humano (KUHLENKAMP et al., 1993). Afinidades relativas de análogos  $\alpha$ -tocoferol para  $\alpha$ -TTP, calculado a partir do grau de concorrência para a forma  $\alpha$ , são as seguintes:  $\alpha$ -tocoferol, 100%;  $\beta$ -tocoferol, 38%;  $\gamma$ -tocoferol, 9%;  $\delta$ -tocoferol, 2% (SINGH et al., 2005).

A vitamina E é classificada como uma vitamina lipossolúvel, devido a sua solubilidade em solventes de baixa polaridade. A solubilidade em meio aquoso é, portanto, relativamente baixa, penetrando nos tecidos lipídicos ou migrando através do corpo para domínios hidrofóbicos de estruturas moleculares, como lipoproteínas. Dentro da célula, as partições de vitamina E no núcleo hidrofóbico das membranas celulares são distintas, e sua relativa concentração difere de uma membrana à outra (WANG e QUINN, 1999).

A localização preferencial da vitamina E nos adipócitos, nos órgãos de armazenamento de gorduras e nas membranas celulares é certamente devida a essa característica hidrofóbica e isso caracteriza e identifica o papel funcional da vitamina E como um antioxidante e estabilizador de membrana lipídica (RICCIONI et al., 2007).

O acúmulo de alfa-tocoferol no sangue e os órgãos dependem da espécie e é órgão específico, como mostra o estudo realizado por Elmadfa e Walter (1981) onde órgãos de ratos (fígado, adrenal) contêm níveis mais elevados de alfa-tocoferol em comparação com os mesmos órgãos, em porcos. A faixa normal de concentração de vitamina E no plasma é 5-16 mg/L, ou aproximadamente 20-30  $\mu$ M (SAREMI e ARORA, 2010).

O  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol constituem mecanismos essenciais de defesa celular contra oxidantes endógenos e exógenos. Ao contrário de muitos outros antioxidantes celulares, a reação do antioxidante  $\alpha$ -tocoferol, não é enzimática e é rápida. O seu papel principal como antioxidante é devido ao seqüestro de radicais lipídicos peroxil, que propagam a peroxidação lipídica (SIES et al., 1993). Medições *in vitro*

da taxa relativa de inibição da corrente de propagação da cadeia de LPO indicaram que o  $\alpha$ -tocoferol elimina os radicais peroxil consideravelmente mais rápido que a reação deste com o substrato lipídico (di MASCIO et al., 1989; SIES et al., 1993; WANG e QUINN, 1999).

No entanto, alguns trabalhos indicam que outros isômeros como  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol são melhores antioxidantes (GUINAZ et al., 2009), e os tocotrienóis como sendo os compostos mais potentes na atividade antioxidante *in vitro*, mas pesquisas *in vivo* ainda devem confirmar esses resultados (GUINAZ et al., 2009). Tem sido relatado que  $\gamma$ -tocoferol é um antioxidante mais eficiente do que  $\alpha$ -tocoferol contra ERN (di MASCIO et al., 1991). A suplementação somente com  $\alpha$ -tocoferol pode esgotar o  $\gamma$ -tocoferol, o que poderia explicar a ausência de seu efeito sobre  $\bullet$ NO observado em alguns ensaios com essa vitamina (DEVARAJ e JIALAL, 2005).

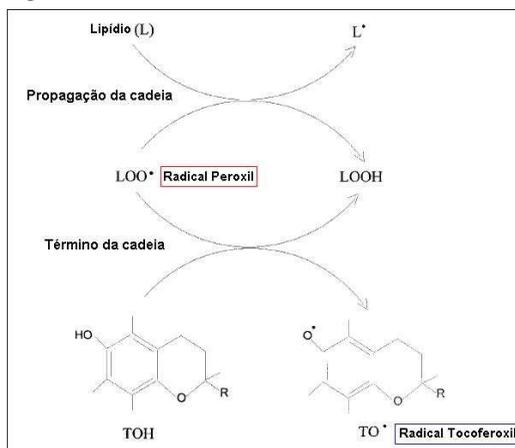
A comparação entre  $\alpha$ -tocoferol e  $\alpha$ -tocotrienol, em sistemas de membranas microssomais, revelou que os tocotrienóis são antioxidantes mais eficazes (SUZUKI et al., 1993), contudo em sistemas químicos seriam equivalente ao  $\alpha$ -tocoferol (YOSHIDA et al., 2003). Além disso, vários ácidos graxos insaturados interagem com o  $\alpha$ -tocoferol, assim como os polifenóis, exibindo efeito sinérgico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001).

O teor de vitamina E das membranas muitas vezes determina a suscetibilidade das membranas microssomais, das LDL, hepatócitos, ou de órgãos inteiros, a reagirem com outros oxidantes reativos, incluindo oxigênio singlete, o radical alcóxil, peroxinitrito, dióxido de nitrogênio, o ozônio e ânion superóxido (di MASCIO et al., 1991).

Devido à alta reatividade dos radicais hidroxil e alcóxil e da concentração de  $\alpha$ -tocoferol ser relativamente elevada nos lipídeos de membrana, é provável que o  $\alpha$ -tocoferol proporcione proteção direta contra o ataque por estes radicais. Entretanto a proteção contra o ataque de radicais peroxil pelo  $\alpha$ -tocoferol, é de maior importância biológica (WANG e QUINN, 1999, TRABER e ATKINSON, 2007).

O  $\alpha$ -tocoferol reage com um radical peroxil por transferência de hidrogênio, então a transferência de prótons forma um hidroperóxido lipídico e o radical tocoferoxil, conforme abaixo (figura 12):

Figura 12: Reações *scavenger* do  $\alpha$ -tocoferol.



Fonte: Adaptado de WANG e QUINN (1999).

Nas membranas, o poder antioxidante real do  $\alpha$ -tocoferol é decorrente à sua capacidade de doação de átomos de hidrogênio, à sua localização (penetração) e movimento dentro da membrana, além da eficiência da reciclagem do radical tocoferoxil por redutores citosólicos, como o ácido ascórbico e a GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). A proteção da vitamina E nas membranas é importante para o bom funcionamento da barreira endotelial vascular, para a redução de estímulos para a proliferação de miócitos na camada média, e para diminuição dos fatores quimiotáticos para os monócitos (STEPHENS et al., 1996), evitando danos ao endotélio causados pela infecção com *T. cruzi*. O papel protetor da vitamina E para o endotélio, é suportada por uma ação estimulante sobre a síntese de prostaglandina ( $PGI_2$ ), um agente vasodilatador e anti-agregação plaquetária (KAWACHI et al., 1994).

Dados epidemiológicos sobre suplementação com vitamina E têm demonstrado que ela possui propriedade antioxidante na diminuição de risco de eventos cardiovasculares (DANDONA et al., 2007; GEY e PUSKA, 1989). É sabido que as ERO e ERN desempenham um papel fundamental na patogênese de uma variedade de doenças cardiovasculares e o aumento dos seus níveis contribui para a condição de estresse oxidativo e para a progressão da aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca além de outras doenças (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006; DANDONA et al., 2007). Block e colaboradores

(2008) mostraram que doses de 800UI de vitamina E/dia são capazes de diminuir a concentração plasmática de isoprostanos, um marcador conhecido de peroxidação lipídica em doenças humanas, pois níveis elevados deste marcador sugerem papel importante da geração de radicais livres na patofisiologia das doenças vasculares.

As miocardites chagásicas sustentam lesões oxidativas onde macrófagos e neutrófilos são ativados para controlar a infecção por *T. cruzi* constituindo uma importante fonte de estresse oxidativo no hospedeiro (WEN et al., 2010). Além disso, verificaram que o estresse oxidativo do miocárdio é dependente da produção mitocondrial de ERO, durante o curso da doença de Chagas (WEN et al., 2010).

Estudos epidemiológicos observacionais realizados nas décadas de 80 e 90 sugeriram que pessoas que se alimentam com uma dieta rica em vitamina E,  $\beta$ -caroteno e vitamina C, têm uma menor incidência de desenvolver doença isquêmica do coração (DIC) (MARCHIOLI et al., 2001). Outros estudos epidemiológicos têm relatado que as populações com maiores consumos e também os maiores níveis séricos de vitamina E, têm menor risco de desenvolver esse tipo de doença (CLARKE e ARMITAGE, 2002).

A evidência epidemiológica mais confiável vem dos estudos de *coorte* prospectivo, onde os dados sobre o consumo alimentar e avaliação dos níveis séricos de vitamina, utilizando amostras de sangue, são coletadas antes do início da doença. Esses dados têm mostrado uma associação inversa entre o risco de DIC e a ingestão dietética de vitamina E (SALONEN et al., 1985). Normalmente, esses estudos prospectivos têm demonstrado que os indivíduos com ingestão de vitamina E têm riscos cerca de 30-40% menor de desenvolverem doenças cardiovasculares. As evidências epidemiológicas são a favor da vitamina E, seguidos de suplementação com  $\beta$ -caroteno e em menor relação com uso de vitamina C (CLARKE e ARMITAGE, 2002).

No estudo *Nurses' Health Study* (1993), os pesquisadores mostraram que o uso de suplementação com vitamina E, por pelo menos dois anos, reduziu o risco de doenças cardiovascular. Contudo também verificaram que doses pequenas, ou seja, menores do que 1.000 UI/dia, e de curta duração, seriam insuficientes para tal função (STAMPFER et al., 1993).

Kushi e colaboradores (1996) estudaram 34.486 mulheres na pós-menopausa, nos EUA e encontraram que a ingesta de vitamina E foi inversamente associado com o risco de morte por doença cardiovascular (KUSHI et al., 1996). Num estudo realizado pelo *Health Professionals' Follow-up Study*, com 39.910 profissionais de saúde do sexo masculino

com idades entre 40-75 anos, e que foram acompanhados por 4 anos, mostrou que o risco de eventos cardiovasculares para os homens que consumiam mais de 60 UI/dia de vitamina E era menor em comparação com aqueles que consumiam menos de 7,5 UI/dia dessa vitamina (RIMM et al., 1993).

Outro estudo realizado pelo *Finnish Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study (ATBC study)*, realizado com fumantes do sexo masculino, analisaram o efeito protetor da suplementação com o  $\alpha$ -tocoferol acrescido de  $\beta$ -caroteno. Esses indivíduos tiveram uma ligeira diminuição, não-significativa, na incidência de câncer de próstata em comparação com o grupo placebo (HEINONEN et al., 1998).

Os estudos epidemiológicos discutidos acima sugerem uma associação inversa entre a vitamina E e eventos coronarianos, entretanto Vivekananthan e colaboradores (2003) analisaram sete ensaios clínicos de tratamento com vitamina E e oito com tratamento com  $\beta$ -caroteno e mostraram que a vitamina E não reduziu o risco de morte por doenças cardiovascular, enquanto que o  $\beta$ -caroteno foi associado a um aumento ligeiro, mas significativo, no risco de morte por eventos cardiovasculares (VIVEKANANTHAN et al., 2003).

Outro estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, realizado pelo *Physicians' Health Study II (PHS II)* mostrou que não houve correlação entre suplementação com vitaminas E e C e prevenção de eventos cardiovasculares. Foram 14. 641 médicos, do sexo masculino, com idade de 50 anos ou mais, incluindo 754 homens com doenças cardiovasculares (5,1%), acompanhados por 10 anos. Os pacientes receberam 400 UI de vitamina E sintética em dias alternados e 500 mg de vitamina C diariamente. Ao final deste estudo, os pesquisadores mostraram que esses dados não fornecem suporte para o uso desses suplementos para a prevenção da doença cardiovascular em homens de meia-idade e idosos (SESSO et al., 2008). Entretanto em uma carta ao editor da revista *Free radical Biology and Medicine*, L. Jackson Roberts II, destaca que um trabalho e um comentário relacionado, publicado em 2007 por Roberts e colaboradores (2007), que definiu a farmacologia clínica de vitamina E em humanos, não foram discutidos. Eles descobriram que as doses de vitamina E superiores a 400 UI, a cada dois dias são necessários para suprimir o estresse oxidativo sistêmico elevado em seres humanos. Além disso, RRR- $\alpha$ -tocoferol, o tipo de vitamina E testados no estudo Roberts, tem o dobro da biodisponibilidade de vitamina sintética avaliado em PHS II e,

portanto, a dose e o tipo de vitamina E, testado no PHS II não teria sido esperado na redução do nível de estresse oxidativo causado pela doença cardiovascular (ROBERT et al., 2009).

Existe um consenso entre os especialistas de que a vitamina E é segura em níveis de até 800 UI/dia, e provavelmente, o dobro desta dose (PRYOR, 2000). Em uma revisão realizada por Kappus e Diplock (1992) sobre a segurança de vitamina E, os autores concluem que não existem efeitos colaterais até 800 equivalentes de alfa-tocoferol ( $\alpha$ -ET) o que corresponderia a 1200 UI, e que a faixa terapêutica estaria entre 200-1600  $\alpha$ -ET. Ainda, os efeitos colaterais são apenas previstos em doses de 1000 a 3000  $\alpha$ -ET/dia (correspondente a cerca de 1.500 UI/dia), que consistem em queixas gastrointestinais, creatinúria e comprometimento da coagulação sanguínea, que são, no entanto, geralmente não graves, e desaparecem rapidamente na redução da dose ou na descontinuidade da administração de vitamina E.

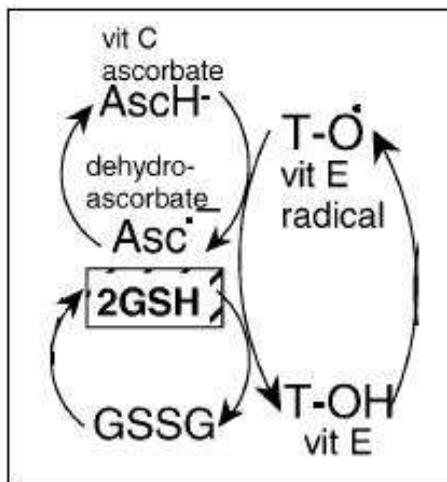
Assim, os níveis de vitamina E consumida como resultado de suplementação com 400 ou mesmo 800 UI/dia estão dentro dos limites seguros. Contudo, estudos mostraram que a vitamina E diminuiu a adesão de plaquetas e os níveis de suplementação em doses acima de 400 UI/dia, podendo aumentar o tempo de coagulação (KIM e WHITE, 1996). Portanto, pode ser prudente para aqueles indivíduos que tomam anticoagulantes, ter monitoramento periódico de seus tempos de coagulação.

Ainda relacionado à importância dos antioxidantes endógenos, temos o principal tiol endógeno, o tripeptídeo glutatona reduzida (GSH) ( $\delta$ -glutamil-cisteinil-glicina), um antioxidante não-enzimático hidrossolúvel intracelular considerado o principal tampão redox tiol-dissulfeto das células (CHANTRY et al., 1999). A GSH é abundante tanto no citosol (1-11 mM), núcleo (3-15 mM), como nas mitocôndrias (5-11 mM), sendo o principal antioxidante solúvel nestes compartimentos celulares (KOSOWER e KOSOWER, 1978; MEISTER, 1981; FAHEY e NEWTON, 1983) e presente em todos os organismos que utilizam o metabolismo oxidativo (WILHELM FILHO et al., 2002).

O papel protetor principal da GSH contra o estresse oxidativo a envolve como um cofator para várias enzimas detoxificantes, como a GPx e a GST, como participante do transporte de aminoácidos através das membranas plasmáticas, como seqüestradora diretamente do  $\cdot$ OH e do oxigênio singlete e como regeneradora de importantes antioxidantes, como as vitaminas C e E, de volta às suas formas reduzidas e ativas. A

GSH pode reduzir diretamente o radical tocoferoxil da vitamina E, ou indiretamente via redução de semidehidroascorbato para ascorbato (figura 13) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Figura 13: Etapas da glutatona na regeneração de vitamina E e C.

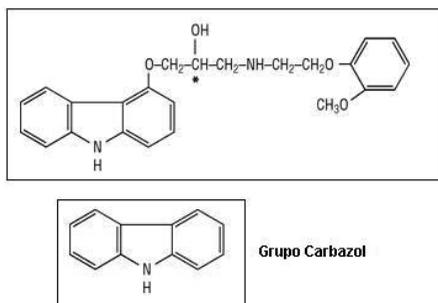


Fonte: Adaptado de VALKO et al. (2006).

### 1.9.2 Carvedilol

O carvedilol é uma ariloxipropanolamina, cujo nome químico é 1-carbazolil-4-oxil-3-2-metoxifenoxietil-amino-propanol-2, amplamente usado como antagonista  $\beta$ -adrenérgico (figura 14) (OLIVEIRA et al., 2001). Contém um anel aromático conectado a uma estrutura carbazol por uma cadeia metoxifenoxietil-amino-2-propanol. Em adição a esta atividade  $\beta$ -bloqueadora, o carvedilol tem fraca propriedade antagonista  $\alpha$ -1-adrenérgica (FEUERSTEIN e RUFFOLO, 1996).

Figura 14: Estrutura química do carvedilol.



Fonte: <http://dailymed.nlm.nih.gov>

O carvedilol é rapidamente absorvido após administração de dose oral, atingindo pico plasmático entre 1 ou 2 horas (MORGAN, 1994). O tempo de meia-vida plasmático do carvedilol é cerca de 7-10 horas na maioria dos indivíduos, assim o fármaco pode requerer administração 2 vezes ao dia. No plasma, aproximadamente 98% do fármaco liga-se predominantemente à albumina (MORGAN, 1994). É quase exclusivamente metabolizado pelo fígado, e menos de 2% do fármaco original é encontrado na urina (FRISHMAN, 1998). Alguns dos metabólitos do carvedilol têm atividade  $\beta$ -bloqueadora, e um deles, o 4-hidroxifenil é aproximadamente 13 vezes mais potente que o carvedilol nesta ação. Aproximadamente 60% desses metabólitos são secretados na bile e excretados nas fezes (FRISHMAN, 1998).

Em contraste com outros  $\beta$ -bloqueadores que demonstraram aumentar triglicédeos (TG) e diminuir a lipoproteína de alta densidade (HDL), o carvedilol parece ter efeito neutro ou benéfico na atividade da lipase lipoprotéica e nos níveis de TG e HDL (GIUGLIANO et al., 1997; BAKRIS et al., 2004).

Os primeiros estudos sobre as propriedades antioxidantes com este composto indicaram que ele é mais potente na inibição na produção do  $\cdot\text{OH}$  do que outros antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos (YUE et al., 1992), sendo capaz de prevenir oxidação lipídica (YUE et al., 1992). O efeito antioxidante tem sido atribuído largamente à sua estrutura carbazol, e seus metabólitos hidroxilados têm capacidade antioxidante maior quando comparados ao próprio carvedilol (YUE et al., 1992). A estrutura química do carvedilol contém um centro quiral (figura 14), resultando em dois enantiômeros. Embora ambos enantiômeros sejam igualmente potentes no antagonismo do  $\alpha$ -1-adrenoreceptor vascular, o

efeito  $\beta$ -bloqueador é exercido apenas pela forma (S)-carvedilol (EL-SHERIF e TURITTO, 2005).

O carvedilol é usado para tratar humanos com IC e provou ser efetivo em inúmeros estudos clínicos (SANDERSON et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001). Comparando indivíduos com IC, o carvedilol parece ser ligeiramente superior que outros  $\beta$ -bloqueadores em prolongar a vida e reduzir os eventos clínicos, cujo mecanismo ainda permanece incerto, o que poderia ser devido à sua capacidade antioxidante (POOLE-WILSON et al., 2003).

O efeito antioxidante do carvedilol tem sido relatado em vários experimentos, incluindo estudos com células de membrana do miocárdio, onde o carvedilol inibiu a LPO iniciada pelas ERO, e preveniu dano oxidativo em células endoteliais, células do músculo liso e células neuronais (DULIN e ABRAHAM, 2004). As propriedades antioxidantes do carvedilol, e sua relação com a fosforilação oxidativa mitocondrial, da homeostase do cálcio e obtenção de energia, tornam este fármaco o único  $\beta$ -bloqueador a ter a sua utilização vantajosa em patologias cardíacas associadas ao estresse oxidativo (GÁSPÁROVÁ et al., 2010). O potencial antioxidante do carvedilol tem sido relacionado com a habilidade de se ligar-se a íons Fe (III) e Cu (II), impedindo a oxidação de lipídeos, proteínas e da fração lipoproteica LDL, mediadas por estes metais. Em adição, a natureza lipofílica do carvedilol melhora a sua concentração em membranas lipídicas e na LDL, fornecendo proteção antioxidante específica (TADOLINI e FRANCONI, 1998).

Sua atividade antioxidante é 10 vezes maior que a vitamina E, porém alguns de seus metabólitos são cerca de 50 a 100 vezes mais potentes do que o próprio carvedilol. O carvedilol protege contra as ERO numa concentração entre 0,1-100 mM, que comportam doses entre 25-50 mg/dia e que foram utilizadas neste trabalho (FERRARI et al., 1999). A capacidade do carvedilol em preservar os antioxidantes endógenos foi avaliada em homogenatos de cérebro, onde o  $\cdot\text{OH}$  induziu rápida depleção (80%) de  $\alpha$ -tocoferol. Neste modelo, o carvedilol preservou a vitamina E (YUE et al., 1992). Em células endoteliais expostas ao estresse oxidativo, o carvedilol preveniu a perda de GSH induzida por ERO (YUE et al., 1993).

Estudos em modelo experimental de isquemia de miocárdio têm indicado que os leucócitos polimorfonucleares são uma das principais fontes de ERO, incluindo  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  e HOCl, gerados na região da isquemia (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). O tratamento com o carvedilol mostrou inibir a liberação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  desses leucócitos

polimorfonucleares ativados (YUE et al., 1992). A interação física do carvedilol com modelo de membrana lipídica foi estudada usando técnica de fluorescência e calorimetria diferencial (WU et al., 2007). Esses estudos mostraram que o carvedilol liga-se à membrana lipídica com certa afinidade. A localização do carvedilol na membrana poderia aumentar a inibição da cadeia de LPO. Estudos com análise calorimétrica diferencial sugerem que o carvedilol tem um efetivo fluidificante que poderia alterar a mobilidade das ERO na membrana e o efeito da taxa de LPO (YUE et al., 1999), pois o carvedilol tem uma bem definida localização nas membranas. Com esta técnica, o grupo carbazol do carvedilol foi encontrado dentro do núcleo dos hidrocarbonetos lipídicos adjacentes às cadeias acilfosfolipídicas e esta localização na membrana, facilitaria a interação hidrofóbica com as cadeias acilfosfolipídicas e fornece potente atividade antioxidante, como um resultado de um aprisionamento das ERO pela doação de elétrons, rompendo assim, a cadeia de reações da LPO (HEINECKE et al., 1986).

A atividade antioxidante do carvedilol poderia também ser devido a um mecanismo de ação adicional. Muito provavelmente isto esteja associado com o fato de que o carvedilol cause uma diminuição da geração de ERO nos eritrócitos, indiretamente afetando o menor consumo de enzimas antioxidantes (KOWALSKI et al., 2008).

Em um trabalho realizado por Wu e colaboradores (2007), o carvedilol demonstrou atenuar o dano oxidativo no DNA indicado pelo marcador de dano o aducto, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-dG) em pacientes hipertensos, sugerindo relevância clínica do seu efeito antioxidante (WU et al., 2007). Lee e colaboradores (2005) realizaram um estudo piloto com tratamento de pacientes hipertensos com carvedilol e os resultados mostraram que o dano oxidativo ao DNA ocorre em pacientes hipertensos mais do que em indivíduos com pressão arterial normal, e que o dano oxidativo ao DNA é significativamente diminuído pela administração de carvedilol na dose terapêutica (12,5 a 25 mg/dia) (LEE et al., 2005). Devido à capacidade antioxidante do carvedilol e o possível papel do estresse oxidativo como indutor de apoptose, também tem sido hipotetizado que o carvedilol poderia proteger os miócitos e as células endoteliais por inibição da apoptose (FERRARI et al., 1999).

Tendo em vista as considerações acima, a ação do carvedilol pode ser particularmente importante na insuficiência cardíaca congestiva, comumente na cardiopatia chagásica, uma condição clínica na qual o uso de  $\beta$ -bloqueadores já se encontra bem estabelecido.

## 2.0 JUSTIFICATIVA DO PROJETO

A presente proposta é decorrência de continuidade do projeto original “Efeitos de derivados imidazólicos com ação antihelmíntica e antichagásica nas defesas antioxidantes e na expressão do citocromo P-450 1A1”, que vem sendo aprovado pelo CNPq desde 1999, através de bolsa de produtividade ao seu coordenador (orientador deste projeto), tendo como principal colaborador, o Dr. Roberto Coury Pedrosa da UFRJ, além de colaboradores da própria UFSC. Este projeto, também faz parte da linha de pesquisa do Dr. Roberto Coury Pedrosa registrada no CNPq desde o ano de 2001, intitulada “Mecanismos causantes da progressão do dano miocárdio na doença de Chagas com perspectiva prognóstica e terapêutica: disfunção autonômica - marcadores precoces”.

Na primeira etapa dessa linha de investigação, o primeiro subprojeto mostrou que o fármaco tripanocida, benznidazol (BZN) possui capacidade de induzir a expressão do sistema CYP1A1 e da GST, indicando, pelo seu potencial gerador de ERO no hospedeiro, a possibilidade de gerar compostos carcinogênicos derivados do processo de biotransformação (PEDROSA et al., 2001). De modo análogo, foi estudada posteriormente em um segundo subprojeto, a ação de derivados imidazólicos com ação anti-helmíntica, onde foi possível verificar que o albendazol provoca um estresse oxidativo mais acentuado que o mebendazol (LOCATELLI et al., 2004).

Em seqüência, outro subprojeto avaliou o *status* antioxidante e o estresse oxidativo no sangue de pacientes com cardiopatia chagásica crônica nos seus vários estágios evolutivos, onde os resultados evidenciaram um acentuado estresse oxidativo diretamente proporcional ao comprometimento da doença, ou seja, pacientes em estágios mais avançados apresentaram diminuição quase generalizada do seu *status* antioxidante. Estes dados sugeriram fortemente que o *status* antioxidante destes pacientes está gradativamente comprometido com a extensão da doença, ficando expostos a progressivas condições de estresse oxidativo (de OLIVEIRA et al., 2007).

Cerca de dois anos após essa primeira avaliação nos pacientes chagásicos crônicos, num subprojeto seqüencial, foi verificado novamente o *status* antioxidante desses mesmos pacientes, onde os resultados mostraram que os níveis das enzimas mantiveram-se diminuídos (MAÇAO et al., 2007), confirmando dados anteriores (de

OLIVEIRA et al., 2007) de uma progressiva diminuição da capacidade antioxidante do sangue com a evolução da doença de Chagas. Novamente, o grupo de pacientes em estágio mais avançado da doença, exibiu menor compensação antioxidante, confirmando uma deficiência mais acentuada daqueles pacientes em manter estas defesas face ao estresse oxidativo (MAÇAO et al., 2007).

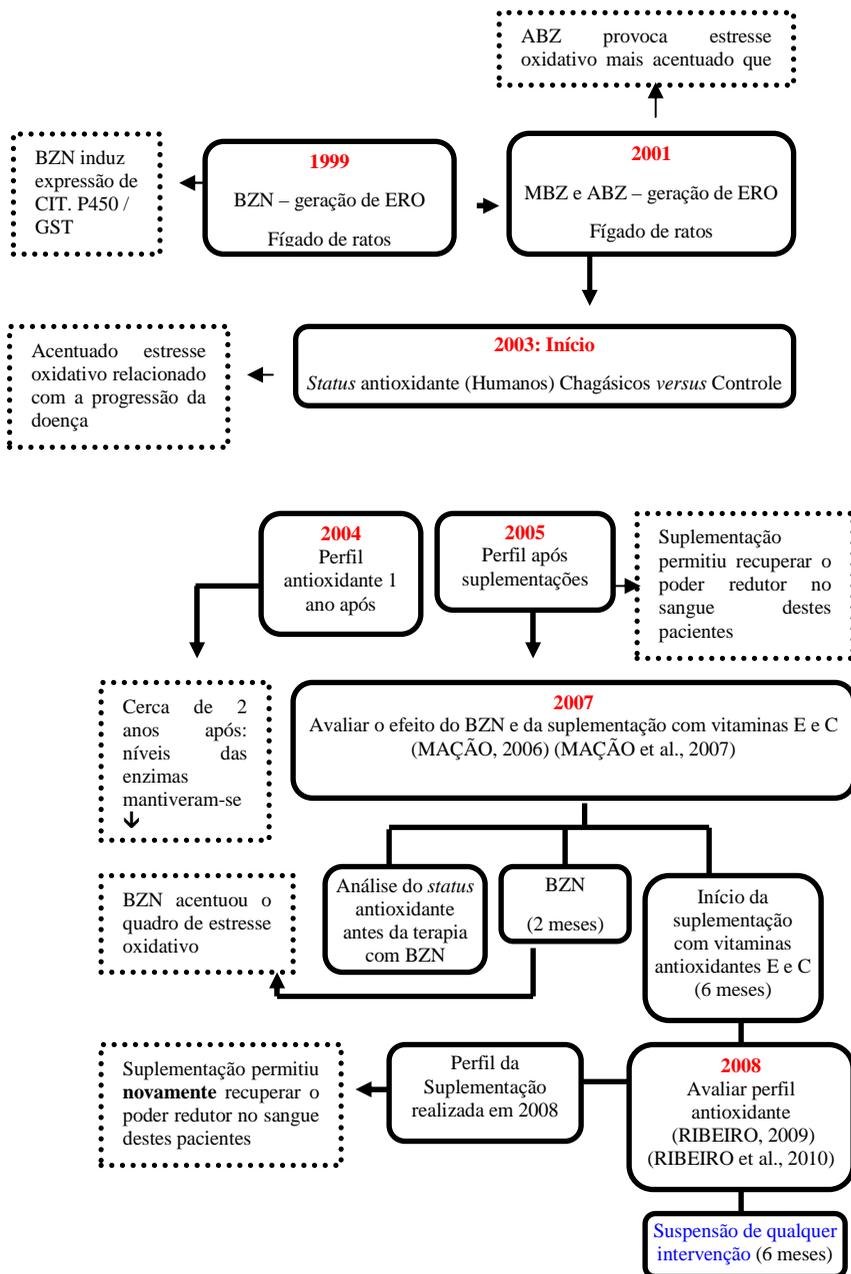
O conceito de que o tratamento parasiticida possa influenciar o curso da doença de Chagas, vem ganhando maior subsídio (MARNETTO et al., 2007). Embora haja comprovação da importância do parasito (ou seus antígenos) na patogênese da miocardite chagásica crônica (HIGUCHI et al., 2003), a observação da regressão total ou parcial do processo inflamatório tem sido mostrada em animais tratados com drogas antiparasitárias (GARCIA et al., 2005) e terapia antioxidante (PEDROSA et al., 2001; RIVERA et al., 2002; MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010).

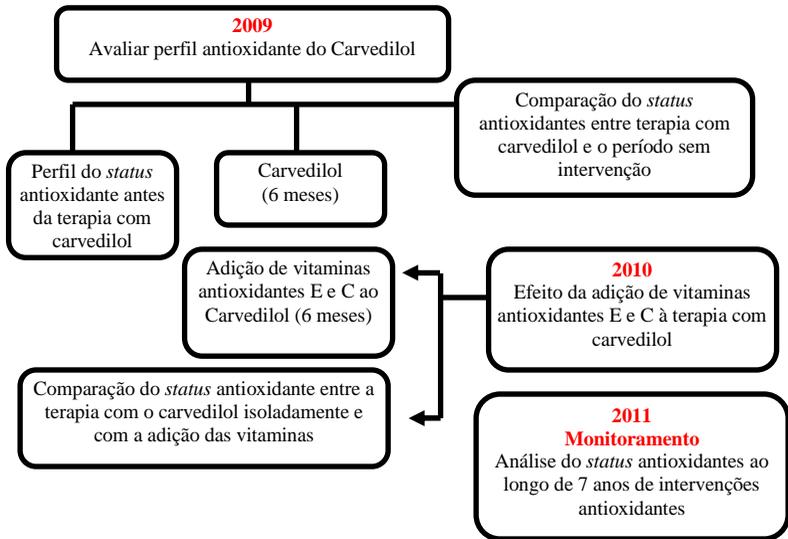
Mais recentemente, nosso grupo realizou um estudo envolvendo a administração do BZN (5mg/kg/dia; 2 meses) nestes mesmos pacientes chagásicos crônicos seguida da mesma terapia antioxidante (Vitaminas E e C; 6 meses), revelando que o BZN acentuou o quadro de estresse oxidativo no sangue, enquanto que a suplementação novamente permitiu recuperar o poder redutor sanguíneo dos pacientes (RIBEIRO et al., 2010).

Dando continuidade aos estudos anteriores do nosso grupo acima mencionado e que constituíram cinco defesas de mestrado no Programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC (PGFAR) (de BEM, 2001; LOCATELLI, 2001, de OLIVEIRA, 2004; MAÇAO, 2006; RIBEIRO, 2009), e como conclusão do projeto original indagou-se sobre a eficácia da ação do carvedilol de forma isolada ou da combinação da ação do carvedilol com a suplementação de antioxidantes nutricionais em intervir de modo sinérgico no processo oxidativo e inflamatório nestes mesmos pacientes chagásicos crônicos.

Adicionalmente, se a persistência da atenuação verificada no quadro de estresse oxidativo e do processo inflamatório constatados nos trabalhos anteriores, também estaria presente na combinação da suplementação antioxidante (vitaminas E e C) e do carvedilol, após um período relativamente longo de ausência de qualquer intervenção terapêutica, apresentadas na forma de fluxograma segundo figura 15 abaixo:

Figura 15: Fluxograma das etapas envolvidas neste projeto.





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- a) Verificar o efeito isolado do carvedilol, durante 6 meses, e o efeito combinado com a terapia de suplementação de vitaminas antioxidantes após período de 6 meses, do sangue de pacientes chagásicos crônicos com cardiopatia em diferentes estágios evolutivos da doença.
- b) Monitorar os distintos parâmetros analisados ao longo de 7 anos de intervenções antioxidantes intercaladas, no sentido de analisar a eventual persistência da atenuação do estresse oxidativo no sangue destes pacientes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### **a) Com relação à intervenção com Carvedilol e Vitaminas E e C:**

- Verificar as diferenças das defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, GPx, CAT, GST e GR) no sangue de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, antes da administração do carvedilol (6 meses)
- Verificar as diferenças das defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, GPx, CAT, GST e GR) no sangue de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, após administração do carvedilol (6 meses)
- Verificar as diferenças das defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, GPx, CAT, GST e GR) no sangue de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, após a associação desse fármaco com vitaminas E e C (6 meses)
- Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não-enzimáticas (GSH e vitamina E), presentes respectivamente no sangue e plasma desses pacientes, antes da administração do carvedilol (6 meses), e após sua administração
- Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não-enzimáticas (GSH e vitamina E), presentes respectivamente no sangue e plasma desses pacientes, após a associação do carvedilol com a terapia com vitaminas E e C (6 meses)

- Avaliar indicadores de estresse oxidativo como proteínas carboniladas (PC), bem como nos níveis de lipoperoxidação (concentração de TBARS), presentes no plasma desses pacientes, antes da administração do carvedilol (6 meses), e após a sua administração (6 meses)
- Avaliar indicadores de estresse oxidativo como proteínas carboniladas (PC), bem como nos níveis de lipoperoxidação (concentração de TBARS), presentes no plasma desses pacientes, após a associação de carvedilol com as vitaminas E e C (6 meses)
- Avaliar os indicadores de inflamação como óxido nítrico, mieloperoxidase e adenosina deaminase no soro destes pacientes, antes da administração do carvedilol (6 meses), e após a sua administração (6 meses)
- Avaliar os indicadores de inflamação como óxido nítrico, mieloperoxidase e adenosina deaminase no soro destes pacientes, após a associação de carvedilol com as vitaminas E e C (6 meses).

**b) Com relação ao monitoramento de 7 anos de intervenções antioxidantes:**

- Realizar uma análise temporal do perfil dos diferentes marcadores de estresse oxidativo a longo de 7 anos de acompanhamento no sangue destes mesmos pacientes, particularmente do efeito da persistência ao longo prazo das intervenções antioxidantes.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ESTRATIFICAÇÃO DA AMOSTRA – INTERVENÇÃO: CARVEDILOL E VITAMINAS E/C**

#### **4.1.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo de intervenção terapêutica, prospectivo, de uma amostra pertencente a uma coorte aberta, constituída de pacientes acompanhados no Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho HUCFF-UFRJ..

#### **4.1.2 Seleção de pacientes**

A amostra do estudo foi composta de pacientes que se encontravam na fase crônica da doença forma cardíaca, definida através de exame eletrocardiográfico e ecocardiograma, que tivessem seguido o fluxograma de atendimento do ambulatório de doença de Chagas do HUCFF-UFRJ de forma espontânea, segundo os seguintes critérios:

##### **4.1.2.1 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos somente os pacientes que tiveram o estresse oxidativo estudado previamente no ano de 2003 em diante, com idade entre 21 a 70 anos acompanhados ativa e regularmente no ambulatório de cardiopatia chagásica do Serviço de Cardiologia do HUCFF com diagnóstico de doença de Chagas, e que mantiveram os mesmos hábitos alimentares. Somente foram incluídos pacientes chagásicos crônicos sem outras doenças associadas, afastados da zona endêmica há mais de 20 anos. A inclusão ou não no projeto foi de espontânea responsabilidade do paciente, quando este assinava o termo de consentimento livre e esclarecido apresentado por uma pessoa sem interesse direto no projeto (profissionais da enfermagem participantes da equipe do Dr. Roberto Coury Pedrosa-HUCFF-UFRJ).

#### 4.1.2.2 Critérios de Exclusão

*A - Estados fisiológicos, condições médicas prévias e/ou concomitantes:*

- pacientes que não completaram o protocolo inicial de admissão;
- pacientes tratados previamente com carvediol;
- pacientes com dados clínicos ou laboratoriais sugestivos de doença renal ou hepática grave ou disfunção tireoideana;
- pacientes com história prévia de doença pulmonar obstrutiva crônica (todas as formas), alcoolismo crônico ou tabagismo;
- pacientes portadores de anemia crônica, obesidade, cardiopatia hipertensiva, diabetes mellitus ou outra doença sistêmica;
- presença de outras afecções, tais como infecções ou neoplasias, desordens auto-imunes, doença neurodegenerativa;
- pacientes com sinais, sintomas ou história clínica de cardiopatia isquêmica confirmada após investigação.
- pacientes com conhecida ou suspeita de hipersensibilidade a fármacos;
- história de acidente vascular cerebral nos últimos 6 meses;
- pacientes que estavam participando de outros estudos;

*B- Critérios de exclusão cardiovascular*

- pressão sistólica mantida abaixo de 90mmHg e/ou sintomas de hipotensão arterial, tais como síncope, tonteira, fraqueza;
- história de infarto agudo do miocárdio nos últimos 3 meses;
- pacientes portadores de doenças orovalvares;
- fatores associados causando insuficiência cardíaca: hipo ou hipertireoidismo (incluindo tirotoxicose), anemia, hipertensão arterial de difícil controle;
- arritmias cardíacas graves que poderiam causar instabilidade hemodinâmica: taquiarritmias atriais (Flutter e/ou fibrilação rápida) ou ventriculares, bloqueios de 2° e 3° grau.

*C- Critérios biológicos de exclusão*

- níveis de creatinina sérica > 2 mg/100ml;
- níveis de potássio sérico > 5,5 mEq/L ou < 3,5 mEq/L;
- hemoglobina < 9 g%;

- níveis de glicemia > 147 mg/dl em dois exames consecutivos;
- hiponatremia ( $\text{Na}^+ < 130 \text{ mEq/L}$ ).

#### 4.1.3 Diagnóstico sorológico da doença de Chagas

Realizado em todos os pacientes encaminhados ao ambulatório, mesmo se trouxessem resultados anteriores externos, através da pesquisa de anticorpos *anti-T. cruzi*, utilizando 2 métodos com princípios metodológicos diferentes. A diluição considerada reação sorológica positiva foi a estabelecida pelo laboratório centro de referência de Manguinhos-FIOCRUZ/RJ. O paciente soropositivo foi aquele com dois testes sorológicos positivos, em duas coletas diferentes. No caso de dúvidas entre os métodos, as amostras de soro foram re-testadas com a imunofluorescência e, persistindo a discrepância, foi considerado o resultado deste método. Estes exames foram realizados pelo laboratório de imunologia do HUCFF-UFRJ. O sangue foi coletado sempre pela mesma pessoa, no mesmo dia da semana, na parte da manhã e em jejum.

#### 4.1.4 Classificação da CCC segundo Los Andes modificada por Xavier

Vários sistemas de classificação foram desenvolvidos na cardiopatia chagásica. As classificações de Kuschnir e de *Los Andes* são freqüentemente usadas em estudos longitudinais (KUSCHNIR et al., 1985; CARRASCO et al., 1990; BENCHIMOL BARBOSA, 2007). Devido à diversidade de apresentações clínicas, fica um tanto difícil chegar-se a um consenso sobre a melhor forma de estratificação de risco na CCC (STORINO, 1994).

O presente trabalho adotou a classificação de *Los Andes* modificada, a qual descreve da seguinte forma os diferentes graus de comprometimento (BERN et al., 2007):

Grupo I: Pacientes com sorologia positiva, assintomáticos e sem evidências clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de cardiopatia. De acordo com os achados do ecocardiograma (ECG) (ventriculograma), estes pacientes foram subdivididos por sua vez, nos subgrupos IA e IB. No subgrupo IA se agruparam os pacientes com ventriculograma normal, classificados como casos de “infecção chagásica sem lesões cardíacas”. No subgrupo IB foram incluídos aqueles chagásicos com evidências de assinergia em um ou mais segmentos do ventrículo esquerdo (usualmente no ápice e região ínfero-

lateral esquerda). Estes pacientes foram classificados como portadores de cardiopatia crônica na fase “incipiente”.

Grupo II: Pacientes com sorologia positiva, assintomáticos ou não, com anormalidades no ECG convencional de repouso. Estas foram usualmente extra-sístoles ventriculares e/ou distúrbios na condução átrio-ventricular (AV) ou intraventriculares, excetuando os bloqueios incompletos do ramo direito e esquerdo e as alterações inespecíficas da repolarização ventricular. Este grupo foi classificado como “chagásicos com o ECG anormal e sem insuficiência cardíaca”.

Grupo III: Pacientes com sorologia positiva e evidência passada ou presente de insuficiência cardíaca congestiva, classificados como “em fase de insuficiência miocárdica”.

No projeto inicial deste trabalho (2003) foi utilizada a antiga classificação de Los Andes que preconizava a divisão em 4 grupos de forma distinta à apresentada no presente trabalho e atualmente usada na literatura pertinente, entretanto, com a mesma fundamentação clínica. Os pacientes foram agrupados também conforme o grau de comprometimento cardíaco, da seguinte forma: grupos I, II, III e IV, correspondendo à atual que é constituída pelos grupos IA (antigo I) e IB (antigo II), II (antigo III) e III (antigo IV).

#### **4.1.5 Protocolo de Avaliação**

##### **4.1.5.1 Exame Clínico**

A avaliação clínica foi realizada para permitir a verificação de sinais e sintomas cardiovasculares e digestivos, compatíveis com a doença de Chagas, assim como para fazer o diagnóstico diferencial com outras cardiopatias ou doenças não-cardíacas que afetassem o sistema cardiovascular. Os dados coletados foram registrados em um questionário-padrão (apêndice 1). Todos os pacientes responderam a um questionário relacionado à atividade física e hábitos alimentares (apêndice 2). Os pacientes foram examinados por uma única pessoa durante as consultas ambulatoriais (Dr. Roberto Coury Pedrosa).

Os hábitos alimentares dos pacientes foram checados por 3 vezes em tempos diferentes através de questionário (apêndice 2) e uma quarta vez através de um relatório alimentar descrito pelo paciente. Somente foram considerados para o estudo aqueles pacientes que tiveram as respostas coincidentes entre os questionários e o descritivo. Ao longo do presente estudo foram checados pelo menos mais 2 vezes os hábitos alimentares dos mesmos.

À medida que os pacientes eram incluídos no presente estudo, os mesmos fizeram num período de 1 semana uma avaliação laboratorial incluindo: hemograma, glicemia, uréia e creatinina, ácido úrico, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídios, sódio, cálcio e potássio, proteínas totais e frações, provas de função hepática e tireoidiana, exame parasitológico de fezes e análise de urina para elementos anormais e sedimentos. Estes exames foram realizados ao longo do presente estudo quando necessários clinicamente.

Nos 30 primeiros dias após a inclusão eram realizados os seguintes exames: o ECG convencional de repouso com 12 derivações; telerradiografia de tórax pósterio-anterior e perfil, o ecocardiograma uni e bidimensional com *Doppler* e o estudo de estresse oxidativo. Todas as informações foram obtidas, diretamente dos pacientes ou de seus prontuários. Do mesmo modo, ao longo do estudo, esses exames foram repetidos anualmente e quando se fizeram necessários, ou seja, com mudança clínica do paciente, excetuando o estudo de estresse oxidativo que foi realizado sempre após as intervenções ocorridas. As defesas antioxidantes e os biomarcadores de estresse oxidativo foram determinados em três momentos do estudo nos respectivos grupos: uma antes da intervenção com carvedilol e 2 após a administração do carvedilol (6 meses) e em seguida após administração conjunta de carvedilol com as vitaminas E e C por mais 6 meses (carvedilol dose de 12,5 mg, 3 vezes ao dia por 6 meses, vitamina E na dose de 800UI/dia e vitamina C 500mg/dia em dose única por 6 meses).

As medicações foram conforme estabelecidos pela Diretriz Brasileira referente a pacientes chagásicos, o carvedilol foi administrado na dose de 12,5mg, 3 vezes ao dia, desde o primeiro dia até o último dia do estudo, sendo estes pacientes acompanhados com ECG, Holter e consulta médica a cada etapa da coleta de sangue.

Em todos os grupos, foram observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial. Esta etapa foi de responsabilidade do médico cardiologista Dr. Roberto Coury Pedrosa, e foi realizada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Ocorreram visitas médicas a cada etapa de 6 meses conforme o protocolo até quando terminou o presente estudo (após tratamento com vitaminas E, C e carvedilol).

#### 4.1.5.2 Terapia farmacológica

As intervenções diagnósticas e terapêuticas seguiram as recomendações das diretrizes específicas para acompanhamento e tratamento das complicações da cardiopatia chagásica crônica, atualizadas pelo Consenso Brasileiro de doença de Chagas no que refere à insuficiência cardíaca. No grupo de pacientes com ECG alterado foi utilizada inicialmente medicação inibidora do sistema renina-angiotensina (IECA). O tratamento com IECA foi iniciado com 25 mg/dia ajustado semanalmente até a dose máxima 150 mg/dia, ou até a dose clinicamente tolerada (no caso de tosse ou angioedema, o captopril foi substituído pelo losartan 50mg/dia); nos pacientes com hipotensão arterial sintomática, a dose do captopril foi diminuída até tornar-se assintomático. A terapia com digital, furosemida e/ou hidroclorotiazida foi usada quando havia clínica de insuficiência cardíaca descompensada, sendo suspensos com a melhora dos sintomas. Amiodarona foi prescrita para aqueles com relato de síncope e TV monomórfica não-sustentada, particularmente associada à disfunção de VE moderada ou grave (FE < 45%). Marcapasso foi indicado quando havia bradiarritmia grave.

#### 4.1.5.3 Eletrocardiograma (ECG)

O ECG foi realizado com 12 derivações, em repouso, analisado conforme os critérios da NYHA (*New York Heart Association*), utilizando-se o código de Minnesota (ROSE et al., 1982) modificado para a cardiopatia de chagásica (MAGUIRE et al., 1982), a qual foi definida segundo os critérios da TDR-OMS (1983, 1986). Os traçados foram re-avaliados, durante este estudo, seguindo as diretrizes do Consenso Brasileiro de doença de Chagas (2005). Avaliou-se a presença de alterações inespecíficas isoladas, tais como bradicardia sinusal, baixa voltagem, bloqueio incompleto de ramo direito, hemibloqueio anterior esquerdo, bloqueio atrioventricular de I grau e alterações inespecíficas do segmento ST-T.

Foram também pesquisados a presença de bloqueio completo de ramo direito, ESV monomórficas isoladas, extra-sístoles ventriculares polimórficas ou repetitivas, bloqueio átrio-ventricular de 2º e 3º grau, alterações primárias de ST-T, frequência cardíaca menor que 40 batimentos por minuto, área eletricamente inativa, disfunção do nó sinusal, fibrilação atrial, bloqueio completo de ramo esquerdo e TVNS.

#### 4.1.5.4 Avaliação Radiológica

A radiografia de tórax foi realizada nas posições pósterio-anterior e perfil esquerdo. A identificação de cardiomegalia foi feita pelo índice cárdio-totácico (ICT) superior a 0,50. O diâmetro da artéria pulmonar e o padrão de distribuição vascular pulmonar foram avaliados. A distribuição vascular pulmonar foi considerada normal quando vasos encontravam-se abaixo do pedículo vascular, balanceada quando igualmente distribuídos abaixo e acima do pedículo vascular, ou invertida quando ocorria uma grande visualização dos vasos acima do pedículo vascular. A análise das radiografias foi realizada por um observador independente, radiologista, de forma cega, sem conhecimento de dados clínicos ou de outros métodos complementares.

#### 4.1.5.5 Ecocardiograma (ECG)

Foi realizado em aparelho inicialmente da marca HP Sonus 100. O exame ecocardiográfico incluiu os cortes paraesternal do eixo longo, paraesternal do eixo curto, apical de quatro câmaras e subcostal por meio de um transdutor de 2,5 MHZ. As medidas dos diâmetros intracavitários foram realizadas segundo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. Foram avaliados os diâmetros sistólicos e diastólicos do VE (respectivamente, VES e VED), espessura diastólica do septo interventricular (SIV), espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE), diâmetro ântero-posterior do átrio esquerdo e da aorta ascendente.

A análise da função sistólica global do VE foi feita pela análise da contratilidade global do ventrículo esquerdo ao exame bidimensional. A função sistólica global do VE foi classificada em normal, disfunção leve, disfunção moderada e disfunção severa pelo grau de espessamento das paredes ventriculares na sístole. A disfunção sistólica leve correspondeu a valores de fração de ejeção (FE) de 45% a 55%, a disfunção sistólica moderada correspondeu a valores da fração de ejeção de < 45% a 35%, a disfunção sistólica severa correspondeu a valores da FE < 35%. Para o cálculo do valor numérico da FE foi utilizada a fórmula de Teicholtz (REF), onde foi feita a estimativa dos volumes sistólico e diastólico do VE (respectivamente VES e VED), os quais foram obtidos através do esquema:  $V = (7,0 / 2,4 \times D) \times D^3$ , onde V é igual ao volume do VE, sistólico ou diastólico. Após a obtenção dos

volumes sistólico e diastólico do VE, foi feito o cálculo da FE pela fórmula:  $FE (\%) = (VD - VS) / VD \times 100$ , onde FE = fração de ejeção, VD = volume diastólico do VE e VS = volume sistólico do VE.

#### **4.1.6 Aspectos Bioéticos**

A população estudada na presente tese faz parte de uma coorte dinâmica iniciada em 1990, antes da atual normatização para pesquisa médica no Brasil (1996). É um estudo quase-experimental de série de casos, onde todas as intervenções diagnósticas e terapêuticas seguem as recomendações das diretrizes específicas para acompanhamento e tratamento das complicações da CCC. O projeto do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUCFF-UFRJ, atendendo as diretrizes nacionais e internacionais para pesquisa em seres humanos (Resolução n° 1996 do Conselho Nacional de Saúde), que regulamentam experimentos envolvendo pessoas (parecer CEP n° 053/07). Todos os pacientes receberam informações sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento informado, livre e esclarecido (apêndice 4). O médico cardiologista Dr. Roberto Coury Pedrosa foi responsável pelo esclarecimento dos pacientes e pela obtenção da assinatura dos mesmos no termo de consentimento.

Todos os pacientes incluídos no presente projeto tiveram à sua disposição, de forma absolutamente gratuita, os testes diagnósticos e algumas medicações recomendados pelas diretrizes para tratamento da cardiopatia chagásica crônica e suas complicações. O projeto contou ainda com a participação do Serviço Social do HUCFF-UFRJ, que prestou assistência aos pacientes orientandos, no que refere aos seus direitos previdenciários e obtenção de passe livre nos transportes urbanos.

#### **4.1.7 Conflitos de Interesse**

O pesquisador responsável pela coleta dos dados, coordenador e autor desta linha de pesquisa não foi subvencionado. Não há nenhum interesse, particular ou financeiro, por parte do mesmo ou dos seus orientandos, na terapia estabelecida nos pacientes chagásicos.

#### **4.1.8 Protocolo Experimental**

Imediatamente após a coleta de amostra do paciente (via venosa, com seringas heparinizadas), foram precipitadas alíquotas de sangue em

ácido tricloroacético 12% (1:10, v:v) e centrifugadas. Para determinação de vitamina C plasmática, a amostra foi acidificada com ácido metafosfórico 10% para preservar a determinação de ascorbato. A preparação dos hemolisados e plasma que foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes, foi realizada através de centrifugação (5000 g durante 3 minutos) do sangue total, para obtenção da fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido até sua posterior análise. Esta etapa de preparação das amostras foi realizada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela equipe do Dr. Roberto Coury Pedrosa. As amostras foram conservadas em nitrogênio líquido até seu envio à UFSC, onde foram analisadas.

#### **4.1.9 Fármaco e Vitaminas**

O fármaco Carvedilol, (RS)-1-(9H-carbazol-4-iloxi)-3-[2-(2-etoxifenoxil) etilamino] propina-2-ou, foi gentilmente cedido pelo laboratório Farmacêutico do Estado de São Paulo, grupo EMS Sigma Farma, e também as vitaminas E e C (E-Tabs e Energil C, respectivamente).

#### **4.1.10 Equipamentos**

A avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas, níveis de GSH e outros marcadores de estresse oxidativo foram realizadas com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível, duplo feixe marca/modelo GBC 916, acoplado a um software apropriado.

A avaliação da vitamina E foi realizada utilizando cromatografia líquida (HPLC), utilizando equipamento Varian ProStar-310 com Detector UV / vis (Walnut Creek, CA, USA), um injetor manual, e a versão Starfinder 5.5 de software. O aparelho de HPLC foi equipado com uma coluna ChromSpher 5 C18 (4,6 mm x 250 mm) (Walnut Creek, CA, USA). As determinações de \*NO, ADA e MPO foram realizadas em Leitor de ELISA Plate Reader 210 (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, USA).

#### **4.1.11 Reagentes**

Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse

oxidativo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (*St. Louis, USA*). O restante foi de grau analítico provenientes de empresas nacionais como a Vetec, Merk e Reagen.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO

### 4.2.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação do dano oxidativo lipídico foi realizada no plasma através da detecção no plasma de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o produto majoritário, malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa, os quais são derivados de oxidação do processo de lipoperoxidação (BIRD e DRAPER, 1984). O método consiste na precipitação de plasma com ácido tricloroacético a 12%, seguido da incubação em tampão tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico 0,73% durante 60 min. a 100 °C. Posteriormente, o material foi resfriado durante 30 min. a 5 °C, centrifugado (5 min. a 10000 g), e a mensuração do cromóforo rosa foi detectada 535nm, com valores calculados expressos em nmol. ml<sup>-1</sup>.

### 4.2.2 Proteína carbonilada (PC)

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado no soro pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Inicialmente foram adicionados 100 µL do plasma em 600 µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina), seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação a cada 15 min. Após, foi adicionado 600 µL de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min., seguido de centrifugação (5 min. a 800 g). O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min. a 800 g), com 600 µL de etanol-acetato de etila. Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 600 µL de guanidina, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C por 60 min., para posteriormente proceder a leitura a 360 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Lowry e colaboradores (1951), usando como padrão a albumina. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol. mg<sup>-1</sup>.

## 4.3 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

### 4.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada em hemolisado de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. A amostra adicionada na cubeta com a solução de adrenalina retardou a oxidação e conseqüentemente a produção de adrenocromo através da enzima SOD. Em uma cubeta contendo 1,95 ml de glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 µl de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar). A velocidade inicial de formação do adrenocromo foi monitorada durante cerca de 100s do início da reação, com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15s em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar a alíquota da amostra, geralmente em torno de 20 a 50 µl, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota, totalizando um tempo de aproximadamente 3 min. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD ( $U\ SOD\ ml^{-1}$ ) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo. As amostras foram previamente lavadas com solução de clorofórmio: etanol (3:5 v:v), com o intuito de eliminar a interferência da hemoglobina e impedir a geração do ânion superóxido artefactual no ensaio.

### 4.3.2 Glutationa peroxidase (GPx)

Para a análise enzimática de GPx em hemolisado, o método de Flohé e Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e conseqüente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético

(DPTA) a 5 mM, 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu$ l de amostra e 10  $\mu$ l de t-BuOOH em 1 ml de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em  $\mu$ mol.  $\text{min}^{-1}$ .  $\text{ml}^{-1}$ . Alíquotas de 5  $\mu$ l de KCN 50 mM foram adicionadas ao ensaio para evitar superavaliação da enzima devido à oxidação da hemoglobina presente nos lisados.

#### **4.3.3 Catalase (CAT)**

A atividade da enzima catalase foi determinada no hemolisado segundo o método descrito por Aebi (1984), o qual se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 mL desta solução em cubeta, com acréscimo de 20  $\mu$ L do lisado para realizar a leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 20 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em  $\text{mmol. min}^{-1}$ .  $\text{ml}^{-1}$ .

#### **4.3.4 Glutathione redutase (GR)**

A GR foi determinada no hemolisado pelo método de Calberg e Mannervick (1985), o qual verificou em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutathione oxidada e DPTA 5 mM foi adicionado na cubeta (0,95ml), e a adição de 50  $\mu$ l de amostra deu início a reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva decrescente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em  $\mu$ mol.  $\text{min}^{-1}$ .  $\text{ml}^{-1}$ .

#### **4.3.5 Glutathione S-transferase (GST)**

A atividade da GST foi determinada no hemolisado espectrofotometricamente de acordo com Habig e colaboradores (1976). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando uma substância mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada a um meio contendo 10  $\mu$ l de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), 10  $\mu$ l de GSH 0,1 M e 970  $\mu$ l de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, além da cubeta de referência, na qual foram adicionados os mesmos reagentes, com

exceção da amostra. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em  $\mu\text{mol. min.}^{-1}. \text{ml}^{-1}$ . O hemolisado utilizado para a determinação dessa enzima foi diluído 1:10, diferentemente das demais, para evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que interferia na avaliação da cinética enzimática.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICAS

##### 4.4.1 Glutathiona reduzida (GSH)

O nível de GSH no sangue total foi determinado através dos tióis não-protéicos, considerando que a GSH representa aproximadamente 95% destes tióis. Para avaliar a nível eritrocitário de pequenos tióis em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v), foi empregado o método de Beutler e colaboradores (1963), onde a adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão tris-HCL 0,2M pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permite, após cerca de 3 min. e agitação da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato de cor amarela, mensurável em 412nm. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ .

##### 4.4.2 Vitamina E

A determinação dos níveis de  $\alpha$ -tocoferol plasmáticos foi realizada através de quantificação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com detecção UV, em 292 nm, pelo método descrito por Nicoletti e colaboradores (2001). Inicialmente, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de plasma em 100  $\mu\text{l}$  de etanol e agitado em vórtex por 10s.

Em seguida, foi adicionado 100 $\mu\text{l}$  de hexano e agitado em vórtex por mais 45s, seguido de uma centrifugação a 800 g por 5 min. Posteriormente, 75  $\mu\text{l}$  do sobrenadante (fase hexano) foi transferida para um tubo e o hexano foi evaporado em nitrogênio. Foram adicionados 25  $\mu\text{l}$  de dietiléter e 75  $\mu\text{l}$  de metanol, com injeção desse extrato no sistema cromatográfico.

As colunas foram eluídas isocriticamente com metanol e o fluxo foi de 1  $\text{ml.min.}^{-1}$ . A concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol foi determinada através de uma curva-padrão, sendo que os valores foram expressos em  $\mu\text{mol. l}^{-1}$ .

### 4.4.3 Vitamina C

A determinação quantitativa do ácido ascórbico plasmático foi realizada através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção eletroquímica, segundo o método descrito por Lykkesfeldt e colaboradores (1995). Além da mensuração de ácido ascórbico total, foi necessário reduzir o dehidroascorbato (DHAA) presente nas amostras. Uma alíquota do plasma foi misturada com igual volume de ácido metafosfórico 10% no momento da coleta. Durante o ensaio, essa alíquota foi centrifugada a 4000 g por 10 min., em 4 °C.

O ácido ascórbico total foi medido após redução do DHAA (forma oxidada do ácido ascórbico), por adição de 100 µl da amostra a 50 µl de tampão Tris 0,5 M, pH 9,0, contendo ditiotreitól 10 mM, resultando em um pH de 6,1 a 6,2, a 25 °C por 5 min. Adicionou-se 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M à amostra resfriada e 20 µl da mistura foi injetada no HPLC. A fase móvel foi fosfato de hidrogênio dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,1 M, EDTA 2,5 mM e cloreto de dodeciltrimetilamônio 2,0 mM, pH 3,0. O fluxo foi 1,2 ml/min.

## 4.5 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

### 4.5.1 Determinação de Adenosina Deaminase (ADA)

A determinação da atividade da enzima ADA foi analisada no soro de acordo com o método de Galanti e Giusti (1966), inicialmente, foram preparadas amostras padrões para montar a curva padrão em diferentes concentrações: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (35 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (15 mM) e NH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> (15 mM), variando a entre 10–50 U/l.

Em seguida, alíquotas de 20µl de soro foram adicionadas ao tampão adenosina fosfato pH 6,5 (500 ml), composto por NaH<sub>2</sub>-PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (35 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (15 mM) e adenosina (0,5mM), seguido de uma incubação durante 1 hora a 37°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de uma solução de fenol (1 mM), nitroprussiato (0,17mM) e tampão alcalino (1000 ml: NaOCl, 11 mM). Finalmente, a leitura foi realizada em 630 nm, os valores foram calculados através da curva-padrão e expressos em UI<sup>-1</sup>.

#### 4.5.2 Determinação da Mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade de MPO foi realizada no soro segundo o método descrito por Rao e colaboradores (1993). Inicialmente, 40  $\mu\text{L}$  da amostra ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos 0,7-140  $\text{mU mL}^{-1}$ ) foram transferidos para cubetas e a reação iniciada com a adição de 360  $\mu\text{L}$  de meio tampão (0,167  $\text{mg mL}^{-1}$  de *o*-dianisidina 2HCl e 0,0005% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Após 15 min. de incubação à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30  $\mu\text{L}$  de azida sódica 1%. Em seguida as amostras foram centrifugadas (3000g, por 5 min.), e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas a 450 nm. A curva-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140  $\text{mU mL}^{-1}$ ) foi determinada, permitindo a sua quantificação posterior. Os valores da MPO foram expressos em  $\text{mU mL}^{-1}$ , com o auxílio da equação da reta (FRÖDE e MEDEIROS, 2001).

#### 4.5.3 Análise quantitativa do óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) pelo nitrito/nitrato

O óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) foi indiretamente quantificado no soro pela formação de seus metabólitos nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). No dia dos experimentos, 300  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi submetido à desproteíntização. Para cada amostra, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de solução de sulfato de zinco (20%) e incubadas em banho de gelo por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (2000 g por 15 min.) e o resultado final desta primeira etapa foi à obtenção de um sobrenadante límpido. A seguir, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta e diluídos em solução contendo 200  $\mu\text{L}$  de solução saturada de cloreto de vanádio III (0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl) (3%) (p/v) (MIRANDA et al., 2001). Nesta mesma cubeta foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e incubado durante 40 minutos, a 37<sup>o</sup> C. A reação de  $\text{NO}_2^-$  com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, USA) em 540 nm. Curva-padrão com concentrações previamente conhecidas de  $\text{NO}_2^-$  (0 - 150  $\mu\text{M}$ ) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato, em  $\mu\text{M}$ , com auxílio da equação da reta.

## **4.6 Análise Estatística**

As comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo e inflamatórias dentro dos diferentes grupos foram realizadas através da Análise de Variância – ANOVA, a um fator, complementada pelo teste de Tukey-Kramer. Os dados foram analisados pelo método dos modelos lineares generalizados para medidas repetidas. Este origina resultados da análise estatística, especificando diferenças dentro de um mesmo grupo e entre os diferentes tratamentos aplicados. O nível de significância adotado foi de 5%.

Para todas as análises foi utilizado o Software SPSS versão 11.5.0, adquirido sob licença pela Universidade Federal de Santa Catarina em 06/09/2002. Todo o desenho estatístico foi assinalado pelo professor Dr. Manuel Rosa de Oliveira Lino, do Departamento de Informática e Estatística, da UFSC.

## **4.7 ESTRATIFICAÇÃO DA AMOSTRA - MONITORAMENTO DE 7 ANOS DE INTERVENÇÃO ANTIOXIDANTE**

### **4.7.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo de intervenção terapêutica, prospectivo, de uma amostra pertencente a uma coorte aberta, constituída de pacientes acompanhados no Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho HUCFF-UFRJ.

### **4.7.2 Seleção de pacientes**

A amostra do estudo foi composta de pacientes que se encontravam na fase crônica da doença forma cardíaca, definida através de exame eletrocardiográfico e ecocardiograma, que tivessem seguido o fluxograma de atendimento do ambulatório de doença de Chagas do HUCFF-UFRJ de forma espontânea, segundo os seguintes critérios:

#### **4.7.2.1 Critérios de Inclusão**

Para análise dos 7 anos foram considerados apenas os pacientes que se mantiveram no mesmo grupo desde o início do projeto (ano de 2003). Ao longo dos 7 anos de estudo, 13 de 42 pacientes mudaram de grupo e não foram computados para esta análise geral. Cabe ressaltar que os novos pacientes que entraram no estudo, a partir de 2008, para

adequar ao número uniforme nos grupos, também não foram computados. O total de pacientes considerados para esta análise foi de 29 pacientes.

#### 4.7.2.1 Critérios de exclusão

##### *A - Estados fisiológicos, condições médicas prévias e/ou concomitantes:*

- pacientes que não completaram o protocolo inicial de admissão;
- pacientes tratados previamente com carvediol;
- pacientes com dados clínicos ou laboratoriais sugestivos de doença renal ou hepática grave ou disfunção tireoideana;
- pacientes com história prévia de doença pulmonar obstrutiva crônica (todas as formas), alcoolismo crônico ou tabagismo;
- pacientes portadores de anemia crônica, obesidade, cardiopatia hipertensiva, diabetes mellitus ou outra doença sistêmica;
- presença de outras afecções, tais como infecções ou neoplasias, desordens auto-imunes, doença neurodegenerativa;
- pacientes com sinais, sintomas ou história clínica de cardiopatia isquêmica confirmada após investigação.
- pacientes com conhecida ou suspeita de hipersensibilidade a fármacos;
- história de acidente vascular cerebral nos últimos 6 meses;
- pacientes que estavam participando de outros estudos;

##### *B- Critérios de exclusão cardiovascular*

- pressão sistólica mantida abaixo de 90mmHg e/ou sintomas de hipotensão arterial, tais como síncope, tonteira, fraqueza;
- história de infarto agudo do miocárdio nos últimos 3 meses;
- pacientes portadores de doenças orovalvares;
- fatores associados causando insuficiência cardíaca: hipo ou hipertireoidismo (incluindo tirotoxicose), anemia, hipertensão arterial de difícil controle;

- arritmias cardíacas graves que poderiam causar instabilidade hemodinâmica: taquiarritmias atriais (Flutter e/ou fibrilação rápida) ou ventriculares, bloqueios de 2° e 3° grau.

*C- Critérios biológicos de exclusão*

- níveis de creatinina sérica > 2 mg/100ml;
- níveis de potássio sérico > 5,5 mEq/L ou < 3,5 mEq/L;
- hemoglobina < 9 g%;
- níveis de glicemia > 147 mg/dl em dois exames consecutivos;
- hiponatremia (Na<sup>+</sup> < 130 mEq/L).

### **4.7.3 Diagnóstico sorológico da doença de Chagas**

Realizado em todos os pacientes encaminhados ao ambulatório, mesmo se trouxessem resultados anteriores externos, através da pesquisa de anticorpos *anti-T. cruzi*, utilizando 2 métodos. A diluição considerada reação sorológica positiva foi a estabelecida pelo laboratório centro de referência de Manguinhos-FIOCRUZ/RJ.

O paciente soropositivo foi aquele com dois testes sorológicos positivos, em duas coletas diferentes. No caso de dúvidas entre os métodos, as amostras de soro foram re-testadas com a imunofluorescência e, persistindo a discrepância, foi considerado o resultado deste método. Estes exames foram realizados pelo laboratório de imunologia do HUCFF-UFRJ. O sangue foi coletado sempre pela mesma pessoa, no mesmo dia da semana, na parte da manhã e em jejum.

### **4.7.4 Protocolo de Avaliação**

#### **4.7.4.1 Exame Clínico**

A avaliação clínica foi realizada para permitir a verificação de sinais e sintomas cardiovasculares e digestivos, compatíveis com a doença de Chagas, assim como para fazer o diagnóstico diferencial com outras cardiopatias ou doenças não-cardíacas que afetassem o sistema cardiovascular. Os dados coletados foram registrados em um questionário-padrão (apêndice 1). Todos os pacientes responderam a um questionário relacionado à atividade física e hábitos alimentares (apêndice 2). Os pacientes foram examinados por uma única pessoa

durante as consultas ambulatoriais (Dr. Roberto Coury Pedrosa).

Os hábitos alimentares dos pacientes foram checados por 3 vezes em tempo diferentes através de questionário (apêndice 2) e uma quarta vez através de um relatório alimentar descrito pelo paciente. Somente foram considerados para o estudo aqueles pacientes que tiveram as respostas coincidentes entre os questionários e o descritivo. Ao longo do presente estudo foram checados pelo menos mais 2 vezes os hábitos alimentares dos mesmos.

À medida que os pacientes eram incluídos no presente estudo, os mesmos fizeram num período de 1 semana uma avaliação laboratorial incluindo: hemograma, glicemia, uréia e creatinina, ácido úrico, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídios, sódio, cálcio e potássio, proteínas totais e frações, provas de função hepática e tireoidiana, exame parasitológico de fezes e análise de urina para elementos anormais e sedimentos. Estes exames foram realizados ao longo do presente estudo quando necessários clinicamente.

Nos 30 primeiros dias após a inclusão eram realizados os seguintes exames: o ECG convencional de repouso com 12 derivações; telerradiografia de tórax pósterio-anterior e perfil, o ecocardiograma uni e bidimensional com *Doppler* e o estudo de estresse oxidativo. Todas as informações foram obtidas, diretamente dos pacientes ou de seus prontuários. Do mesmo modo, ao longo do estudo, esses exames foram repetidos anualmente e quando se fizeram necessários, ou seja, com mudança clínica do paciente, excetuando o estudo de estresse oxidativo que foi realizado sempre após as intervenções ocorridas. Um esquema de consultas médicas foi determinado para monitorar o acompanhamento dos pacientes durante o tratamento, sendo que foram realizadas visitas médicas após:  $11 \pm 2$  dias, 3 semanas  $\pm 3$  dias, 2 meses (final do período de tratamento com benznidazol) e 6 meses (final do período de tratamento com Vitaminas E e C).

Além disso, amostras de sangue para exame hematológico (hemograma) foram realizadas a cada duas ou três semanas durante o tratamento com BZN e marcadores de avaliação da função hepática, e da função renal (AST, ALT, bilirrubinas, creatinina, uréia) foram coletadas nas visitas de três semanas e dois meses iniciais correspondente ao período de tratamento com o benznidazol. Os pacientes foram monitorados para evitar a ocorrência de dermatite durante 10 dias após o início do tratamento com BZN e foi orientado evitar a utilização de álcool, para evitar reações tipo dissulfiram/álcool. Todos estes exames foram executados nos laboratórios do ICES/HUCFF-UFRJ.

As defesas antioxidantes e os biomarcadores de estresse oxidativo no presente trabalho foram determinados seguindo a seguinte ordem: a determinação inicial precedendo a primeira suplementação (2006), seguido por uma anterior ao tratamento com BZN (2008); posteriormente, foi realizada uma determinação após 2 meses de tratamento com BZN (5mg/kg/dia), e, após 6 meses, a segunda terapia antioxidante com vitaminas E 800UI/dia e C 500 mg/dia.

Dando continuidade ao estudo, foi então realizada uma determinação após um período de 6 meses sem intervenção (2009), seguidas de duas determinações, sendo uma após a administração isolada do carvedilol (dose de 12,5 mg, 3 vezes ao dia, durante 6 meses), e outra após administração conjunta de carvedilol com as vitamina E e C por mais 6 meses (carvedilol dose de 12,5 mg, 3 vezes ao dia, vitamina E na dose de 800UI/dia e vitamina C 500mg/dia).

Em todos os grupos, foram observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial. Esta etapa foi de responsabilidade do médico cardiologista Dr. Roberto Coury Pedrosa, e foi realizada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Ocorreram visitas médicas a cada etapa de 6 meses conforme o protocolo até quando terminou o presente estudo (após tratamento com vitaminas E, C e carvedilol).

#### **4.7.5 Aspectos Bioéticos**

A população estudada na presente tese faz parte de uma coorte dinâmica iniciada em 1990, antes da atual normatização para pesquisa médica no Brasil (1996). É um estudo de casos, onde todas as intervenções diagnósticas e terapêuticas seguem as recomendações das diretrizes específicas para acompanhamento e tratamento das complicações da CCC.

O projeto do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUCFF-UFRJ, atendendo as diretrizes nacionais e internacionais para pesquisa em seres humanos (Resolução nº 1996 do Conselho Nacional de Saúde), que regulamentam experimentos envolvendo pessoas (parecer CEP nº 053/07).

Todos os pacientes receberam informações sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento informado, livre e esclarecido (apêndice 4). O médico cardiologista Dr. Roberto Coury Pedrosa foi

responsável pelo esclarecimento dos pacientes e pela obtenção da assinatura dos mesmos no termo de consentimento.

Todos os pacientes incluídos no presente projeto tiveram à sua disposição, de forma absolutamente gratuita, os testes diagnósticos e algumas medicações recomendados pelas diretrizes para tratamento da cardiopatia chagásica crônica e suas complicações.

O projeto contou ainda com a participação do Serviço Social do HUCFF-UFRJ, que prestou assistência aos pacientes orientandos, no que refere aos seus direitos previdenciários e obtenção de passe livre nos transportes urbanos.

#### **4.7.6 Conflitos de Interesse**

O pesquisador responsável pela coleta dos dados, coordenador e autor desta linha de pesquisa não foi subvencionado. Não há nenhum interesse, particular ou financeiro, por parte do mesmo ou dos seus orientandos, na terapia estabelecida nos pacientes chagásicos.

#### **4.7.7 Protocolo Experimental**

Imediatamente após a coleta de amostra do paciente (via venosa, com seringas heparinizadas), foram precipitadas alíquotas de sangue em ácido tricloroacético 12% (1:10, v:v) e centrifugadas. Para determinação de vitamina C plasmática, a amostra foi acidificada com ácido metafosfórico 10% para preservar a determinação de ascorbato.

A preparação dos hemolisados e plasma que foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes, foi realizada através de centrifugação (5000 g durante 3 minutos) do sangue total, para obtenção da fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido até sua posterior análise.

Esta etapa de preparação das amostras foi realizada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela equipe do Dr. Roberto Coury Pedrosa. As amostras foram conservadas em nitrogênio líquido até seu envio à UFSC, onde foram analisadas.

#### 4.7.8 Equipamentos

A avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas, níveis de GSH e outros marcadores de estresse oxidativo foram realizadas com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível, duplo feixe marca/modelo GBC 916, acoplado a um software apropriado. A avaliação da vitamina E foi realizada utilizando cromatografia líquida (HPLC), utilizando equipamento Varian ProStar-310 com Detector UV / vis (Walnut Creek, CA, USA), um injetor manual, e a versão Starfinder 5.5 de software. O aparelho de HPLC foi equipado com uma coluna ChromSpher 5 C18 (4,6 mm x 250 mm) (Walnut Creek, CA, USA). As determinações de  $\bullet$ NO, ADA e MPO foram realizadas em Leitor de ELISA Plate Reader 210 (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, USA).

#### 4.7.9 Reagentes

Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (*St. Louis*, USA). O restante foi de grau analítico provenientes de empresas nacionais como a Vetec, Merck e Reagen.

#### 4.7.10 Análise estatística

Com relação aos marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios foi realizado um estudo transversal, ao longo dos 7 anos, de intervenções antioxidantes, e as diferenças analisadas através da Análise de Variância – ANOVA, a um fator, complementada pelo teste de Tukey-Kramer. Também foi realizada uma análise de regressão, através do método de associação para variáveis quantitativas, e aquelas que possuíam um valor do coeficiente de correlação linear  $r$  de Pearson superior a 0,50, foram considerados como associação significativa entre as mesmas.

Para todas as análises foi utilizado o Software SPSS versão 11.5.0, adquirido sob licença pela Universidade Federal de Santa Catarina em 06/09/2002. Todo o desenho estatístico foi assinalado pelo professor Dr. Manuel Rosa de Oliveira Lino, do Departamento de Informática e Estatística, da UFSC.

## 5 RESULTADOS

### *a) Com relação à intervenção com Carvedilol e Vitaminas E e C*

#### 5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA ESTUDADA

Dos 200 pacientes acompanhados no ambulatório de cardiopatia chagásica do HUCFF-UFRJ, 77 foram excluídos do presente estudo por terem mudado os seus hábitos alimentares. Isso significa que, nos periódicos e sucessivos inquéritos relacionados aos hábitos alimentares, estes pacientes apresentaram alterações no seu cardápio, o que poderia interferir com os conteúdos de vitaminas E e C fornecidos aos mesmos, e, por consequência, no quadro de estresse oxidativo sistêmico avaliado.

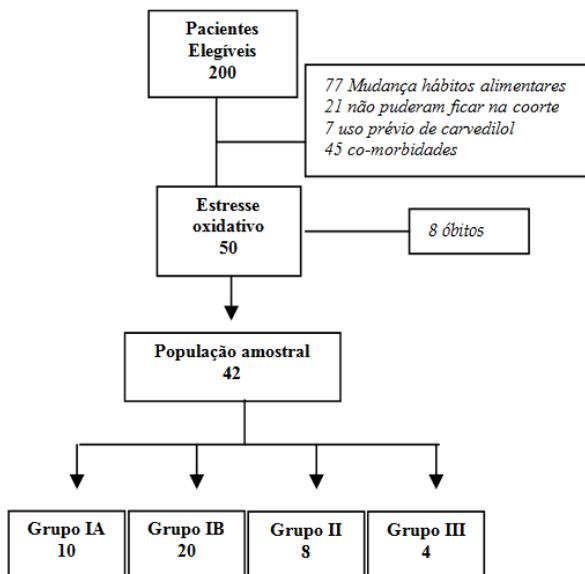
Dos 123 pacientes restantes, 21 pacientes, após a realização dos exames admissionais optaram por não manter acompanhamento no HUCFF-UFRJ: 6 devido a dificuldades financeiras; 5 retornaram ao serviço médico de origem; 7 por uso prévio de carvedilol; 3 tiveram o diagnóstico de insuficiência renal crônica, sendo 2 em programa de diálise; 18 tiveram o diagnóstico de *diabetes mellitus* tipo II; e 24 tiveram evidências de cardiopatia hipertensiva (diagnóstico através de dados clínicos e ecocardiográficos). Cinquenta pacientes tiveram previamente estabelecidos o estresse oxidativo no ano de 2003 (de OLIVEIRA, 2004).

Houve 8 óbitos informados pelos familiares e confirmados pelo banco de dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM-2005). O presente trabalho, relativo ao objetivo da intervenção do carvedilol e sua combinação posteriormente às vitaminas antioxidantes E e C, foi constituído no seu final por 42 pacientes. Entre os 42 pacientes selecionados no início do estudo, a idade variou de 31 a 67 anos, com média de  $58,8 \pm 10,3$  anos, sendo 25 pacientes do sexo masculino (60%). O índice de massa corporal (IMC) médio foi  $24,3 \pm 5,1$   $\text{kg.m}^{-2}$ . Neste período de estudo nenhum paciente mudou de grupo e nem houve alteração nos hábitos alimentares (conforme figura 16).

No início do projeto no ano de 2003, o grupo III era composto por dez pacientes. Entretanto, ao longo desses últimos anos, alguns pacientes foram a óbito ou abandonaram o projeto, diminuindo consideravelmente a sua amostragem, sendo que, devido à resposta limitada desse grupo frente à terapia antioxidante (MAÇAO et al.,

2007), não foram recrutados mais pacientes classificados com grau III para o presente estudo.

Figura 16: Fluxograma com a seleção e o fluxo dos participantes em cada etapa do estudo.



Fonte: Dados do autor

As características biométricas e demográficas dos 42 pacientes chagásicos iniciais classificados nos quatro grupos de comprometimento miocárdio são mostradas na tabela 2. Com relação às medicações utilizadas pelos pacientes, estas foram suspensas por 48 horas antes de cada coleta, isto significa 5 vidas-médias, ou seja, na primeira teríamos 50% da substância presente no sangue do paciente, na segunda teríamos 25%, na terceira 12,5%, na quarta 6,25% e na quinta apenas 3,125% da substância. A única medicação que tem vida-media longa é a Amiodarona, entretanto foram comparadas amostras de pacientes que faziam seu uso com grupo controle e os mesmos não alteraram as medidas das variáveis testadas. A avaliação radiológica mostrou que o índice cardio-torácico aumentou com o grau de comprometimento cardíaco ( $p=0,0001$ ). Não foram realizadas radiografias de esôfago e/ou enema opaco. O ecocardiograma mostrou fração de ejeção nos

pacientes do grupo III significativamente menor do que nos demais grupos ( $p=0,0001$ ). O diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo foi corrigido para a área da superfície corporal e valores acima de  $32 \text{ mm/m}^2$  foram considerados anormais. Com base nesse critério, 12 pacientes apresentaram dilatação do ventrículo esquerdo.

O comprometimento miocárdico à direita, expresso pela hipertensão pulmonar, esteve presente nos pacientes do grupo II e III. A análise comparativa das variáveis categóricas entre os grupos (tabelas 2 e 3) foi realizada pelo teste exato de Fisher e teste de Mantel-Haenszel, sendo assinalado pelo estatístico do serviço de cardiologia do HUCFF da UFRJ. Estas variáveis são mutáveis, ou seja, para cada paciente a variação apareceu mais de uma vez, nas constantes determinações que foram realizadas. Sendo algumas destas medidas apresentadas na forma de percentual, podemos considerar os resultados encontrados como médias destas determinações.

Tabela 2: Características biométricas e demográficas dos 42 pacientes chagásicos iniciais classificados nos quatro grupos de comprometimento miocárdio.

Variável	IA	IB	II	III	Anova p
Idade (média±dp)	58,9±10,2	61,8±11,2	58,8±11,1	59±11,1	0,10
Sexo (m/total)	6/10	6/20	4/8	1/4	-
IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	25,5±4,2	24,1±3,1	24,3±4,3	23±3,8	0,25
Atividade física regular (%)	78	75	60	20	-
Constipação (< 3 dias)	-	12,5	35	42	-
Disfagia (%)	47,8	37	88	91	-
Hemoglobina (g/dl)	13,3±1,2	13,8±1,1	12,8±1,6	10±1,8	0,11
Creatinina (mg/dl)	0,96±0,6	1,1±0,3	0,9±0,4	1,0±0,3	0,13
TSH ( $\mu\text{g/ml}$ )	2±1,2	2,8±0,9	3,2±0,7	3,1±0,8	0,17
Leucócitos (células/ $\text{mm}^3$ )	12x103±1,2	11x103±1,1	13x103±0,9	13x103±0,8	0,19
Fármacos					
Amiodarona (n)	-	-	2	2	
Captopril (n)	-	20	8	4	

Valores representam média±desvio padrão. IMC – índice de massa corpórea. TSH – hormônio estimulante da tireóide

Tabela 3: Dados referentes à radiologia, eletrocardiograma e ecocardiograma

Variável	IA	IB	II	III	Anova P
<b>Radiografia de tórax</b>					
- Índice cardiotorácico (m±dp)	0,45±0,02	0,45±0,02	0,48±0,04	0,52±0,02	0,0001*
- Compatível com ICC (%)	-	-	20	100	0,001♣
<b>Eletrocardiograma</b>					
- BRD (5)	-	55,7	62,3	97,8	0,001♥
- BRD = HBAE (%)	-	68,9	72,1	99,1	0,003♥
- Área inativa (%)	-	2	55	89,3	0,001♥
<b>Ecocardiograma</b>					
- FEVE (%)	65,2	61,6	42,4	37,6	0,0001•
- IDdfVE (mm/m <sup>2</sup> )	28,3±1,8	29,2±1,2	32,3±4,8	35,9±1,9	0,001•
- Hipertensão pulmonar (%)	-	-	25	44	0,001•

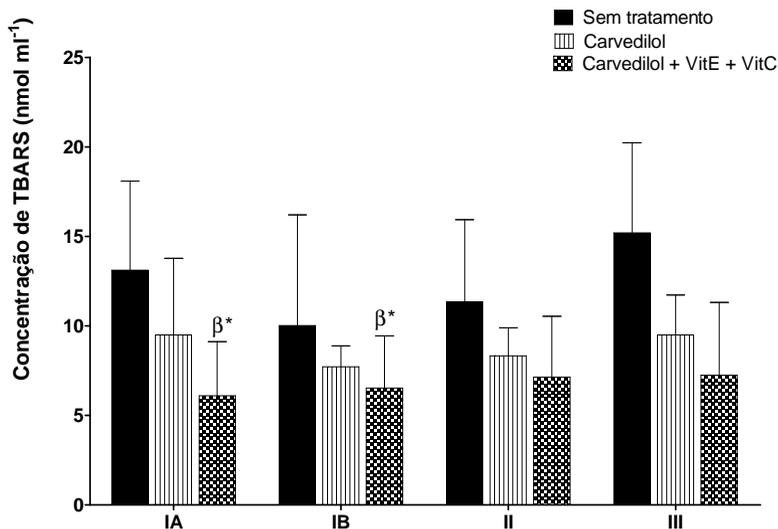
Valores representam média±desvio padrão. HBAE - hemibloqueio anterior esquerdo; FEVE - fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IDdfVE - índice diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; TVNS - Taquicardia ventricular não sustentada; EV - extra-sístole ventricular; BCRD - bloqueio completo do ramo direito. Tukey (IA <sup>1</sup> III)\*; (IA <sup>1</sup> III)♣; (IB <sup>1</sup> III)♥; (IA <sup>1</sup> III)•

## 5.2 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO OXIDATIVO

### 5.2.1 Lipoperoxidação Tecidual – Determinação de TBARS

A análise estatística não mostrou diferenças significativas nos níveis de TBARS após a terapia com carvedilol em todos os grupos estudados, contudo observou-se que os valores apresentaram tendência de diminuição em relação aos pacientes que estavam sem tratamento (tabela 4 – apêndice 5 e figura 17). Após a suplementação vitamínica, os grupos com menos acometimento cardíaco (IA e IB) apresentaram valores significativamente diminuídos nos níveis de TBARS: grupo IA de 13,11±9,98 para 6,10±3,02 (p<0,05), e no grupo IB de 10,02±6,18 para 6,52±2,92 (p<0,05), permanecendo inalterados nos outros grupos, conforme figura abaixo. Não houve diferença significativa entre as intervenções aplicadas (tabela 4 – apêndice 5 e figura 17).

Figura 17: Níveis de TBARS em plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C. Nível de significância: \*  $p < 0,05$ .

### 5.2.2 Proteína Carbonilada (PC)

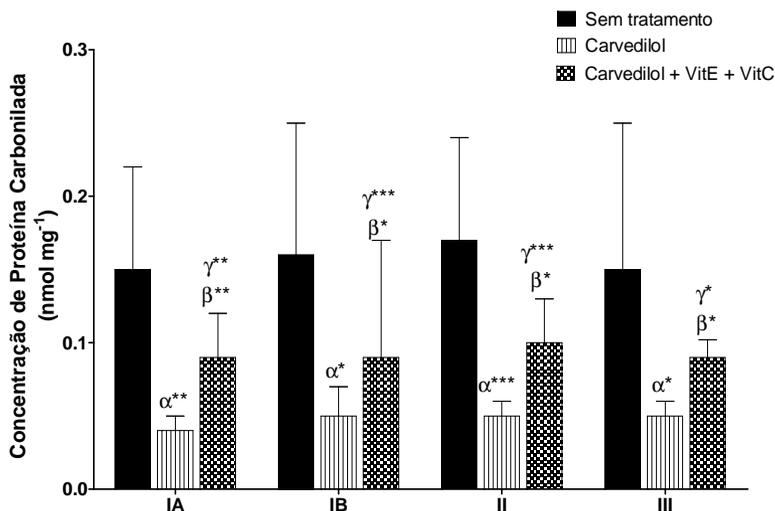
A determinação do dano às proteínas mostrou valores significativamente diminuídos em todos os grupos, após terapia com carvedilol: IA ( $0,15 \pm 0,07 - 0,04 \pm 0,01$ ,  $p < 0,01$ ), IB ( $0,16 \pm 0,19 - 0,05 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ), II ( $0,17 \pm 0,07 - 0,05 \pm 0,01$ ,  $p < 0,001$ ), e o grupo III ( $0,15 \pm 0,10 - 0,05 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) (tabela 4 – apêndice 5 e figura 18).

Ao analisar estatisticamente os valores da PC após suplementação com vitaminas, observou-se o mesmo perfil de diminuição significativa em todos os grupos: IA ( $0,15 \pm 0,07 - 0,09 \pm 0,03$ ,  $p < 0,01$ ), IB ( $0,16 \pm 0,19 - 0,09 \pm 0,08$ ,  $p < 0,01$ ), II ( $0,17 \pm 0,07 - 0,10 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ) e grupo III ( $0,15 \pm 0,10 - 0,09 \pm 0,12$ ,  $p < 0,05$ ) (tabela 4 – apêndice 5 e figura 18).

Quando comparados os dois tratamentos entre si, houve um aumento significativo nos valores de PC em todos os grupos estudados: IA ( $0,04 \pm 0,01 - 0,09 \pm 0,03$ ,  $p < 0,01$ ), IB ( $0,05 \pm 0,02 - 0,09 \pm 0,08$ ,

$p < 0,001$ ), II ( $0,05 \pm 0,01 - 0,10 \pm 0,03$ ,  $p < 0,001$ ) e grupo III ( $0,05 \pm 0,01 - 0,09 \pm 0,12$ ,  $p < 0,05$ ). Contudo, esses valores permanecem estatisticamente diminuídos em relação aos não tratados (tabela 4 – apêndice 5 e figura 18).

Figura 18: Níveis de PC em plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol,  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C, e  $\gamma$  entre carvedilol versus carvedilol + vitaminas E e C. Níveis de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

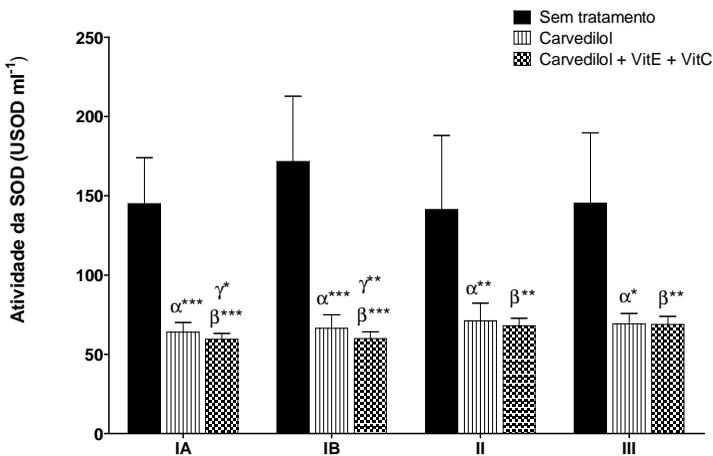
### 5.3 DETERMINAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

#### 5.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi estatisticamente diminuída após terapia de 6 meses com carvedilol nos 4 grupos analisados: IA ( $144,99 \pm 29,00 - 64,04 \pm 6,05$ ,  $p < 0,001$ ), IB ( $171,52 \pm 41,16 - 66,37 \pm 8,56$ ,  $p < 0,001$ ), II ( $141,26 \pm 46,62 - 70,98 \pm 11,24$ ,  $p < 0,01$ ) e grupo III ( $145,44 \pm 44,12 - 69,20 \pm 6,54$ ,  $p < 0,05$ ) (tabela 5 – apêndice 6 e figura 19).

A suplementação com as vitaminas E e C durante 6 meses após o tratamento com carvedilol mostrou uma diminuição significativa da atividade da SOD em todos os grupos estudados: IA ( $144.99 \pm 29.00 - 59,44 \pm 3,76$ ,  $p < 0,001$ ), IB ( $171.52 \pm 41.16 - 59,89 \pm 4,36$ ,  $p < 0,001$ ), II ( $141.26 \pm 46.62 - 68,05 \pm 4,75$ ,  $p < 0,01$ ) e grupo III ( $145.44 \pm 44.12 - 68,91 \pm 5,01$ ,  $p < 0,01$ ). Houve diferença significativa entre as duas intervenções apenas nos grupos IA ( $64.04 \pm 6.05 - 59,44 \pm 3,76$ ,  $p < 0,05$ ) e IB ( $66.37 \pm 8.56 - 59,89 \pm 4,36$ ,  $p < 0,01$ ) (tabela 5 – apêndice 6 e figura 19).

Figura 19: Atividade da SOD em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



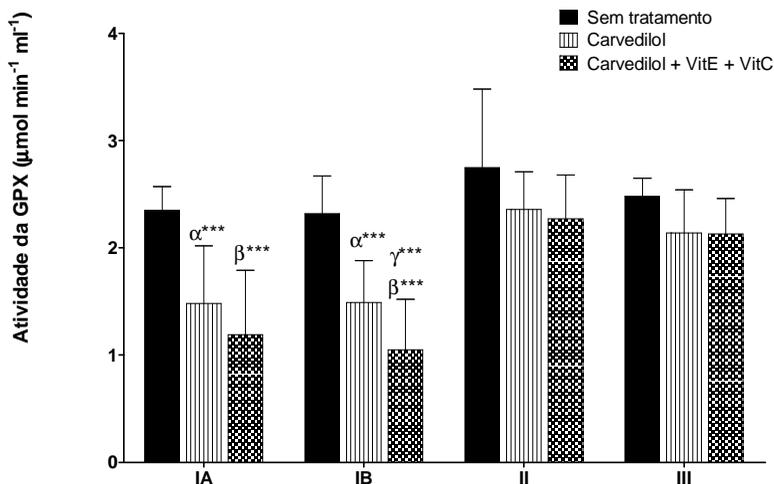
Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol,  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C, e  $\gamma$  entre carvedilol versus carvedilol + vitaminas E e C. Níveis de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.3.2 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx diminuiu significativamente apenas nos grupos IA ( $2.35 \pm 0.22 - 1.48 \pm 0.54$ ,  $p < 0,001$ ) e IB ( $2.32 \pm 0.35 - 1.49 \pm 0.39$ ,  $p < 0,001$ ) com a intervenção do carvedilol, enquanto nos grupos II e III ela manteve-se inalterada (tabela 5 – apêndice 6 e figura

20). Observou-se que a diminuição verificada anteriormente (grupos IA e IB) permaneceu significativa apenas nestes dois grupos. Após a adição das vitaminas à terapia com carvedilol, no grupo IA os valores passaram de  $2.35 \pm 0.22$  para  $1,19 \pm 0,60$  ( $p < 0,001$ ), e no grupo IB de  $2.32 \pm 0.35$  para  $1,05 \pm 0,47$  ( $p < 0,001$ ), sendo que neste último ainda foi significativamente menor que no tratamento somente com carvedilol ( $p < 0,001$ ) (tabela 5 – apêndice 6 e figura 20). No restante dos grupos não houve diferença significativa entre as intervenções, repetindo os resultados obtidos no tratamento somente com o carvedilol.

Figura 20: Atividade da GPx em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol,  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C, e  $\gamma$  entre carvedilol versus carvedilol + vitaminas E e C. Nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$ .

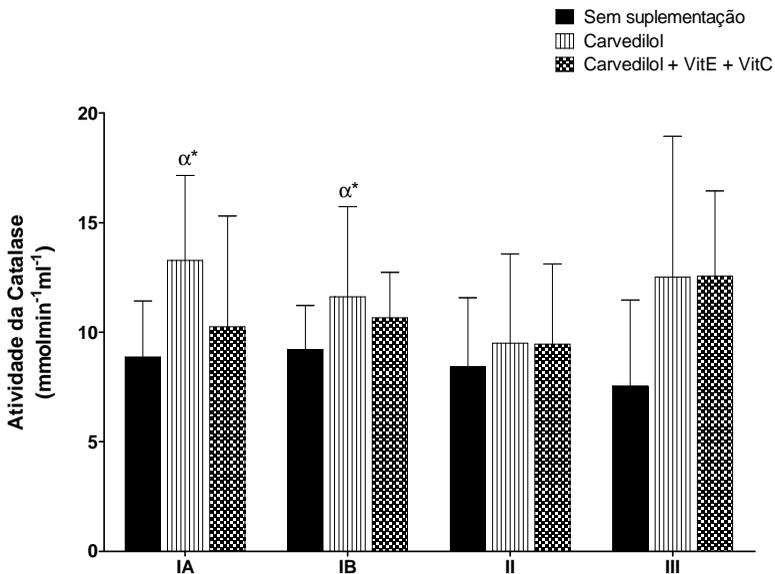
### 5.3.3 Atividade da Catalase (CAT)

No primeiro momento do tratamento de modo semelhante à GPx, essa enzima apresentou uma elevação significativa nos grupos IA ( $8,87 \pm 2,55$  -  $13,27 \pm 3,88$ ,  $p < 0,05$ ) e IB ( $9,21 \pm 2,01$  -  $11,62 \pm 4,10$ ,

$p < 0,05$ ), permanecendo inalterada no restante dos grupos analisados (tabela 5 – apêndice 6 e figura 21).

Após a segunda etapa de tratamento, os valores desta enzima permaneceram inalterados em todos os grupos estudados. Não houve diferenças significativas entre as duas intervenções (tabela 5 – apêndice 6 e figura 21).

Figura 21: Atividade da CAT em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



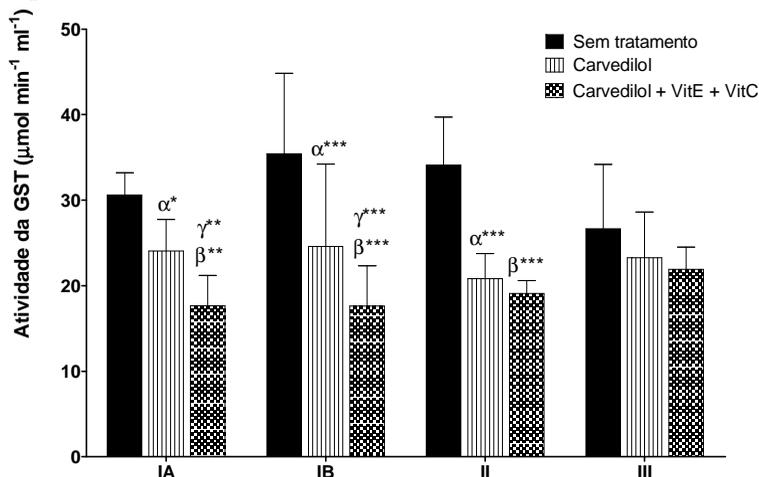
Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol. Nível de significância:  $*p < 0,05$ .

### 5.3.4 Atividade da Glutathiona transferase (GST)

A atividade da GST após a intervenção com carvedilol manteve-se significativamente diminuída nos grupos de menor acometimento cardíaco, ou seja nos grupos IA ( $30,61 \pm 2,58 - 24,07 \pm 3,68$ ,  $p < 0,05$ ) e IB ( $35,41 \pm 9,42 - 24,58 \pm 9,64$ ,  $p < 0,001$ ) e também no grupo II ( $34,10 \pm 5,64 - 20,81 \pm 2,95$ ,  $p < 0,001$ ). Nos pacientes do grupo III não houve diferença

significativa (tabela 5 – apêndice 6 e figura 22). Com a adição das vitaminas à terapia com o carvedilol, observou-se comportamento similar nestes mesmos grupos: no grupo IA houve uma diminuição significativa ( $30,61 \pm 2,58 - 17,68 \pm 3,52$ ,  $p < 0,01$ ) e no grupo IB uma diminuição de  $35,41 \pm 9,42$  para  $17,63 \pm 4,70$  ( $p < 0,001$ ). No grupo II manteve-se a diminuição significativa ( $34,10 \pm 5,64 - 19,08 \pm 1,52$ ,  $p < 0,001$ ). Houve diferença significativa entre as duas intervenções, somente nos grupos IA ( $24,07 \pm 3,68 - 17,68 \pm 3,52$ ,  $p < 0,01$ ) e no grupo IB ( $24,58 \pm 9,64 - 17,63 \pm 4,70$ ,  $p < 0,001$ ) (tabela 5 – apêndice 6 e figura 22).

Figura 22: Atividade da GST em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol,  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C, e  $\gamma$  entre carvedilol versus carvedilol + vitaminas E e C. Níveis de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

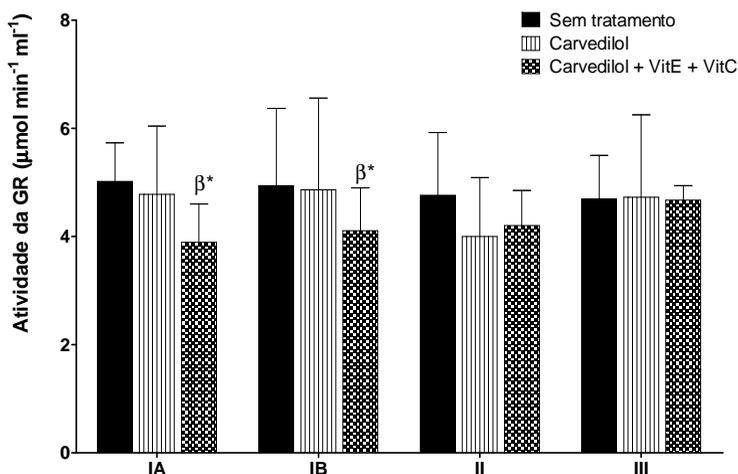
### 5.3.5 Atividade da Glutathiona redutase (GR)

Após o tratamento com carvedilol e diferentemente do comportamento das demais enzimas, não se observaram diferenças

significativas nos valores da atividade desta enzima em nenhum dos grupos estudados (tabela 5 – apêndice 6 e figura 23).

Após a adição das vitaminas E e C, novamente os grupos com menor comprometimento (grupos IA e IB) apresentaram uma diminuição significativa na atividade de GR: grupo IA houve diminuição de  $5,02 \pm 0,71$  para  $3,89 \pm 0,71$  ( $p < 0,05$ ) e IB diminuição de  $4,94 \pm 1,43$  para  $4,11 \pm 0,79$  ( $p < 0,05$ ) (tabela 5 – apêndice 6 e figura 23). Não houve diferença significativa entre as duas intervenções.

Figura 23: Atividade da GR em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C. Nível de significância:  $*p < 0,05$ .

## 5.4 DETERMINAÇÕES DOS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS E NUTRICIONAIS

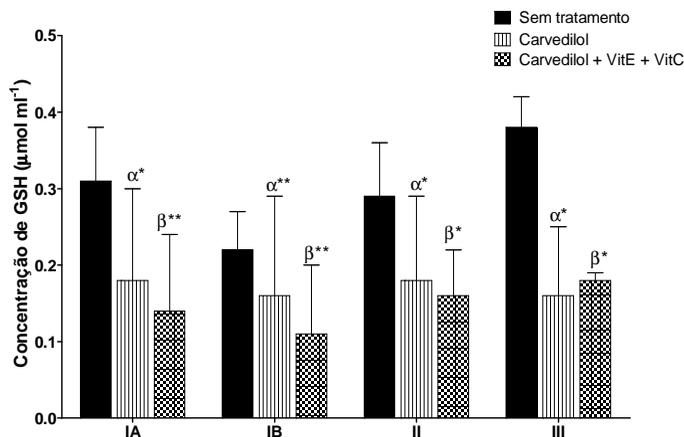
### 5.4.1 Concentrações de Pequenos Tióis Não-Protéicos (GSH)

Os níveis de GSH no sangue total, pós-carvedilol apresentou diminuição significativa em todos os grupos estudados: IA ( $0,31 \pm 0,17$  -

0,18±0,12,  $p<0,05$ ), IB (0,22±0,17 - 0,16±0,13,  $p<0,01$ ), II (0,29±0,10 - 0,18±0,11,  $p<0,05$ ) e grupo III (0,38±0,15 - 0,16±0,09,  $p<0,05$ ) (tabela 4 - apêndice 5 e figura 24).

Após a adição das vitaminas, todos os grupos mantiveram os níveis de GSH diminuídos significativamente: IA uma diminuição de 0,31±0,17 para 0,14±0,10, ( $p<0,01$ ), IB 0,22±0,17 para 0,11±0,09 ( $p<0,01$ ), II 0,29±0,10 para 0,16±0,06 ( $p<0,05$ ) e finalmente, uma diminuição no grupo III de 0,38±0,15 para 0,18±0,10 ( $p<0,05$ ). Não houve diferença significativa entre as intervenções testadas (tabela 4 - apêndice 5 e figura 24).

Figura 24: Níveis de GSH em sangue total de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol,  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C. Níveis de significância: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

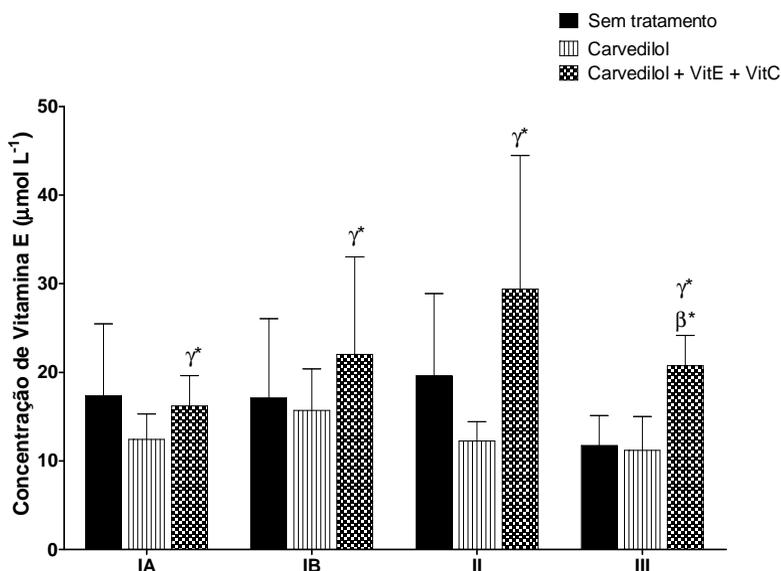
#### 5.4.2 Concentração de vitamina E

A concentração deste antioxidante não-enzimático manteve-se inalterada após a terapia com carvedilol, (tabela 4 - apêndice 5 e figura 25). Após a adição de vitaminas E e C ao tratamento inicial, observou-se que apenas o grupo III mostrou valores de vitamina E aumentados

significativamente em relação aos pacientes sem tratamento, passando de  $11,72 \pm 3,40$  para  $20,76 \pm 3,38$  ( $p < 0,05$ ). Após comparar apenas os tratamentos que envolviam a terapia com o carvedilol e a adição das vitaminas e carvedilol, observou-se que todos os grupos mostraram aumento significativo nos seus valores, indicando que houve uma absorção efetiva da vitamina E pelos pacientes suplementados.

Os valores aumentaram em IA de  $12,44 \pm 2,85$  para  $16,18 \pm 3,45$  ( $p < 0,05$ ), IB de  $15,70 \pm 4,68$  para  $22,02 \pm 11,0$  ( $p < 0,05$ ), II de  $12,24 \pm 2,18$  para  $29,40 \pm 15,08$  ( $p < 0,05$ ), e finalmente no grupo III houve um aumento de  $11,18 \pm 3,83$  para  $20,76 \pm 3,38$  ( $p < 0,05$ ) (tabela 4 – apêndice 5 e figura 25).

Figura 25: Níveis de Vitamina E em plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C, e  $\gamma$  entre carvedilol versus carvedilol + vitaminas E e C. Nível de significância:  $*p < 0,05$ .

### 5.4.3 Concentração de vitamina C

As determinações das concentrações de vitamina C não permitiram sua inclusão nos resultados, devido a problemas na reprodução da metodologia do HPLC, com detector eletroquímico, segundo o método de escolha inicial descrito por Lykkesfeldt e colaboradores (1995), pois os níveis de vitamina C foram muito baixos ou indetectáveis nas amostras, apesar da redução prévia das mesmas para contornar eventuais oxidações.

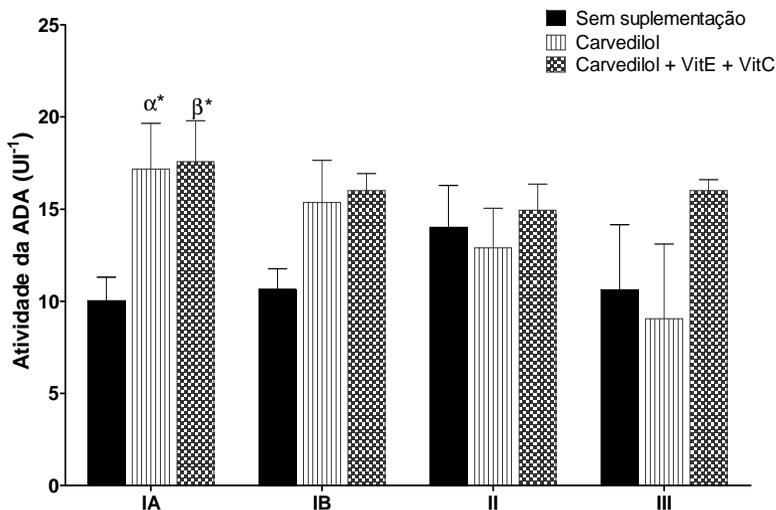
De forma semelhante, outros trabalhos desenvolvidos por nosso grupo, como Maçao e colaboradores (2007), Ribeiro e colaboradores (2010) registraram problemas durante a corrida analítica ao analisar as amostras de vitamina C e igualmente devido a problemas da mesma natureza, seus valores não foram fornecidos. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da USP-SP, coordenado pelo Dr. Pio Colepicolo.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

### 5.5.1 Atividade da Adenosina Deaminase (ADA)

A ADA não sofreu alteração significativa após o tratamento com carvedilol, exceto para o grupo IA, onde houve um aumento significativo ( $10,03 \pm 1,28$  -  $17,17 \pm 2,49$ ,  $p < 0,05$ ); (tabela 4 - apêndice 5 e figura 26). Após a suplementação vitamínica esse perfil foi mantido, apenas com aumento significativo no grupo IA ( $10,03 \pm 1,28$  -  $17,58 \pm 2,21$ ,  $p < 0,05$ ), enquanto não se detectou diferenças entre as intervenções aplicadas.

Figura 26: Atividade da ADA no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).

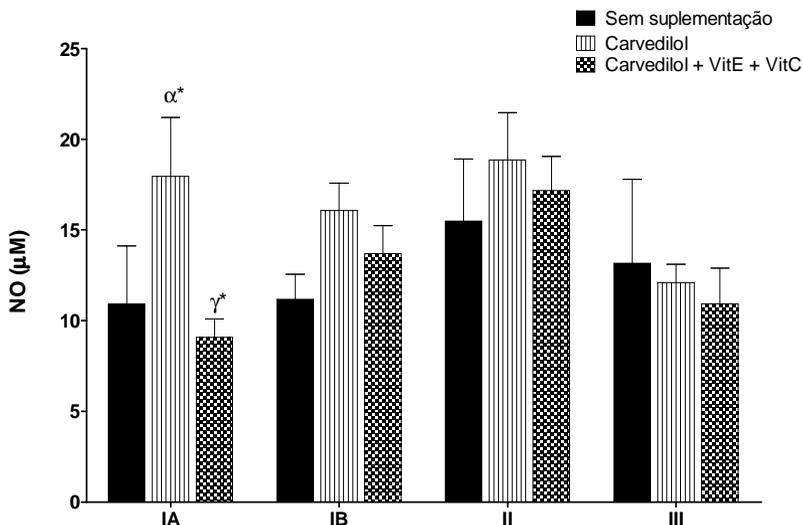


Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol,  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C. Nível de significância:  $*p < 0,05$ .

### 5.5.2 Concentração de Óxido Nítrico ( $\bullet$ NO)

De modo semelhante ao perfil mostrado pela atividade da enzima ADA, a concentração de  $\bullet$ NO apenas mostrou-se significativamente aumentada no grupo IA após a terapia com carvedilol: IA ( $10,93 \pm 3,19$  -  $17,96 \pm 3,24$ ,  $p < 0,05$ ), (tabela 4 - apêndice 5 e figura 27). Após a adição das vitaminas ao carvedilol, os valores permaneceram inalterados, exceto no grupo IA, onde foi detectada uma diminuição entre os seus valores ( $17,96 \pm 3,24$  -  $9,09 \pm 1,00$ ,  $p < 0,05$ ).

Figura 27: Nível de \*NO no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



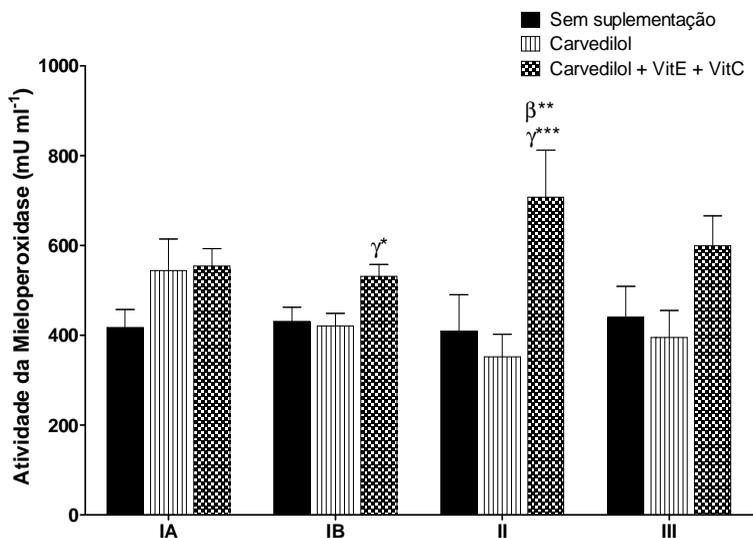
Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\alpha$  entre sem tratamento versus carvedilol e  $\gamma$  entre carvedilol versus carvedilol + vitaminas E e C. Nível de significância:  $*p < 0,05$ .

### 5.5.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Não ocorreu nenhuma variação da MPO nos grupos estudados após a terapia com carvedilol, (tabela 4 – apêndice 5 e figura 35). Contudo, após a terapia com a adição das vitaminas E e C ocorreu um aumento significativo apenas no grupo II ( $409,54 \pm 80,95$  -  $707,42 \pm 104,83$ ,  $p < 0,01$ ) (tabela 4 - apêndice 5 e figura 28).

Interessantemente, quando foram comparados os dois tratamentos, carvedilol e carvedilol com adição das vitaminas, houve um aumento significativo apenas nos grupo IB ( $420,70 \pm 27,88$  -  $531,54 \pm 25,84$ ,  $p < 0,05$ ) e II ( $352,13 \pm 50,36$  -  $707,42 \pm 104,83$ ,  $p < 0,001$ ) (tabela 4 - apêndice 5 e figura 28).

Figura 28: Atividade da MPO no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de *Los Andes* modificada, sem tratamento e períodos pós-carvedilol (6 meses) e pós-terapia antioxidante com vitaminas E e C e carvedilol (6 meses).



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os três tratamentos:  $\beta$  entre sem tratamento versus carvedilol + Vitaminas E e C, e  $\gamma$  entre carvedilol versus carvedilol + vitaminas E e C. Níveis de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### ***b) Com relação ao monitoramento de 7 anos de intervenções antioxidantes***

#### **5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA ESTUDADA**

Para análise dos 7 anos de monitoramento foram considerados apenas os pacientes que permaneceram no mesmo grupo desde o início do projeto (ano de 2003). Ao longo dos 7 anos, 13 de 42 pacientes mudaram de grupo e não foram computados para esta análise geral.

Cabe ressaltar que os novos pacientes que entraram no estudo a partir de 2008, para adequação do número uniforme nos grupos analisados, também não foram computados. O total de pacientes

considerados para esta análise foi de 29. Infelizmente, algumas poucas determinações não puderam ser analisadas devido a problemas técnicos e/ou questões logísticas ao longo do período analisado.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO OXIDATIVO

### 5.2.1 Determinação dos Níveis de Lipoperoxidação Tecidual – TBARS

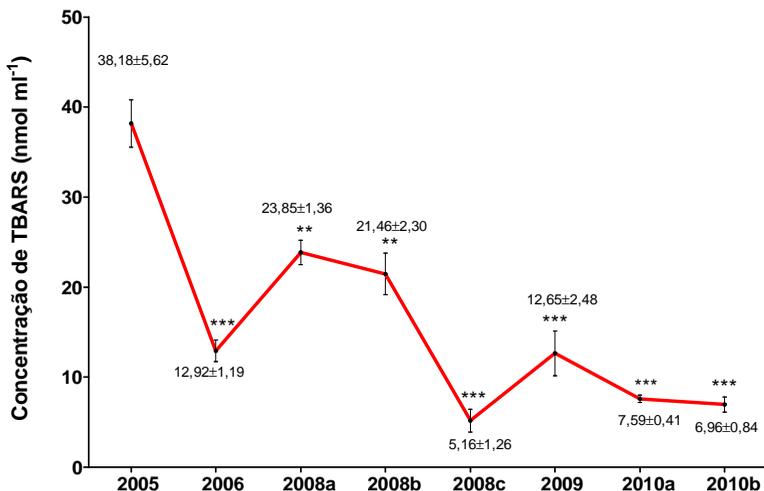
No ano de 2005 sem nenhuma intervenção terapêutica, observaram-se valores de TBARS plasmático relativamente elevados (figura 29). Ao longo dos anos e após as sucessivas intervenções aplicadas, os níveis de TBARS oscilaram, mas evidencia-se uma tendência de constante diminuição.

Fica evidente que as intervenções (2006, 2008c e 2010b) com os antioxidantes nutricionais inibiram os níveis de TBARS, enquanto que após os intervalos (2008a e 2009) sem esta intervenção estes níveis exibiram aumentos relativos, ficando em posições intermediárias.

Após o insulto oxidativo provocado pela administração de BZN (2008b), seus valores aumentaram em relação à primeira suplementação vitamínica aplicada no ano de 2006.

O tratamento com o carvedilol (2010a) seria o provável responsável por diminuir o processo de lipoperoxidação, mantendo-se assim após a administração conjunta deste fármaco com as vitaminas (2010b) (figura 29).

Figura 29: Níveis de TBARS em plasma de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



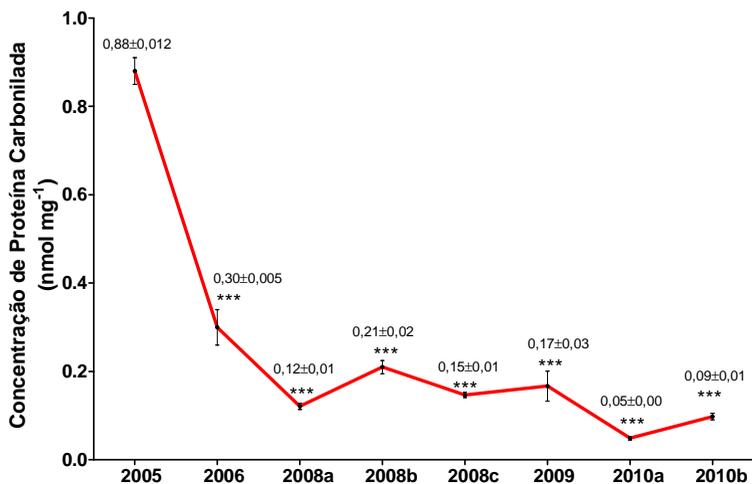
(2004: dados não disponibilizados); 2005: um ano após a primeira determinação (sem intervenções antioxidantes); 2006: após suplementação com vitaminas E (800UI/dia) C (500mg/dia) por 6 meses; 2008a: dois anos após a última suplementação; 2008b: após uso de benznidazol (5mg/Kg/day, 2 meses); 2008c: pós-suplementação com vitaminas; 2009: período sem intervenções (6 meses); 2010a: após uso de carvedilol (37,5 mg, 6 meses); e 2010b: associação de carvedilol com vitaminas E e C (6 meses).

Níveis de significância: \*\* $p < 0,05$ ) e \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente à determinação inicial (2005).

### 5.2.2 Determinação da Concentração de Proteína Carbonilada (PC)

O marcador de dano protéico (PC) apresentou um perfil de queda semelhante ao do TBARS ao longo das intervenções. Observa-se que, após a primeira suplementação (2006), seus valores diminuíram significativamente em relação ao início do projeto. Após dois anos da primeira intervenção antioxidantes (2008a), seus valores permaneceram significativamente diminuídos em relação ao início do projeto (2005), aumentando após o insulto oxidativo com BZN (2008b). O tratamento com carvedilol (2010a) e as suplementações vitamínicas aparentemente contiveram a progressão do dano oxidativo às proteínas (figura 30).

Figura 30: Níveis de PC em plasma de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



2005 – 2010b: vide legenda figura 29.

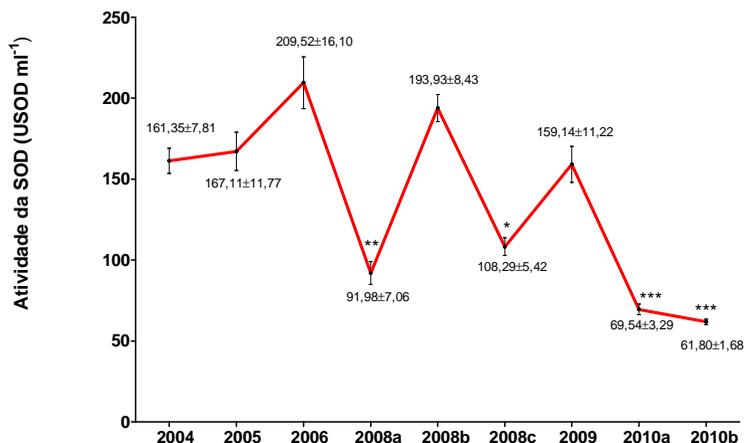
Níveis de significância: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001, comparativamente à determinação inicial (2005).

## 5.3 DETERMINAÇÕES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### 5.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD do início do projeto (2004) até a primeira suplementação (2006), não sofreu variações significativas nos seus valores (figura 31). Entretanto, dois anos da primeira suplementação, seus valores mostraram-se significativamente diminuídos em relação ao início do projeto (2004), mantendo assim um perfil de queda até o fim (2010b). Assim como a SOD, a maioria das enzimas antioxidantes tiveram suas atividades aumentadas após os pacientes serem expostos ao tratamento (2 meses) com BZN (2008b), diminuindo, em contraste, gradativamente sua atividade após cada suplementação vitamínica, sugerindo um comportamento enzimático muito semelhante entre si.

Figura 31 Atividade da SOD em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



2004: início do projeto (sem intervenções); 2005 – 2010b: vide legenda figura 29.

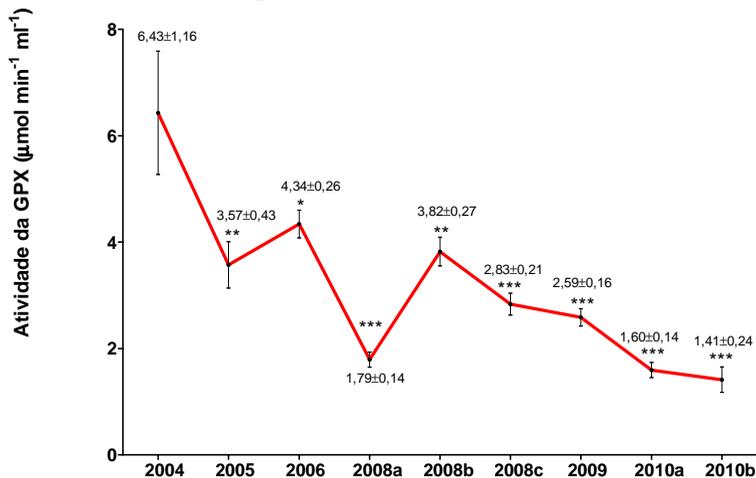
Níveis de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente à determinação inicial (2004).

### 5.3.2 Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx)

Igualmente à atividade da SOD, a enzima GPx também teve sua atividade diminuída ao longo dos 6 anos de monitoramento. Inicialmente, 1 ano após a primeira determinação e sem nenhuma intervenção (2005), seus valores diminuíram significativamente e mostraram leve aumento após a primeira suplementação (2006).

Após dois anos da primeira suplementação (2008a), seus valores mantiveram-se significativamente diminuídos em relação ao início do projeto (2004), aumentando apenas após insulto oxidativo com BZN 2008(b), e diminuindo gradativamente com as intervenções antioxidantes aplicadas (2008b, 2010a, 2010b) (figura 32).

Figura 32: Atividade da GPx em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



2004: início do projeto (sem intervenções); 2005 – 2010b: vide legenda figura 29.

Níveis de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente à determinação inicial (2004).

### 5.3.3 Atividade da Catalase (CAT)

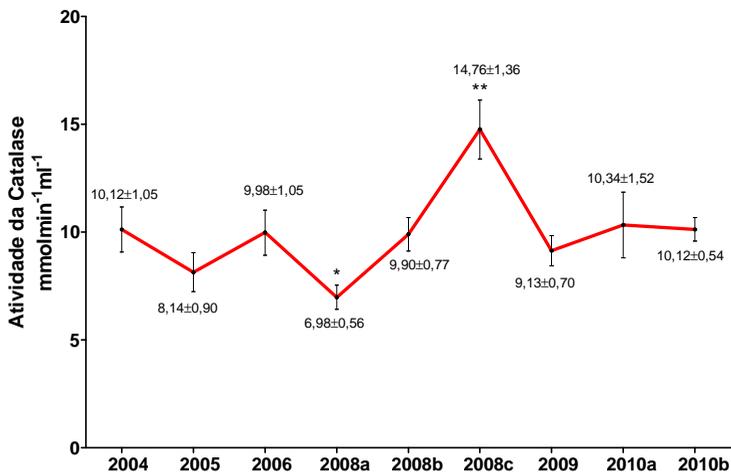
A catalase apresentou um perfil distinto das outras enzimas após as intervenções antioxidantes (figura 33), mostrando pequenas oscilações em sua atividade e um aumento acentuado após uma das suplementações (2008c) vitamínicas realizadas.

### 5.3.4 Atividade da Glutathione transferase (GST)

O perfil enzimático da GST após a primeira suplementação (2006) (figura 34), diminuiu significativamente em relação ao início do projeto (2004), mantendo-se assim após dois anos dessa primeira suplementação (2008a). Sua atividade foi aumentada após tratamento com BZN (2008b), apresentando uma diminuição gradativa ao longo dos 2 últimos anos de acompanhamento, após cada suplementação

vitamínica, sendo significativa após a intervenção com carvedilol (2010a) e de sua associação com as vitaminas (200b).

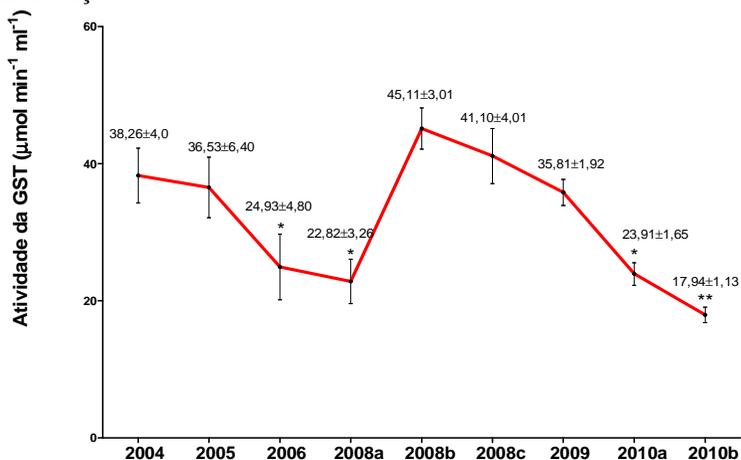
Figura 33: Atividade da CAT em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



2004 início do projeto (sem intervenções); 2005 – 2010b: vide legenda figura 29.

Níveis de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , comparativamente à determinação inicial (2004).

Figura 34: Atividade da GST em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



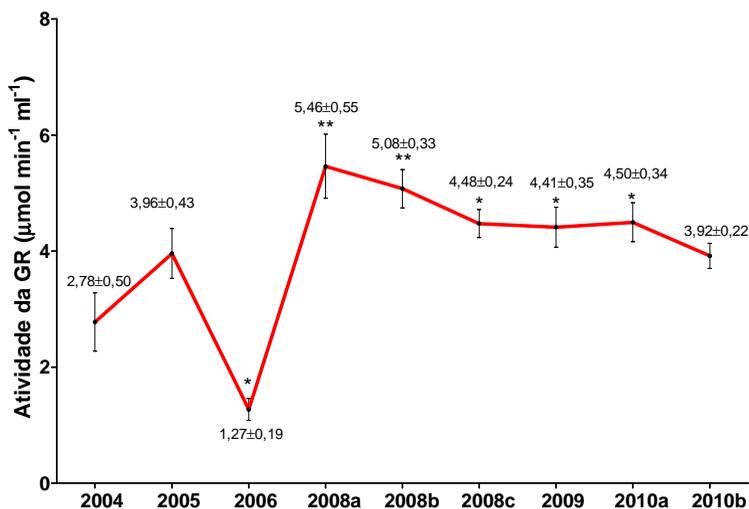
2004: início do projeto (sem intervenções); 2005 - 2010b:  
vide legenda figura 29 .

Nível de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , comparativamente à  
determinação inicial (2004).

### 5.3.5 Atividade da Glutathione redutase (GR)

O perfil da atividade da enzima GR mostrou certa semelhança ao da GST, com diminuição significativa de sua atividade após a primeira suplementação (2006). Dois anos após essa primeira suplementação, sua atividade aumentou significativamente em relação ao início do projeto, mostrando-se diminuída gradativamente ao longo dos 2 últimos anos de intervenção. Igualmente à maioria das enzimas antioxidantes, a GR aumentou expressivamente sua atividade após o tratamento com o fármaco BZN (2008b) (figura 35).

Figura 35: Atividade da GR em hemolisados de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 6 anos de acompanhamento com diferentes intervenções



2004: início do projeto (sem intervenções); 2005 - 2010b: vide legenda figura 29.

Níveis de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , comparativamente à determinação inicial (2004).

Reiterando o que já fora mencionado anteriormente, ao analisar o comportamento de todas as enzimas (SOD, GPx, GR, GST) ao longo de todo o período de monitoramento, foi possível observar que, após a administração do fármaco BZN (2008b), houve, em geral, aumento de suas atividades, e que, após as intervenções antioxidantes, tiveram também de forma generalizada, suas atividades diminuídas até o final do período analisado (2010b).

A participação do carvedilol (2010a) reforçou o efeito desta contínua tendência de queda das atividades destas enzimas.

## 5.4 DETERMINAÇÕES DOS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS E NUTRICIONAIS

### 5.4.1 Concentrações de Pequenos Tióis Não-Protéicos (GSH)

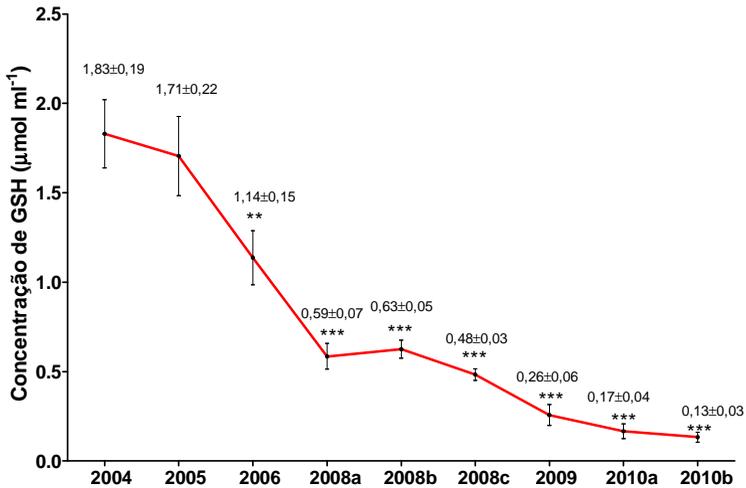
O perfil de diminuição dos níveis de GSH no sangue total dos pacientes CCC, também acompanhou temporalmente a diminuição verificada no dano lipídico e no dano protéico (figura 36).

Após a primeira suplementação (2006), os níveis de GSH diminuíram significativamente em relação ao início do projeto (2004), mantendo-se significativamente diminuídos após dois anos desta primeira suplementação.

O período após a primeira suplementação vitamínica (2006) mostrou uma aparente eficácia na manutenção dos níveis de GSH significativamente menores, em relação ao início do projeto (2004), sendo ainda mais diminuídos após cada intervenção antioxidante.

Ocorreu um discreto aumento nos seus níveis após o insulto oxidativo com BZN (2008b), de modo semelhante ao constatado na maioria das enzimas.

Figura 36: Níveis de GSH em sangue total de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



2004: início do projeto; 2005 - 2010b:  
vide legenda figura 29.

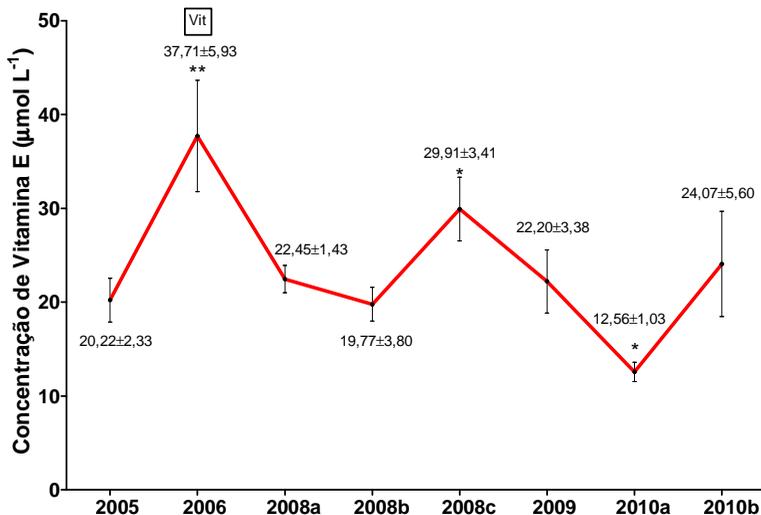
Níveis de significância: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente à determinação inicial (2004).

#### 5.4.2 Concentração de vitamina E

O perfil da vitamina E sofreu poucas alterações significativas ao longo do período analisado, considerando tanto os períodos sem suplementação (2005, 2008a e 2009), como os períodos após cada suplementação (2006, 2008c, 2010a e 2010b). Pode-se observar após a primeira suplementação (2006), um aumento significativo nos seus níveis em relação à determinação anterior (2005). Dois anos após essa suplementação (2008a), seus valores tenderam a voltar aos níveis iniciais, enquanto que o insulto oxidativo provocado pelo BZN (2008b) promoveu uma diminuição dos seus níveis. A segunda suplementação (2008c) mostrou novamente um aumento significativo em relação à primeira determinação (2005). Decorridos 6 meses e 24 meses da última suplementação, seus valores diminuíram gradativamente, (2009 e 2010a, respectivamente) somente retornando próximos aos valores

iniciais novamente após a adição das vitaminas à terapia com carvedilol (2010b), (2005).

Figura 37: Níveis de Vitamina E em plasma de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



(2004: dados não disponibilizados); 2005 - 2010b: vide legenda figura 29. Níveis de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , comparativamente à determinação inicial (2005).

De modo semelhante à resposta das suplementações antioxidantes, o carvedilol aparentemente foi eficaz em manter diminuídas as atividades das enzimas antioxidantes e os níveis dos antioxidantes não-antioxidantes, como GSH e vitamina E (figuras 36 e 37), e também dos marcadores de dano (figuras 29 e 30). É possível inferir que a combinação dos tratamentos, ou seja, utilizando os três antioxidantes conjuntamente (carvedilol, vitaminas E e C), teriam apresentado uma possível ação sinérgica entre os mesmos.

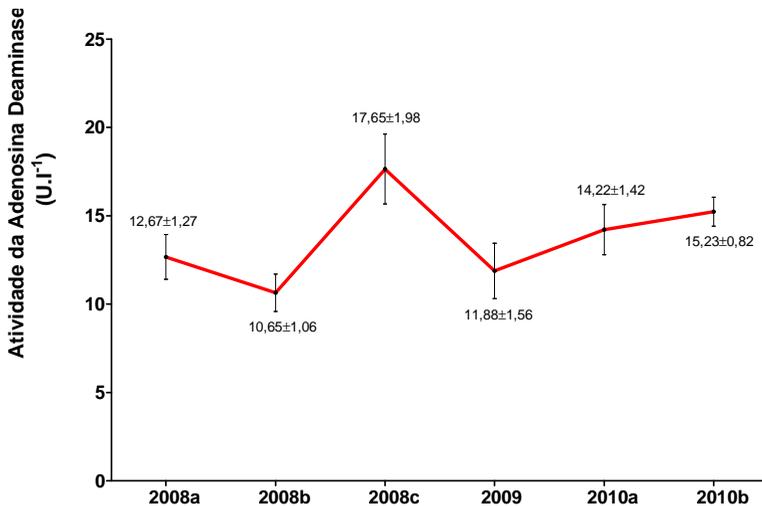
Até mesmo a enzima catalase (figura 33), que mostrou seu valor aumentado (2008c) após a suplementação antioxidante, teve suas atividades aproximadas aos valores iniciais, com tendência a estabilizarem-se ao longo do período analisado, após o tratamento combinado dos três antioxidantes.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

### 5.5.1 Atividade da Adenosina Deaminase (ADA)

Os níveis de ADA não mostraram diferenças significativas ao longo das intervenções (figura 38).

Figura 38: Atividade da ADA no soro de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 2 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



2004 a 2006: determinações não foram realizadas; 2008a - 2010b: vide legenda figura 29.

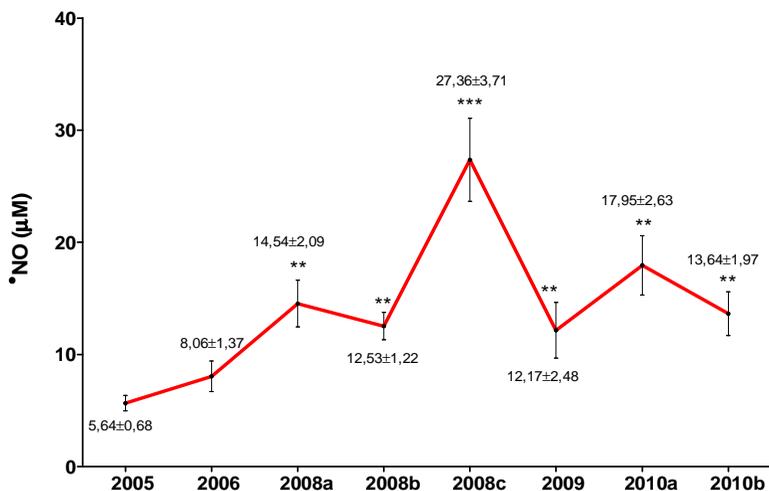
### 5.5.2 Concentração de Óxido Nítrico (•NO)

Por outro lado, o marcador inflamatório •NO (figura 39), mostrou níveis aumentados ao longo dos anos, com destaque para o aumento pós-suplementação (2008c).

### 5.5.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

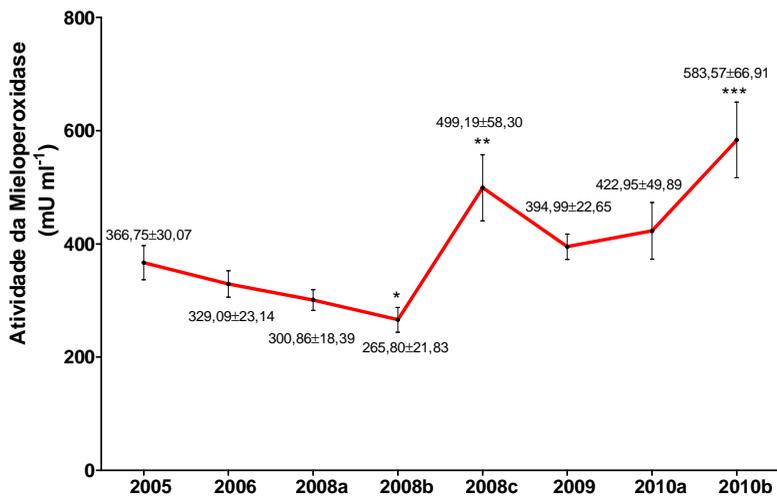
De modo semelhante aos níveis de  $\bullet\text{NO}$  encontrados, a atividade da MPO manteve-se aumentada ao longo dos anos de monitoramento, com destaque para os aumentos nos períodos pós-suplementações (2008c e 2010b) (Figura 40).

Figura 39: Níveis de  $\bullet\text{NO}$  no soro de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



(2004: dados não disponibilizados); 2005 - 2010b: vide legenda figura 29.  
Níveis de significância: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente à determinação inicial (2005).

Figura 40: Atividade da MPO no soro de pacientes chagásicos crônicos no decorrer de 5 anos de acompanhamento com diferentes intervenções.



(2004: dados não disponibilizados); 2005 - 2010b:  
vide legenda figura 29.

Níveis de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ,  
comparativamente à determinação inicial (2005).



## 6 DISCUSSÃO

### *a) Com relação à intervenção com Carvedilol e Vitaminas E e C*

Após a aplicação de carvedilol no presente estudo, houve uma diminuição significativa no marcador de dano protéico e apenas uma tendência à diminuição dos (TBARS) níveis do marcador de dano lipídico (LPO). De modo semelhante, estudo recente mostrou que o carvedilol foi efetivo em diminuir o dano oxidativo, através da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA), produto majoritário da LPO (ou seja, muito próximo aos níveis de TBARS), em mitocôndria de ratos, após indução de dano celular com cisplatina (RODRIGUES et al., 2011).

Evidências experimentais e clínicas já evidenciaram anteriormente que o carvedilol é vantajoso sobre os outros medicamentos  $\beta$ -bloqueadores, devido à sua potente ação antioxidante (YUE et al., 1999; NAKAHIRA et al., 2010). Contudo, resultados obtidos por Jonsson e colaboradores (2007), não encontraram nenhuma diferença significativa nos níveis de TBARS em pacientes com ICC tratados com carvedilol. Este último resultado assemelha-se aos resultados encontrados no presente trabalho, em que também não foram evidenciados diferenças significativas nos níveis de TBARS, ressaltando porém que o maior dano oxidativo e menores respostas antioxidantes ocorreram nos pacientes mais acometidos pela CCC (grupos II e III).

Similarmente aos resultados encontrados em nosso laboratório (de Oliveira, 2004), Wen e colaboradores (2004), evidenciaram um aumento nos produtos de lipoperoxidação e carbonilação protéica no coração de chagásicos durante o curso da infecção e desenvolvimento da doença. Outro trabalho também realizado por este grupo, mostrou um aumento de 66% nos níveis de MDA e de 168% nos conteúdos de aductos de carbonilação protéica no miocárdio de ratos cronicamente infectados por *T. cruzi* (WEN et al., 2004). Em estudo realizado recentemente, o carvedilol inibiu a oxidação mitocondrial e de grupos tióis eficientemente, protegendo as mitocôndrias contra o dano oxidativo induzido pela xantina oxidase (GÁSPÁROVÁ et al., 2010). Isso poderia justificar, após administração de carvedilol no presente trabalho, a diminuição nos conteúdos de proteína carbonil em todos os grupos estudados.

Keith e colaboradores (1998) encontraram uma significativa correlação direta entre a severidade de doenças cardíacas e o nível de estresse oxidativo associado inversamente aos níveis dos antioxidantes. Do mesmo modo, Ghatak e colaboradores (1996), em estudo realizado em pacientes com ICC, mostraram níveis plasmáticos de MDA aumentados em relação aos controles, revelando uma correlação direta da severidade da insuficiência cardíaca com os níveis de MDA. Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, com esses mesmos pacientes chagásicos crônicos, evidenciaram aumento sistêmico na geração de ERO paralelamente à progressão da doença (de OLIVEIRA et al., 2007; MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010). Um declínio na atividade da MnSOD na matriz mitocondrial no miocárdio, durante a progressão da infecção e da doença de Chagas já fora demonstrado anteriormente, predispondo o coração dos chagásicos ao estresse oxidativo (ZACKS et al., 2005).

Após a intervenção com carvedilol, a GR permaneceu inalterada em todos os grupos, a atividade da CAT aumentou nos grupos IA e IB, a atividade da SOD mostrou-se diminuída em todos os grupos, enquanto que as atividades das enzimas GPx e GST apenas diminuíram nos grupos menos acometidos. Estas respostas diferenciadas poderiam ser atribuídas ao melhor *status* das defesas antioxidantes nos pacientes menos acometidos (IA e IB), aspecto já observado em nossos trabalhos anteriores, com estes mesmos pacientes (de OLIVEIRA et al., 2007; MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010).

A cardioproteção do carvedilol é atribuída à presença do grupo carbazol na sua molécula, e, devido à sua lipofilia, pode concentrar-se mais de 10 mil vezes em membranas lipídicas, permitindo que o grupo carbazol tenha acesso direto ao local de peroxidação dos ácidos graxos, conferindo, desta forma, sua potente atividade antioxidante em relação a outros beta-bloqueadores (DANDONA et al., 2007).

É sabido que o carvedilol age seqüestrando os radicais livres ou suprimindo sua geração, principalmente do radical ânion superóxido (ASLAM, 2008). Esta última atuação é de suma importância, pois inibe a produção deste radical, impedindo a propagação da geração de ERO (DANDONA et al., 2007). Isto poderia justificar a diminuição da atividade da SOD verificada no presente trabalho após a intervenção do carvedilol, provavelmente em decorrência da sua habilidade específica em seqüestrar o radical ânion superóxido.

Nosso grupo de pesquisa constatou recentemente que, após suplementação com vitaminas E e C nestes mesmos pacientes, houve um aumento da CAT (RIBEIRO et al., 2010). Esses resultados assemelham-se aos encontrados após a suplementação com carvedilol, podendo indicar que a suplementação com vitamina E protegeria as células contra a inativação da CAT em condições experimentais (CHOW, 1980; 1992). Além disso, tanto o alfa como o  $\gamma$ -tocoferol podem aumentar a expressão do receptor ativador de proliferação do peroxissoma (PPAR- $\gamma$  e PPAR- $\alpha$ ), os quais estão envolvidos na ativação da  $\beta$ -oxidação lipídica. Mais especificamente, durante o processo de  $\beta$ -oxidação de lipídios nesta organela, ocorre elevação da produção de  $H_2O_2$ , e um conseqüente aumento da atividade da CAT (LATRUFFE et al., 2000; CAMPBELL et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2007), o que explicaria o aumento da atividade desta enzima após a suplementação antioxidante nestes pacientes. Isto também poderia ser conseqüência da persistência da suplementação anterior aplicada a estes mesmos pacientes (RIBEIRO et al., 2010), um efeito que aparentemente ocorreu na maioria dos parâmetros examinados neste estudo e que serão melhor explorados no próximo item (6.0.b).

Recente trabalho sobre análise proteômica no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC), mostrou uma expressão da enzima CAT aumentada quando comparada a indivíduos saudáveis (TEIXEIRA, 2009), aspecto que também poderia justificar a persistência deste aumento da CAT ou da manutenção de suas atividades relativamente elevadas, ao longo dos vários anos de monitoramento (vide item 6.0.b adiante).

Da mesma forma, o carvedilol aparentemente compensou a utilização da vitamina E pelos pacientes chagásicos no curso do presente estudo, através da manutenção de seus níveis em todos os grupos estudados. A capacidade sinérgica do carvedilol em preservar os antioxidantes endógenos já havia sido relatada em vários estudos congêneres (YUE et al., 1992; YUE et al., 1993; RUFFOLO e FEUERSTEIN, 1997), assim como a participação dos seus metabólitos hidroxilados na sua ação antioxidante, como já fora mencionado anteriormente, podendo potencializar em até 50 ou 60 vezes mais o efeito do próprio carvedilol (FERRARI et al., 1999). Por outro lado, os níveis de GSH diminuíram em todos os grupos de pacientes, após a intervenção com o fármaco, sugerindo uma relação sinérgica entre carvedilol, vitamina E e GSH, propriedade já descrita na literatura (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Com relação aos marcadores enzimáticos de inflamação MPO e ADA, apenas a atividade da enzima ADA foi aumentada, e somente no grupo de menor comprometimento (IA), o mesmo ocorrendo com relação aos níveis de  $\bullet\text{NO}$ . Os neutrófilos são uma importante fonte de produção de ERO, liberando quimiocinas e enzimas proteolíticas que aumentam a extensão do dano oxidativo e lesão no miocárdio (FEUERSTEIN et al., 1997). O carvedilol é também um potente antioxidante, considerando sua capacidade de prevenir o infiltrado de células inflamatórias no miocárdio (WU et al., 2007), suprimindo a expressão gênica de ICAM-1, uma molécula de adesão responsável pela fixação de neutrófilos ativados nos processos inflamatórios (FEUERSTEIN et al., 1997). Uma diminuição destes infiltrados foi verificada pela determinação da atividade da ADA e Proteína C Reativa (PCR), que se mostraram diminuídas após tratamento com carvedilol (MA et al., 1996; DANDORA et al., 2007). Estes resultados são coerentes com os obtidos no presente estudo, pois, exceção à ADA, não houve aumento dos marcadores inflamatórios, sugerindo uma contribuição do carvedilol na estabilização ou até mesmo atenuação do processo inflamatório.

A administração de 12,5 mg de carvedilol duas vezes ao dia provocou uma diminuição na PCR e na proteína quimiotática de monócito (PQM), após uma e também após 6 semanas de seu uso (DANDONA et al., 2007). Como a atividade da ADA é baseada no infiltrado de mononucleares, poderia ser sugerido que o carvedilol foi responsável pela redução da migração de leucócitos mononucleares, pois os valores de ADA mantiveram-se inalterados após sua intervenção, excetuando novamente os pacientes pertencentes ao grupo IA. Esse aumento restrito ao grupo IA poderia ser decorrência do estágio menos avançado da doença cardíaca chagásica, em que os pacientes continuariam respondendo melhor à infecção através do recrutamento de monócitos e mantendo, conseqüentemente, elevada a atividade da ADA.

O aumento nos níveis de  $\bullet\text{NO}$  nos pacientes do grupo IA poderia ser atribuído à ação tripanocida associada ao peroxinitrito (NAVILIAT et al., 2005), pois o aumento da nitração de proteínas (3-nitrotirosina), detectadas em processos inflamatórios no miocárdio de camundongos chagásicos, como conseqüência do aumento dos níveis de  $\bullet\text{NO}$ , pareceu diminuir a parasitemia, mas promoveu paralelamente, dano colateral ao miocárdio. Da mesma maneira, Dhiman e colaboradores (2008) mostraram que animais infectados com *T. cruzi* apresentaram aumento do conteúdo de  $\bullet\text{NO}$  e de estresse nitrosativo, verificado pelo aumento

da nitração de proteínas, proporcional ao grau de comprometimento do miocárdio. Outra hipótese deste aumento é que o estresse oxidativo aumentaria a síntese de dimetil-arginina assimétrica, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase endotelial, conseqüentemente ocasionando uma elevação nos níveis séricos de  $\bullet\text{NO}$  (BHOGADE et al., 2008), o que poderia novamente ter ocorrido no presente estudo e de forma restrita ao grupo IA.

No segundo momento da primeira parte do presente trabalho, após a intervenção com o carvedilol, mais dois antioxidantes nutricionais (vitamina E e C) foram suplementados juntamente com o carvedilol aos pacientes, por um período de 6 meses. O efeito benéfico da interação destes três antioxidantes pareceu evidente, quando comparados os níveis plasmáticos de TBARS nas três intervenções aplicadas (vide figura 17). Os grupos menos acometidos (IA e IB) tiveram diminuição significativa dos níveis plasmáticos de TBARS, sendo que os demais grupos apresentaram apenas uma tendência a diminuir seus valores médios. Os níveis de TBARS e PC mostraram valores inversamente proporcionais às concentrações plasmáticas de vitamina E. Perfil semelhante foi mantido ao longo do monitoramento (7 anos), enfoque da segunda parte deste trabalho, o qual será detalhado adiante.

Apesar de não determinadas as concentrações plasmáticas no presente estudo, a importância da vitamina C reside principalmente na recuperação do radical  $\alpha$ -tocoferoxil, garantindo o seu efeito antioxidante como interruptor de processos de propagação de ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006; BHOGADE et al., 2008).

De modo semelhante aos níveis de TBARS, os níveis de PC também mostraram-se significativamente diminuídos em todos os grupos analisados. Interessantemente, quando da comparação das duas intervenções, os níveis de PC foram significativamente maiores nos pacientes tratados com as vitaminas do que somente com o carvedilol. Conforme mencionado anteriormente, comparada à vitamina E, a atividade antioxidante do carvedilol e de seus metabólitos na prevenção da oxidação de grupos tióis e outros sistemas, pode ser de até 10 vezes (NAKAHIRA et al., 2010), ou mesmo 50-60 mais potente (FERRARI et al., 1999). Reiterando, isto poderia ser atribuído à sua lipofilia, permitindo ao carvedilol concentrar-se mais de 10 mil vezes em membranas lipídicas, onde o grupo carbazol teria acesso direto ao local de peroxidação dos ácidos graxos e proteínas (DANDONA et al., 2007). Todavia, neste particular, a interação entre os três antioxidantes não

apresentou o sinergismo esperado na proteção dos grupos tióis protéicos. Contudo, é importante salientar que, mesmo os valores estando aumentados após combinação dos três antioxidantes, eles foram significativamente menores quando comparados aos resultados obtidos sem nenhuma intervenção.

Houve também uma diminuição dos níveis de GSH no sangue total de pacientes em todos os grupos após a intervenção com as vitaminas antioxidantes. A glutatona é o mais importante tiol celular, encontrada em todos os organismos aeróbios em concentrações muito elevadas comparativamente aos demais antioxidantes (~1-10 mM) (WILHELM FILHO et al., 2002), atuando como antioxidante e como substrato para várias enzimas que previnem e minimizam os efeitos deletérios das ERO e ERN (KOSOWER e KOSOWER, 1978; MEISTER, 1981). A GSH pode atuar sinergicamente com a vitamina E, por participar do seu processo de regeneração (di MASCIO et al., 1991), o que poderia explicar sua diminuição pelo aumento dos níveis de vitamina E pós-suplementação em todos os grupos estudados. O aumento significativo dos níveis plasmáticos de vitamina E também evidenciou que a mesma foi eficientemente absorvida pelos pacientes e biodisponibilizada proporcionalmente à sua suplementação.

Com exceção da atividade da SOD, a qual diminuiu em todos os grupos, as demais enzimas antioxidantes também diminuíram generalizadamente suas atividades, em quase todos os grupos, sendo estas alterações melhor evidenciadas nos grupos menos acometidos (IA e IB). Assim, as atividades da GR e da GPx foram significativamente diminuídas nos grupos menos acometidos, onde aparentemente os pacientes apresentaram uma melhor capacidade sistêmica de reagir frente aos insultos oxidativos e nitrosativos (MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010). Coerentemente, Chuang e colaboradores (2006) mostraram que ocorreu um aumento nas atividades antioxidantes enzimáticas também relacionado a um mau prognóstico (CHUANG et al. 2006).

De modo distinto, a atividade da CAT manteve-se inalterada em todos os grupos, aspecto que poderia estar relacionado à diminuição no fornecimento de NADPH às células (BHOGADE et al., 2008), além constituir uma resposta paralela à diminuição da GPx e dos níveis de TBARS, consequência provável da eficácia da suplementação vitamínica.

Com relação aos marcadores de inflamação, a atividade da ADA manteve-se aumentada apenas no grupo IA, efeito semelhante ao constatado somente com a intervenção do carvedilol. De modo similar, após a suplementação vitamínica, os níveis de  $\bullet\text{NO}$ , diminuíram significativamente apenas no grupo IA, que anteriormente estiveram aumentados. Já foi descrito na literatura que a vitamina E pode prevenir a toxicidade do nitrito via formação e propagação de uma forma altamente reativa de ERN, o peroxinitrito (MINAMIYAMA et al., 2006). Assim, a diminuição nos níveis de  $\bullet\text{NO}$  no grupo de pacientes IA poderia ser consequência dos níveis aumentados de vitamina E neste grupo.

A atividade da MPO mostrou-se elevada nos grupos IB e III. Concentrações plasmáticas de MPO acima dos valores normais foram encontradas em pacientes com infarto agudo do miocárdio e associadas ao risco aumentado de mortalidade (LOBES et al., 2010), e identificados como marcadores de gravidade de doença em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica (NG et al., 2006). O aumento de MPO constatado principalmente nos pacientes do grupo II poderia estar relacionado ao grau de comprometimento cardíaco. No entanto, a comparação direta dos níveis de MPO entre os diferentes estudos existentes na literatura continua problemática, porque diferem, tanto na amostra de sangue (plasma ou soro) utilizada, como nos métodos de ensaios em laboratório para determinar de suas concentrações (LOBBES et al., 2010). Também é possível que este parâmetro sofra modificações com a evolução da doença, pois a doença de Chagas, em sua fase cardíaca crônica, é uma doença progressiva, com múltiplas implicações morfo-funcionais do miocárdio e, por isso, apresentar manifestações laboratoriais variadas.

A título de esclarecimento, é importante ressaltar as limitações do desenho deste estudo, pois o objetivo da primeira parte do presente estudo não foi avaliar os padrões de normalidade para os parâmetros analisados, e tampouco daqueles anteriormente desenvolvidos em nosso laboratório (MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010). Trata-se de um estudo de intervenção terapêutica de uma amostra pertencente a uma coorte aberta constituída de pacientes acompanhados no ICES/Serviço de Cardiologia, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-UFRJ. Logo, o objetivo principal deste componente do presente estudo foi avaliar a intervenção antioxidante com o carvedilol, e posteriormente, através da adição das vitaminas antioxidantes ao carvedilol em um dado momento, e não comparar estes pacientes com

um grupo de indivíduos sadios, aspecto que foi contemplado no trabalho inicial do projeto sobre Doença de Chagas (de OLIVEIRA, 2004). Deve ser salientado que em determinado grupo de pacientes, independentemente da forma rigorosa como a classificação foi realizada, diferenças individuais entre os componentes do mesmo grupo clínico são encontradas. Portanto, a doença de Chagas é uma entidade notável, não só pela sua variedade clínica, mas também por sua variabilidade individual.

Na segunda parte desta tese, propôs-se verificar o efeito da eventual persistência das várias intervenções antioxidantes ao longo de 7 anos de acompanhamento, considerando sua eficácia entre sucessivos períodos intercalados nestas intervenções.

#### ***b) Com relação ao monitoramento de 7 anos de intervenções antioxidantes***

Especialmente nas duas últimas décadas, a possibilidade de que vitaminas antioxidantes, em especial as vitaminas E e C, pudessem com segurança atenuar processos oxidativos, particularmente no tratamento de doenças cardiovasculares e no processo aterosclerótico, suscitou grande interesse na comunidade científica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Além disso, os processos oxidativos podem desempenhar um papel importante na patogênese de muitas outras doenças crônicas, incluindo doenças neurodegenerativas e câncer (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006; GAZIANO, 2004).

Na segunda parte desta tese, o perfil do marcador de estresse oxidativo relacionado com LPO (níveis de TBARS), foi gradual e significativamente diminuído ao longo de 7 anos, provavelmente por consequência direta das terapias antioxidantes aplicadas intervaladamente nos anos de 2006, 2008c e 2010. Apartir da primeira suplementação com vitaminas E e C (2006), os níveis de TBARS mantiveram-se diminuídos em relação ao início (2005), com quedas ainda maiores após as suplementações subsequentes, sugerindo a eficácia da intervenção antioxidante, tanto das vitaminas *per se*, como posteriormente da ação isolada ou combinada com o fármaco carvedilol. Perfil semelhante também foi observado no marcador de dano protéico (níveis de PC).

Inversamente aos níveis diminuídos de danos lipídico e protéico constatados nestes períodos, ocorreu uma elevação nos níveis plasmáticos de vitamina E, mostrando que a mesma foi efetivamente

absorvida, e que este aumento possa ter interferido diretamente na diminuição dos níveis de TBARS e PC. Também os níveis de GSH foram diminuídos concomitantemente ao aumento dos níveis de vitamina E nos mesmos períodos citados, provavelmente através da ação sinérgica e compensatória entre ambos os antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). A relação estatística evidenciou uma correlação significativamente direta entre TBARS e GSH, ( $r=0,511$ , coeficiente de Pearson;  $p<0,01$ ), sugerindo que a diminuição do dano lipídico teria sido consequência da diminuição paralela dos níveis de GSH.

O perfil das enzimas antioxidantes evidenciou um aumento significativo na maioria delas, decorrente da administração por 2 meses do fármaco BZN (2008b), provavelmente como consequência da sua capacidade de gerar ERO e ERN como mecanismo de ação (RIBEIRO, 2009). Após as seguidas intervenções vitamínicas e delas com o carvedilol, observou-se uma diminuição quase generalizada de suas atividades, provavelmente decorrente da atenuação do estresse oxidativo associada à própria doença (de OLIVEIRA, 2004).

A enzima SOD mostrou uma progressiva e persistente diminuição na sua atividade entre 2008 e 2010, podendo ser atribuída à ação das vitaminas E e C anteriormente administradas a estes pacientes. Observou-se também que, após o insulto oxidativo promovido pelo BZN, sua atividade aumentou, provavelmente para compensar o excesso de geração de ERO proveniente da ação deste fármaco. Após as suplementações seguintes (2008c, 2010a e 2010b), ocorreu diminuição de sua atividade, sendo mais expressiva no momento em que fármaco carvedilol foi administrado, tanto isoladamente como associado às vitaminas E e C, sugerindo uma interação sinérgica entre estes antioxidantes na atenuação do dano oxidativo. A capacidade antioxidante do carvedilol e sua lipofilia, juntamente com a participação da vitamina E como antioxidante, poderiam justificar essa diminuição na atividade da SOD em relação às outras suplementações. A capacidade acumulativa da vitamina E (BUCKLEY et al., 1995) após as sucessivas suplementações, igualmente poderia explicar esta diminuição enzimática ao longo de 7 anos no sangue destes pacientes.

As atividades da enzima GPx diminuiu progressiva e gradativamente ao longo dos vários anos de monitoramento. A persistência do efeito redutor das vitaminas E e C após a primeira suplementação antioxidante (2006), estaria ainda presente após dois anos decorridos (2008a). Aparentemente, as demais enzimas, para

compensar o efeito oxidativo do BZN, tiveram suas atividades igualmente aumentadas. A GPx-fosfolípido hidroperóxido, é uma fração enzimática da GPx que é capaz de reagir com fosfolípidos, inibindo o processo de lipoperoxidação de membranas, o que poderia ter contribuído para a diminuição nos níveis de TBARS ao longo do monitoramento (ARTHUR, 2000; IMAI e NAKAGAWA, 2003).

A catalase mostrou atividades estáveis (2006, 2010a, 2010b), ou mesmo aumentada (2008c) nos períodos pós-suplementações antioxidantes, mostrando um perfil distinto daquele exibido pelas demais enzimas antioxidantes. Um estudo do perfil protéico de pacientes com CCC mostrou que esta enzima está especialmente aumentada (TEIXEIRA, 2009), podendo justificar a persistência de seu aumento e/ou declínio, mesmo após as sucessivas suplementações. Após a última etapa de suplementação com carvedilol e associação das vitaminas (2010a e 2010b), foi possível observar uma diminuição de CAT em relação à suplementação ocorrida em 2008(c). Esse efeito poderia ser consequência da participação do fármaco carvedilol, com potente ação antioxidante, cerca de até 10 vezes maior comparativamente à vitamina E (FERRARI et al., 1999), enquanto sua associação à suplementação antioxidante (2010b) mostrou uma diminuição ainda maior.

Os aumentos da CAT provavelmente, refletiriam uma compensação à elevada produção endógena de  $H_2O_2$  e outros hidroperóxidos, pois em eritrócitos, a GPx é responsável pela detoxificação de  $H_2O_2$ , enquanto que o aumento da atividade da CAT só ocorreria quando altas concentrações de  $H_2O_2$  fossem produzidas sistemicamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001, 2006).

O perfil de atividade da GST manteve-se semelhante ao das demais enzimas, ocorrendo uma diminuição significativa na sua atividade logo após a primeira suplementação, mantendo-se diminuída dois anos após (2008a), podendo ser reflexo da primeira suplementação (2006) na manutenção do poder redutor sistêmico. Diferentemente das outras enzimas, a atividade da GST manteve-se inalterada em relação ao início do projeto. Entretanto, quando da administração do fármaco BZN (2008b), foi possível observar uma tendência de aumento neste período, que poderia ser atribuído à capacidade detoxificadora de xenobióticos desta enzima (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

A atividade da enzima GR mostrou um perfil semelhante às demais enzimas após o ano de 2008. Sua atividade diminuiu significativamente após a primeira suplementação (2006), e, após dois anos, teve sua atividade significativamente aumentada em relação ao

início do monitoramento. A partir de então, mesmo após o tratamento com BZN e das novas suplementações vitamínicas, observou-se uma progressiva diminuição da sua atividade, aproximando-se dos valores iniciais evidenciados em 2005. A diminuição ocorrida a partir da segunda suplementação (2008c), também poderia ser atribuída à suplementação com as vitaminas E e C, mantendo-se num patamar semelhante nos anos seguintes.

Considerando os resultados *in vivo* e *in vitro* pontuais de biomarcadores de dano lipídico (níveis de TBARS ou MDA), como também de dano às proteínas (PC), é possível constatar que, da mesma forma que os estudos acima mencionados, alguns apoiam e outros refutam o uso de vitaminas E e C na atenuação de estresse oxidativo, conforme elencados abaixo.

Estudo com 29 pacientes diabéticos adultos que receberam dose diária de 100 UI de vitamina E ou placebo por um período de três meses, mostrou uma diminuição significativa no MDA plasmático no grupo suplementado (JAIN et al., 1998). Estudo subsequente, realizado com 24 crianças diabéticas através do mesmo projeto, mostrou novamente uma diminuição significativa de MDA no grupo suplementado (JAIN et al., 2000). Outro estudo envolvendo 49 pacientes diabéticos, que receberam 504 mg/dia de alfa-tocoferol e/ou placebo, por um período de 6 meses, mostrou uma diminuição dos níveis de TBARS *ex-vivo* para o grupo de pacientes suplementados, contudo nenhuma mudança foi detectada na capacidade antioxidante dos eritrócitos, conforme determinado pelos níveis de glutatona e atividade da glutatona peroxidase (MANUEL Y KEENOY et al., 2001).

Em estudo randomizado com 49 pacientes HIV suplementados diariamente com 800 UI de vitamina E e 1 g de vitamina C, controlado com placebo por um período de 3 meses, mostrou declínio nos níveis de MDA plasmático no grupo de suplementados (ALLARD et al., 1998).

Com relação aos marcadores inflamatórios analisados no presente trabalho, \*NO e MPO, com exceção da ADA (2008), os quais foram determinados a partir do ano de 2005, exibiram níveis progressivamente elevados em relação ao início do estudo (2005).

Sendo a enzima MPO considerada como um marcador de gravidade de doença em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica, poderia se esperar um aumento ao longo dos anos de acompanhamento, compatível com a evolução da doença, da mesma forma a produção de \*NO (NG et al., 2006). Por ser de caráter crônico, na doença de Chagas ocorre produção de TNF $\alpha$  que induz a expressão de iNOS pelo

macrófago, resultando num *burst* de  $\bullet\text{NO}$  (BHOGADE et al., 2008). Pérez-Fuentes e colaboradores (2007) também mostraram aumento simultâneo de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\bullet\text{NO}$  em pacientes chagásicos crônicos. Como citado anteriormente, tem sido encontrada no sangue periférico de pacientes com a forma indeterminada e na forma cardíaca da doença de Chagas, induzidas pela membrana lipídica do *T. cruzi*, a presença de citocinas pré e pró-inflamatórias como o  $\text{TNF}\alpha$  (DUTRA et al., 1997; FERREIRA et al., 2003). A atividade da ADA só foi mensurada a partir de 2008(a), a qual se manteve inalterada no período.

Como mencionado anteriormente, também é possível que estes tipos de parâmetros sofram modificações com a evolução da doença, pois a doença de Chagas é uma doença progressiva, com múltiplas implicações morfo-funcionais do miocárdio e, por isso, podem apresentar manifestações laboratoriais variadas.

Ulker e colaboradores (2003) relataram a eficácia da suplementação de vitamina E e C em reverter a disfunção endotelial, através da regulação da eNOS e atividade da NAD(P)H-oxidase em um modelo animal de ratos. A incubação de aortas de ratos hipertensos com diferentes concentrações de vitamina C (10 a 100  $\mu\text{mol/L}$ ) e, especificamente, com altas concentrações de vitamina E (100  $\mu\text{mol/L}$ ), melhorou a função endotelial, atenuou a produção de  $\text{O}_2\bullet^-$ , bem como a atividade NAD(P)H oxidase, promovendo aumento da atividade da eNOS e geração de  $\bullet\text{NO}$ , de acordo com o verificado no presente trabalho. Ainda em outro estudo realizado por Saran e colaboradores (2003), usando 800 UI/dia de vitamina E, realizado com 8 pacientes ambulatoriais estáveis com doença renal crônica e não-diabéticos e 6 controles saudáveis, com o objetivo de medir os níveis plasmáticos de dimetilarginina assimétrica no início e após 8 semanas do tratamento, mostrou que após o tratamento com vitamina E, houve diminuição significativa dos níveis plasmáticos da dimetilarginina assimétrica em seis de oito pacientes, o que implicaria no aumento disponibilidade de  $\bullet\text{NO}$  (SARAN et al., 2003).

Cominacini e colaboradores (1997) mostraram que a administração de vitamina E em meio de cultura com células endoteliais humanas, diminuiu a expressão de várias moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) pela LDL oxidada, e, conseqüentemente, diminuiu a adesão de monócitos. Da mesma forma, Martin e colaboradores (1997), mostraram que, o enriquecimento *in vitro* de células endoteliais da aorta humana com alfa-tocoferol (42  $\mu\text{mol/L}$ ), inibiu significativamente a adesão de monócitos LDL-induzida

de uma maneira dose-dependente, com uma concomitante redução dos níveis de ICAM. Da mesma forma que o alfa-tocoferol, os derivados sintéticos da vitamina E, como acetato e succinato também mostraram inibir o TNF- $\alpha$  induzido por ativação de NF-kB *in vitro* em um trabalho realizado por Suzuki e Packer (1993).

A atividade antiinflamatória medida pela diminuição da PCR, e a função antioxidante medida pela diminuição do tempo de oxidação da LDL, também foi relatada em um estudo realizado por Uprichard e colaboradores (2000) em pacientes com diabetes após a suplementação de RRR-alfa-tocoferol na dose de 800 UI/dia, por seis semanas.

Van Tits e colaboradores (2000), em um ensaio clínico de administração de RRR-alfa-tocoferol (600 IU/dia por seis semanas) em pacientes hipertrigliceridêmicos primários e indivíduos normolipidêmicos, mediram a liberação de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e a quimiocina (IL-8) a partir de células mononucleares do sangue periférico antes e depois de intervenção com vitamina E. Após a suplementação *in vitro*, a produção de citocinas IL-8 diminuiu significativamente nos dois grupos. Sugeriram que a suplementação com alfa-tocoferol poderia influenciar a resposta inflamatória de infiltrado de células imunes nos espaços subendoteliais e, portanto, seu uso em implicações terapêuticas torna-se relevante em processos inflamatórios crônicos como a aterogênese.

Devaraj e colaboradores (1996, 2000) estudaram o efeito da suplementação RRR-alfa-tocoferol sobre a função de monócitos e marcadores inflamatórios, e mostraram que a suplementação com 1200 UI/dia em voluntários normais, bem como em pacientes diabéticos tipo 2, com e sem doença macrovascular, significativamente influenciou a função dos monócitos, demonstrada pela diminuição da oxidação lipídica e geração de O<sub>2</sub><sup>•</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diminuindo tanto a liberação da citocina IL-1 $\beta$  pró-aterogênicas, como a adesão de monócitos às células endoteliais, mostrando claramente que a suplementação com RRR-alfa-tocoferol teve ação anti-inflamatória.

Em outro pequeno ensaio clínico realizado por Smith e colaboradores (2003) com pacientes com doença renal terminal, foram avaliados no sangue parâmetros de estresse oxidativo como as concentrações plasmáticas de metabólitos da vitamina E e F<sub>2</sub>-isoprostanos, bem como marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6 e PCR), antes e após a diálise em duas ocasiões, antes e após 2 meses da suplementação diária de 400 UI de RRR-alfa-tocoferol. A suplementação com RRR-alfa-tocoferol aumentou significativamente

sua concentração plasmática e seus metabólitos aumentaram até dez vezes, sem afetar a concentração plasmática de IL-6, PCR, TNF $\alpha$  e concentração de F<sub>2</sub>-isoprostanos livres. Os resultados sugeriram uma complexa inter-relação entre inflamação e estresse oxidativo e que não sofreu interferência da suplementação, provavelmente pelo curto prazo de suplementação de vitamina E.

Islam e colaboradores (2000) também não mostraram nenhum efeito significativo em qualquer dos parâmetros estudados (auto-anticorpos para LDL-ox, moléculas de adesão, sICAM, e vCAM) pela suplementação com 800 UI/dia de all-rac-tocoferol por 12 semanas. No entanto, os resultados mostraram enriquecimento significativo de alfa-tocoferol nos níveis de LDL e aumento da fase *lag* (tempo de latência para partícula de LDL se oxidar, em minutos) da oxidação da LDL, em pacientes renais crônicos (PORTAL et al., 2003).

Elliott e colaboradores (1995) também não conseguiram demonstrar qualquer melhora da função endotelial após três meses de tratamento com 800 UI/dia de RRR-alfa-tocoferol, bem como Simons e colaboradores (1999), que igualmente não conseguiram mostrar qualquer melhora da função endotelial em idosos que receberam 1000 UI/dia de RRR-alfa-tocoferol em comparação com placebo.

Em pacientes com angina espástica crônica, o tratamento com 300 mg/dia de acetato de alfa-tocoferol teve significativamente restaurada a vasodilatação fluxo-dependente, e essa melhora foi associada à diminuição dos níveis TBARS plasmático (MOTOYAMA et al., 1998).

Mesmo considerando a polêmica ainda presente na literatura (PASHKOW et al., 2011),, numerosos estudos *in vitro* têm documentado a função antioxidante da vitamina E, conforme estão relacionados abaixo, em ordem cronológica crescente aproximada, discriminando aspectos determinantes de sua ação, inclusive quanto à sua eficácia, e que geralmente são desconsiderados em abordagem mais abrangente, como comumente ocorre nas abordagens de meta-análise.

A hipótese inicialmente proposta por Morel e colaboradores (1984), Steinbrecher e seus colegas (1984), e Mitchinson (1994), de que a oxidação de lipídios insaturados na partícula de LDL, bem como as seqüelas decorrentes dessa oxidação, desempenham um papel crucial na patogênese da aterosclerose, e que isso estaria ligado ao conteúdo de vitamina E, é atualmente aceita, fornecendo forte plausibilidade biológica para o papel da vitamina E na prevenção de doenças cardiovasculares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Estudos epidemiológicos, a partir de estudos observacionais prospectivos, e de

ensaios clínicos de intervenção tornaram-se disponíveis nas três últimas décadas, confirmando o papel da vitamina E na prevenção de doenças do coração.

Um aspecto fundamental muitas vezes negligenciado consiste em que as concentrações utilizadas na ingestão de vitamina E em estudos de intervenção e meta-análises, situadas entre 100-800 UI/dia, são praticamente impossíveis de serem obtidas nos alimentos, notadamente considerando o processo de industrialização, o qual promove a remoção da maior parte deste componente antioxidante na sua forma natural (SAREMI e ARORA, 2010).

Outro aspecto essencial neste particular foi revelado muito tempo atrás, em estudo em ratos, que mostrou que diferentes respostas fisiológicas têm diferentes curvas dose-resposta (PRYOR, 2000). Em particular, o peso e a taxa de crescimento normal são obtidos quando os ratos são alimentados com 7,5 mg/kg de vitamina E, sendo 15 mg/kg adequado para prevenir miopatia e 50 mg/kg para a prevenção de hemólise. No entanto, a resposta de linfócitos a mitógenos, uma medida da resposta do sistema imunológico, exigiria um consumo ainda maior de vitamina E, desta forma, o nível ideal e recomendado diário de vitamina E para 50 mg/kg em ratos (BENDICH et al., 1986).

Desta forma, se respostas diferentes têm diferentes curvas dose-resposta em humanos, assim como em ratos, não se pode simplesmente perguntar: "Quanto de vitamina E é suficiente?" Em vez disso, deve-se perguntar: "Quanto de vitamina E é suficiente para fornecer a máxima proteção contra um determinado problema em particular?" Ou seja, é possível que uma ótima proteção contra uma condição, como um infarto do miocárdio naqueles que já provaram a doença cardíaca, pode requerer uma dose diferente de vitamina E em outra condição, como a prevenção do câncer em uma população com saúde normal, ou a proteção contra a doença de Alzheimer (MORRIS et al., 1998). Assim, cada ensaio, com diferentes populações e pontos finais diferentes, pode encontrar diferentes ingestas de vitamina E para fornecer uma proteção adequada e evitar o estresse oxidativo relacionado. Esta dificuldade também ocorre quando se questiona a respeito de doses-padrão de antioxidantes em termos de uso genérico na população (PRYOR, 2000).

A seguir serão enumerados alguns trabalhos favoráveis à suplementação de vitamina E ou seu uso através de alimentos ricos neste antioxidante nutricional e, posteriormente, outras com resultados contrários a sua utilização.

Esterbauer e colaboradores (1991) mostraram que a adição *in vitro* de vitamina E no plasma de doadores humanos aumentou o conteúdo de alfa-tocoferol de 9 para 30 mg/mol na partícula de LDL, e a resistência oxidativa da LDL de uma forma quase linear.

Em estudo similar, voluntários saudáveis receberam várias combinações de antioxidantes por períodos diferentes, e amostras de sangue foram tomadas em intervalos específicos, sendo testada a suscetibilidade à oxidação de LDL. Na primeira fase, os pacientes receberam 60 mg/dia de beta-caroteno por 3 meses, após receberem, além do beta-caroteno, 1.600 mg/dia de vit.E, em seguida receberam  $\beta$ -caroteno, vitamina E e 2 g/dia de vitamina C por igual período. Na fase 2 do estudo, receberam apenas vitamina E durante 5 meses. Os autores descobriram que na fase 1 a adição de vitamina E aumentou os níveis de vitamina E na LDL quase 2,5 vezes mais, enquanto a susceptibilidade da LDL à oxidação foi diminuída entre 30%-40%. Na fase 2 do experimento, a suscetibilidade da LDL à oxidação foi diminuída em ~50% (REAVEN et al., 1993).

Muitos estudos têm estabelecido propriedades antioxidantes e antiaterogênicas de vitamina E em modelos animais. Ferré e colaboradores (2001) estudaram o efeito de dietas com alto teor de gordura sobre a peroxidação lipídica hepática e efeitos antioxidantes em camundongos deficientes de apolipoproteína-E. Os resultados mostraram que as dietas suplementadas com óleo de oliva, óleo de palma, ou óleo de semente de girassol diminuiu significativamente o tamanho da lesão aterosclerótica. No entanto, houve uma associação entre os ratos que estavam em dietas suplementadas com óleos de palma ou de coco e um aumento significativo na peroxidação lipídica hepática. Esta associação não foi encontrada em animais alimentados com óleos de sementes de oliva ou de girassol, dietas contendo maior teor de vitamina E. Sugeriram que o alto teor de vitamina E no azeite de oliva ou óleo de semente de girassol protegeria contra os efeitos hepatotóxicos. Verlangieri e Bush (1992) relataram a inibição de 35% da formação da lesão aterosclerótica em macacos alimentados com suplementação de alfa-tocoferol, indicando que o alfa-tocoferol pode ser profilática e terapêuticamente eficaz na aterosclerose.

Davì e colaboradores (1997, 1999) mostraram em seres humanos suplementados com 100-600 mg/dia de alfa-tocoferol por duas semanas, diminuição na excreção urinária de F2-isoprostanos, em 34% a 36%, em indivíduos hipercolesterolêmicos e diabéticos. Marangon e colaboradores (1999) mostraram que a suplementação de adultos

saudáveis com 400 UI/dia de RRR-alfa-tocoferol, por oito semanas, também resultou em níveis mais baixos de excreção urinária de F2-isoprostanos.

Jialal e colaboradores (1995) utilizaram doses de 60, 200, 400, 800 e 1200 UI/dia para grupos de oito indivíduos em cada grupo. Após oito semanas de suplementação, não houve diferença na oxidação da LDL nos grupos que receberam placebo ou vitamina E em níveis de 60 ou 200 UI/dia, mas os níveis acima de 400 UI/dia de vitamina E, fizeram diminuir significativamente a suscetibilidade da LDL em sofrer oxidação. Em alguns momentos do estudo, doses de 800 ou 1200 mostraram ser ligeiramente mais eficazes do que 400 UI/dia. Os autores estudaram a fase *lag* antes de oxidação, bem como a taxa de oxidação, usando TBARS ou a formação de conjugados dieno contendo hidroperóxidos lipídicos, concluindo que a dose mínima de vitamina E necessária para diminuir significativamente a suscetibilidade do LDL à oxidação foi de 400 UI/dia (PRYOR, 2000).

Apesar de ainda muita polêmica envolvida (PASHKOW et al., 2011), muitos estudos de *coorte* transversal têm encontrado uma associação entre o consumo de antioxidantes e um risco diminuído de desenvolver doenças cardíacas, com resultados mais favoráveis à suplementação com a vitamina E (GAZIANO, 2004). Alguns dos primeiros dados apoiando a hipótese de que a vitamina E confere proteção contra as doenças cardiovasculares (DCV), estão relacionados com o experimento MONICA (*Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*), estudo epidemiológico descritivo em uma população de 16 homens e mulheres, onde os níveis de  $\alpha$ -tocoferol mostraram-se inversamente associados às taxas de mortalidade devido à doença de cardiopatia isquêmica. Na análise de regressão parcial, a vitamina E apresentou uma correlação inversa ainda mais forte com a mortalidade por doença isquêmica do coração (GEY e PUSKA, 1989).

O estudo caso-controle de grande porte EURAMIC (*European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer*), comparou as concentrações de vitamina E em relação às amostras de tecido adiposo de 683 pessoas com infarto agudo do miocárdio (IAM) e 727 controles (KARDINAAL et al., 1993). A suplementação de vitamina E pareceu estar associada ao menor risco de infarto do miocárdio.

Outros estudos de *coorte* prospectivos avaliaram a relação entre a ingestão de vitamina E e a incidência da doença coronariana. O *Nurses'*

*Health Study* (NHS), o maior dos estudos de coorte prospectivo até agora publicado, realizou uma investigação entre a associação da ingestão de vitamina E e doença cardiovascular (DCV) em 87.245 enfermeiras entre 34 e 59 anos e sem histórico de DCV (STAMPFER et al., 1993). Depois de 8 anos de acompanhamento, as mulheres com maior ingestão de vitamina E revelaram um risco 34% menor de desenvolver doença coronariana. Ainda fizeram uma comparação entre a ingestão de vitamina E por alimentos e por suplementos, sugerindo uma associação inversa apenas para os suplementos. As mulheres que tomaram pelo menos 100 UI de suplementos de vitamina E por dia, por mais de dois anos, sofreram reduções de 40% ou mais do risco de doença coronariana.

Em contraste, o estudo *Iowa Women's Health Study* (IWHS), avaliou a associação entre a ingestão de vitaminas antioxidantes e mortalidade por DCV, por mais de 7 anos em 34.386 mulheres pós-menopáusicas sem histórico de DCV, e concluiu que o consumo de vitaminas existentes nos alimentos, mas não de suplementos, foi fortemente associado a um menor risco de mortalidade por doença coronária (KUSHI et al., 1996).

Por outro lado, o estudo (*Study of Middle-Aged French-Canadian Men*) avaliou a relação entre o uso de suplementos vitamínicos em uma coorte de 2.313 homens da cidade de Quebec, por 5 anos, sugerindo uma associação inversa entre uso de suplementos vitamínicos e doença cardíaca isquêmica (MEYER et al., 1996).

Da mesma forma, o estudo finlandês *Finnish Cohort Study* (FCS), de 14 anos de acompanhamento, também encontrou uma significativa associação inversa entre a ingestão de vitamina E e mortalidade coronária entre 5.133 homens e mulheres de 30 a 69 anos de idade e, inicialmente, livres de DCV (KNEKT et al., 1994).

Igualmente, o ensaio clínico randomizado *Cambridge Heart Antioxidant Study*, CHAOS) envolvendo 2.002 pacientes com doença arterial coronariana, os quais foram aleatoriamente designados para receber a vitamina E (400 ou 800 UI/dia) ou placebo por um período médio de 510 dias (STEPHENS et al., 1996), revelou que a suplementação da vitamina E foi associada a um menor risco de infarto do miocárdio não-fatal.

Outro estudo revelado pelo *Health Professionals Follow-up Study* (HPFS), que avaliou 39.910 profissionais de saúde do sexo masculino entre 40 e 75 anos, não diagnosticados por doença arterial coronariana (DAC), diabetes, ou hipercolesterolemia e consumo de suplementos vitamínicos (RIMM et al., 1993), após 4 anos de acompanhamento,

concluiu que somente a ingestão de doses maiores de vitamina E (100 UI/dia), estaria relacionada inversamente ao desenvolvimento de doença coronariana.

A relação entre o consumo da vitamina E e doenças cardiovasculares também foi examinada em estudos de coortes em idosos, como o EPESE (*Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly Program*), envolvendo 11.178 homens e mulheres americanos, com idade entre 67-105 anos. Encontrou uma diminuição do risco de mortalidade por doença coronária e mortalidade geral entre aquelas que tomaram suplementos de vitamina E durante um período de 9 anos (LOSONCZY et al., 1996).

O estudo de Rotterdam (*Rotterdam Study*) também avaliou uma população de idosos, 4.802 mulheres e homens holandeses entre 55 e 95 anos, sem histórico de infarto do miocárdio. No entanto, ao contrário do estudo EPESE, limitou-se a antioxidantes presentes na dieta. Depois de um período de acompanhamento de 4 anos, não foi observada uma associação entre a ingestão de vitaminas E e C proveniente da dieta e diminuição do risco de infarto do miocárdio (KLIPSTEIN-GROBUSCH et al., 1999).

Igualmente, no estudo realizado pelo *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT), com a participação de 734 homens com idades entre 35 a 57 anos e em risco para DCV, onde foram coletadas amostras de sangue no início e congeladas por 20 anos para posterior análise, não houve associação entre os níveis séricos de vitamina E e o risco de infarto do miocárdio não-fatal ou morte coronariana (GAZIANO, 2004).

Da mesma forma, o *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocárdio* (GISSI), analisando 11.323 homens e mulheres com recente infarto do miocárdio, as quais receberam 300 mg/dia de vitamina E durante um período de 3,5 anos, mostrou apenas uma tendência não-significativa em direção ao surgimento de menores eventos cardiovasculares não-fatais (GISSI et al., 1999).

Por outro lado, serão elencados a seguir alguns dos trabalhos mais importantes que indicam ausência de benefício da suplementação vitamínica em humanos, no sentido de registrar e acentuar a polêmica inerente ao tema em pauta.

Também uma série de estudos randomizados, controlados com placebo (COOK et al., 2007; SESSO et al., 2008), além de um estudo de meta-análise (EIDELMAN et al., 2004), investigaram os efeitos da

vitamina E sobre a ocorrência da doença cardiovascular, e não revelaram efeito algum da vitamina E sobre infarto do miocárdio, AVC ou morte por doença cardiovascular.

Em conformidade, vários estudos neste formato também apontam para uma ineficácia no uso de suplementações vitamínicas (PASHKOW et al., 2011), tal como mostrado em estudo de intervenção duplo-cego, controlado por placebo, com 56 pacientes com insuficiência cardíaca que receberam 335mg diária de alfa-tocoferol, por um período de 12 semanas, revelando nenhum efeito sobre os níveis plasmáticos de MDA e também qualquer efeito sobre a atividade glutaciona peroxidase no plasma (KEITH et al., 2001).

Outros estudos randomizados igualmente controlados por placebo, também apontam para um efeito negativo na utilização de suplementos vitamínicos (PASHKOW et al., 2011), como é o caso do estudo realizado com 59 homens saudáveis e fumantes, com 2 meses de intervenção vitamínica, que mostrou um aumento significativo dos níveis de MDA após doses diárias de 200mg de vitamina E combinada com ácido ascórbico 250mg, 30mg de beta-caroteno e 100µg de selênio em comparação com placebo (DRAGSTED, 2008).

Pesquisadores da *Primary Prevention Project* investigaram em 4495 pacientes com idade média de 64,4 anos com um ou mais fatores de risco cardiovascular (hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, obesidade, história familiar de prematuros MI, idosos), o efeito do uso da aspirina e vitamina E sobre os desfechos cardiovasculares em pacientes com fatores de risco cardiovascular. Os pacientes foram aleatoriamente designados para receber 100 mg de aspirina, placebo e 300 mg de vitamina E por dia, e foram acompanhados por uma média de 3,6 anos. Os autores não encontraram nenhuma diferença significativa no número de desfechos primários entre os pacientes que receberam ou não vitamina E (de GAETANO et al., 2001).

Em um estudo relacionado, Hodis e colaboradores (2002) investigaram o efeito da vitamina E na progressão da aterosclerose em pacientes com baixo risco para doença cardiovascular. Randomizaram 353 pacientes com idade de 40 anos ou mais, com os níveis de colesterol LDL de 130 mg/dL para receber 400 UI de alfa-tocoferol e/ou placebo diariamente, acompanhados por uma média de 3 anos. Os autores concluíram que a suplementação de vitamina E não reduziu significativamente a progressão da espessura da camada da íntima arterial em comparação aos pacientes que receberam placebo.

Lee e colaboradores (2005) investigaram os efeitos a longo prazo de vitamina E na doença cardiovascular em 39.876 mulheres saudáveis

com idades entre 45 anos ou mais, que foram randomizadas para receberem vitamina E (600 UI a cada dois dias) ou placebo, acompanhadas por uma média de 10 anos. Os autores mostraram que a vitamina E não diminuiu significativamente o risco de grandes eventos cardiovasculares em comparação ao placebo. A vitamina E também não reduziu significativamente a incidência de infarto do miocárdio ou AVC em comparação ao placebo. Entretanto, o risco de morte por evento cardiovascular diminuiu significativamente no grupo suplementado com a vitamina E, quando comparado ao placebo.

De forma similar, 9.541 pacientes com 55 anos de idade ou mais, foram estudados por Yusuf e colaboradores (2000) sobre os efeitos da vitamina E e ramipril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) em pacientes com alto risco para doença cardiovascular (ou doença pré-existente cardiovascular ou diabetes e mais um fator de risco), onde os pacientes receberam 400 UI/dia de vitamina E, 10 mg de ramipril e placebo, acompanhados por uma média de 4,5 anos. Os autores não encontraram nenhuma diferença significativa nos pacientes que receberam vitamina E versus placebo. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos no número de mortes por doenças cardiovasculares, infarto do miocárdio, AVC, eventos cardiovasculares secundários ou morte por todas as causas. Os autores concluíram que a vitamina E não tem efeito sobre os desfechos cardiovasculares em pacientes com doenças cardiovasculares de alto risco.

Devem ainda ser considerados alguns ensaios clínicos que mostraram que a vitamina E poderia estar associada a certos efeitos adversos, conforme os mencionados a seguir (PASHKOW et al., 2011).

Heinonen e colaboradores (1994) testaram se a ingestão de alfa-tocoferol e beta-caroteno estaria associada com menor risco de câncer de pulmão e outros cânceres em 29.133 fumantes do sexo masculino com idades entre 50 e 69 anos, que receberem 50 mg de alfa-tocoferol, 20 mg de beta-caroteno, isoladamente ou em conjunto, e ainda placebo, diariamente, com acompanhamento por 6,1 anos. Os autores relataram que o alfa-tocoferol foi associado à menor incidência de câncer de próstata, mas não câncer de pulmão. Além disso, embora o alfa-tocoferol não tenha mostrado efeito sobre a mortalidade, foi associado ao aumento de mortes por AVC hemorrágico.

Lonn e colaboradores (2005) prolongaram o estudo HOPE (YUSUF et al., 2000) para determinar os efeitos a longo prazo da suplementação de vitamina E em eventos cardiovasculares, em pacientes

com alto risco de doença cardiovascular. Dos 9.541 pacientes incluídos no estudo original do HOPE, 3.994 concordaram em continuar a intervenção e 738 concordaram em ser passivamente monitorados e foram acompanhados por uma média de 7 anos. Os autores mostraram que, entre todos os pacientes do HOPE, maiores eventos cardiovasculares não foram significativamente diferentes entre os que receberam vitamina E e os que receberam placebo. Pacientes que receberam vitamina E, no entanto, tiveram um risco maior de insuficiência cardíaca e hospitalização por insuficiência cardíaca.

Miller e colaboradores (2005) realizaram um estudo de metanálise para determinar a relação dose-dependente entre a suplementação de vitamina E e risco de mortalidade. Examinaram 19 ensaios clínicos randomizados, controlados que testaram o efeito da suplementação de vitamina E, com doses variando de 16,5 a 2000 UI/dia. Dos 11 ensaios clínicos que testaram altas doses de vitamina E, 400 UI/dia ou mais, nove demonstraram um aumento na mortalidade por qualquer causa, em comparação ao controle. Os autores concluíram que altas doses de suplementação de vitamina E deveriam ser evitadas, pois estaria associada a aumento de todas as causas de mortalidade.

A *American Heart Association* (AHA), consultoria científica em vitaminas antioxidantes e o Comitê de Nutrição da AHA estabeleceram recomendações sobre o uso de suplementos antioxidantes para reduzir o risco de doença cardiovascular. Com base em todas as evidências científicas disponíveis atualmente, o uso de vitamina E e outros suplementos vitamínicos antioxidantes para prevenir a doença cardiovascular, não se justificaria. A AHA, no entanto, aconselha o consumo de alimentos que são abundantes em vitaminas antioxidantes e outros nutrientes (frutas, legumes, grãos integrais e nozes) para evitar doenças cardiovasculares (SAREMI e ARORA, 2010).

Embora outras funções adicionais da vitamina E já tenham sido estudadas e bem caracterizadas, como a própria participação no processo de gametogênese e fertilidade, a sua função antioxidante continua sendo a melhor estabelecida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Apesar dos estudos realizados com cultura de células e modelos animais sugerirem que a vitamina E têm efeitos promissores antisquêmicos, antiaterosclerótica, anticarcinogênicos, antiinflamatórios, os resultados de sua suplementação em humanos são ainda controversos, possivelmente devido à análise complexa envolvida, desde a seleção inadequada dos indivíduos do estudo (sexo, *status* da vitamina E, *status* imune, número amostral), quanto pela escolha da dose utilizada, do tempo de ingestão e também do período de monitoramento, diferenças

nas formas de suplementação (tocoferol em forma natural ou sintética). Outros fatores que também podem interferir nestes estudos, seriam o número de parâmetros analisados e a análise sendo órgão-específica ou análise sistêmica, em termos de formular as conclusões e considerações finais. Entretanto, com todas essas limitações, ainda parece que a RRR-alfa-tocoferol, a forma natural de vitamina E, é a que demonstra um melhor efeito multifacetado na homeostase vascular e doenças cardiovasculares (SINGH et al., 2005; BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009).

Trabalhos recentes realizados em nosso laboratório evidenciaram que o efeito protetor da combinação da intervenção com as vitaminas E e C por 6 meses, provavelmente estaria relacionado à sua capacidade antioxidante em pacientes com CCC, mesmo após 2 meses de administração do fármaco BZN (RIBEIRO et al., 2010). Além disso, os resultados obtidos com os mesmos pacientes em estudo anterior (MAÇAO et al., 2007), quando foi avaliado o efeito isolado dessa intervenção antioxidante, de forma semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, mostrou que o tratamento com a suplementação com vitaminas E e C, promoveu uma atenuação do dano oxidativo no sangue nestes pacientes, dano esse diretamente relacionado à progressão da doença, conforme já havia sido descrito em estudo anterior pelo nosso grupo de pesquisa (de OLIVEIRA et al., 2007). De forma análoga, outro trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa também mostrou a eficácia da combinação das vitaminas E e C em atenuar o estresse oxidativo sanguíneo relacionado com o tratamento de pacientes com hepatite C tratados com ribavirina e interferon (FARIAS, 2009). Além disso, trabalhos realizados em parceria com outros laboratórios da UFSC, mostraram igualmente a eficácia da suplementação antioxidante vitamínica em pacientes (crianças) com queimaduras moderadas (BARBOSA, 2006), bem como pacientes portadores de fibrose cística (BENNEMANN, 2011).

Em resumo, considerando os resultados encontrados no presente trabalho e nos estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa, é possível sugerir que as diversas intervenções antioxidantes (associação apenas as vitaminas E e C ou na combinação delas com carvedilol), ao longo dos 7 anos de monitoramento, foram eficazes em atenuar o estresse oxidativo sistêmico em pacientes com CCC.

O efeito benéfico das sucessivas intervenções ficou evidenciado pela manutenção das atividades das enzimas antioxidantes em níveis relativamente baixos ou intermediários, considerando os intervalos temporais entre as intervenções antioxidantes. Deste modo,

aparentemente, as intervenções antioxidantes intervaladas preservaram os pacientes com CCC do insulto oxidativo decorrente dos distintos estágios da doença de Chagas. Também é possível inferir que a associação de carvedilol com as vitaminas E e C foi capaz de melhorar o *status* antioxidante destes pacientes, uma vez que, quando associadas, essas terapias foram mais eficientes do que quando utilizadas isoladamente.

Quanto aos resultados clinicamente observáveis, um grupo da UFRJ, associado ao co-orientador desta tese, está concluindo trabalho complementar com os mesmos pacientes e condições terapêuticas. Segundo os resultados clinicamente mais expressivos, ocorreu uma significativa redução das arritmias ventriculares observadas com a suplementação em todos os grupos, com exceção grupo IA, devido ao pequeno número de extras-sístoles. Portanto, provavelmente existe uma correlação entre as sucessivas intervenções antioxidantes, atenuação do estresse oxidativo sistêmico e redução das arritmias ventriculares nos pacientes com CCC.

## 7 CONCLUSÕES

### *a) Com relação à intervenção com Carvedilol e Vitaminas E e C*

1. O tratamento isolado com o carvedilol foi efetivo em atenuar o estresse oxidativo sistêmico no sangue de pacientes chagásicos crônicos com cardiopatia (CCC), evidenciado pela diminuição dos níveis de PC e TBARS, e pela diminuição da maioria das atividades das enzimas antioxidantes analisadas neste trabalho.
2. De modo semelhante, a associação do carvedilol com as vitaminas E e C, indica a possibilidade de sinergismo entre estes três antioxidantes na atenuação do dano oxidativo associado à CCC.
3. Tanto o carvedilol administrado isoladamente, como na associação com as vitaminas, foi aparentemente incapaz de conter a evolução do processo inflamatório, indicado pelo aumento dos marcadores ADA e MPO.

### *b) Com relação ao monitoramento de 7 anos de intervenções antioxidantes*

- 1- De modo geral, o perfil apresentado pelos diferentes marcadores de estresse oxidativo analisados ao longo do período de monitoramento mostraram-se inalterados ou diminuídos em relação às análises iniciais, sugerindo que as sucessivas suplementações foram capazes de proteger contra a progressão do insulto oxidativo sistêmico associado à CCC.
- 2- Esta atenuação do estresse oxidativo sistêmico após as várias intervenções antioxidantes poderia ser atribuída primariamente à persistência do efeito acumulativo associado à lipofilicidade da vitamina E.
- 3- As concentrações plasmáticas de vitamina E manteve-se inalterada no período sem intervenção vitamínica, sugerindo um acúmulo deste antioxidante lipossolúvel.
- 4- As intervenções antioxidantes ao longo do período de monitoramento não foram capazes de diminuir significativamente o processo inflamatório da CCC.



## 8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam várias possibilidades futuras, tanto na melhor avaliação dos efeitos de suplementação antioxidante, como na sua utilização rotineira em pacientes com CCC. Conseqüentemente, seria oportuno:

- Determinar biomarcadores de estresse oxidativo mais sensíveis e específicos tais como a 3-nitrotirosina, para avaliação de nitratação de proteínas, bem como avaliação de dano ao DNA (teste do cometa ou de aductos de DNA);
- Reavaliar a determinação plasmática de vitamina C;
- Sugerir a continuidade do monitoramento do estresse oxidativo em pacientes com CCC, buscando a consolidação da eficácia da suplementação antioxidante contemplando os três antioxidantes em pauta.



## REFERÊNCIAS

ABEL, L.C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA D.; BOCCHI, E.A.; TEIXEIRA, H.C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v. 17, n. 1, p. 99-107, 2001.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v. 204, p. 234-254, 1984.

ALLARD, J.P.; AGHDASSI, E.; CHAU, J.; TAM, C.; KOVACS, C.M.; SALIT, I.E.; WALMSLEY, S.L. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. **AIDS**, v. 12, n. 13, p. 1653-1659, 1998.

ALMEIDA, I.C.; CAMARGO, M.M.; PROCÓPIO, D.O.; SILVA, L.S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T.; FERGUSON, M.A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J**, v.19, n. 7, p.1476-1485, 2000.

AGUIRRE, R.; MAY, J.M. Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. **Pharmacol Ther**, v. 119, n. 1, p. 96-103, 2008.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; DE CASTRO, S.L. Desafios da pesquisa científica após 90anos da descoberta da doença de Chagas. Cap. 11. Questões da doença humana para trabalho em modelos animais p: 17-19 In: Araújo-Jorge, De Castro (orgs) Doença de Chagas: **Manual para experimentação animal**, Editora Fiocruz, RJ, Brasil, 2000.

ARTHUR JR. The glutathione peroxidases. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, n. 13-14, p. 1825-1835, 2000.

ASLAM, S. Cardiovascular disease in dialysis patients: do some antihypertensive drugs have specific antioxidant effects or is it just blood pressure reduction? Does antioxidant treatment reduce the risk for cardiovascular disease? **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 17, n. 1, p. 99-105, 2008.

ÁVILA, H.A.; SIGMAN, D.S.; COHEN, L.M.; MILLIKAN, R.C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Mol Biochem Parasitol**, v. 48, n. 2, p. 211-221, 1991.

BAKRIS, G.L.; FONSECA, V.; KATHOLI, R.E.; MCGILL, J.B.; MESSERLI, F.H.; PHILLIPS, R.A.; RASKIN, P.; WRIGHT- JR, J.T.; OAKES, R.; LUKAS, M.A.; ANDERSON, K.M.; BELL, D.S.; GEMINI INVESTIGATORS. Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 292, n. 18, p. 2227-2236, 2004.

BARBOSA, E. Efeito da suplementação de vitamina E, vitamina C e zinco no estresse oxidativo e no tempo de reepitelização em pacientes pediátricos queimados. 2006. 157f. Dissertação (mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quím Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BENCHIMOL BARBOSA, P.R. Noninvasive prognostic markers for cardiac death and ventricular arrhythmia in long-term follow-up of subjects with chronic Chagas' disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n.2, p.167-178, 2007.

BENDICH, A.; GABRIEL, E.; MACHLIN, L.J. Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat. **J Nutr**, v. 116, n. 4, p. 675-681, 1986.

BENNEMANN, G.D. Marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em crianças e adolescentes com fibrose cística. 2011. 135f. Dissertação (mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BERN, C.; MONTGOMERY, S.P.; HERWALDT, B.L.; RASSI, A, J.R.; MARIN-NETO, J.A.; DANTAS, R.O.; MAGUIRE, J.H.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L.V.; GILMAN, R.H.; REYES, P.A.; SALVATELLA, R.; MOORE A.C. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.

BIOLO A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N. Chagas Cardiomyopathy - Where Do We Stand After a Hundred Years? **Prog Cardiovasc Dis**, v. 52, n. 4, p. 300–316, 2010.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v 90, p.105-110, 1984.

BLOCK, G.; JENSEN, C.D.; MORROW, J.D.; HOLLAND, N.; NORKUS, E.P.; MILNE, G.L.; HUDES, M.; DALVI, T.B.; CRAWFORD, P.B.; FUNG, E.B.; SCHUMACHER, L.; HARMATZ, P. The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 4, p. 377-384, 2008.

BOCCHI, E.A.; FIORELLI, A. The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report. First Guideline Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. **J Heart Lung Transplant**, v. 20, n. 6, p. 637-645, 2001.

BHOGADE, R.B.; SURYAKAR, A.N.; JOSHI, N.G.; PATIL, R.Y. Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in hemodialysis patients. **J Indian Clin Bioch**, v. 23, n. 3, p. 233-237, 2008.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p.707-716, 1973.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, n. 2, p. 534-541, 1983.

BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 429-35, 1984.

BRIGELIUS-FLOHÉ R. Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 5, p. 543-554, 2009.

BRUNO, R.S.; LEONARD, S.W.; PARK, S.I.; ZHAO, Y.; TRABER, M.G. Human vitamin E requirements assessed with the use of apples fortified with deuterium-labeled alpha-tocopheryl acetate. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 299-304, 2006.

BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A.; GRAY, J.I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. **J Anim Sci**, v. 76, n.10, p.3122-3130, 1995.

BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. **Ann N Y Acad Sci**, v. 570, p. 7-22, 1989.

BURTON, G.W.; TRABER, M.G.; ACUFF, R.V.; WALTERS, D.N.; KAYDEN, H.; HUGHES, L.; INGOLD, K.U. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **Am J Clin Nutr**, v. 67, n. 4, p. 669-684, 1998.

CADENAS E, SIES H. The lag phase. **Free Radic Res**, v. 28, n. 6, p. 601-609, 1998.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CAMPBELL, S.E.; STONE, W.L.; WHALEY, S.G.; QUI, M.; KRISHNAN, K. Gamma ( $\gamma$ ) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma ( $\gamma$ ) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**, v.3, p.25-50, 2003.

CAMPOS, E.B.P.; YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **J Vasc Br**, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.

CARDONI, R.L.; GARCÍA, M.M.; DE RISSIO, A.M. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v. 90, n. 1, p. 65-72, 2004.

CAROD-ARTAL, F.J.; VARGAS, A.P. ; MELO, M. ; HORAN, T.A. American trypanosomiasis (Chagas' disease): an unrecognised cause of stroke. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 516-518, 2003.

CARR, A.C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 69, n. 6, p. 1086-1107.

CARRANZA, J.C.; VALADARES, H.M.; D'ÁVILA, D.A.; BAPTISTA, R.P.; MORENO, M.; GALVÃO, L.M.; CHIARI, E.; STURM, N.R.; GONTIJO, E.D.; MACEDO, A.M.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 9, p. 963, 973, 2009.

CARRASCO, H.A.; GUERRERO, L.; PARADA, H.; MOLINA, C.; VEGAS, E.; CHUECOS, R. Ventricular arrhythmias and left ventricular myocardial function in chronic chagasic patients. **Int J Cardiol**, v. 28, n. 1, p.35-41, 1990.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

- CHANTRY, C.J.; RODRIGUES, J.L.; FEBO, I.; DIAZ, C.; RODRIGUEZ-ORENGO, J.F. Plasma glutathione concentrations in non-infected infants born from HIV-infected mothers: developmental profile. **P R Health Sci J**, v.18, n. 3, p. 267-272, 1999.
- CHOW, C.K. Glucose and dietary vitamin E protection against catalase inactivation in the red cells of rats. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 50, n. 4, p. 364-369, 1980.
- CHOW, C.K. Oxidative damage in the red cells of vitamin E-deficient rats. **Free Radic Res Commun**, v. 16, n. 4, p. 247-258, 1992.
- CHUANG, C.C.; SHIESH, S.C.; CHI, C.H.; TU, Y.F.; HOR, L.I.; SHIEH, C.C.; CHEN, M.F. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. **Crit Care**, v. 10, n. 1, p. R36, 2006.
- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS. **Rev Soc Bras Med Trop**, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. v. 38, Supl. 3, p. 1-29, 2005.
- CLARKE, R.; ARMITAGE, J. Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large-scale randomised trials. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 16, n. 5, p. 411-415, 2002.
- COMINACINI, L.; GARBIN, U.; PASINI, A.F.; DAVOLI, A.; CAMPAGNOLA, M.; CONTESSI, G.B.; PASTORINO, A.M.; LO CASCIO, V. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. **Free Radic Biol Med**, v. 22, n. 1-2, p. 117-127, 1997.
- CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, v.12, n. 4, p. 274-277, 1996.
- COOK, N.R.; ALBERT, C.M.; GAZIANO, J.M.; ZAHARRIS, E.; MACFADYEN, J.; DANIELSON, E.; BURING, J.E.; MANSON, J.E. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. **Arch Intern Med**, v. 167, n. 15, p. 1610-1618, 2007.

DANDONA, P.; GHANIM, H.; BROOKS, D.P. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. **J Hypertens**, v. 25, n. 4, p. 731-741, 2007.

DAVÌ, G.; ALESSANDRINI, P.; MEZZETTI, A.; MINOTTI, G.; BUCCIARELLI, T.; COSTANTINI, F.; CIPOLLONE, F.; BON, G.B.; CIABATTONI, G.; PATRONO, C. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 7, n. 11, p. 3230-3235, 1997.

DAVÌ, G.; CIABATTONI, G.; CONSOLI, A.; MEZZETTI, A.; FALCO, A.; SANTARONE, S.; PENNESE, E.; VITACOLONNA, E.; BUCCIARELLI, T.; COSTANTINI, F.; CAPANI, F.; PATRONO, C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. **Circulation**, v. 99, n. 2, p. 224-229, 1999.

DAVIES, K.J.; DELSIGNORE, M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. **J Biol Chem**, v. 262, n. 20, p. 9908-9913, 1987.

de BEM, A.F. Avaliação da expressão do citocromo P4501A1 hepático e das defesas antioxidantes em ratos tratados com Benznidazol. 2001. 66 f. Dissertação. (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

de OLIVEIRA, T.B. Avaliação do estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica. 2004. 103f. Dissertação. (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

de OLIVEIRA, T.B.; PEDROSA, R.C.; FILHO, D.W. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. **Int J Cardiol**, v.116, n.3, p.357-363, 2007.

de GAETANO G; COLLABORATIVE GROUP OF THE PRIMARY PREVENTION PROJECT. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. **Lancet**, v. 357, n. 9250, p. 89-95, 2001.

DEBORGGRAEVE, S.; CORONADO, X.; SOLARI, A.; ZULANTAY, I.; APT, W.; MERTENS, P.; LAURENT, T.; LECLIPTEUX, T.; STESENS, T.; DUJARDIN, J.C.; HERDEWIJN, P.; BÜSCHER P. T. *cruzi* OligoC-TesT: a simplified and standardized polymerase chain reaction format for diagnosis of Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 6, e450, 2009.

DEVARAJ, S.; LI, D.; JIALAL, I. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. **J Clin Invest**, v. 98, n.3, p. 756-763, 1996.

DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation. **Circulation**, v. 102, n. 2, p. 191-196, 2000.

DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Failure of vitamin E in clinical trials: is gamma-tocopherol the answer? *Nutr Rev*, v. 63, n. 8, p. 290-23, 2005.  
 DEVELOUX, M. ; LESCURE, F.X. ; LE LOUP, G. ; PIALOUX, G. Chagas disease. **Rev Med Interne**, v. 30, n. 8, p. 686-95, 2009.

di MASCIO, P.; KAISER, P.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys**, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.

di MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **Am J Clin Nutr**, v. 53, 1 Suppl, p. 194S-200S, 1991.

DIAS, J.C.P. Chagas' disease and its control in Latin America: an analysis of possibilities. *Cad Saúde Pública*, v. 9, n. 2, p. 201-209, 1993.

DIAS, J.C.P.; COURA JR. Epidemiologia. Em: *Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral*, Cap. 3, Ed Por JCP Dias e JR Coura (orgs), Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 33-65, 1997.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim Nova**, v. 15, p. 1-14, 2009.

DHIMAN, M.; NAKAYASU, E.S.; MADAIHAH, Y.H.; REYNOLDS, B.K.; WEN, J.J.; ALMEIDA, I.C.; GARG, N.J. Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins: implications in Chagas' disease. **Am J Pathol**, v. 173, n. 3, p. 728-740, 2008.

DONG, M.; VONGCHAMPA, V.; GINGIPALLI, L.; CLOUTIER, J.F.; KOW, Y.W.; O'CONNOR, T.; DEDON, P.C. Development of enzymatic probes of oxidative and nitrosative DNA damage caused by reactive nitrogen species. **Mutat Res**, v. 594, n. 1-2, p. 120-134, 2006.

DOS REIS, G.A.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NUNES, M.P.; LOPES, M.F. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 5, p. 237-243, 2005.

DRAGSTED, L.O. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. **Eur J Nutr**, v. 47 Suppl 2, p. 3-18, 2008.

DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; PINTO-DIAS, J.C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO-PARRA, J.F. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. **Scand J Immunol**, v. 45, n. 1, p. 74-80, 1997.

DULIN B.; ABRAHAM, W.T. Pharmacology of carvedilol. **Am J Cardiol**, v. 93, n. 9A, p. 3B-6B, 2004.

EIDELMAN, R.S.; HOLLAR, D.; HEBERT, P.R.; LAMAS, G.A.; HENNEKENS, C.H. Randomized trials of vitamin E in the treatment and prevention of cardiovascular disease. **Arch Intern Med**, v. 164, n.14, p. 1552-1556, 2004.

ELMADFA, I.; WALTER, A. How large is the tocopherol accumulation capacity of organs? Long term trials with various high oral alpha-tocopherol doses administered to rats and guinea pigs. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 51, n. 3, p.284-292, 1981.

ELLIOTT, T.G.; BARTH, J.D.; MANCINI, G.B. Effects of vitamin E on endothelial function in men after myocardial infarction. **Am J Cardiol**, v. 76, n. 16, p. 1188-1190, 1995.

EL-SHERIF, N.; TURITTO, G. Electrophysiologic effects of carvedilol: is carvedilol an antiarrhythmic agent? **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 28, n. 9, p. 985-990, 2005.

ESTERBAUER, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; STRIEGL, G.; WAEG G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. **Am J Clin Nutr**, v. 53, Suppl:314S–321S, 1991.

FAHEY, R.C.; NEWTON, G.L. Occurrence of low molecular weight thiols in biological systems. In *Function of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects* (A. Larsson; S. Orrenius; A. Holmgren and B. Mannervick, p. 251-260. Raven, New York, 1983.

FARIAS, M. S. Avaliação da intervenção nutricional com vitaminas E e C e o mineral zinco no estresse oxidativo de pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado a ribavirina. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FERRARI, R.; AGNOLETTI, L.; CECONI, C.; CURELLO, S.; NESTA, F.; MANFREDINI, R. Endothelial Dysfunction in Congestive Heart Failure: Effects of Carvedilol. **Heart Fail Rev**, v. 4, p. 53–63, 1999.

FERREIRA, R.C.; IANNI, B.M.; ABEL, L.C.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J., CUNHA-NETO, E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 407-111, 2003.

FERRÉ, N.; CAMPS, J.; PAUL, A.; CABRÉ, M.; CALLEJA, L.; OSADA, J.; JOVEN, J. Effects of high-fat, low-cholesterol diets on hepatic lipid peroxidation and antioxidants in apolipoprotein E-deficient mice. **Mol Cell Biochem**, v. 218, n.1-2, p. 165-169, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, R.C.; IANNI, B.M.; ABEL, L.C.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 407-411, 2003.

FEUERSTEIN, G.Z.; RUFFOLO JR, R.R. Carvedilol, a novel vasodilating beta-blocker with the potential for cardiovascular organ protection. **Eur Heart J**, v. 17, Suppl B:24-9, 1996.

FEUERSTEIN, G.Z.; BRIL, A.; RUFFOLO JR, R.R. Protective effects of carvedilol in the myocardium. **Am J Cardiol**, v. 80, n. 11A, p. 41L-45L, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horiz Biochem Biophys**, v. 1, p. 1-37, 1974.

FRIDOVICH I. Biological effects of the superoxide radical. **Arch Biochem Biophys**, v. 247, n. 1, p. 1-11, 1986.

FRISHMAN, W.H. Carvedilol. **N Engl J Med**, v. 339, n. 24, p.1759-1765, 1998.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm**, v. 14, n. 4, p. 223 – 227, 2001.

GALANTI, B.; GIUSTI, G. Direct colorimetric method for the determination of adenosine deaminase and 5-AMP deaminase in the blood. **Boll Soc Ital Biol Sper**, v.42, n. 19, p. 1316-20, 1966.

GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; CAMPOS, A.C.; RIBEIRO, R.S.; SOARES, M.B.P. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations Antimicrob. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 1521-1528, 2005.

GÁSPÁROVÁ, Z.; ONDREJČKOVÁ, O.; GAJDOŠÍKOVÁ, A.; GAJDOŠÍK, A.; SNIRC, V.; STOLC S. Oxidative stress induced by the Fe/ascorbic acid system or model ischemia in vitro: effect of carvedilol and pyridoinole antioxidant SMe1EC2 in young and adult rat brain tissue. **Interdiscip Toxicol**, v. 3, n. 4, p. 122-126, 2010.

GAZIANO, J.M. Vitamin E and cardiovascular disease: observational studies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1031, p. 280-291, 2004.

GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J Immunol**, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

GHATAK, A.; BRAR, M.J.; AGARWAL, A.; GOEL, N.; RASTOGI, A.K.; VAISH, A.K.; SIRCAR, A.R.; CHANDRA, M. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. **Int J Cardiol**, v. 57, n. 2, p. 119-127, 1996.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE, S.W.; DWYER, P.; FENN, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p. 623-626, 1954.

GEY, K.F.; PUSKA, P. Plasma vitamins E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. **Ann N Y Acad Sci**, v. 570, p. 268-82, 1989.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 4, p.190-195, 2005.

GIUGLIANO, D.; ACAMPORA, R.; MARFELLA, R.; DE ROSA, N.; ZICCARDI, P.; RAGONE, R.; DE ANGELIS, L.; D'ONOFRIO, F. Metabolic and cardiovascular effects of carvedilol and atenolol in non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension. A randomized, controlled trial. **Ann Intern Med**, v.126, n. 12, p. 955-999, 1997.

GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E After Myocardial Infarction: Results of the GISSI-Prevenzione Trial, **Lancet**, v. 354, n. 0177, p. 447-455, 1999.

GOKCE, N.; KEANEY, J.F. JR.; FREI, B.; HOLBROOK, M.; OLESIAK, M.; ZACHARIAH, B.J.; LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J.W.; VITA, J.A. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 99, n. 25, p. 3234-3240, 1999.

GONZÁLEZ, R.; COLLADO, J.A.; NELL, S. BRICEÑO, J.; TAMAYO, M.J.; FRAGA, E.; BERNARDOS, A.; LÓPEZ-CILLERO, P.; PASCUSI, J.M.; RUFÍÁN, S.; VILAREM, M.J.; DE LA MATA, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; MAUREL, P.; MUNTANÉ, J. Cytoprotective properties of  $\alpha$ -tocopherol are relates to gene regulation in cultured d-galactosamine-treated human hepatocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 43, p. 1439-1452, 2007.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOWSKI, J., SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUIMARÃES, A.C. Cardiopatia crônica: insuficiência cardíaca. Em: Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral, Cap 13 Ed. JCP Dias e JR Coura (org), Ed Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 223-236, 1997.

GUINAZ, M.; MILAGRES, R.C.R.M, PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; CHAVES, J.B.P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovo. **Quim Nova**, v. 32, n. 8, p. 2098-2103, 2009.

- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, p.7130-7139, 1976.
- HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **Br J Exp Pathol**, v. 70, n. 6, p. 737-757, 1989.
- HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem Soc Trans**, v. 24, n. 4, p. 1023-1027, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radic Biol Med**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radic Biol Med**. 4rd ed. Clarendon Press, 2006.
- HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v.11, n. 3, p. 298-300, 1956.
- HEINECKE, J.W.; BAKER, L.; ROSEN, H.; CHAIT, A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. **J Clin Invest**, v. 77, n. 3, p. 757-761, 1986.
- HEINONEN, O.P.; ALBANES, D. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. **N Engl J Med**, v. 330, n. 15, p. 1029-1035, 1994.
- HEINONEN, O.P.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J.; TAYLOR, P.R.; HUTTUNEN, J.K.; HARTMAN, A.M.; HAAPAKOSKI, J.; MALILA, N.; RAUTALAHTI, M.; RIPATTI, S.; MÄENPÄÄ, H.; TEERENHOVI, L.; KOSS, L.; VIROLAINEN, M.; EDWARDS, B.K. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, n. 6, p. 440-446, 1998.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; REIS, M.M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, v. 60, n. 1, p. 96-107, 2003.

HODIS, H.N.; MACK, W.J.; LABREE, L.; MAHRER, P.R.; SEVANIAN, A.; LIU, C.R.; LIU, C.H.; HWANG, J.; SELZER, R.H.; AZEN, S.P.; VEAPS, RESEARCH GROUP. Alpha-tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis: the Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). **Circulation**, v. 106, n.12, p. 1453-1459, 2002.

HUANG, H.; CHAN, J.; WITTNER, M.; JELICKS, L.A., MORRIS, S.A., FACTOR, S. M., WEISS, L.M., BRAUNSTEIN, V.L., BACCHI, C.J., YARLETT, N.; CHANDRA, M.; SHIRANI, J.; TANOWITZ, H.B. Expression of Cardiac Cytokines and Inducible Form of Nitric Oxide Synthase (NOS2) in Trypanosoma cruzi-infected Mice. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 1, p. 75-88, 1999.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n 2, p. 145-169, 2003.

ISLAM, K.N.; O'BYRNE, D. ; DEVARAJ, S.; PALMER, B.; GRUNDY, S.M.; JIALAL, I. Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. **Atherosclerosis**, v. 150, n. 1, p. 217-224, 2000.

JAIN, S.K.; KRUEGER, K.S.; MCVIE, R.; JARAMILLO, J.J.; PALMER, M.; SMITH, T. Relationship of blood thromboxane-B2 (TxB2) with lipid peroxides and effect of vitamin E and placebo supplementation on TxB2 and lipid peroxide levels in type 1 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1511-156, 1998.

JAIN, S.K.; MCVIE, R. ; SMITH, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. **Diabetes Care**, v. 23, n. 9, p. 1389-1394, 2000.

JIALAL, I.; FULLER, C.J.; HUET, B.A. The effect of alpha-tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose-response study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 15, n. 2, p. 190-198, 1995.

JONSSON, G.; ABDELNOOR, M.; SELJEFLOT, I.; ARNESEN, H.; HOSTMARK, A.T.; KJELDSSEN, S.E.; OS, I.; WESTHEIM, A.S. The antioxidative effects of long-term treatment are more pronounced for carvedilol than for atenolol in post-myocardial infarction patients. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 49, n. 1, p.27-32, 2007.

KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z.I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 8, p.1037-1046, 2002.

KAPPUS, H.; DIPLOCK, A.T. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. **Free Radic Biol Med**, v.13, n.1, p.55-74, 1992.

KARDINAAL, A.F.; KOK, F.J.; RINGSTAD, J.; GOMEZ-ARACENA, J.; MAZAEV, V.P.; KOHLMEIER, L.; MARTIN, B.C.; ARO, A.; KARK, J.D.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; EURAMIC (European community multicenter study on antioxidants, myocardial Infarction, and breast cancer) coordinating centre, TNO Toxicology and Nutrition Institute, Zelst, Netherlands. Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC Study. **Lancet**, v. 342, n. 8884, p.1379-1384, 1993.

KAWACHI, I.; COLDITZ, G.A.; ASCHERIO, A.; RIMM, E.B.; GIOVANNUCCI, E.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. Prospective study of phobic anxiety and risk of coronary heart disease in men. **Circulation**, v. 89, n. 5, p.1992-1997, 1994.

KEITH, M.E; GERANMAYEGAN, A.; SOLE, M.J.; KURIAN, R.; ROBINSON, A.; OMRAN, A.S.; JEEJEEBHOY, K.N. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 31, n. 6, p. 1352-1356, 1998.

KEITH, M.E.; JEEJEEBHOY, K.N.; LANGER, A.; KURIAN, R.; BARR, A.; O'KELLY, B.; SOLE, M.J. A controlled clinical trial of vitamin E supplementation in patients with congestive heart failure. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2, p. 219-224, 2001.

KIM, J.M.; WHITE, R.H. Effect of vitamin E on the anticoagulant response to warfarin. **Am J Cardiol**, v. 77, n. 7, p. 545-546, 1996.

KIRCHHOFF, L.V.; VOTAVA, JR.; OCHS, D.E.; MOSER, D.R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 5, p.1171-1175, 1996.

KLIPSTEIN-GROBUSCH, K.; GELEIJNSE, J.M.; DEN BREEIJEN, J.H.; BOEING, H.; HOFMAN, A.; GROBBEE, D.E.; WITTEMAN, J.C. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. **Am J Clin Nutr**, v. 69, n. 2, p. 261-266, 1999.

KNEKT, P.; REUNANEN, A.; JÄRVINEN, R.; SEPPÄNEN, R.; HELIÖVAARA, M.; AROMAA, A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. **Am J Epidemiol**, v. 139, n.12, p.1180-1189, 1994.

KOSOWER, N.S.; KOSOWER, E.M. The glutathione status of cells. **Int Rev Cytol**, v. 54, p. 109-160, 1978.

KOWALSKI, J.; BANACH, M.; BARYLSKI, M.; IRZMANSKI, R.; PAWLICKI, L. Carvedilol modifies antioxidant status of patients with stable angina. **Cell Mol Biol Lett**, v. 13, n. 2, p. 230-239, 2008.

KUHLENKAMP, J.; RONK, M.; YUSIN, M.; STOLZ, A.; KAPLOWITZ, N. Identification and purification of a human liver cytosolic tocopherol binding protein. **Protein Expr Purif**, v. 4, n. 5, p. 382-389, 1993.

KUSCHNIR, E.; SGAMMINI, H.; CASTRO, R.; EVEQUOZ, C.; LEDESMA, R.; BRUNETTO, J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. **Arq Bras Cardiol**, v. 45, n.4, p.249-256, 1985.

KUSHI, L.H.; FEE, R.M.; SELLERS, T.A.; ZHENG, W.; FOLSOM, A.R. Intake of vitamins A, C, and E and postmenopausal breast cancer. The Iowa Women's Health Study. **Am J Epidemiol**, v. 144, n. 2, p.165-174, 1996.

KUSHI, L.H.; FOLSOM, A.R.; PRINEAS, R.J.; MINK, P.J.; WU, Y.; BOSTICK, R.M. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. **N Engl J Med**, v. 334, n. 18, p. 1156-1162, 1996.

LANNES, J. Coordenação geral do portal. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 19 de abril de 2011.

LATRUFFE, N.; CHERKAOUI MALKI, M.; NICOLAS-FRANCES, V.; CLEMENCET, M.C. ; JANNIN, B.; BERLOT, J.P. Regulation of the Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation-Dependent Pathway by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  and Kinases. **Biochem Pharmacol**, v. 60, n. 8, p. 1027–1032, 2000.

LEE, J.; LEE, M.; KIM, J.U.; SONG, K.I.; CHOI, Y.S.; CHEONG, S.S. Carvedilol reduces plasma 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in mild to moderate hypertension: a pilot study. **Hypertension**, v. 45, n.5, p.986-990, 2005.

LEE, I.M.; COOK, N.R.; GAZIANO, J.M.; GORDON, D.; RIDKER, P.M.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 294, n.1, p. 56-65, 2005.

LEMINEUR, T.; DEBY-DUPONT, G.; PREISER, J.C. Biomarkers of oxidative stress in critically ill patients: what should be measured, when and how? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 9, n. 6, p.704-710, 2006.

LEON, J.S.; DANIELS, M.D.; TORIELLO, K.M.; WANG, K.; ENGMAN, D.M. A cardiac myosin-specific autoimmune response is induced by immunization with *Trypanosoma cruzi* proteins. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3410-3417, 2004.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v.186, p.464-478, 1990.

LI, R.K.; SOLE, M.J.; MICKLE, D.A.; SCHIMMER, J.; GOLDSTEIN, D. Vitamin E and oxidative stress in the heart of the cardiomyopathic syrian hamster. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 2, p. 252-258, 1998.

LOBBES, M.B.; KOOI, M.E.; LUTGENS, E.; RUITERS, A.W.; LIMA PASSOS, V.; BRAAT, S.H.; ROUSCH, M.; TEM CATE, H.; VAN ENGELSHOVEN, J.M.; DAEMEN, M.J.; HEENEMAN, S. Leukocyte counts, myeloperoxidase, and pregnancy-associated plasma protein a as biomarkers for cardiovascular disease: towards a multi-biomarker approach. **Int J Vasc Med**. 2010; 2010:726207. *Epub 2010 May 30*.

LOCATELLI, C. Avaliação da expressão do citocromo P4501A1 hepático e das defesas antioxidantes em ratos. 2001. 112f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

LOCATELLI, C.; PEDROSA, R.C.; de BEM, A.F.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CORDOVA, C.A.; WILHELM-FILHO, D. A comparative study of albendazole and mebendazole-induced, time-dependent oxidative stress. **Redox Rep**, v. 9, n. 2, p. 89-95, 2004.

LONN, E.; BOSCH, J.; YUSUF, S.; SHERIDAN, P.; POGUE, J.; ARNOLD, J.M.; ROSS, C.; ARNOLD, A.; SLEIGHT, P.; PROBSTFIELD, J.; DAGENAIS, G.R.; HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 293, n. 11, p. 1338-1347, 2005.

LOSONCZY, K.G.; HARRIS, T.B.; HAVLIK, R.J. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. **Am J Clin Nutr**, v. 64, n. 2, p.190-196, 1996.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n.1, p. 265-275, 1951.

LYKKESFELDT, J.; LOFT, S.; POULSEN, H. E. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection – are they reliable biomarkers of oxidative stress? **Anal Biochem**, v. 229, p. 329-335. 1995.

MA, X.L.; YUE, T.L.; LOPEZ, B.L.; BARONE, F.C.; CHRISTOPHER, T.A.; RUFFOLO JR, R.R.; FEUERSTEIN, G.Z. Carvedilol, a new beta adrenoreceptor blocker and free radical scavenger, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic rabbits. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 277, n. 1, p. 128-136, 1996.

MACMAHON, M.T.; NEALE, G. The absorption of alpha-tocopherol in control subjects and in patients with intestinal malabsorption. **Clin Sci**, v. 38, n. 2, p. 197-210, 1970.

MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.; MESTRINER, F.L.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Trypanosoma cruzi–Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide–Dependent Trypanocidal Activity. **Circulation**, v.102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.

MAÇAO, L.B. Avaliação do estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica após terapêutica antioxidante. 2006. 93 f. Dissertação. (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

MAÇAO, L.B.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R.C.; PEREIRA, A.; BACKES, P.; TORRES, M.A.; FRÖDE, T.S. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **Int J Cardiol**, v. 123, n. 1, p. 43-49, 2007.

MAGUIRE, J.H.; MOTT, K.E.; SOUZA, J.A.; ALMEIDA, E.C.; RAMOS, N.B.; GUIMARÃES, A.C. Electrocardiographic classification and abbreviated lead system for population-based studies of Chagas' disease. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 16, n. 1, p. 47-58, 1982.

MANUEL Y KEENOY, B.; SHEN, H.; ENGELEN, W.; VERTOMMEN, J.; VAN DESSEL, G.; LAGROU, A.; DE LEEUW, I. Long-term pharmacologic doses of vitamin E only moderately affect the erythrocytes of patients with type 1 diabetes mellitus. **J Nutr**, v. 131, n. 6, p. 1723-1730, 2001.

MARANGON, K.; DEVARAJ, S.; TIROSH, O.; PACKER, L.; JIALAL, I. Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n.(9-10), p. 1114-1121, 1999.

MARCHIOLI, R.; SCHWEIGER, C.; LEVANTESI, G.; TAVAZZI, L.; VALAGUSSA, F. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. **Lipids**, v. 36, Suppl:S53-63, 2001.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMÕES, M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v.115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.

MARTIN, A.; FOXALL, T.; BLUMBERG, J.B.; MEYDANI, M. Vitamin E inhibits low-density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 3, p. 429-436, 1997.

MELLO-FILHO, AC.; HOFFMANN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**, v. 218, n. 1, p. 273-5, 1984.

MEYER, F.; BAIRATI, I. ; DAGENAIS, G.R. Lower ischemic heart disease incidence and mortality among vitamin supplement users. **Can J Cardiol**, v. 12, n. 10, p. 930-934, 1996.

MILLER, E.R 3RD.; PASTOR-BARRIUSO, R.; DALAL, D.; RIEMERSMA, R.A.; APPEL, L.J.; GUALLAR, E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. **Ann Intern Med**, v. 142, n. 1, p. 37-46, 2005.

MINAMIYAMA, Y.; TAKEMURA, S.; HAI, S.; SUEHIRO, S.; OKADA, S. Vitamin E deficiency accelerates nitrate tolerance via a decrease in cardiac P450 expression and increased oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 5, p. 808-816, 2006.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v.5, n.1, p.62-71, 2001.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n.10, p. 188-192, 1972.

MITCHINSON, M.J. The new face of atherosclerosis. **Br J Clin Pract**, v. 48, n. 3, p. 149-151, 1994.

MONSEN, E.R. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. **J Am Diet Assoc**, v. 100, n. 6, p. 637-640, 2000.

MOREL, D.W.; DICORLETO, P.E.; CHISOLM, G.M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. **Arteriosclerosis**, v. 4, n. 4, p. 357-364, 1984.

MORGAN T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. **Clin Pharmacokinet**, v. 26, n. 5, p. 335-346, 1994.

MORRIS, M.C.; BECKETT, L.A.; SCHERR, P.A.; HEBERT, L.E.; BENNETT, D.A.; FIELD, T.S.; EVANS, D.A. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 12, n. 3, p. 121-126, 1998.

MOTOYAMA, T.; KAWANO, H.; KUGIYAMA, K.; HIRASHIMA, O.; OHGUSHI, M.; TSUNODA, R.; MORIYAMA, Y.; MIYAO, Y.; YOSHIMURA, M.; OGAWA, H.; YASUE H. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. **J Am Coll Cardiol**, v. 32, n. 6, p. 1672-1679, 1998.

MUÑOZ-SARAVIA, S.G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Fail Rev**, 2010 Dec 17, (*Epub ahead of print*).

NAKAHIRA, A.; MINAMIYAMA, Y.; TAKEMURA, S.; HIRAI, H.; SASAKI, Y.; OKADA, S.; FUNAE, Y.; SUEHIRO, S. Coadministration of carvedilol attenuates nitrate tolerance by preventing cytochrome p450 depletion. **Circ J**, v. 74, n. 8, p. 1711-1717, 2010.

NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADI, R. Protein 3-Nitrotyrosine Formation during Trypanosoma cruzi Infection in Mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 12, p. 1825-1834, 2005.

NG, L.L.; PATHIK, B.; LOKE, I.W.; SQUIRE, I.B.; DAVIES, J.E. Myeloperoxidase and C-reactive protein augment the specificity of B-type natriuretic peptide in community screening for systolic heart failure. **Am Heart J**, v. 152, n. 1, p. 94-101, 2006.

NICOLETTI, G.; CRESCIBENE, M.; SCORNAIENCHI, M.; BASTONE, L.; BAGALÀ, A.; NAPOLI, I.D.; CARACCILOLO, M.; QUATTRONE, A. Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 33, n.1, p. 7-12, 2001.

OLIVEIRA, P.J.; ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M.; MORENO, A.J. Carvedilol reduces mitochondrial damage induced by hypoxanthine/xanthine oxidase: relevance to hypoxia/reoxygenation injury. **Cardiovasc Toxicol**, v.1, n. 3, p. 205-213, 2001.

PARRA, A.V.; RODRIGUES, V.; CANCELLA, S.; CORDEIRO, J.A.; BESTETTI, R.B. Impact of socioeconomic status on outcome of a Brazilian heart transplant recipients cohort. **Int J Cardiol**, v. 125, n. 1, p. 142-143, 2008.

PASHKOW, F. J. Oxidative Stress and Inflammation in Heart Disease: Do Antioxidants Have a Role in Treatment and/or Prevention? **Int J Inflamm**, 2011, 2011:514623. *Epub 2011 Aug 11*.

PEDROSA, R.C.; de BEM, A.F.; LOCATELLI, C.; PEDROSA, R.C.; GEREMIAS, R.; WILHELM FILHO, D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Rep**, v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PÉREZ-FUENTES, R.; GUEGAN, J.,F.; BARNABE, C.; LOPEZ-COLOMBO, A.; SALGADO-ROSAS, H.; TORRES-RASGADO, E.; BRIONES, B.; ROMERO-DIAZ, M.; RAMOS-JIMENEZ, J.; SANCHEZ-GUILLEN, M DEL C. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 29329-9, 2003.

PÉREZ-FUENTES, R.; LÓPEZ-COLOMBO, A.; ORDÓÑEZ-TOQUERO, G.; GOMEZ-ALBINO, I.; RAMOS, J.; TORRES-RASGADO, E.; SALGADO-ROSAS, H.; ROMERO-DÍAZ, M.; PULIDO-PÉREZ, P.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, M.C. 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**, v. 101, n. 2, p. 123-132, 2007.

PLENTZ, R.D.; IRIGOYEN, M.C. ; MULLER, A.S.; CASARINI, D.E.; RUBIRA, M.C.; MORENO JUNIOR, H.; MADY, C.; IANNI, B.M.; KRIEGER, E.M.; CONSOLIM-COLOMBO, F. Venous endothelial dysfunction in Chagas' disease patients without heart failure. **Arq Bras Cardiol**, v. 86, n. 6, p. 466-471, 2006.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p.1163-82, 2004.

POOLE-WILSON, P.A.; SWEDBERG, K.; CLELAND, J.G.; DI LENARDA, A.; HANRATH, P.; KOMAJDA, M.; LUBSEN, J.; LUTIGER, B.; METRA, M.; REMME, W.J.; TORP-PEDERSEN, C.; SCHERHAG, A.; SKENE, A. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. **Lancet**, v. 362, n. 9377, p.7-13, 2003.

PORTAL, V.L.; MORIGUCHI, E. H.; VIEIRA, J.L.C.; SCHIO, S.; MASTALIR, E.T.; BUFFÉ, F.; BORTOLINI, E.B.; BRÜCH, R.S.; RODRIGUES, R. Comparação do Efeito de Dois Inibidores da HMG Côa Redutase sobre a Suscetibilidade da LDL à Oxidação. **Arq Bras Cardiol**, v. 80, n. 2, p. 150-155, 2003

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart diseases: Basic scienc to clinical intervention trials. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n.1, p. 141–164, 2000.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. **Inflamm**, v. 17, p. 723-741, 1993.

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

REAVEN, P.D.; KHOUW, A.; BELTZ, W.F.; PARTHASARATHY, S.; WITZTUM, J.L. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. **Arterioscler Thromb**, v. 13, n. 4, p. 590-600, 1993.

REIS, D.D., JONES, E.M., TOSTES, S. JR., LOPES, E.R., GAZZINELLI, G., COLLEY, D. G., MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic Chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-644, 1993.

RIBEIRO, A.L.; ROCHA, M.O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.31, n. 3, p. 301-314, 1998.

RIBEIRO, C.M. Efeito do Tratamento do Benznidazol e da Terapia Antioxidante na Cardiopatia Chagásica Crônica. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

RIBEIRO, C.M.; BUDNI, P.; PEDROSA, R.C.; FARIAS, M.S.; PARISOTTO, E.B.; DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; OLIVEIRA-SILVA, D.; COLEPICOLO, P.; FILHO, D.W. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, v. 145, n. 1, p. 27-33, 2010.

RICCIONI, G.; BUCCIARELLI, T.; MANCINI, B.; CORRADI, F.; DI ILIO, C.; MATTEI, P.A.; D'ORAZIO, N. Antioxidant vitamin supplementation in cardiovascular diseases. **Ann Clin Lab Sci**, v. 37, n. 1, p. 89-95, 2007.

RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1450-1456, 1993.

RIVERA, M.T.; DE SOUZA, A.P.; MORENO, A.H.; XAVIER, S.S.; GOMES, J.A.; ROCHA, M.O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; NÈVE, J.; VANDERPAS, J.; ARAÚJO-JORGE, T.C. Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 6, p. 706-712, 2002.

ROBERTS, L.J. 2<sup>ND</sup>; OATES, J.A.; LINTON, M.F.; FAZIO, S.; MEADOR, B.P.; GROSS, M.D.; SHYR, Y.; MORROW, J.D. The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 10, p. 1388-1393, 2007.

ROBERTS, L.J. 2<sup>ND</sup>; TRABER, M.G.; FREI, B. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease and cancer in men. **Free Radic Biol Med**, Letter to the Editor, v. 46, n. 11, p. 1558, 2009.

ROCHA, M.O.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Front Biosci**, v. 8, e44-54, 2003.

RODRIGUES, M.A.; RODRIGUES, J.L.; MARTINS, N.M.; BARBOSA, F.; CURTI, C.; SANTOS, N.A.; SANTOS, A.C. Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Chem Biol Interact**, v. 189, n. 1-2, p. 45-51, 2011.

ROSE, G.; BLACKBURN, H.; GILLIUM, R.F.; PRINEAS, R.J. Cardiovascular survey methods, **World Health Organization**, Monograph Series n. 56, 1982.

ROSSI, M.A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, v. 30, n. 3, p. 335-340, 1991.

ROSSI, M.A. Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis. Sao Paulo **Med J**, v. 113, n. 2, p. 750-756, 1995.

RUFFOLO JR, R.R.; FEUERSTEIN, G.Z. Pharmacology of carvedilol: rationale for use in hypertension, coronary artery disease, and congestive heart failure. **Cardiovasc Drugs Ther**, Suppl 1, p. 247-256, 1997.

SALONEN, J.T.; SALONEN, R.; PENTTILÄ, I.; HERRANEN, J.; JAUHAINEN, M.; KANTOLA, M.; LAPPETELÄINEN, R.; MÄENPÄÄ, P.H.; ALFTHAN, G.; PUSKA, P. Serum fatty acids, apolipoproteins, selenium and vitamin antioxidants and the risk of death from coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 56, n. 4, p. 226-231, 1985.

SANDERSON, J.E.; CHAN, S.K.; YIP, G.; YEUNG, L.Y.; CHAN, K.W.; RAYMOND, K.; WOO, K.S. Beta-blockade in heart failure: a comparison of carvedilol with metoprolol. **J Am Coll Cardiol**, v. 34, n. 5, p.1522-1528, 1999.

SANTOS, C.X.; ANILKUMAR, N.; ZHANG, M.; BREWER, A.C.; SHAH, A.M.Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n.7, p. 777-793, 2011.

SARAN, R.; NOVAK, J.E.; DESAI, A.; ABDULHAYOGLU, E.; WARREN, J.S.; BUSTAMI, R.; HANDELMAN, G.J.; BARBATO, D.; WEITZEL, W.; D'ALECY, L.G.; RAJAGOPALAN, S. Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 11, p.2415-2420, 2003.

SAREMI, A.; ARORA, R. Vitamin E and Cardiovascular Disease. **Am J Ther**, v. 17, n. 3, p. e56-e65, 2010.

SESSO, H.D.; BURING, J.E.; CHRISTEN, W.G.; KURTH, T.; BELANGER, C.; MACFADYEN, J.; BUBES, V.; MANSON, J.E.; GLYNN, R.J.; GAZIANO, J.M. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. **JAMA**, v. 300, n. 18, p.2123-2133, 2008.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 311, n. 1152, p. 617-31, 1985.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. **Ann N Y Acad Sci**, v. 669, p. 7-20, 1993.

SILVEIRA, C.A.; CASTILLO, E.; CASTRO, C. Evaluation of an specific treatment for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase. **Rev Soc Bras Med Trop**, v 33, n. 2, p. 191–196, 2000.

SIMONS, L.A.; VON KONIGSMARK, M.; SIMONS, J.; STOCKER, R.; CELERMAJER, D.S. Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. **Atherosclerosis**, v. 143, n. 1, p. 193-19, 1999.

SMITH, KS LEE C.L.; RIDLINGTON, J.W.; LEONARD, S.W.; DEVARAJ, S.; TRABER, M.G. Vitamin E supplementation increases circulating vitamin E metabolites tenfold in end-stage renal disease patients. **Lipids**, v. 38, n. 8, p. 813-819, 2003.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annu Rev Nutr**, v. 25, p. 151–174, 2005.

SOBRINHO, J.L.S.; FONTES, D.A.F.; LYRA, M.A.M.; SOARES, M.F.R.; ROLIM NETO, P.J. Chagas.s disease: 100 years from its discovery. **Rev Bras Farm**, v. 90, n. 4, p. 283-289, 2009.

STADTMAN, E.R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p. 1105-1112, 2004.

STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.; WILLETT, W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1444-1449, 1993.

STEINBRECHER, U.P.; PARTHASARATHY, S.; LEAKE, D.S.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 12, p. 3883-387, 1984.

STEINBECK, M.J.; KHAN, A.U.; KARNOVSKY, M.J. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. **J Biol Chem**, v. 268, n.21, p. 15649–15654, 1993.

STEPHENS, N.G.; PARSONS, A.; SCHOFIELD, P.M.; KELLY, F.; CHEESEMAN, K.; MITCHINSON, M.J. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). **Lancet**, v. 347, n. 9004, p. 781-786, 1996.

STERNICK, E.B.; MARTINELLI, M.; SAMPAIO, R.; GERKEN, L.M.; TEIXEIRA, R.A.; SCARPELLI, R.; SCANAVACCA, M.; NISHIOKA, S.D.; SOSA, E. Sudden cardiac death in patients with chagas heart disease and preserved left ventricular function. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 17, n. 1, p.113-116, 2006.

STOCKER, R.; BOWRY, V.W. In: Cadenas E, Packer L, editors. Handbook of antioxidants. New York: Marcel Dekker, p. 27, 1996.

STORINO, R.A. Chagas crónico. In: Storino RA and Milei, J **Enfermedad de Chagas**, Buenos Aires, Doyma Argentina, p. 247-266, 1994.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J,F, JR. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 978-992, 2011.

SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; WASSALL, S.R.; CHOO, Y.M.; GOVIL, G.; KAGAN, V.E.; PACKER L. Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p.10692-10699, 1993.

SUZUKI, Y.J.; PACKER, L. Inhibition of NF-kappa B DNA binding activity by alpha-tocopheryl succinate. **Biochem Mol Biol Int**, v. 31, n. 4, p. 693-700, 1993.

TADOLINI, B.; FRANCONI, F. Carvedilol inhibition of lipid peroxidation. A new antioxidative mechanism. **Free Radic Res**, v. 29, n. 5, p.377-387, 1998.

TAFURI, W.L. Immunopathology of Chagas disease – a historical overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, Suppl 1, p. 247-248, 1999.

TEIXEIRA, P.C. Análise proteômica no miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica: alterações no metabolismo energético cardíaco. 2009. 234f. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

TORRE-AMIONE G. Immune activation in chronic heart failure. **Am J Cardiol**, v. 95, n. (11A):3C-8C; discussion 38C-40C, 2005.

TORRICO F.; CASTRO M.; SOLANO M.; RODRIGUEZ P.; TORRICO, M.C.; TRUYENS C.; CARLIER Y. Effects of maternal infection with *Trypanosoma cruzi* in pregnancy development and in the newborn infant. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, Suppl 2, p. 73-76, 2005.

TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 1, p. 4-15, 2007.

TRABER, M.G.; STEVENS, J.F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 1000-1103, 2011.

ULKER, S.; MCKEOWN, P.P.; BAYRAKTUTAN, U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 534-539, 2003

UPRITCHARD, J.E.; SUTHERLAND, W.H.; MANN, J.I. Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, n. 6, p. 733-738, 2000.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop**, v. 115, n.1-2, p. 55-68, 2010.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol Cell Biochem**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; RHODES, C.J. ; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN TITS, L.J.; DEMACKER, P.N.; DE GRAAF, J.; HAK-LEMMERS, H.L.; STALENHOF, A.F. alpha-tocopherol supplementation decreases production of superoxide and cytokines by leukocytes ex vivo in both normolipidemic and hypertriglyceridemic individuals. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 2, p. 458-464, 2000.

VERLANGIERI, A.J.; BUSH M.J. Effects of d-alpha-tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. **J Am Coll Nutr**, v. 11, n. 2, p. 131-138, 1992.

VIVEKANANTHAN, D.P.; PENN, M.S.; SAPP, S.K.; HSU, A.; TOPOL, E.J. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2017-2023, 2003.

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes. **Prog Lipid Res**, v. 38, n. 4, p. 309-336, 1999.

WEN, J.J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 12, p. 2072-2081, 2004.

WEN, J.J.; VYATKINA, G.; GARG, N. Oxidative Damage during Chagasic Cardiomyopathy Development: Role of Mitochondrial Oxidant Release and Inefficient Antioxidant Defense. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 11, p. 1821-1833, 2004.

WEN, J.J.; GUPTA, S.; GUAN, Z.; DHIMAN, M.; CONDON, D.; LUI, C.; GARG, N.J. Phenyl-alpha-tert-butyl-nitron and benzonidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic Rats. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 22, p.2499-2508, 2010.

WHO (World Health Organization). TDR and product/drug discovery, introduction, 2009. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/topics/product-drug-development> >, Acesso em: 13 de maio de 2011.

WILHELM FILHO, D.; SELL, F.; RIBEIRO, L.; GHISLANDI, M.; CARRASQUEDO, F.; FRAGA, C.G.; WALLAUER, J.P.; SIMÕES-LOPES, P.C.; UHART, M.M. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n. 3, p. 885-892, 2002.

WU, T.C.; CHEN, Y.H. LEU, H.B.; CHEN, Y.L.; LIN, F.Y.; LIN, S.J.; CHEN, J.W. Carvedilol, a pharmacological antioxidant, inhibits neointimal matrix metalloproteinase-2 and -9 in experimental atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 11, p.1508-1522, 2007.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chem Phys Lipids**, v. 123, n. 1, p. 63-75, 2003.

YUE, T.L.; CHENG, H.Y.; LYSKO, P.G.; MCKENNA, P.J.; FEUERSTEIN, R.; GU, J.L.; LYSKO, K.A.; DAVIS, L.L.; FEUERSTEIN, G. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 263, n. 1, p. 92-98, 1992.

YUE, T.L.; MCKENNA, P.J.; LYSKO, P.G.; RUFFOLO JR, RR.; FEUERSTEIN, G.Z. Carvedilol, a new antihypertensive, prevents oxidation of human low density lipoprotein by macrophages and copper. **Atherosclerosis**, v. 97, n. 2-3, p. 209-216, 1992.

YUE, T.L.; MCKENNA, P.J.; GU, J.L.; CHENG, H.Y.; RUFFOLO JR, R.R.; FEUERSTEIN, G.Z. Carvedilol, a new antihypertensive agent, prevents lipid peroxidation and oxidative injury to endothelial cells. **Hypertension**, v. 22, n.6, p. 922-928, 1993.

YUE, T.I.; RUFFOLO R. JR.; FEUERSTEIN, G. Antioxidant Action of Carvedilol: A Potential Role in Treatment of Heart Failure. **Heart Fail Rev**, v. 4, p. 39-51, 1999.

YUSUF, S.; DAGENAIS, G.; POGUE, J.; BOSCH, J.; SLEIGHT, P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. **N Engl J Med**, v. 342, n. 3, p. 154-160, 2000.

ZACKS, M.A.; WEN, J.J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N.  
An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of  
oxidative stress. **An Acad Bras Cienc**, v. 4, p. 695-715, 2005.



10- Classe Funcional da NYHA

(1) Classe I (2) Classe II (3) Classe III (4) Classe IV

11-Internação prévia devido a Insuficiência Cardíaca

12-Desfibrilador Cardíaco Intracavitário

13-Taquicardia Ventricular Sustentada

14-Diag de Disautonomia (necessário presença dos 3 itens

*a-ausência de ansiedade*

*b-ausência de transpiração*

*c-bradicardia e/ou hipotensão*

15-Morte Súbita Ressuscitada

Você já teve alguma perda súbita e momentânea da consciência e do tônus postural que necessitou de manobras de ressuscitação?

*A-Taquicardia Ventricular Sustentada*

*B-Fibrilação Ventricular*

*C-Assistolia*

*D-Atividade elétrica sem pulso-a-BAV 3º grau*

*b-outra bradiarritmia*

*c-outra ritmo*

16-Diagnóstico de Embolia Pulmonar

17-Diagnóstico de Embolia Sistêmica

18-Diagnóstico de AVC / TIA

19-Sincope

20-Marca-passo

21-Fibrilação Atrial

\*DOENÇAS ASSOCIADAS NÃO CARDÍACAS

22-Diabetes

23-Doença vascular periférica

24-Disfunção Respiratória

25-Doença coronariana

26-Insuficiência Renal Crônica

27-Doença vascular cerebral

28-Dislipidemia

29-Cancer

30-Hipertensão

31-Outros

## \* HÁBITOS

32-Diagnóstico de Tabagismo

*a-Nunca Fumou**b-Fumante (1 ou mais maço/dia)**c-Ex-fumante (não fuma nos últimos 6 meses)**d-Eventualmente*

33-Alcoolismo Crônico (presença de duas ou mais respostas positivas)

(1)-Sim (2)-Não

-Se alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ou parar de beber

-Se as pessoas o aborrecem porque criticam o seu modo de beber

-Se se sente culpado pela maneira com que costuma beber

-Se costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou ressaca

## \* ESCOLARIDADE

34-Que nível de escolaridade você chegou a completar?

1-Analfabeto|

2-Nunca foi a escola mas sabe ler e escrever

3-Primeiro grau incompleto

4-Primeiro grau completo

5-Segundo grau incompleto

6-Segundo grau completo

7-Terceiro grau (curso universitário) completo

## \* MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Pes. |\_\_|\_\_|\_\_| kg

Altura |\_\_|\_\_|\_\_| cm

35-Relação cintura |\_\_|\_\_|\_\_| cm

36-Pressão arterial sistólica|\_\_|\_\_|\_\_|mmHg diastólica|\_\_|\_\_|\_\_| mmHg

## \* AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

(1) Sim (2) Não

37-Normal

38- Índice cardio-torácico  $\geq 0,50$ 

39-Sinais de congestão pulmonar

## \*ALTERAÇÕES NO ECG DE REPOUSO CONVENCIONAL

(1)-Sim (2)-Não

40-Normal

41-Bradicardia sinusal &lt;50bpm ou pausa sinusal &gt; 3,0 seg

42-BAV 1º grau

43-Distúrbio condução AV ( 2 e/ou 3 grau )

44-Alterações primárias de ST-T

45-Baixa voltagem (&lt;0,5 Mv todas as derivações frontais)

46-Fibrilação Atrial

47-Extra-Sístoles Ventriculares

48-BRE

49-Área Eletricamente Inativa (Q &gt; 40ms 2 derivações contínuas)

(a) anterior (b) inferior (c) posterior (d) lateral (e) antero-lateral

50-BRD

51-HBAE

52-Marcapasso

## \* MONITORIZAÇÃO CONTÍNUA DO ECG DURANTE EXERCÍCIO

(1)-Surgiu (2)-Ausente (3)-Aumentou (4)-Diminuiu (5)-Mantida

Considerar o maior nº de arritmias durante 30 segundos qualquer de registro

53-Ext Vent

54-Taqui Vent Monomórfica Não Sustentada

55-Distúrbio de condução atrioventricular

56-Distúrbio de condução intraventricular

## \*ELETROCARDIOGRAFIA DINÂMICA (HOLTER)

(1) Sim (2) Não

57-Taquicardia com QRS estreito  $\geq 150$  bpm > 30 seg58-Taquicardia com QRS estreito  $\geq 150$  bpm < 30 seg

59-Taquicardia com QRS estreito &lt; 150 bpm &gt; 30 seg

60- Taquicardia com QRS estreito &lt; 150 bpm &lt; 30 seg

61-Taquicardia com QRS alargado  $\geq 150$  bpm duração  $\geq$  bat

- 62-Taquicardia com QRS alargado < 150 bpm duração ≥ 4 bat
- 63-Bradicardia sustentada < 35 bpm
- 64-Bloqueio sinoatrial
- 65-Pausa sinusal ≥ 3 segundos
- 66-Ritmo escape juncional
- 67-Bradicardia sinusal inapropriada
- 68-Taqui-bradicardia
- 69-Bradiarritmia pós-parada cardíaca
- 70-Bloqueio AV 2º grau Mobitz Tipo 1
- 71-Bloqueio AV 2º grau Mobitz Tipo 2
- 72-Bloqueio AV 3º grau
- 73-Fibrilação e/ou Flutter atrial
- 74-Distúrbio de condução intraventricular
- 75-Falha de marcapasso 76-
- Desfibrilador - qualquer documentada descarga
- 77-Síncope - qualquer relato
- 78-Arritmia ventriculares complexa multiforme > 10/hora
- \* ECOCARDIOGRAMA Bi-Doppler
- (1)-Sim (2)-Não
- 79-Normal
- 80-Evidência de anormalidade contrátil segmentar
- (a) anterior (b) inferior (c) posterior (d) lateral (e) apical
- 81-Alteração de contratilidade difusa
- 82-Disfunção sistólica de VE leve
- 83-Disfunção sistólica de VE moderada
- 84-Disfunção sistólica de VE grave
- 85-Trombo em VE
- 86-Aneurisma
- (a) anterior (b) inferior (c) posterior (d) lateral (e) apical
- 87-Diâmetro diastólico de VE mm 88-
- Diâmetro sistólico de VE mm
- 89-FEVE %
- 90-Disfunção Diastólica |
- (a)-Ausente (b)-Padrão de Deficit de Relaxamento (c)-Padrão Restritivo
- (d)-Padrão Pseudo-normalização
- \*MEDICAMENTOS
- (1)-Sim (2)-Não
- 91-Diurético de alça
- 92-Diuréticos outros

- 93-Digital
- 94-IECA
- 95-ARBs
- 96-Espironolactona
- 97-Anticoagulante Oral
- 98-Amiodarona
- 99-Outros antiarritmico
- 100-Aspirina
- 101-Beta bloqueador

\* IMPRESSÃO FINAL

- 102-Forma Clínica Cardíaca (estágios evolutivos)
  - 1-Cardiopatia Chagásica Crônica leve (grupo IA)
  - 2-Cardiopatia Chagásica Crônica moderada (grupo IB)
  - 3-Cardiopatia Chagásica Crônica grave sem ICC (grupo II)
  - 4-Cardiopatia Chagásica Crônica grave com ICC (grupo III)
    - (1) Sim
    - (2) Não
- 103-Esôfagopatia
- 104-Colopatia

## APÊNDICE 2

### Ficha de ACOMPANHAMENTO NUTRICIONAL do Programa Cardio/Chagas /HU-UFRJ

#### IDENTIFICAÇÃO

1) Nome.....

02- N° Prontuário

\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|

03- Data de Nascimento

\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|

04-Etnia

\_\_\_\_|

( 1 ) Negra ( 2 ) Branca ( 3 ) Mulata ( 4 ) Outra

05- Sexo

\_\_\_\_|

( 1 ) Masculino

( 2 ) Feminino

06- Naturalidade.....

07-Data da Avaliação Inicial

\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|

08-Afastado da zona endêmica há.....anos

#### HISTORIA ALIMENTAR

09-Quantas refeições você faz regularmente?. Lembre-se de todas as refeições-café da manhã, almoço,janta e lanches que você faz em casa ou fora de casa:

( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5 ( ) 6 ou mais

10-Você tem uma alimentação saudável?

( ) Sim ( ) Não ( ) as vezes

Justifique:

11-Marque com (X) nos alimentos que você gosta de comer ou beber:

( ) frango

( ) legumes

( ) bolo

( ) peixe

( ) verduras

( ) pão

( ) carne de boi

( ) frutas

( ) hamburger

( ) ovo

( ) suco

( ) pizza

( ) feijão

( ) leite

( ) cachorro-quente

( ) arroz

( ) queijo

( ) biscoito

( ) macarrão

( ) danone

( ) doce/chocolate

( ) angu

( ) refrigerante

( ) pipoca

12-Marque um (X) nos alimentos que você come sempre (pelo menos uma vez por semana):

- |                                       |                                       |  |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> frango       | <input type="checkbox"/> legumes      | <input type="checkbox"/> bolo            |
| <input type="checkbox"/> peixe        | <input type="checkbox"/> verduras     | <input type="checkbox"/> pão             |
| <input type="checkbox"/> carne de boi | <input type="checkbox"/> frutas       | <input type="checkbox"/> hamburger       |
| <input type="checkbox"/> ovo          | <input type="checkbox"/> suco         | <input type="checkbox"/> pizza           |
| <input type="checkbox"/> feijão       | <input type="checkbox"/> leite        | <input type="checkbox"/> cachorro-quente |
| <input type="checkbox"/> arroz        | <input type="checkbox"/> queijo       | <input type="checkbox"/> biscoito        |
| <input type="checkbox"/> macarrão     | <input type="checkbox"/> danone       | <input type="checkbox"/> doce/chocolate  |
| <input type="checkbox"/> angu         | <input type="checkbox"/> refrigerante | <input type="checkbox"/> pipoca          |

13-Você come com mais frequência alimentos:

- fritos       cozidos       grelhados ou assados  
 alterando todas as formas de preparo

14-Com que frequência mensal você costuma comer fast foods (Mac Donalds, Bobs etc)

- nunca     quase nunca     1     2     3     4     5 ou mais

15-O que você costuma levar de lanche para o trabalho?

16-Você come doce com frequência?

- todo dia     uma vez por semana     2 vezes por semana  
 3 vezes por semana     nunca

17-Você se acha:

- gordo     magro     no peso ideal     acima do peso ideal  
 abaixo do peso ideal

18-Você pratica atividade física?

- sim                       não    Qual?      Quantas vezes por semana?

## APÊNDICE 3

### Protocolo de Aprovação no Comitê de Ética (053/07)

DE : CARDIOLOGIA HUCFF

FAX : 25622759

09 MAI. 2007 11:31 Pág. 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho  
Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

- Coordenador:**  
 Alice Helena Dutra Violante  
 Médico - Prof. Associada
- Secretária:**  
 Maria Tereza Antonio  
 Farmacêutica - Especialista
- Membros Titulares:**  
 Helena Maria Almeida Horst  
 Prof. Associada  
 Patrícia Ingo Parra Cabas  
 Médico - Prof. Associada  
 Elina Regina Ambrósio  
 Assessoria Social - Mestre  
 Helena Warynsky  
 Representante dos Acadêmicos  
 Luiz Carlos Duarte de Miranda  
 Médico - Prof. Adjunto  
 Lucio da Conceição de Araújo  
 Marques  
 Enfermeiro - Mestre  
 Paulo Felix Barros  
 Médico - Prof. Adjunto  
 Regina de Fátima Revellin  
 Farmacêutica - Doutora  
 Roberto Coury Pedrosa  
 Médico - Doutor  
 Zuzana Rodrigues de Silva  
 Professora
- Membros Suplentes:**  
 Beatriz Moritz In'no  
 Médico - Doutor  
 Cecília de Assis Martinsso  
 Jornalista  
 Carlos Alberto Guimarães  
 Médico - Prof. Adjunto  
 Lucio Helena Lara Viçoso Amari  
 Médico - Doutoranda  
 Maria de Fátima Casanova Lopes  
 Representante dos Acadêmicos  
 Mariângela Oliveira de Silva  
 Enfermeira  
 Maria Fernanda Parkeid  
 Engenheira - Doutor  
 Cláudia Maria Gomes  
 Socióloga - Doutor  
 Verin Tias de Oliveira  
 Assessoria Social

CEP - MEMO - n.º 319/07

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2007.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dr. Roberto Coury Pedrosa

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: n.º 053/07- CEP

Título: "Efeito do tratamento com o benzonidazol e da terapia antioxidante na cardiopatia chagásica crônica"

Pesquisador (a) responsável: Dr. Roberto Coury Pedrosa

Data de apreciação do parecer: 12/04/2007

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 12/10/2007, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof.ª Alice Helena Dutra Violante  
Coordenadora do CEP

## APÊNDICE 4

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Título do estudo:** Efeito do carvedilol e monitoramento de terapias antioxidantes ao longo de 7 anos em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos.

Instituição: Hospital Universitário C.F.F-UFRJ-Serviço de Cardiologia  
Investigador: Dr. Roberto Coury Pedrosa (Inscrição no CRM nº 5244441-3) (RJ) - Telefone: 25622618 / 25622434

#### **Introdução**

Você está sendo convidado para participar voluntariamente de uma pesquisa clínica. Antes de decidir a respeito de sua participação nesse estudo, é importante que você leia e entenda esse documento e o que está envolvido nesta pesquisa clínica (também chamada de estudo clínico). Esse documento, chamado de “termo de consentimento livre e esclarecido” descreve os objetivos, os procedimentos, os riscos, os benefícios, os pagamentos e os desconfortos do estudo. Esse documento também descreve o seu direito de deixar o estudo a qualquer momento. Nenhuma promessa ou garantia sobre resultados dessa pesquisa pode ser feita. Por favor, pergunte quantas vezes você achar necessário para decidir se você quer participar deste estudo. Se estiver de acordo com as informações deste documento, você irá assiná-lo e receberá uma das cópias assinadas para que possa guardá-la com você.

#### **Descrição/objetivos do estudo**

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico porque você tem uma doença chamada doença de Chagas com grau de comprometimento variável nos diferentes órgãos, principalmente o coração. O objetivo deste estudo é verificar se a administração do carvedilol, um medicamento que pode ser útil na atenuação de sua doença. Também, o estudo vai verificar se a administração das vitaminas C e E (medicamentos antioxidantes) vão te ajudar a combater sua doença.

#### **Desenho do estudo/duração/número de pacientes**

Esse estudo caracteriza-se por ser um estudo clínico, observacional, assistencial. É importante que você tome o medicamento de acordo com as instruções dadas pelo médico do estudo (Dr Roberto Coury Pedrosa). A duração do tratamento do estudo também dependerá

dos efeitos colaterais que você desenvolver. Caso você interrompa a tomada do medicamento do estudo, você será acompanhado pelo seu médico (Dr Roberto Coury Pedrosa) para ver a evolução no seu estado geral de saúde.

### **Descrição do estudo**

#### **Procedimentos na avaliação inicial**

Se você decidir participar do estudo, você realizará determinados testes e procedimentos para ajudar a descobrir se você pode fazer parte desse estudo. Esses testes e procedimentos são chamados “procedimentos da avaliação inicial”. Os procedimentos da avaliação inicial pode ocorrer até uma semana antes que você inicie o tratamento. Você será solicitado a assinar esse documento antes que qualquer teste possa ser realizado. O seu médico perguntará sobre a sua história médica. Isto pode incluir doenças que você teve no passado, doenças diferentes da doença de Chagas que você tem atualmente (por exemplo, diabetes, hipertensão, asma) e todos os medicamentos que você tomou nas últimas semanas. A história de tratamento anteriores que você utilizou para o tratamento da sua doença de Chagas bem como quaisquer efeitos colaterais em andamento desses tratamentos anteriores serão registrados. Serão também realizados: exame físico (incluindo a medida do seu peso, altura, pressão arterial sanguínea, frequência cardíaca e temperatura corporal), um eletrocardiograma (ECG- um teste que produz um quadro gráfico da atividade elétrica de seu coração), ecocardiograma (um teste que mede a função de bombeamento de sangue do seu coração). Radiografias de torax serão realizados caso não tenham sido realizadas recentemente. Ao longo do curso do estudo, serão obtidas e enviadas para o seu prontuário cópias dessas avaliações. Após esta consulta inicial, será coletado sangue de uma veia (10 ml de sangue igual a quantidade de 1 colher de sopa) e ai então você deverá iniciar o medicamento (carvedilol) durante 6 meses, três vezes ao dia. Nesse período você deverá retornar em consulta médica 1 vezes. Nova consulta médica será marcada após 6 meses da administração das vitaminas C e E. Nesta visita de final do tratamento com as vitaminas será novamente coletado sangue de uma veia de meu braço.

Então será iniciado uma nova etapa aonde serão administrados o carvedilol e as vitaminas, por 6 meses, fazendo nova consulta após este período para coletar amostras de sangue.

Alguns dos exames de sangue que estão sendo realizados são exames de rotina e ajudarão o seu médico a monitorar o seu sangue em relação a qualquer mudança. Alguns exames de sangue estão sendo

realizados com os propósitos da pesquisa e não seriam realizados caso você não estivesse recebendo o tratamento do estudo. O seu sangue, após processado, será armazenado apenas para realização dos exames propostos, sendo posteriormente desprezados. Serão observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do seu sangue até a análise laboratorial final.

É possível que, após todos os testes terem sido revisados, você não possa fazer parte desse estudo. Da mesma forma, pode haver outras razões, pelas quais você não pode participar e, nesse caso, o seu médico discutirá todas essas razões com você.

Alguns exames de sangue, realizados na visita de avaliação inicial, podem precisar ser repetidos, mas apenas caso o seu médico avalie que esses exames são necessários. Será solicitado a você que informe qualquer medicamento que você esteja tomando na semana anterior à primeira dose do tratamento

### **Tratamento**

Caso você se qualifique para o estudo e concorde em participar, você receberá o seguinte tratamento: Carvedilol 12,5mg em três tomadas no dia durante 6 meses, seguidos de Carvedilol na mesma dose + 800UI/dia vitamina E + 500mg/dia vitamina C, tomada única, por mais 6 meses. O fornecimento da medicação do estudo será feito a você no consultório do seu médico, juntamente com as instruções sobre como tomar os comprimidos em casa. Você e/ou um membro de sua família, será solicitado a contatar o seu médico caso você desenvolva qualquer efeito colateral mental ou físico ou caso você tenha qualquer pergunta sobre o carvedilol, a vitamina C ou sobre a vitamina E fornecida a você. Você deve tomar as doses do carvedilol e das vitamina C e E imediatamente antes da sua principal alimentação.

Você também será solicitado a trazer todos os frascos de tratamento deste estudo a cada visita. Se você continuar no andamento do estudo, então você receberá uma nova prescrição através do consultório de seu médico

### **Procedimento do estudo**

Enquanto estiver tomando a medicação do estudo você será solicitado a seguir a programação de visitas clínicas do estudo para monitorar sua segurança e se os tratamentos estão funcionando

Durante cada visita você irá realizar as seguintes avaliações:

-Exame físico que inclui a medida do seu peso, pressão arterial sanguínea, frequência cardíaca e temperatura corporal e uma avaliação de sua progressão no estudo

-Você deve informar quaisquer sintomas que você desenvolver desde o início do estudo ou qualquer mudança nos sintomas que você relatou durante as visitas prévias

-Você também deve informar sobre quaisquer medicamentos que você tomou desde o início do estudo ou sobre qualquer mudança no medicamento que você tenha relatado nas visitas anteriores

-Depois que você interromper sua participação no estudo, o seu médico assistente (Dr Roberto Coury Pedrosa) continuará seu acompanhamento clínico.

Se, em qualquer momento, você desenvolver efeitos colaterais (efeitos não desejáveis), você deve deixar que o seu médico do estudo saiba o mais cedo possível para que a assistência médica possa ser fornecida, caso necessária

### **Riscos associados com o estudo**

O principal risco para você nesse estudo é que pode receber um medicamento em que nós não conhecemos todos os efeitos colaterais do mesmo ou todos os efeitos colaterais que poderiam acontecer quando o medicamento do estudo é combinado com outros medicamentos ou com álcool. Reações podem acontecer com este medicamento. Dessa forma você deve discutir sempre a possibilidade de uso de álcool ou de quaisquer outros medicamentos (que não necessitam de prescrição, que necessitam de prescrição) ou uso de drogas ilícitas com o seu médico enquanto você estiver participando deste estudo. Você também deve notificar qualquer outro profissional da área de saúde que o examine, que você está participando deste estudo, especialmente caso você esteja a ponto de realizar um procedimento cirúrgico, um procedimento dental ou qualquer outro tratamento medicamentoso.

### **O risco do Carvedilol**

Alguns efeitos colaterais podem ser preditos, mas nem todos os efeitos colaterais que você poderia ter podem ser preditos. Em estudos prévios realizados em voluntários saudáveis que receberam o carvedilol, a maioria dos efeitos colaterais foi leve e com pouca inconveniência. Alguns dos efeitos colaterais observados foram: vertigem, sonolência, alteração da visão, cefaléia, distúrbios gastrintestinais (flatulência, inchaço, náuseas, vômitos, diarreia, constipação, indigestão), erupção cutânea, cansaço, perda de apetite, Artralgia,

### **O risco da vitamina C**

Alguns efeitos colaterais podem ser preditos, mas nem todos os efeitos colaterais que você poderia ter podem ser preditos. Em estudos prévios realizados em voluntários saudáveis que receberam a vitamina C, a maioria dos efeitos colaterais foi leve e com pouca inconveniência. Alguns dos efeitos colaterais observados foram: dor de cabeça, sintomas gastrointestinais (flatulência, inchaço, náuseas, vômitos, diarreia, constipação, indigestão), erupção cutânea, cansaço, perda de apetite, sintomas de gripe, insônia, vermelhidão na face, aftas orais, gosto metálico e aumento nos testes que medem as funções normais do fígado

### **O risco da vitamina E**

Os efeitos colaterais relacionados a vitamina E podem também ser leves e com pouca inconveniência. Em estudos prévios realizados em voluntários saudáveis que receberam a vitamina E foram observados alguns efeitos colaterais tais como: cansaço, perda de apetite, sintomas de gripe, insônia e as vezes flatulência

Tendo em vista que a vitamina E teve sua dose aumentada, isto é, 800mg/dia e não sendo a dose usualmente usada, podem ser observados outros efeitos colaterais dos quais ainda não se tem conhecimento até esse momento. Você será acompanhado de perto em relação a qualquer efeito colateral e o medicamento será interrompido caso ocorram efeitos colaterais graves.

### **Riscos associados com procedimentos**

Alguns dos testes que serão realizados em você (radiografias) irão lhe expor a quantidades controladas de radiação. A coleta de sangue pode causar dor, edema, trauma local, irritação ou vermelhidão local; você pode se sentir mal ou desenvolver infecção no local da punção da agulha. É importante que você informe qualquer efeito colateral o mais cedo possível ao seu médico do estudo. Você não deve esperar até a sua próxima visita agendada

Enquanto participar neste estudo, você não deve doar sangue. O seu médico do estudo revisará a lista de medicamentos que você está tomando atualmente para determinar se algum destes medicamentos não pode ser tomado em combinação com o medicamento do estudo. Caso você queira quaisquer destes medicamentos e um substituto satisfatório não seja identificado, você não será elegível para participar neste estudo. Não será solicitado que você deixe de tomar qualquer medicamento de que você necessite. Você deve relatar qualquer uso de medicamentos

(que não necessite de prescrição, que necessite de prescrição) ou uso de drogas ilícitas, que você esteja tomando em qualquer momento durante este estudo.

### **Gravidez/controlado da natalidade**

Por não se ter muitas informações sobre os efeitos do carvedilol, da vitamina C e E em crianças ainda por nascer ou crianças em amamentação, você não será incluída no estudo se estiver grávida ou amamentando ou planejando ficar grávida durante o estudo. Se você tiver potencial de engravidar e decidir participar neste estudo, você deve aderir a métodos aceitáveis de controle de natalidade enquanto estiver participando do estudo.

Se a qualquer momento durante o estudo, você engravidar ou achar que está grávida, ou descobrir mais tarde que engravidou durante o estudo, você deve contactar seu médico do estudo imediatamente para receber instruções de como proceder.

### **Possíveis benefícios associados com o estudo**

Não há nenhuma garantia de que você se beneficiará ao fazer parte neste estudo. Um possível benefício para você em participar neste estudo pode incluir a melhoria dos seus sintomas e/ou de sua doença. Nenhum benefício adicional será fornecido a você como resultado dos testes de pesquisa realizados em suas amostras de sangue. Entretanto, caso você não seja beneficiado pessoalmente, o conhecimento acumulado com a sua participação neste estudo pode beneficiar outros pacientes no futuro

### **Confiabilidade**

As informações de seu histórico médico são confidenciais e serão tomadas todas as precauções para preservá-las. A menos que requerido judicialmente, apenas o investigador, e auditores terão acesso a dados confidenciais de seu prontuário médico e dados que o identifiquem pelo nome.

Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

Assinando este consentimento você estará autorizando para estas pessoas o acesso ao seu prontuário médico e aos seus dados

Todo o material biológico coletado será utilizado apenas neste estudo para realização dos exames laboratoriais específicos no próprio

protocolo. Este material não será utilizado em outros estudos ou para outros fins.

### **Novos achados**

Durante o estudo você será informado de qualquer nova descoberta significativa sobre os resultados de exames, que possa alterar sua vontade de continuar participante deste estudo.

Respostas às perguntas sobre este estudo

Se durante o estudo clínico você tiver problemas ou queira esclarecer alguma dúvida sobre a conduta deste estudo, entre em contato com o: Dr.Roberto Coury Pedrosa - pelo telefone: \_2562-2618 ou 2562-2434

### **Participação voluntária**

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar bem como desistir do mesmo a qualquer momento, antes ou durante o período do estudo sem qualquer prejuízo ao seu tratamento. Caso você decida descontinuar do estudo após seu início, para sua própria segurança você deverá retornar ao hospital para conversar com o médico do estudo para que ele possa orientá-lo sobre as possíveis opções.

### *Consentimento para participar deste estudo*

Li, ou alguém leu para mim, as informações contidas neste documento antes de eu assinar este termo de consentimento. Minha participação neste estudo é voluntária. Poderei retirar-me deste estudo a qualquer momento sem causar mal-estar ou comprometer meu atendimento médico neste hospital, e nem violar meus direitos. Minha participação neste estudo pode também ser encerrada pelos médicos envolvidos, por razões que serão explicadas. Tive chance de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram plenamente. Entendo também que posso contatar os indivíduos abaixo mencionados no caso de qualquer preocupação relativa a este estudo.

Por meio deste, decido voluntariamente participar deste estudo. Afirmo que recebi uma cópia assinada deste acordo de consentimento livre e esclarecido e que a minha assinatura neste consentimento, como participante, não significa que estou renunciando aos meus direitos legais, de acordo com as leis vigentes no Brasil.

Nome do participante (letra de forma):

---

Assinatura

data

Atestado da pessoa que obteve o consentimento

Uma das pessoas listadas abaixo, ou ambos, explicou cuidadosamente ao participante a natureza do estudo de pesquisa acima. Atesto por meio deste que, segundo meu melhor entendimento, a pessoa que assinou este termo de consentimento entende a natureza, os requisitos, os benefícios e os riscos de participar e que sua assinatura é válida. Nenhum problema médico ou de linguagem prejudicou seu entendimento.

---

Nome do investigador (letra de forma) Assinatura  
data

Informação para contato com os membros da equipe da pesquisa

Título: \_\_\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

---

Assinatura do coordenador da pesquisa-Médico investigador  
data



## APÊNDICE 5

Tabela 4: Comparação dentro do mesmo grupo dos níveis de GSH, TBARS, PC, Vitamina E e \*NO e atividades da MPO e ADA, no sangue de pacientes chagásicos em três tempos diferentes de tratamento

	Grupo IA (n=10)			Grupo IB (n=20)			Grupo II (n=8)			Grupo III (n=4)		
	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)
TBARS	13,11±9,98	9,5±4,28	6,10±3,02β*	10,02±6,18	7,71±1,17	6,52±2,92β*	11,34±4,60	8,33±1,55	7,13±3,40	15,19±5,04	9,50±2,22	7,25±4,06
PC	0,15±0,07	0,04±0,01α**	0,09±0,03β**γ**	0,16±0,19	0,05±0,02α*	0,09±0,1β**γ***	0,17±0,07	0,05±0,01α***	0,10±0,03β**γ***	0,15±0,10	0,05±0,01α*	0,09±0,12β**γ*
GSH	0,31±0,17	0,18±0,12α*	0,14±0,10β**	0,22±0,17	0,16±0,13α**	0,11±0,09β**	0,29±0,10	0,18±0,11α*	0,16±0,06β*	0,38±0,15	0,16±0,09*α	0,18±0,10β*
Vit. E	17,36±8,11	12,44±2,85	16,18±3,45γ*	17,12±8,93	15,70±4,68	22,02±11,0γ*	19,64±9,25	12,24±2,18	29,40±15,08γ*	11,72±3,40	11,18±3,83	20,76±3,38β**γ*
ADA	10,03±1,28	17,17±2,5α*	17,58±2,21β*	10,67±1,08	15,36±2,29	16,01±0,92	14,02±2,27	12,90±2,14	14,94±1,41	10,63±3,52	9,05±4,06	16,01±0,59
*NO	10,93±3,19	17,96±3,2 α*	9,09±1,00γ*	11,18±1,38	16,07±1,50	13,70±1,53	15,49±3,42	18,86±2,60	17,17±1,89	13,17±4,62	12,10±1,00	10,92±1,98
MPO	417,3±40,1	544,18±70,05	553,96±39,21	430,97±31,53	420,70±27,9	531,54±25,84γ*	409,54±80,95	352,13±50,36	707,42±104,83β**γ***	440,92±68,15	395,08±60,10	559,04±66,62

TBARS - espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (nmol ml<sup>-1</sup>); PC - proteína carbonil (nmol mg<sup>-1</sup>); GSH - glutatona reduzida (μmol ml<sup>-1</sup>); Vitamina E (μmol ml<sup>-1</sup>); ADA - adenosina deaminase (U l<sup>-1</sup>); \*NO - óxido nítrico (μM); MPO - mieloperoxidase (mU ml<sup>-1</sup>); Valores representam média±desvio- padrão \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 representam diferenças significativas dentro do mesmo grupo chagásico.

## APÊNDICE 6

Tabela 5: Comparação dentro do mesmo grupo das enzimas antioxidantes no sangue de pacientes chagásicos em três tempos diferentes de tratamento

	Grupo IA (n=10)			Grupo IB (n=20)			Grupo II (n=8)			Grupo III (n=4)		
	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)	Sem tratamento	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol	Após 6 meses de tratamento com Carvedilol/ Vitaminas (E, C)
SOD	144,99±29,0	64,04±6,05 $\alpha^{***\gamma}$ *	59,44±3,76 $\beta^{***}$	171,52±41,16	66,37±8,56 $\alpha^{**}$ *	59,89±4,36 $\beta^{***}$ $\gamma^{**}$	141,26±46,6	70,9±11,2 $\alpha^{**}$	68,05±4,75 $\beta^{**}$	145,4±44,1	69,20±6,54 $\alpha^*$	68,91±5,01 $\beta^{**}$
GPx	2,35±0,22	1,48±0,54 $\alpha^{***}$	1,19±0,60 $\beta^{***}$	2,32±0,35	1,49±0,39 $\alpha^{***}$	1,05±0,47 $\beta^{***\gamma^{***}}$	2,75±0,73	2,36±0,35	2,27±0,41	2,48±0,17	2,14±0,40	2,13±0,33
CAT	8,87±2,55	13,27±3,88 $\alpha^*$	10,25±5,06	9,21±2,01	11,62±4,10 $\alpha^*$	10,67±2,07	8,43±3,14	9,50±4,06	9,46±3,65	7,54±3,93	12,51±6,43	12,56±3,89
GST	30,61±2,58	24,0717±3,68*	17,68±3,52 $\beta^{**\gamma^*}$ *	35,41±9,42	24,58±9,64 $\alpha^{**}$ *	17,63±4,70 $\beta^{***\gamma^{**}}$ *	34,10±5,64	20,81±2,9 $\alpha^{**}$ *	19,08±1,52 $\beta^{***}$	26,66±7,51	23,28±5,33	21,93±2,58
GR	5,02±0,71	4,78±1,26	3,89±,71 $\beta^*$	4,94±1,43	4,86±1,70	4,11±0,79 $\beta^*$	4,76±1,16	4,00±1,09	4,20±0,65	4,69±0,81	4,73±1,52	4,67±0,27

SOD - superóxido dismutase (U SOD ml<sup>-1</sup>); GPx - glutathiona peroxidase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ); CAT - catalase ( $\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ); GST - glutathiona S-transferase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ); GR - glutathiona redutase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ); Valores representam média±desvio-padrão \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 representam diferenças significativas dentro do mesmo grupo chagásico.