



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA - PGFAR
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS

LEONILDA BANKI MAÇÃO

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CARDIOPATIA
CHAGÁSICA CRÔNICA APÓS TERAPÊUTICA ANTIOXIDANTE

Florianópolis - Santa Catarina – Brasil

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA - PGFAR
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS

Leonilda Banki Maçao

**Avaliação do estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica
após terapêutica antioxidante**

Dissertação apresentada como requisito
Parcial à Obtenção do Título de Mestre
em Farmácia – Fármaco Medicamento e
Análises Clínicas na Universidade Federal
de Santa Catarina – UFSC

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Coury Pedrosa

Florianópolis, SC, Brasil

Junho, 2006

Aos meus pais, Francisco (*in memoriam*) e Dorotéia, pelo exemplo de vida e apoio, fundamentais para a realização dos meus objetivos. Ao meu marido Wladimir, pelo apoio incondicional, carinho e paciência demonstrados ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Danilo Wilhelm Filho, pela competência, compreensão e paciência com que orientou o meu trabalho e, principalmente, por ter aceitado me orientar mesmo com as minhas limitações de tempo e distância. Agradeço ainda pela amizade e apoio nos momentos difíceis, sem os quais não teria conseguido completar este trabalho.

Ao Dr. Roberto Coury Pedrosa, cuja participação foi fundamental neste trabalho, coordenando com dedicação e competência a parte clínica. Destaco sua valiosa ajuda para que eu pudesse entender os mecanismos da cardiopatia chagásica.

Ao Laboratório Sigma Pharma, pela doação da vitamina E, e ao Laboratório Neo Química pela doação da vitamina C, viabilizando assim, a realização dessa pesquisa.

Ao Dr. Pio Colepicollo, e ao doutorando Moacir A. Torres, que nos proporcionaram analisar as vitaminas no Laboratório de Bioquímica da USP.

À Prof^a Tânia Silva Fröde, pelas análises da mieloperoxidase e do óxido nítrico, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, e à mestrandia Stella, pelo desenvolvimento da parte analítica.

À Prof^a Rozangela C. Pedrosa, cujo laboratório esteve sempre de portas abertas, para nos auxiliar sempre que necessário.

À Prof^a Tânia C. Pasa, que me abriu as portas do seu laboratório quando cheguei à UFSC, a acabou despertando o meu interesse para esta área tão fascinante da pesquisa.

A Minancora & Cia Ltda, cujo apoio foi determinante para que eu pudesse realizar este trabalho. Agradeço, em especial, a Mauren A. Trizotto, pela compreensão e amizade, principalmente nas horas de maior correria.

Às colegas Aline e Patrícia, pela grande ajuda no desenvolvimento da parte prática.

Ao colega Tiago, pelos conhecimentos técnicos que me proporcionou ao longo deste trabalho.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A cardiopatia chagásica é uma doença com patogenia ainda não elucidada. Há evidências recentes que sugerem que danos produzidos pelo estresse oxidativo podem contribuir para a evolução da doença de Chagas. Trabalho concluído pelo nosso grupo (Oliveira, 2004) mostrou a existência de um quadro de estresse oxidativo, com perda parcial das defesas antioxidantes paralelamente à evolução da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o *status* antioxidante no sangue de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos classificados em 4 grupos, nomeados de I a IV (cada grupo com n=10), de acordo com o grau de comprometimento cardíaco, segundo classificação de Los Andes modificada (os pacientes do grupo I apresentavam função cardíaca normal ou disfunção leve, o grupo II apresentava disfunção moderada, o grupo III apresentava disfunção grave e os pacientes do grupo IV apresentavam insuficiência cardíaca), 1 ano após ao primeiro estudo (Oliveira, 2004) e após suplementação antioxidante durante 6 meses (vitaminas E 800 UI/dia e C 500 mg/dia). Foram examinadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona S-transferase (GST), e as defesas antioxidantes não-enzimáticas, como os conteúdos de glutaciona reduzida (GSH) e vitamina E. Foram dosados também os marcadores de dano, como a lipoperoxidação (níveis de TBARS), proteína carbonilada (PC) e atividade da gama-glutamyltransferase (GGT). Foram avaliados ainda os níveis de óxido nítrico (NO) e a atividade da mieloperoxidase (MPO). Após 1 ano do estudo inicial, foi observada uma diminuição na atividade da CAT no grupo I, aumento na atividade da SOD no grupo I, aumento da atividade da GPx no grupo II e diminuição no grupo III, aumento na atividade da GR nos grupos I e II e diminuição da GSH no grupo I. Após a suplementação antioxidante, a atividade da CAT aumentou no grupo II, a atividade da GPx aumentou no grupo I, a atividade da GR aumentou nos grupos I e II, enquanto a atividade da GST diminuiu nos grupos II, III e IV. A concentração de GSH foi maior nos pacientes do grupo I. Por outro lado, as concentrações de TBARS e proteína carbonilada diminuíram de forma acentuada em todos os grupos, sendo que a GGT não apresentou alteração significativa. Os níveis de NO aumentaram no grupo III, enquanto a MPO diminuiu nos grupos II e III. Os resultados indicam que não houve alterações importantes no *status* antioxidante nos pacientes após o período de 1 ano. Mais importante, a suplementação antioxidante permitiu diminuir o estresse oxidativo, especialmente através da diminuição dos níveis de TBARS e proteína carbonilada, provavelmente em consequência do consumo e proteção antioxidante da vitamina E.

Palavras chaves: Cardiopatia chagásica, estresse oxidativo, defesas antioxidantes, suplementação antioxidante, vitamina E.

ABSTRACT

The chagasic cardiopathy consist of a disease which mechanism of action is still unknown. Recent evidences suggest that oxidative damage are involved in the progression of Chagas' disease. A study carried out by our group (Oliveira, 2004) demonstrated an association with oxidative stress and a partial loss of antioxidant defenses parallel with the progression of the disease. The objective of the present work was the evaluation of the antioxidant *status* in the blood of chronic cardiopathy of chagasic patients which were classified in four groups (I, II, III and IV, n=10 each) according to the Los Andes rank (patients of group I showed no cardiac impairment, group II showed mild cardiac impairment, group III showed moderate cardiac impairment and group IV showed congestive heart failure), taking into consideration the degree of cardiopathy, after one year last from the first study (Oliveira, 2004), and after the antioxidant supplementation of vitamin E (800 UI/day) and vitamin C (500 mg/day). Several biomarkers of oxidative stress were evaluated, such as the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST), as well as non-enzimatic antioxidants, such as the contents of reduced glutathione (GSH) and vitamin E. Biomarkers of tissue damage such as lipoperoxidation (TBARS levels), protein carbonyls (PC) levels and the activity of γ -glutamyltransferase (GGT) and myeloperoxidase (MPO), as well as nitric oxide (\bullet NO) levels were also measured. After one year from the first study, decreased CAT activity and increased SOD activity in group I, decreased GPX activity in group III and increased in group II, as well as increased GR activity in group I and II were detected. After the antioxidant supplementation, CAT activity was increased in group II, GPx activity was increased in group I, GR activity was increased in groups I and II, whilst GST activity was decreased in groups II, III and IV. The GSH contents were increased in patients of group I. The contents of TBARS and protein carbonyls were decreased after the antioxidant supplementation, whilst GGT activity remained unchanged. \bullet NO contents were increased in groups II and III MPO activity was decreased in groups II and III. The results indicate that there were slight changes in the antioxidant *status* in the patients after one year period. More importantly, the antioxidant supplementation decreased the oxidative stress, especially through the diminished levels of TBARS and protein carbonyls, but also through the elevation of the activities of some antioxidant enzymes, probably as a consequence of vitamin E consumption and antioxidant protection.

Key words: Chagasic cardiopathy, oxidative stress, antioxidant defenses, antioxidant supplementation, vitamin E.

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	1
<i>1.1.1 Importância</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 Gravidade da forma clínica cardíaca na fase crônica</i>	<i>2</i>
<i>1.1.3 Manifestações clínicas da cardiopatia chagásica crônica</i>	<i>4</i>
<i>1.1.4 Patogenia da cardiopatia chagásica crônica</i>	<i>4</i>
1.1.4.1 Mecanismos Inflamatórios Ligados ao Parasita	5
1.1.4.2 Agressão Auto-Imune.....	5
1.1.4.3 Alterações Microvasculares.....	6
1.1.4.4 Mecanismos Neurogênicos (Disautonomia).....	6
<i>1.1.5 Tratamento da cardiopatia chagásica crônica</i>	<i>6</i>
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	7
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERN)	9
1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES	10
1.4.1 <i>Vitamina E</i>	11
1.4.2 <i>Vitamina C</i>	13
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO	14
1.5.1 <i>Dano ao DNA</i>	15
1.5.2 <i>Peroxidação lipídica</i>	15
1.5.3 <i>Dano a proteínas</i>	15
1.5.4 <i>Gama glutamiltransferase (GGT)</i>	16
1.6 O ESTRESSE OXIDATIVO EM PATOLOGIAS HUMANAS	16
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA DE CHAGAS	17
2 OBJETIVO GERAL	19
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS:	19
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES	20
3.1.1 <i>Critérios de inclusão</i>	21
3.1.2 <i>Critérios de exclusão</i>	21
3.1.3 <i>Dados a serem obtidos</i>	22
3.1.4 <i>Definições</i>	23
3.1.5 <i>Estádios evolutivos na cardiopatia chagásica crônica</i>	24
3.1.6 <i>Diagnóstico de insuficiência cardíaca congestiva</i>	25
3.1.7 <i>Exame clínico</i>	26
3.1.8 <i>Estratégia após a realização dos exames complementares</i>	26
3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
3.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	27
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	28

3.5 EQUIPAMENTOS:	28
3.6 REAGENTES	29
3.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	29
3.7.1 <i>Defesas antioxidantes enzimáticas</i>	29
3.7.1.1 Catalase (CAT)	29
3.7.1.3 Glutaciona peroxidase (GP _x)	30
3.7.1.4 Glutaciona redutase (GR).....	31
3.7.1.5 Glutaciona S-transferase (GST)	31
3.7.2 <i>Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas</i>	32
3.7.2.1 Glutaciona reduzida (GSH).....	32
3.7.2.2 Vitamina E.....	32
3.7.2.3 Vitamina C.....	33
3.7.3 <i>Determinação dos marcadores de dano</i>	33
3.7.3.1 Lipoperoxidação tecidual - TBARS	33
3.7.3.2 Proteína carbonilada	33
3.7.3.3 Gama-glutamiltransferase (GGT).....	34
3.7.4 <i>Análise quantitativa do óxido nítrico (NO) pelo nitrito/nitrato</i>	35
3.7.5 <i>Determinação da Mieloperoxidase</i>	35
4 RESULTADOS	37
4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DA POPULAÇÃO ESTUDADA	37
CARACTERÍSTICA.....	38
4.2 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS	39
4.2.1 <i>Atividade da catalase (CAT)</i>	39
4.2.2 <i>Atividade da superóxido dismutase (SOD)</i>	40
4.2.3 <i>Atividade da glutaciona peroxidase (GP_x)</i>	41
4.2.4 <i>Atividade da glutaciona redutase (GR)</i>	43
4.2.5 <i>Atividade da glutaciona S-transferase (GST)</i>	44
4.3 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS	45
4.3.1 <i>Glutaciona reduzida (GSH)</i>	45
4.3.2 <i>Vitamina E</i>	47
4.3.3 <i>Vitamina C</i>	47
4.4 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO.....	48
4.4.1 <i>Lipoperoxidação tecidual (TBARS)</i>	48
4.4.2 <i>Proteína carbonilada</i>	49
4.4.3 <i>Gama-glutamiltransferase (GGT)</i>	49
4.5 ÓXIDO NÍTRICO (NO)	50
4.6 MIELOPEROXIDASE (MPO).....	51
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES.....	63
7 PERSPECTIVAS.....	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9 ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 – Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas	11
02 - Diagrama da Classificação de Los Andes modificada por Xavier (1999)	25
03 - Atividade da Catalase (CAT) no intervalo de 1 ano	39
04 - Atividade da Catalase (CAT) antes e após a administração de vitamina E e C	40
05 - Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no intervalo de 1 ano	40
06 - Atividade da Superóxido dismutase (SOD) antes e após a administração de vitamina E e C	41
07 - Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) no intervalo de 1 ano	42
08 - Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) antes e após a administração de vitamina E e C	42
09 - Atividade da Glutaciona redutase (GR) no intervalo de 1 ano	43
10 - Atividade da Glutaciona redutase (GR) antes e após a administração de vitamina E e C	44
11 - Atividade da Glutaciona S-transferase (GST) no intervalo de 1 ano	44
12 - Atividade da Glutaciona S-transferase (GST) antes e após a administração de vitamina E e C	45
13 - Concentração da Glutaciona reduzida (GSH) no intervalo de 1 ano	46
14 - Concentração da Glutaciona reduzida (GSH) antes e após a administração de vitamina E e C	46
15 - Concentração de vitamina E antes e após a administração de vitamina E e C	47
16 - Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) antes e após a administração de vitamina E e C	48
17 - Concentração de proteína carbonilada antes e após a administração de vitamina E e C.	49
18 - Concentração da Gama-glutamilttransferase (GGT) antes e após a administração de vitamina E e C	50
19 - Concentração de Óxido nítrico (NO) antes e após a administração de vitamina E e C.	50
20 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO) antes e após a administração de vitamina E e C	51

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 – Características da população estudada	37
02 – Características eletrocardiográficas	38
03 - Características eletrocardiográficas	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Fator transcripcional-1
CAT	Catalase
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
GGT	γ -glutamilttransferase
GR	Glutaciona redutase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
GT	Glutaciona total
HO [•]	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HClO ⁻	Ácido hipocloroso
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
LOOH	Hidroperóxido lipidíco.
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	Fator nuclear kappa-B
[•] NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PC	Proteína carbonilada
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

1.1.1 Importância

A doença de Chagas (tripanossomíase americana) é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Schmuñis, 2000). É transmitida pelo hemíptero hematófago da família Reduviidae, um vetor natural, bem como pela transfusão sanguínea, pela forma congênita, oral e acidentes laboratoriais (Rabinovich *et al.*, 1990). Decorrido quase um século da sua descoberta, em 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, a doença de Chagas ainda constitui um dos maiores problemas de saúde pública da América Latina (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000). Tem uma ampla distribuição na América Central e América do Sul, é endêmica em 21 países, com 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e 100 milhões de pessoas sobre o risco de adquiri-la (WHO, 2004). A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que a doença de Chagas é responsável pela morte de 23000 pessoas todo o ano (WHO, 1991; Prata, 2001).

Chagas, desde o início de suas observações resumiu a história natural da doença em duas fases distintas: a aguda (inicial, de rápida duração, com elevada parasitemia e geralmente autolimitada) e a crônica (tardia, de evolução lenta e com baixa parasitemia), esta compreendendo uma forma indeterminada e as chamadas formas clínicas determinadas (cardíaca, digestiva ou mista). A forma cardíaca, levando-se em conta a gravidade das manifestações que pode acarretar, representa, sem dúvida, a mais importante do ponto de vista médico-social (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000).

Na década passada, os programas de controle da transmissão da doença em diversos países endêmicos foram notavelmente bem sucedidos. A interrupção da transmissão da doença baseada no controle do vetor foi alcançada em alguns países e é eminente em outros, conduzindo à redução substancial na incidência da doença de Chagas na América Latina (WHO, 2006).

Definida como uma doença inflamatória crônica em atividade causada por um protozoário, a cardiopatia chagásica crônica faz parte do grupo das cardiopatias secundárias. Predomina no sexo masculino, é mais freqüente entre a terceira e a sexta décadas de vida e constitui a principal causa de cardiopatia nas áreas em que a doença de Chagas é endêmica. A maioria dos chagásicos desenvolve a cardiopatia partir da forma indeterminada da doença, geralmente 10 a 30 anos após a infecção inicial pelo *T. cruzi* (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000). Em torno de 30% dos indivíduos soropositivos desenvolvem alguma forma de expressão de doença crônica cardíaca; em cerca de 10% desses as manifestações clínicas serão significativas, associando-se a conspícua morbidade e mortalidade (Marin-Neto *et al*, 2000). Se considerarmos que no Brasil há cerca de 5 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, pode-se estimar em um milhão a um milhão e meio o número de chagásicos com comprometimento do coração (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000).

1.1.2 Gravidade da forma clínica cardíaca na fase crônica

A doença de Chagas apresenta um comportamento bastante heterogêneo em sua fase crônica na forma cardíaca, com evolução imprevisível. Desde a sua descrição inicial, diversas propostas de classificação do acometimento cardíaco foram feitas ao longo do tempo, para facilitar o manejo clínico desses pacientes, bem como para avaliação prognóstica e terapêutica.

Mais recentemente, o consenso brasileiro composto por pesquisadores na área de doença de Chagas, procurando uniformizar a avaliação dos pacientes na fase crônica, propôs uma nova classificação baseada na recomendada pelo ACC/AHA (American College Cardiology/American Heart Association) para pacientes em risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca. A validação desta classificação para pacientes na fase crônica da doença de Chagas foi realizada por Xavier e colaboradores (2005), através da análise crítica da curva de sobrevida de uma coorte de 1053 pacientes com doença de Chagas. Foram excluídos da classificação os pacientes com ECG normal devido à ausência de casos de insuficiência cardíaca neste grupo durante o seguimento. Esta classificação permite identificar subgrupos distintos do ponto de vista prognóstico e terapêutico, e baseia-

se em dados clínicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos, com interesse particular voltado à função sistólica.

Comparada à classificação de Los Andes modificada por Xavier (1999), ambas possibilitam uma melhor discriminação entre 4 grupos de prognósticos distintos. As diferenças entre os 4 grupos são bem demarcadas e com uma progressão mais gradativa de um grupo para outro. A única diferença entre ambas é que a classificação recomendada pelo consenso brasileiro exclui pacientes com eletrocardiograma normal.

No presente trabalho utilizou-se a classificação de Los Andes modificada por Xavier (1999), uma vez que a mesma inclui pacientes com eletrocardiograma normal, sendo a mesma classificação usada anteriormente nos mesmos pacientes, quando o objetivo foi avaliar o estresse oxidativo nos vários graus de comprometimento cardíaco (Oliveira, 2004).

A classificação de Los Andes modificada por Xavier define os vários estádios evolutivos de acometimento cardíaco na doença de Chagas baseado na análise clínica, eletrocardiográfica e ecocardiográfica, conforme segue:

Grau I: infecção com ECG normal ou boderline, função ventricular normal ou apenas discretamente deprimida;

Grau II: infecção com ECG anormal e disfunção sistólica ventricular esquerda moderada;

Grau III: infecção com ECG anormal e disfunção sistólica ventricular esquerda grave;

Grau IV: infecção com insuficiência cardíaca.

Nesta classificação, os pacientes com eletrocardiograma normal e os com evidências clínicas de insuficiência cardíaca (IC) são classificados nos grupos I e IV, respectivamente, sem necessidade de realização de estudo ecocardiográfico. Os pacientes restantes (com eletrocardiograma alterado e sem IC) são classificados de acordo com a sua função ventricular, avaliada pela ecocardiografia. Os pacientes com função normal ou apenas levemente deprimida também são classificados no grupo I, em função de suas curvas de sobrevida semelhantes. Os pacientes com disfunção moderada constituem o grupo II, e aqueles com disfunção grave o grupo III (Xavier, 1999).

1.1.3 Manifestações clínicas da cardiopatia chagásica crônica

As manifestações cardíacas resultam das alterações fundamentais (inflamação, lesões celulares e fibrose) que o *T. cruzi* provoca, direta ou indiretamente, no tecido especializado de condução, no miocárdio contrátil e no sistema nervoso autônomo intracardíaco (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000). Dentre as características mais peculiares da cardiopatia chagásica crônica, destacam-se, de maneira especial, seu caráter fibrosante, considerado o mais expressivo dentre as miocardites, a frequência e complexidade das arritmias cardíacas e sua combinação com distúrbios da condução do estímulo atrioventricular e intraventricular, a grande incidência de morte súbita e fenômenos tromboembólicos, assim como de aneurismas ventriculares (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

Entre as taquiarritmias sobressaem-se extra-sístoles ventriculares, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular e fibrilação atrial. A taquicardia ventricular constitui uma das manifestações mais expressivas da cardiopatia chagásica crônica, pela possibilidade de degenerar-se para fibrilação ventricular, principal causa de morte súbita na cardiopatia chagásica crônica. A morte súbita é responsável por 35 a 55% dos óbitos, contra 25 a 30% pela insuficiência cardíaca e 10 a 15% por tromboembolismo (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000).

A diminuição progressiva da massa muscular miocárdica, em consequência da inflamação das fibras cardíacas e formação de extensas áreas de fibrose, contribui para o aparecimento da insuficiência cardíaca, que manifesta-se habitualmente a partir da quarta década de vida, e pode ser considerada como o evento terminal da infecção chagásica quando o quadro não é interrompido por morte súbita (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000). Fenômenos tromboembólicos, dependentes da trombose intracardíaca, estão presentes geralmente nos estádios mais avançados de falência cardíaca, predominando os que atingem o cérebro, os membros inferiores e os pulmões (Oliveira *et al.*, 1983).

1.1.4 Patogenia da cardiopatia chagásica crônica

A cardiopatia chagásica crônica tem como substrato morfológico fundamental uma inflamação progressiva e fibrosante do miocárdio (Rassi Junior & Marin Neto,

2000). Basicamente, quatro mecanismos têm sido propostos para explicar a gênese das lesões que compõem a miocardite chagásica crônica:

1.1.4.1 Mecanismos Inflamatórios Ligados ao Parasita

Investigações empregando técnicas imuno-histoquímicas com anticorpos monoclonais anti *T. cruzi* têm revelado antígenos parasitários relacionados com os focos inflamatórios (Higuchi *et al.*, 1993; Bellotti *et al.*, 1996). Jones e colaboradores (1992), através do método da reação em cadeia da polimerase, detectaram fragmentos genômicos de *T. cruzi*, assim como Ávila (1991), usando técnicas de biologia molecular, detectou antígenos plasmáticos de *T. cruzi*. Assim, torna-se plausível especular que, mesmo sendo de baixa intensidade, o parasitismo pode implicar em continuada invasão das fibras miocárdicas e consequente ruptura dos pseudocistos, causando destruição das células miocárdicas e/ou lesões tóxicas das células circunvizinhas, inflamação e fibrose focal (Marin-Neto *et al.*, 2000). Estudos preliminares mostraram menor incidência de aparecimento e/ou agravamento de lesões cardíacas com o tratamento etiológico de pacientes na fase crônica da doença na forma indeterminada (Viotti *et al.*, 1994; Rassi Junior & Marin-Neto, 2000).

1.1.4.2 Agressão Auto-Imune

O conceito de que o infiltrado inflamatório mononuclear visto na miocardite chagásica crônica seja o efector final de auto-agressão mediada pela imunidade celular encontra-se sedimentado em vários níveis de evidência. Recentemente demonstrou-se, com estudos de microscopia ultra-estrutural em modelos animais, que células efectoras do sistema imune causam lise de células miocárdicas não parasitadas. Por outro lado, a miocardite pode ser induzida em animais não-chagásicos pela transferência passiva de linfócitos TDC4+ obtidos de camundongos infectados (Marin-Neto *et al.*, 2000). Evidência suplementar para a teoria auto-imune é a identificação de epítomos antigênicos relacionados com a reatividade cruzada entre proteínas do *T. cruzi* e proteínas miocárdicas (Pedrosa, 1996; Marin-Neto *et al.*, 2000; Rassi Junior & Marin-Neto, 2000). Segundo Tarleton (2001), o principal suporte para a hipótese auto-imune é a conclusão de que sinais de doença são evidentes em tecidos na aparente ausência de parasitas, além de que a resposta imune aumentada poderia exacerbar a doença.

1.1.4.3 Alterações Microvasculares

Ampla série de evidências subsidia a idéia de que fenômenos isquêmicos transitórios e dependentes de distúrbios microcirculatórios estejam envolvidos na patogênese da cardiopatia chagásica crônica. A miocardite chagásica crônica é essencialmente focal, consistindo basicamente de necrose miocitolítica associada a infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose intersticial reparativa (Marin-Neto *et al.*, 1998). Como a necrose miocitolítica representa lesão celular aparentemente associada a fenômenos hipóxicos e isquêmicos iterativos e de baixa intensidade, postula-se sua atuação patogênica na cardiopatia chagásica crônica (Rossi, 1990).

1.1.4.4 Mecanismos Neurogênicos (Disautonomia)

A teoria neurogênica, fundamentada basicamente em observações anatomopatológicas, postula, como mecanismo patogênico essencial da doença de chagas, um hipotético desequilíbrio autonômico cardíaco criado pela desnervação parassimpática, e conseqüente estímulo crônico do componente simpático (Marin-Neto *et al.*, 2000). Vários aspectos contrapõem-se a esta teoria, sendo que o mecanismo pelo qual o teórico predomínio de estimulação simpática causaria lesão miocárdica permanece especulativo (Marin-Neto *et al.*, 1998).

De qualquer modo, é consenso entre vários autores que mais de um mecanismo deve estar envolvido na patogênese da miocardite chagásica crônica. A visão moderna confere a mecanismos ligados à presença do agente etiológico e a respostas auto-imunes um papel preponderante. Disautonomia e isquemia microvascular são, possivelmente, apenas fatores ancilares, atuando para intensificar e ampliar o alcance deletério daqueles mecanismos sobre o miocárdio (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000; Tarleton, 2001).

1.1.5 Tratamento da cardiopatia chagásica crônica

A fase aguda é a ocasião em que o tratamento é realmente efetivo, uma vez que cerca de 50% a 70% dos pacientes podem ser efetivamente curados. O único parasiticida atualmente existente no mercado é o benzonidazol (BNZ) (Malta, 1996; Dias, 1999; Brener, 2000). O Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005)

preconiza o uso do BZN na forma crônica recente, embora ainda faltem evidências que garantam o sucesso dessa terapia nas diferentes circunstâncias.

Os princípios que norteiam o tratamento da cardiopatia chagásica crônica são os mesmos estabelecidos para outras cardiomiopatias (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000). A insuficiência cardíaca chagásica é tratada de acordo com os princípios terapêuticos da insuficiência cardíaca de outras etiologias, ou seja, repouso, restrição de sódio, diuréticos, digitálicos e vasodilatadores, como hidralazina e nitratos (Marin-Neto *et al.*, 2000). O transplante de coração tem sido utilizado em pacientes chagásicos com insuficiência cardíaca refratária (Marin-Neto *et al.*, 1998), embora possa ocorrer reativação, possibilidade de neoplasia (Bocchi *et al.*, 2001) e rejeição (Sousa *et al.*, 2001).

Embora haja comprovação da importância do parasita (ou seus antígenos) na patogênese da miocardite chagásica crônica (Higuchi, 1997), e observação experimental da regressão total ou parcial das lesões miocárdicas e de músculos esqueléticos em animais tratados com drogas antiparasitárias (Rassi Junior & Marin-Neto, 2000), o conceito de que o tratamento parasiticida possa influenciar o curso da cardiopatia chagásica crônica e a instalação e progressão da insuficiência cardíaca, ultimamente, vem ganhando maior subsídio, porém, carece de comprovação mais robusta (Marin-Neto *et al.*, 2000; Canesin & Barreto, 1997; Viotti, 2006).

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O metabolismo do oxigênio, embora essencial para a vida aeróbica, impõe uma ameaça potencial para as células devido à formação de espécies parcialmente reduzidas de oxigênio (Fridovich, 1986). Em torno de 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbios é reduzido de forma tetravalente até H₂O (Chance *et al.*, 1979) através de reações enzimáticas na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. No entanto, cerca de 2% escapa desta redução bivalente e liga-se de forma monovalente, levando à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Radicais livres são espécies químicas capazes de existência independente e que contém um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital mais externo (Halliwell & Gutteridge, 1999). EROs é o termo coletivo usado para incluir alguns compostos

derivados de O_2 , como peróxido de hidrogênio, que não constituem radicais (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A formação das EROs ocorre sequencialmente pela redução de um elétron do oxigênio produzindo $O_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido), enquanto a redução de mais um elétron, ou a ação enzimática da superóxido dismutase (SOD), produz H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Através de adição de um elétron ao H_2O_2 , ou catalizado pelo sistema Fe^{+2}/Fe^{+3} ou Cu^{+2}/Cu^{+3} , caracterizando a Reação de Fenton, forma o HO^{\bullet} (radical hidroxil). Outra ERO importante é o oxigênio singlete (1O_2), uma espécie excitada fototicamente do oxigênio molecular, igualmente importante promotora de danos em sistemas biológicos (Pryor, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1999). Existem outras EROs formadas em reações de propagação, como os radicais peroxil (ROO^{\bullet}) e alcoxil (RO^{\bullet}), além de espécies reativas derivadas do óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), como o peroxinitrito ($ONOO^-$), que serão detalhadas mais adiante.

A geração de HO^{\bullet} em sistemas biologicamente relevantes, a partir da reação do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (reação de Haber-Weiss) ou da mistura de H_2O_2 com metais de transição como ferro e cobre (reação de Fenton), conforme já mencionado, tem grande significado biológico (Pryor, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1999) devido à sua elevada reatividade, apesar de concentrações intracelulares extremamente baixas ($10^{-18}M$) e reduzidíssimo tempo de vida-média ($10^{-9}s$) (Chance *et al.*, 1979). Isto que faz com que ele reaja muito rapidamente com quase todos os tipos de moléculas, como açúcares, aminoácidos, fosfolípidos e bases de DNA (Halliwell & Gutteridge, 1999), proporcionando as principais reações de propagação (peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e dano ao DNA).

Existem várias fontes de EROs. Entre elas, destaca-se a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, sendo a mitocôndria considerada a maior fonte de produção de EROs nos diferentes tecidos, incluindo o coração (Loschen *et al.*, 1971). Existem também numerosas oxidases e oxigenases geradoras de EROs. Entre elas, a mieloperoxidase (Kettle & Winterbourn, 1997) e a NADPH-oxidase (produzida na membrana dos fagócitos) que reduz O_2 a $O_2^{\bullet-}$ (Cross *et al.*, 1994).

A MPO é uma enzima produzida pelos neutrófilos, que apresenta atividade peroxidase não específica. Ela converte H_2O_2 e cloreto em ácido hipocloroso ($HOCl$) o qual elimina bactérias e fungos, além de ser capaz de oxidar um grande número de moléculas biológicas, devido à sua alta reatividade (Kettle & Winterbourn, 1997).

Outro importante substrato da MPO é o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), que é oxidado a nitrito (NO_2^-), e apresenta-se em quantidades elevadas em condições inflamatórias. Na presença da MPO e H_2O_2 , o NO_2^- é oxidado a dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$), promovendo nitração de proteínas e peroxidação lipídica. Uma reação importante mediada pelo $\text{NO}_2\cdot$ é a oxidação da tirosina, formando nitrotirosina, que apresenta propriedades inflamatórias, estando criticamente envolvida em doenças vasculares inflamatórias (Lau & Baldus, 2006).

Além do sistema xantina oxidase-xantina desidrogenase, podemos citar ainda o sistema de β -oxidação peroxissomal e as oxigenases dependentes do citocromo P-450 (CYP 450) como fontes de EROs (Halliwell & Gutteridge, 1999). Outras enzimas que produzem ânion superóxido são lipoxigenases, ciclooxigenases (Boveris & Cadenas, 1982; Finkel & Holbrook, 2000), além da oxidação de diversas moléculas como a adrenalina, vários aminoácidos, heme proteínas e metais de transição (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERN)

Na década passada ficou evidenciada a contribuição deletéria de espécies reativas de nitrogênio (ERN) nos sistemas biológicos pela ação do monóxido de nitrogênio, conhecido como óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), principalmente através de sua combinação com o $\text{O}_2\cdot^-$ formando ONOO^- , que, mesmo não sendo um radical, é uma forma muito difusível e reativa (Halliwell & Gutteridge, 1999). O ONOO^- é um importante mediador da peroxidação lipídica, incluindo a oxidação da LDL, nitração de proteínas, nitração de desaminação das bases de DNA (Romero *et al.*, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999). O radical $\cdot\text{NO}$ pode converter-se em outras ERNs, tais como cátion nitroso (NO^+), ânion nitroxil (NO^-) ou ONOO^- (Gow & Stamler, 1998).

O $\cdot\text{NO}$ está envolvido em múltiplos efeitos fisiológicos importantes no organismo humano, tais como relaxamento da musculatura lisa, regulação da pressão arterial, microbicida junto a macrófagos, fator importante na agregação plaquetária, no balanço entre crescimento e diferenciação das células vasculares da musculatura lisa, e outras funções GMPc-dependentes (Palmer *et al.*, 1987; Griendling & FitzGerald, 2003). Um dos papéis importantes do $\cdot\text{NO}$ junto com outras

espécies reativas ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $HClO^-$), é a destruição de patógenos por ativação das células fagocíticas, conhecida como “respiratory burst” (Keher, 1993; Dröge, 2002).

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As células empregam várias linhas de defesa contra os produtos tóxicos da redução do oxigênio (Chance *et al.*, 1979). Como antioxidante entende-se qualquer substância capaz de, mesmo em concentrações relativamente baixas, retardar ou prevenir a oxidação de substratos oxidáveis (Halliwell & Gutteridge, 1999).

As enzimas específicas que tratam dos produtos liberados pela redução do oxigênio são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Chance *et al.*, 1979) (Figura 01). Elas constituem a primeira defesa endógena enzimática de neutralização das EROs, sendo que, através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxil, que é extremamente reativo e deletério às células (Boveris & Cadenas, 1997). A SOD converte o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Fridovich, 1974). A catalase converte o H_2O_2 a H_2O e O_2 , enquanto a GPx converte o H_2O_2 , ou outros hidroperóxidos, até H_2O , com oxidação da glutathione reduzida (GSH) formando a glutathione oxidada (GSSG) (Chance *et al.*, 1979).

As células apresentam ainda outras enzimas importantes para a ação antioxidante, como a glutathione redutase (GR), que reduz a glutathione oxidada (GSSG) a GSH, mantendo elevada a razão GSH/GSSG nas células, e a família das glutathione S-transferases (GSTs). As GSTs demonstram uma capacidade peroxidase contra os hidroperóxidos orgânicos e também estão associadas à biotransformação de herbicidas, inseticidas e xenobióticos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação da glutathione em sua forma reduzida (GSH) a estes compostos, aumentando a sua solubilidade e, assim, facilitando a sua excreção (Josephy, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Além dos antioxidantes enzimáticos, várias proteínas e compostos de baixo peso molecular são considerados importantes antioxidantes. Eles podem ser divididos em compostos endógenos, como a própria GSH, bilirrubina, coenzima Q, ácido úrico, alguns hormônios sexuais, melanina, entre outros, e compostos de baixo

peso molecular obtidos da dieta, como as vitaminas E e C, carotenóides (como β -caroteno e licopeno) e uma multiplicidade de compostos fenólicos, destacando-se os flavonóides (Halliwell & Gutteridge, 1999), e outras pequenas moléculas derivadas de fontes vegetais (Scandalios, 1997).

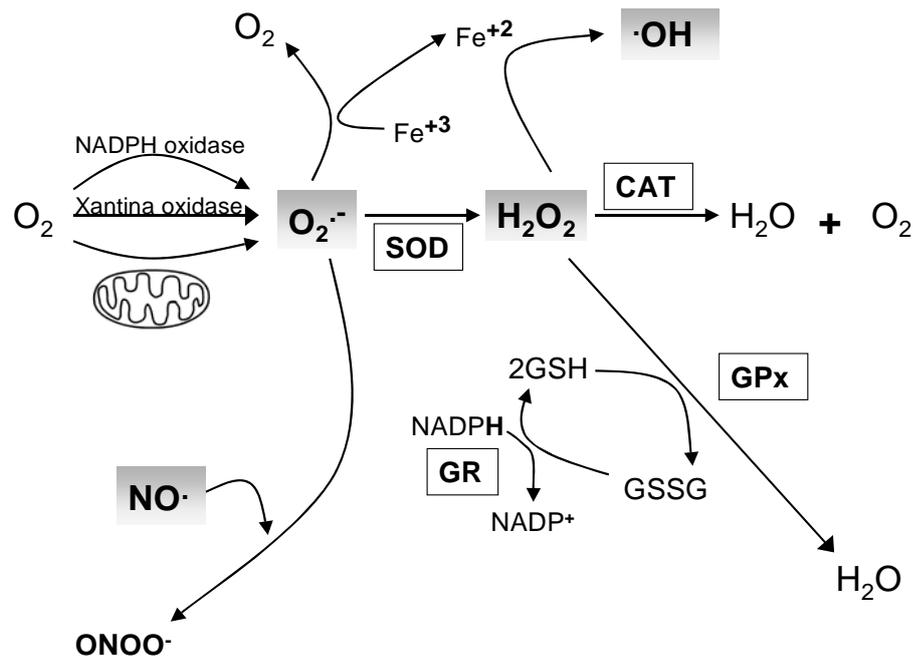


Figura 01. Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas (em cinza). Mitocôndria, NADPHoxidase ou xantina oxidase e outros sistemas convertem O_2 em $O_2^{\cdot-}$, o qual é dismutado pela superóxido dismutase (SOD). H_2O_2 pode ser convertido em H_2O pela catalase (CAT) e/ou glutatona peroxidase (GPx), ou o H_2O_2 pode formar radical hidroxil ($\cdot OH$) após reação com o Fe^{+2} . A glutatona peroxidase (GPx) reduz todos os hidroperóxidos além do H_2O_2 utilizando glutatona reduzida (GSH), um doador de hidrogênio. Outra enzima, a glutatona redutase (GR), mantêm o equilíbrio entre glutatona reduzida ($GSH \approx 99\%$) e glutatona oxidada ($GSSG \approx 1\%$). O $O_2^{\cdot-}$, se não retirado do meio, pode reagir rapidamente com o óxido nítrico ($NO\cdot$) para formar peroxinitrito ($ONOO\cdot$). Adaptado de Griendling & FitzGerald, 2003.

1.4.1 Vitamina E

A vitamina E, como um sequestrante de radicais peroxil, é provavelmente o mais importante inibidor da cadeia de reação de EROs da peroxidação lipídica em animais (Sies, 1985). Os tocoferóis inibem a peroxidação lipídica porque seqüestram radicais peroxil ($LO_2\cdot$) mais rapidamente do que esses radicais podem reagir com ácidos graxos adjacentes ou com membranas protéicas. Em adição, tocoferóis

reagem e eliminam o oxigênio singlete e protegem a membrana contra essas espécies (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O principal papel da vitamina E é proteger os tecidos contra a ação destrutiva da oxidação, sendo o mais efetivo antioxidante lipossolúvel presente nas células (Pryor, 2000). É amplamente divulgada a sua utilidade em prevenir ou modular doenças que são supostamente associadas com estresse oxidativo. Efeitos benéficos de dosagens supranutricionais de vitamina E têm sido reportados para doenças cardiovasculares, câncer, inflamação crônica, Doença de Alzheimer e Mal de Parkinson (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002). Vários testes clínicos têm demonstrado que suplementos de vitamina E podem prevenir e reduzir o risco de doença arterial coronariana e ataques do coração em populações que não apresentam elevado comprometimento na doença cardiovascular. Pelo fato das doenças do coração levarem anos para se desenvolver, a ingestão de vitamina E a longo prazo pode ter um papel importante na sua prevenção (Iannuzzi *et al.*, 2002).

Segundo Pryor (2000), através de diferentes estudos clínicos, foram estabelecidas diferentes indicações de doses diárias adequadas de vitamina E. Jialal *et al.* (1995), após 8 (oito) semanas de suplementação em humanos, demonstrou que concentrações acima de 400 UI/dia diminuíram significativamente a suscetibilidade do LDL em sofrer oxidação, sendo que 800 ou 1200 UI/dia foram ligeiramente mais efetivas. Segundo Kappus & Diplock (1992), em numerosas publicações sobre os usos profiláticos e terapêuticos da vitamina E, pode-se concluir que sua toxicidade é muito baixa, demonstrando que altas doses orais, até 3200 UI/dia, não causam efeitos adversos consistentes. Bendich (1988) também relata que suplementação oral de vitamina E resultou em poucos efeitos, mesmo em doses até 3200 UI/dia. Segundo Meydani *et al.* (1998), 4 (quatro) meses de suplementação com 60-800 UI de vitamina E/dia não apresentou efeitos adversos, considerando estes resultados relevantes para a determinação do risco-benefício da suplementação com vitamina E.

Entretanto, estudos de meta-análise mais recentes e com maior número de participantes (135967 participantes em 19 estudos clínicos), consideraram a relação dose-dependente entre suplementação com vitamina E e a mortalidade total, concluindo que suplementação com altas doses (400 UI/dia ou mais), por pelo menos 1 ano, aumentou todas as causas de mortalidade (Miller, 2005). Por outro lado, em um dos maiores estudos controlados relacionando vitamina E e doença

cardiovascular (Cambridge Heart Antioxidant Study, CHAOS), foi observada uma redução em alguns aspectos do risco cardiovascular, sendo que a vitamina E reduziu o risco de infarto do miocárdio não fatal, mas não alterou o fatal (Staner, 2003; Vogel, 2005). A limitação desta meta-análise é que envolveu pacientes com doença crônica e as conclusões não podem ser generalizadas para adultos saudáveis, além do número amostral ser geralmente pequeno (Miller, 2005). Também não está claro se os investigadores isolaram os efeitos da vitamina E dos outros suplementos (Vogel, 2005). De qualquer forma, o autor desencoraja o uso de suplementação com altas doses de vitamina E até que sua eficácia seja adequadamente comprovada (Miller, 2005).

1.4.2 Vitamina C

O ácido ascórbico (vitamina C) é essencial na dieta e sua deficiência causa uma doença (escorbuto), enquanto seu papel como cofator para várias enzimas está bem estabelecido. *In vitro*, o ascorbato tem demonstrado uma multiplicidade de propriedades antioxidantes, protegendo várias biomoléculas contra lesão por ambos, EROs e ERNs. *In vivo*, a vitamina C pode ser oxidada por numerosas espécies potencialmente envolvidas em doenças humanas (Halliwell & Gutteridge, 1999). Numerosos estudos em humanos citam os efeitos antioxidantes da vitamina C em doença vascular, hipertensão, absorção de ferro e prevenção de câncer gástrico (Padayatty *et al.*, 2003).

A vitamina C pode ter efeitos favoráveis na dilatação vascular, possivelmente através de seu efeito sobre o $\cdot\text{NO}$ (Jackson *et al.*, 1998), aumentando a sua concentração endotelial, por protegê-lo da oxidação, e aumentando a sua síntese (Huang *et al.*, 2000). Vitaminas C e E parecem ter efeito benéfico na função vascular endotelial, no entanto estes efeitos são observados apenas em concentrações plasmáticas supra fisiológicas (Padayatty *et al.*, 2003). Muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo estão associadas com baixos níveis plasmáticos e teciduais de vitamina C, como diabetes melitus (Sinclair *et al.*, 1994), infarto do miocárdio (Riemersma *et al.*, 2000), em algumas infecções e em fumantes (Ayaori *et al.*, 2000). No entanto, ainda não está provado os benefícios clínicos da vitamina C nestas doenças (Padayatty *et al.*, 2003).

As vitaminas C e E trabalham sinergicamente para proteger contra a peroxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999). A atividade antioxidante da vitamina E é aumentada, ou mesmo dependente, de espécies redutoras apropriadas referidas como co-antioxidantes, como a vitamina C. Trabalhos *in vitro* têm demonstrado que o radical α -tocoferoxil, gerado quando oxidantes exógenos interagem com o α -tocoferol, pode ser reduzido pelo ascorbato, evitando a ação tóxica deste radical (Padayatty, 2003) e prevenindo, desta forma, a peroxidação lipídica (Naidoo & Lux, 1998). Em dieta com restrição de vitamina C tem sido reportada diminuição do conteúdo de vitamina E nos tecidos, o que reforça a hipótese de interação entre essas duas vitaminas (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (Sies, 1985; Croft, 1998). O estresse oxidativo pode ocorrer tanto pelo aumento dos pró-oxidantes (EROs), sem o concomitante aumento das defesas antioxidantes, como pela redução das defesas sem o aumento das EROs, ou, ainda, pelo aumento da concentração de EROs paralelamente a uma redução das defesas antioxidantes (Sies, 1985).

Em quantidades relativamente pequenas, as EROs são produtos biológicos do metabolismo celular. Em baixas concentrações, elas podem atuar como segundos mensageiros, reguladores de genes e mediadores da ativação celular (Dröge, 2002; Griendling & FitzGerald, 2003; Polla *et al.*, 2003). Entretanto, em estado de estresse oxidativo ou em altas concentrações, as EROs podem causar danos irreparáveis, mutagênese e carcinogênese, e têm envolvimento em, pelo menos, mais de duas centenas de processos patológicos (Halliwell & Gutteridge, 1999; Nordberger & Arnèr, 2001; Griendling & FitzGerald, 2003). EROS podem rapidamente oxidar proteínas, lipídios e DNA, causando dano celular e levando a célula ou o tecido à morte (Marnett, 2000).

1.5.1 Dano ao DNA

O DNA pode ser oxidado por uma variedade de mecanismos, resultando em dano aos nucleotídeos, por exemplo, formação de 8-oxoguanina (Halliwell & Gutteridge, 1999). Como resultado, a replicação pode ser imprecisa, levando a mutações e erros de transcrição (Evans & Cooke, 2004). As alterações são inúmeras (quebra do DNA, oxidação de purinas, uniões DNA-proteínas indesejáveis, entre outras), especialmente devido ao radical hidroxil. Embora exista o sistema de reparo que rapidamente regenera o DNA (Nordberger & Arnèr, 2001), o nível de dano pode exceder a capacidade de reparo celular (Gaté *et al.*, 1999).

1.5.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é provavelmente a maior conseqüência da ação deletéria das EROs (Halliwell & Gutteridge, 1999). Os ácidos graxos poliinsaturados são, por causa de suas múltiplas duplas ligações, excelente alvos para o ataque das EROs (Sies, 1985; Nordberger & Arnèr, 2001). O processo é iniciado quando o HO[•] captura um átomo de hidrogênio do carbono metileno na cadeia do ácido graxo, que se torna radical alquil (L[•]), e este, na presença de O₂, gera radical peroxil (LOO[•]), que é muito instável e captura um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo adjacente (reação de propagação da peroxidação lipídica) (Pryor, 1986; Gaté *et al.*, 1999). Durante este processo, estas moléculas são decompostas em aldeídos, e o principal deles é o malondialdeído (MDA), altamente tóxico (Dotan *et al.*, 2004). As oxidações aos lipídios pelas EROs constituem a base da formação da placa de aterosclerose (Nordberger & Arnèr, 2001). Inúmeras patologias como diabetes, hiperlipidemia, apoplexia, doenças hepáticas, cardiovasculares, neurodegenerativas, entre outras, mostram níveis aumentados de lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999; Polla *et al.*, 2003).

1.5.3 Dano a proteínas

As EROs podem reagir *in vitro* e *in vivo* com muitos resíduos de aminoácidos, processo conhecido como carbonilação de proteínas, gerando modificações na atividade enzimática, desnaturação, ou destruição da função das proteínas. Este

dano oxidativo às proteínas tem grande importância *in vivo*, já que pode causar dano a receptores, enzimas, interferência na via de transdução de sinal, alteração no transporte de proteínas e enzimas que mantêm os níveis baixos de Ca^{+2} intracelular (Halliwell & Gutteridge, 1999; Gaté et al., 1999; Nordberger & Arnèr, 2001). Modificações de enzimas e proteínas podem ter papel importante na etiologia de doenças, como na artrite reumatóide e escleroderma (Peng, 1997) e ainda aterosclerose, isquemia-reperfusão e aquelas associadas com o envelhecimento (Gaté et al., 1999).

1.5.4 Gama glutamiltransferase (GGT)

A função primária da GGT celular é metabolizar GSH extracelular, permitindo que precursores aminoácidos sejam assimilados e reutilizados para a síntese de GSH intracelular (Forman, 1997). Paradoxalmente, há evidências indicando que a GGT pode estar envolvida na geração de EROs na presença de ferro ou outros metais de transição (Stark et al., 1994). Vários estudos epidemiológicos sugerem que a GGT sérica, em suas condições normais, pode ser uma enzima precocemente relacionada ao estresse oxidativo. Lim e colaboradores (2004) observaram uma relação inversa, dose-dependente, entre as vitaminas antioxidantes nutricionais e os níveis da GGT sérica em condições normais, enquanto o ferro da dieta foi positivamente relacionado aos níveis de GGT sérica. A Determinação da GGT sérica é confiável, simples e econômica (Rhone e White, 1976). Dessa forma, ela poderia ter importantes implicações clínicas e epidemiológicas em estudos relacionados ao estresse oxidativo (Lim et al., 2004; Lee et al., 2004).

1.6 O ESTRESSE OXIDATIVO EM PATOLOGIAS HUMANAS

Na maioria das patologias humanas o estresse oxidativo é consequência e não uma causa do processo (Halliwell & Gutteridge, 1999). Embora o estresse oxidativo tenha um papel secundário, a importância das EROs, e das ERNs, é de suma relevância em muitos casos, como na resposta inflamatória por infecção e outros que, geralmente, liberam “mediadores” como prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas e citocinas. Como exemplo, o TNF (fator de necrose tumoral) pode

ativar reações que liberam EROs, ou o aposto, as EROs podem estimular a produção de mediadores inflamatórios (Halliwell & Gutteridge, 1999; Dröge, 2002).

O estresse oxidativo pode resultar, resumidamente, em três processos: adaptação (aumento das defesas antioxidantes), lesão tecidual (dano ao DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas) e morte celular (necrose ou apoptose). No caso da adaptação do sistema de defesa, diferentes respostas são geradas como proteção completa contra o dano, ou proteção incompleta contra a lesão ou “sub-proteção”, isto é, as células são resistentes ao alto nível de oxidantes (Halliwell & Gutteridge, 1999). A morte celular pode ocorrer através de dois mecanismos, necrose ou apoptose, ambos envolvidos com o estresse oxidativo. Na necrose a célula incha e rompe, liberando seus conteúdos, o que afeta as células adjacentes, já que estes conteúdos podem conter oxidantes (cobre ou ferro livre, por exemplo), podendo impor agressão às células vizinhas e amplificar a lesão tecidual. Já na apoptose ou “suicídio celular”, a própria célula ativa-se para morte sem liberar seus conteúdos para as células vizinhas, o que diminui o dano adjacente. Em várias doenças degenerativas o processo de apoptose está acelerado (Halliwell & Gutteridge, 1999; Halliwell, 2000).

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA DE CHAGAS

Os artigos científicos que relacionam a formação de EROs à doença de Chagas, de uma maneira geral, envolvem o processo no qual o hospedeiro gera EROs ou ERNs, principalmente $\bullet\text{NO}$, como agente microbicida que mata o parasita (Vepa *et al.*, 1994; Saefel *et al.*, 2001), ou estudam as diferenças entre as defesas antioxidantes dos mamíferos e do *Trypanosoma*. O possível mecanismo de ação dos fármacos antichagásicos Nifurtimox e Benzonidazol é via geração de EROs, capaz de matar o tripanosoma (Moncada *et al.*, 1989; Pedrosa *et al.*, 2001). Também foram desenvolvidos trabalhos relacionando os efeitos tóxicos de EROs gerados pelo benzonidazol, que induz o sistema CYP4501A1 e leva o hospedeiro (modelo animal, ratos) a um estado de estresse oxidativo (De Bem, 2001; Pedrosa *et al.*, 2001).

Na doença de Chagas, os artigos referentes ao estresse oxidativo no hospedeiro, fonte de um processo inflamatório, são escassos e inconclusivos. Cardoni *et al.* (1990) encontraram um estado de estresse oxidativo em ratos

infectados com *T. cruzi*, porém apenas tratou a infecção na fase aguda. Em um dos raros trabalhos disponíveis na literatura que relaciona a fase crônica à dosagem das defesas antioxidantes em humanos, Péres-Fuentes *et al.* (2003) relatam uma associação entre o aumento de $\cdot\text{NO}$ e $\text{TNF-}\alpha$ em relação à diminuição das atividades de GPx e SOD plasmáticas com o avanço da patologia, sugerindo que esses fatores podem ser responsáveis pela severidade da doença de Chagas. Por outro lado, Rivera *et al.* (2002) não evidenciaram queda nos níveis de GPx quando tentaram associar, em pacientes chagásicos cardiopatas, a deficiência de selênio à diminuição da atividade da GPx. Souza (2004) também não detectou diferenças significativas na atividade da CAT e da GR em chagásicos crônicos comparados a um controle. Wen e colaboradores (2004) encontraram um consistente declínio na atividade da MnSOD durante a progressão da infecção no miocárdio chagásico, sugerindo que a diminuição da função mitocondrial e geração de EROs predispõe o coração chagásico a um quadro de estresse oxidativo durante a infecção e desenvolvimento da doença (Zacks *et al.*, 2005).

Em recente dissertação de mestrado produzida em nosso laboratório (Oliveira, 2004), ora em fase de publicação (Oliveira *et al.*, 2006), cujo objetivo foi avaliar a associação da evolução da cardiopatia chagásica com as defesas antioxidantes existentes no sangue dos pacientes, foi demonstrada uma depleção nos níveis eritrocitários das enzimas GPx e GST, e também dos conteúdos da GSH, à medida que o remodelamento ventricular avançava (estádio IV), o que pressupõe um estado de estresse oxidativo vinculado à diminuição das defesas antioxidantes. Em outras palavras, os dados sugeriram que o *status* antioxidante destes pacientes torna-se bastante ameaçado com a extensão da doença, ficando expostos a progressivas condições de estresse oxidativo, tanto ao nível sistêmico-sanguíneo como, provavelmente, nos órgãos mais afetados pela doença, como o miocárdio.

Com base no trabalho citado acima, o objetivo do presente projeto foi avaliar o *status* antioxidante no sangue dos mesmos pacientes chagásicos crônicos acompanhados clinicamente no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, após suplementação antioxidante diária de vitamina E e C durante 6 meses, no sentido de verificar sua eficácia em termos de atenuar ou retardar o quadro de estresse oxidativo associado aos diferentes estádios evolutivos da cardiopatia chagásica crônica, como continuidade e seqüência do projeto original.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da terapia antioxidante (suplementação de vitaminas E e C) nas defesas antioxidantes e nos marcadores de dano oxidativo associados aos diferentes estádios evolutivos da cardiopatia chagásica crônica.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS:

1. Avaliar o perfil do *status* antioxidante nos pacientes com cardiopatia chagásica crônica em diferentes estádios evolutivos, através da classificação de Los Andes modificada, 1 ano após a primeira avaliação destas defesas nos mesmos pacientes.
2. Verificar as diferenças nos níveis intraeritrocitários das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GR e GST) presentes no sangue de pacientes com cardiopatia chagásica crônica em diferentes estádios evolutivos, através da classificação de Los Andes modificada, antes e depois da administração diária de vitamina E (800 UI) e C (500 mg) durante 6 meses.
3. Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (conteúdos sanguíneos de GSH e plasmáticos de vitamina E e vitamina C) presentes no sangue destes pacientes, antes e depois da administração de vitamina E e C.
4. Verificar o comportamento dos indicadores de estresse oxidativo (níveis plasmáticos de TBARS e Proteína Carbonilada e níveis séricos de GGT) nestes pacientes, antes e depois da administração de vitamina E e C.
5. Avaliar os níveis de \bullet NO e MPO no sangue destes pacientes, antes e depois da administração de vitamina E e C.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Os pacientes mencionados neste trabalho são oriundos do Ambulatório de Cardiopatia Chagásica do Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ), existente desde 1990, sob responsabilidade do Dr. Roberto Coury Pedrosa.

Os dados clínicos/epidemiológicos são obtidos de modo consecutivo, à medida do arrolamento do paciente no ambulatório. Como norma, a avaliação inicial do paciente após confirmação sorológica, consiste na avaliação clínica e na realização do eletrocardiograma convencional de repouso e radiografia do tórax, na própria semana de admissão. O ecocardiograma e o teste ergométrico são realizados com intervalos não mais do que 30 dias, conforme metodologia descrita a seguir. Como norma de acompanhamento, nos pacientes com cardiopatia evidente, o ECG e o ecocardiograma são realizados na dependência de mudança clínica do paciente. Caso não ocorra alteração no quadro clínico do mesmo, o ECG é realizado anualmente e, se alterado, é acompanhado da realização do ecocardiograma. Nos pacientes assintomáticos e apenas com sorologia positiva, o acompanhamento consiste na avaliação clínica periódica. Os dados obtidos na avaliação inicial e no acompanhamento ambulatorial são armazenados em banco de dados e no prontuário do paciente.

Os pacientes considerados no presente estudo são os mesmos avaliados anteriormente (Oliveira, 2004) e mantiveram-se estáveis clinicamente durante 15 a 21 dias anteriores à sua inclusão. Durante este período, exames laboratoriais foram realizados para satisfazer os critérios biológicos de exclusão e confirmar os critérios de inclusão (biológicos e clínicos). Hemogramas completos foram também realizados para excluir doenças sistêmicas significativas. Os critérios de inclusão foram os mesmos considerados no estudo anterior (Oliveira, 2004).

3.1.1 Critérios de inclusão

- A- Homens ou mulheres com idade entre 21 a 75 anos, afastados da zona endêmica há mais de 20 anos.
- B- Em acompanhamento ativo e regular em serviço de cardiologia com diagnóstico etiológico de doença de Chagas.
- C- Sorologia positiva para doença de Chagas, conforme descrito no item a seguir, sob a denominação avaliação sorológica.
- D- Pacientes na fase crônica da doença de Chagas (forma indeterminada, forma cardíaca com anormalidade contrátil segmentar sem forma clínica aparente, forma cardíaca aparente), de acordo com os critérios da UDNP/WORLD BANK/WHO-TRD (ver definições abaixo), que não se utilizaram de tratamento específico para doença de Chagas.
- E- Potencial de engravidar (se sexo feminino):
 - a) O sujeito da pesquisa não pode ter potencial de engravidar, definido como: pós menopausa por pelo menos 1 ano ou cirurgicamente estéril (ligadura tubária bilateral, ooforectomia bilateral ou histerectomia).
 - b) Se com potencial de engravidar, deve ter teste de gravidez negativo realizado na fase de seleção.

A inclusão ou não do paciente 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).

3.1.2 Critérios de exclusão

- A- Estados fisiológicos, condições médicas prévias e/ou concomitantes
 - presença de outras afecções patológicas sistêmicas associadas, tais como infecções ou neoplasias, desordens auto-imunes, doença neurodegenerativa;
 - o fato de algum exame da fase de seleção demonstrar qualquer achado não compatível com seu diagnóstico cardiovascular;
 - insuficiência cardíaca aguda ou descompensada agudamente;
 - pacientes agudamente doentes;

- doenças hematológicas prévias;
- dados clínicos ou biológicos sugestivos de doença renal grave ou hepática;
- história prévia de doença pulmonar obstrutiva crônica (todas as formas);
- alcoolismo crônico;
- história de acidente vascular cerebral nos últimos 6 meses;
- pacientes com conhecida ou suspeita de hipersensibilidade a drogas;
- pacientes que estejam participando de outros estudos;
- utilização prévia do tratamento específico para doença de Chagas.

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 podem 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 sanguínea > 2 mg/100mL;
- níveis de potássio sérico > 5,5 mEq/L ou < 3,5 mEq/L;
- anemia (hemoglobina < 9 g%);
- níveis de glicemia > 147 mg/dl em dois exames consecutivos;
- Hiponatremia (Na^+ < 130 mEq/L).

3.1.3 Dados a serem obtidos

A- Anamnese e exame físico completos

- Dados constitucionais: data de nascimento (idade), sexo, altura e peso corporal, pressão arterial, frequência cardíaca;

- Dados sócio-econômicos: local de nascimento e perfil migratório, situação conjugal, escolaridade, renda familiar, profissão e vínculo empregatício e ocupação, uso de fumo e de bebidas alcoólicas, dieta e atividade física. História reprodutiva das mulheres;
- Complicações: megaesôfago e colopatia, arritmias, insuficiência cardíaca, fenômenos tromboembólicos e acidente vascular cerebral;
- História patológica pregressa: outras doenças associadas.

B- Base de dados padronizada de exames complementares:

Hemograma, glicemia, creatinina, ácido úrico sérico, potássio sérico, proteínas totais e fracionadas, exame parasitológico de fezes, urinálise para elementos anormais e sedimento, avaliação radiológica, eletrocardiografia de repouso, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídios (exames realizados no Serviço de Cardiologia do HUCFF-UFRJ). Os dados acima referidos foram registrados em ficha apropriada, contendo instruções detalhadas para seu preenchimento correto, incluindo os critérios diagnósticos a serem utilizados (Anexo I).

3.1.4 Definições

O diagnóstico de cardiopatia chagásica crônica é realizado pela presença de sorologia positiva acompanhada de qualquer das alterações cardiológicas descritas a seguir (Xavier *et al.*, 2006):

A- Avaliação sorológica:

A avaliação sorológica dos pacientes foi realizada no laboratório do HUCFF-UFRJ, setor de imunologia. O sangue de cada paciente foi testado independentemente para anticorpos (IgG) contra o *T. cruzi*, pela imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (Frasch *et al.*, 1991; Moncayo & Luquetti, 1990).

O paciente foi considerado soropositivo quando dois dos testes sorológicos para anticorpos *T. cruzi*, em pelo menos dois exames sorológicos diferentes, foram positivos. Havendo discrepância entre os resultados, as amostras de soro desses casos foram retestadas com o teste de imunofluorescência.

B- Alterações cardiológicas

- Aspectos clínicos: palpitações, pré-síncope, precordialgia, dispnéia; bradiarritmias de origem sinusal e/ou átrio-ventricular; taquiarritmias; insuficiência cardíaca; tromboembolismo (pulmonar ou sistêmico); morte súbita (abortada ou ressuscitada)

- Alterações eletrocardiográficas

As alterações eletrocardiográficas foram classificadas conforme os critérios da New York Heart Association, utilizando o código de Minnesota (Rose *et al.*, 1982), modificado para cardiopatia chagásica (Maguire & Souza, 1982), a fim de padronizar a interpretação do ECG, sendo classificados como normal, anormal ou limítrofe.

- Alterações ecocardiográficas

A avaliação da ecocardiografia consistiu na análise da função cardíaca segmentar dos pacientes, e foi expressa em termos de afilamento ou déficit de espessamento sistólico (Schnittger *et al.*, 1983). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi calculada pelo método de Teicholz & Kreulen (1976). Consideradas como alterações ecocardiográficas: alterações da contratilidade miocárdica com padrão difuso ou segmentar, presença de aneurismas apicais, acometimento fibroso-necrótico da parede ínfero-posterior basal e do segmento basal do septo anterior.

3.1.5 Estádios evolutivos na cardiopatia chagásica crônica

Neste trabalho, utilizou-se a classificação de Los Andes (Carrasco *et al.*, 1982; Carrasco, 1983; Carrasco *et al.*, 1987), modificada por Xavier (1999), definindo o acometimento cardíaco na doença de Chagas como sendo constituído de quatro estádios, de acordo com o organograma abaixo:

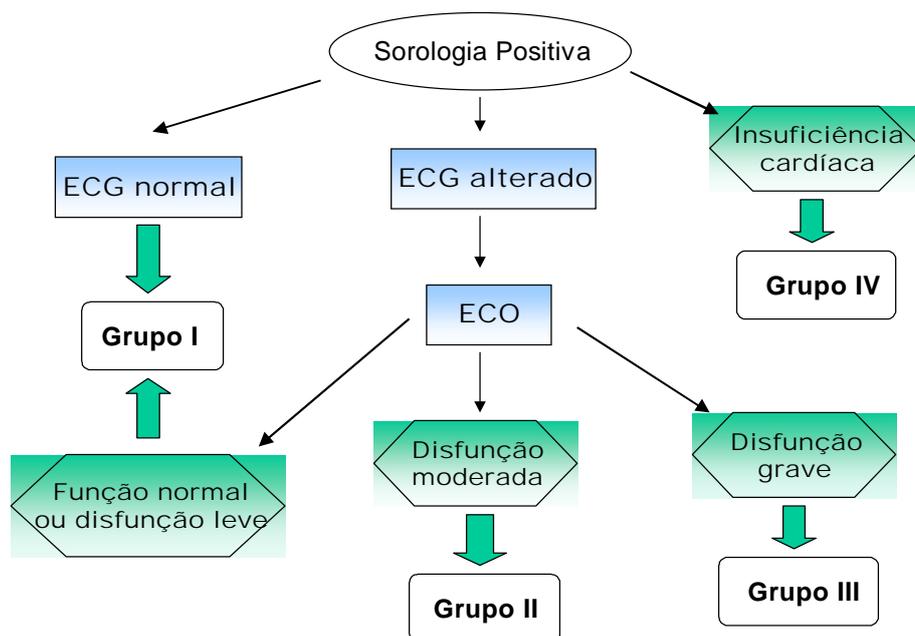


Figura 02 - Diagrama da Classificação de Los Andes modificada por Xavier (1999).

3.1.6 Diagnóstico de insuficiência cardíaca congestiva

O diagnóstico de insuficiência cardíaca congestiva foi o mesmo utilizado por Schoken e colaboradores (1992), adaptado do Primeiro Inquérito de Nutrição e Saúde (First National Health and Nutrition Examination Survey-NHANES-I). Definiu-se insuficiência cardíaca esquerda naqueles pacientes com escore clínico maior ou igual a 3.

Parâmetro utilizado: Dispnéia / dificuldade de respirar

- | | |
|--|----------|
| a) Caminhando depressa no plano ou em acive leve | 1 |
| b) Em passo usual no plano | 1 |
| c) Obrigado a parar por falta de ar, caminhando no plano, passo normal | 2 |
| d) Obrigado a parar por falta de ar, ao caminhar 100m no plano | 2 |
| e) Frequência cardíaca 91 a 110 bpm | 1 |
| mais de 111 bpm | 2 |
| f) Estertores nas bases pulmonares | 1 |
| g) Estertores nas bases e ápices pulmonares | 2 |
| h) Pressão venosa jugular aumentada isolada | 1 |

- i) Pressão venosa jugular aumentada associada a edema 2
- j) Pressão venosa jugular aumentada associada a hepatomegalia 2
- k) Distensão dos vasos dos lobos superiores no Rx de tórax 1
- l) Edema intersticial pulmonar 2
- m) Edema intersticial pulmonar + derrame pleural 2

3.1.7 Exame clínico

A realização do exame clínico permitiu a verificação de sinais e sintomas cardiovasculares e digestivos relacionados à doença de Chagas, assim como a interpretação da história patológica de cada indivíduo para um diagnóstico diferencial com outras doenças cardiovasculares. Os sintomas relacionados ao aparelho cardiovascular, como dispnéia, lipotímia, palpitações, síncope, dor precordial, e aqueles relacionados ao aparelho digestivo referentes à doença de Chagas, como constipação, disfagia e regurgitação, foram registrados em um questionário padrão (ver anexo I). Um histórico alimentar foi obtido do paciente. Foi preenchida uma ficha utilizada para o cadastro de cada paciente no banco de dados.

3.1.8 Estratégia após a realização dos exames complementares

Após a confirmação do diagnóstico de cardiopatia chagásica sem qualquer outra cardiopatia associada (critério sorológico, clínico, epidemiológico, eletrocardiográfico), os pacientes realizaram o ecocardiograma, com finalidade de estabelecer o estágio evolutivo da cardiopatia chagásica crônica, e foram classificados em quatro grupos distintos, cada um composto de 10 pacientes, perfazendo um total de 40 pacientes no presente estudo, conforme o grau de comprometimento cardíaco, através da classificação de Los Andes modificada (Xavier, 1999).

Todos os pacientes em uso de medicamentos tiveram os mesmos suspensos 48 horas precedendo os exames. Aqueles pacientes que não suportaram esta suspensão (maioria do grupo IV), foram mantidos com inibidores da enzima de conversão da angiotensina (captopril) e diurético (furosemida ou espironolactona). O captopril interfere no sistema antioxidante (De Cavanagh *et al.*, 1999, 2000, 2004) e tem uma meia vida de 2 h, enquanto a furosemida tem meia vida de 1 h. Mais de

95% do captopril é excretado no período de 24 h, e a ação diurética da furosemida dura entre 6 à 8 h (Korokolvas, 2000).

As defesas antioxidantes e os biomarcadores de estresse oxidativo no presente trabalho foram determinadas nos 40 pacientes chagásicos em duas oportunidades, ou seja: a primeira determinação precedendo a terapia antioxidante, com um intervalo de 12 meses entre a coleta realizada no estudo de Oliveira (2004) e o presente estudo, e a segunda determinação após 6 meses de terapia antioxidante. A terapia antioxidante consistiu na administração de Vit. E 800UI/dia e Vit. C 500 mg/dia.

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo dentro dos diferentes grupos foram realizadas usando ANOVA (análise de variância), complementada pelo teste de Tukey–Kramer, enquanto o teste *t* de Student foi usado para comparação pareada entre 2 grupos específicos da classificação de Los Andes, admitindo um nível mínimo de significância de $p < 0,05$. A distribuição foi paramétrica.

3.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização deste ensaio clínico, o presente protocolo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em 02 de junho de 2005, protocolo N°. 071/05-CEP (Anexo II). O protocolo experimental atendeu ao que determina a Resolução n° 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas clínicas bem como princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios clínicos (normas de “Good Clinical Practice”). Cada paciente preencheu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III).

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram coletados 10mL de sangue pré e pós-terapia antioxidante. Imediatamente após a coleta de amostra sangüínea de cada indivíduo, via venosa, em tubo contendo EDTA (ou sem EDTA para obtenção do soro), alíquotas de sangue foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:4, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH. A separação dos eritrócitos e plasma, os quais foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo/defesas antioxidantes, foi realizada através de centrifugação rápida (3000 g durante 3 min) do sangue total, para obtenção da fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido até seu envio para o laboratório de Ecofisiologia Respiratória, CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram analisadas e posteriormente desprezadas. Foram observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial final. Esta etapa de preparação das amostras foi realizada no HUCFF-UFRJ, pela equipe do Dr. Roberto Coury Pedrosa (co-orientador do projeto). Os pacientes tiveram seu sangue coletado por uma mesma pessoa, no mesmo dia da semana e no horário entre 9 e 10 h da manhã, com o objetivo de respeitar o ciclo circadiano. Este material foi enviado para a UFSC acondicionado em botijão de transporte contendo nitrogênio líquido, o que confere integridade às amostras, já que os tióis não protéicos e as enzimas antioxidantes permanecem estáveis em nitrogênio líquido por até 6 meses (Palace *et al.*, 1990).

Neste laboratório, após a retirada do material coletado para realização das análises, os eritrócitos foram lavados 2 vezes com solução salina e depois centrifugados (5000 g por 3 min) para posteriormente sofrerem lise por sucessivos congelamentos e descongelamentos. Uma última centrifugação (5000 g, por 5 min) forneceu o sobrenadante (hemolisado) para análise dos diferentes parâmetros.

3.5 EQUIPAMENTOS:

As pesagens foram realizadas em balança analítica marca Ohaus modelo AR2140. Os valores de pH foram medidos com pH-metro marca Digimed, modelo

DM20. A avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas, conteúdos de GSH e outros marcadores de estresse oxidativo foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível duplo feixe marca/modelo GBC 916 acoplado a um software apropriado e a um termostatizador elétrico (sistema Peltier). A avaliação da vitamina E foi realizada em aparelho HPLC SCL 10 AVP Shimadzu, Detector SPD-M10AVP Shimadzu – Diode Array Detector, e a vitamina C foi analisada em aparelho HPLC LC-10AD Shimadzu, Detector ESA Coulochem III (eletroquímico). O $\cdot\text{NO}$ e a MPO foram determinados em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA).

3.6 REAGENTES

A enzima GR, os reagentes ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido ascórbico, albumina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), D- α -tocoferol, epinefrina, nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato na forma reduzida (NADPH), GSH, GSSG, H_2O_2 e tert-butil hidroperóxido foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

3.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.7.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

3.7.1.1 Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi analisada segundo Aebi (1984), que se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio, solução fresca de 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada no dia da análise, em que em 2 mL desta solução em cubeta adicionou-se 20 μL do lisado e procedeu-se a leitura em 240 nm, durante 20 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em $\text{mmol CAT min}^{-1} \text{mL}^{-1}$. Diluições finais mínimas de 500

vezes impediram a ação peroxidativa das hemoglobinas presentes nos lisados (Aebi, 1984).

3.7.1.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida em 480 nm, de acordo com o método de Misra & 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. Quando a amostra era colocada na cubeta a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Numa cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 μ L de adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação). 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 10 a 70 μ L, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 4 ou 5 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, sendo que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo (Misra & Fridovich, 1972). As amostras eram tratadas por uma mistura de clorofórmio:etanol (3:5 v:v), para de retirar a hemoglobina presente nos lisados e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio (Misra & Fridovich, 1972).

3.7.1.3 Glutationa peroxidase (GP_x)

A enzima GP_x catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação, produzindo GSSG (Jones *et al.*, 1981; Epp *et al.*, 1983). Para a determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método de Flohé & Gunzler (1984) usando 10 μ L de amostra e 10 μ L de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 mL de meio de reação, que continha 25 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM pH 7,0, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, colocada momentos antes do

ensaio. O método baseia-se em dismutar o tBuOOH pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx. Mas a medida consiste na oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH medido em 340 nm, já que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH catalisada pela GPx presente na amostra. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores foram expressos em $\mu\text{mol GPx min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$. KCN 50 mM era adicionado ao ensaio para evitar super avaliação da enzima devido à oxidação da hemoglobina presente nos lisados (Flohé & Gunzler, 1984).

3.7.1.4 Glutathione redutase (GR)

O método utilizado para a determinação da atividade desta enzima foi o de Calberg & Mannervick (1985), que verifica, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de glutathione reduzida, a partir da glutathione oxidada, pela ação da GR, enzima presente na amostra, em 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. Assim, o ensaio é uma medida indireta que consiste em registrar a diminuição de NADPH. Foram adicionados na cubeta 0,95 mL de meio de reação e 50 μL de amostra e o tempo de ensaio foi de 30 s. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol GR min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$.

3.7.1.5 Glutathione S-transferase (GST)

A GST constitui um grupo de enzimas que catalisa a formação de tioésteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico (Sagara *et al.*, 1998). A atividade da GST foi medida em 340 nm, de acordo com Habig e colaboradores (1976). A amostra era adicionada a um meio contendo 10 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 μL de GSH 0,1 M e 970 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizou-se 980 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Esta técnica tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato para que a enzima GST, presente na amostra, conjugue a GSH ao CDNB e forme a substância detectável em 340 nm, atividade esta monitorada durante 60 s. As análises foram feitas em

duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol GST min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$. Lisados muito concentrados eram diluídos para evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que interferia na avliação da cinética enzimática.

3.7.2 Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas

3.7.2.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de GSH intraeritrocitária foi determinada através dos tióis não protéicos, já que a GSH representa aproximadamente 95% destes tióis (Beutler *et al.*, 1963). Para avaliar a concentração eritrocitária de pequenos tióis em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v), foi empregado o método de Beutler *et al.* (1963). A adição de 0,2 mL de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão Tris-HCL 0,2M pH 8,0 e 0,1 mL da amostra, permitia, após cerca de 3 min e agitação da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em A_{412} . Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores foram expressos em $\mu\text{mol GSH mL}^{-1}$.

3.7.2.2 Vitamina E

A determinação quantitativa da vitamina E foi realizada através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), através de detecção UV, em 292 nm, segundo o método de Nicoletti *et al.* (2001). Pipetou-se 100 μL de etanol, em um tubo com tampa, adicionou-se 100 μL do plasma, agitou-se em vortex por 10 s e adicionou-se 100 μL de hexano. Agitou-se em vortex por mais 45 s e centrifugou-se a 8000 g por 5 min. Aproximadamente 75 μL do sobrenadante (fase hexano) foi transferida para um tubo e o hexano foi evaporado em nitrogênio. Adicionou-se, então, 125 μL de dietileter e 375 μL de metanol e injetou-se este extrato no sistema cromatográfico. As colunas foram eluidas isocriticamente com metanol e o fluxo foi de 1 mL/min. As amostras foram analisadas em duplicata e a concentração plasmática de α -tocoferol foi determinada através de uma curva-padrão e expressa em $\mu\text{g Vitamina E mL}^{-1}$.

3.7.2.3 Vitamina C

A determinação quantitativa do ácido ascórbico foi igualmente realizada através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção eletroquímica, segundo o método de Lykkesfeldt *et al.* (1995). Como foi medido o 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%. Centrifugou-se a 4000 g por 10 min, em temperatura de 4 °C. Durante o ensaio as amostras foram mantidas em gelo. O ácido ascórbico total foi medido após redução do DHAA, por adição de 100 µL da amostra tratada a 50 µL de tampão Tris 0,5 M, pH 9,0, contendo dithiothreitol (DTT) 10 mM, resultando em um pH de 6,1 a 6,2, a 25 °C por 5 min. Adicionou-se 50 µL de H₂SO₄ 0,2 M à amostra resfriada e 20 µL a mistura foi injetada no HPLC. A fase móvel foi fosfato de hidrogênio dissódico (Na₂HPO₄) 0,1 M, EDTA 2,5 mM e cloreto de dodeciltrimetilamônio 2,0 mM, pH 3,0. O fluxo foi 1,2 mL/min. As amostras foram analisadas em duplicata e a concentração foi expressa em µg Vitamina C mL⁻¹.

3.7.3 Determinação dos marcadores de dano

3.7.3.1 Lipoperoxidação tecidual - TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, através da detecção em A₅₃₅ nm dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (Bird & Draper, 1984). As frações do plasma foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitadas vigorosamente. Em seguida, incubadas em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min a 100 °C. Após, o material foi resfriado durante 30 min a 5 °C e centrifugado (5 min a 10000 g) e a absorbância do cromóforo de cor rósea medida em 535nm, sendo os valores expressos em nmol TBARS mL⁻¹.

3.7.3.2 Proteína carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método proposto por Levine e colaboradores (1990). Foi adicionado 200 µL do plasma em

800 μL de DPNH (2,4-dinitro fenil hidrazina). Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, com agitação a cada 15 min. Adicionou-se 800 μL de TCA 20 %, agitou-se em agitador de tubos, manteve-se em banho de gelo por 10 min e em seguida centrifugou-se por 5 min a 5000 g. Ao pellet foi adicionado 800 μL de TCA 10 %, seguida de agitação e centrifugação por 5 min a 5000 g. Foi adicionado 800 μL de etanol-acetato de etila, com agitação seguinte e centrifugação por 5 min a 14000 g, procedimento que foi repetido por 3 vezes, utilizando o pellet. Ao final, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete, adicionou-se 600 μL de guanidina, manteve-se em banho-maria a 37 °C por 10 min e procedeu-se à leitura a 360 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Lowry e colaboradores (1951), usando como padrão a albumina. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol proteína carbonilada mg^{-1} .

3.7.3.3 Gama-glutamyltransferase (GGT)

As amostras de soro foram coletadas e conservadas em nitrogênio líquido. Durante o experimento as mesmas foram mantidas em temperatura entre 2-8 °C. O reagente utilizado foi o Kit para determinação da gama-glutamyltransferase por método cinético-colorimétrico (GAMA GT PP, da Gold Analisa Diagnóstica Ltda).

A GGT catalisa a transferência do grupamento γ -glutamil da γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina, liberando γ -glutamylglicilglicina e 3-carboxi-4-nitroanilina. A 3-carboxi-4-nitroanilina apresenta elevada absorção em 405 ou 410 nm e a quantidade liberada é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra (IFCC Methods, 2004). Preparou-se o reagente de trabalho misturando 4 volumes de tampão (glicilglicina 206,25 mmol L^{-1} , hidróxido de sódio 130 mmol L^{-1} , pH 7,9) com 1 volume de substrato (γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 32,5 mmol L^{-1}), e manteve-se o reagente de à temperatura de 37°C em banho-maria. Pipetou-se na cubeta 1000 μL do reagente de trabalho e 100 μL da amostra, anotando-se a absorbância inicial e o cronômetro foi acionado simultaneamente. Foram feitas novas leituras a cada minuto, após exatamente 1, 2 e 3 min, sendo que as diferenças entre absorbâncias ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método. O aumento médio de absorbância por minuto ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$) foi medido em 405 nm e a atividade expressa em U GGT L^{-1} .

3.7.4 Análise quantitativa do óxido nítrico (NO) pelo nitrito/nitrato

O óxido nítrico (NO) foi quantificado pela formação de seus metabólitos estáveis nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess (Green *et al.*, 1982; Di Rosa *et al.*, 1996). As amostras de soro foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Nos dias dos experimentos as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e desproteinizadas, adicionando-se hidróxido de sódio (2,5 N) e sulfato de zinco (10%). A seguir, 300 μL da amostra foram diluídos em uma solução contendo formato de amônio (30 μL), fosfato de sódio (30 μL) e suspensão de *Escherichia coli* EC ATCC 25922 (30 μL) diluída (1:10) em tampão PBS. A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à 37°C, e a seguir centrifugada (5000 g, por 5 min). Cerca de 250 μL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, em que o mesmo volume de solução de Griess [sulfanilamida 1% (p/v), ácido fosfórico 5% (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1% (p/v)] foi adicionado e incubado durante 10 min, à temperatura ambiente.

A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das densidades óticas em leitor de Elisa (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_3^- e NO_2^- (0-150 μM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrato/nitrito (NO) em μM , com auxílio da equação da reta (Fröde-Saleh *et al.*, 1999).

3.7.5 Determinação da Mieloperoxidase

As amostras de soro foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Nos dias dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Volumes de 40 μL da amostra ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos 0,7-140 mU mL^{-1}) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360 μL de meio tampão (0,167 mg mL^{-1} de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H_2O_2). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μL de azida sódica 1% (Rao *et al.*, 1993). A seguir, as amostras foram centrifugadas (5000 g, por 5 min), e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas

a 450 nm em leitor de Elisa (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140 mU mL⁻¹) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU mL⁻¹, com o auxílio da equação de reta.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram reunidos 40 pacientes portadores de doença de Chagas na fase crônica e forma cardíaca, com idade média de $55,2 \pm 9,3$ anos (30 a 72 anos). 26 pacientes (65%) eram mulheres. O grupo era composto de indivíduos oriundos de vários estados, sendo 50,8% dos pacientes era natural da Bahia ou de Minas Gerais. A clínica de insuficiência cardíaca estava presente em 15 pacientes (37,5%), sendo que 4 (10%) apresentavam sintomas refratários ao tratamento clínico, mas outros 15 pacientes (37,5%) se encontravam na fase indeterminada da doença de Chagas. A taxa de adesão foi 100% e nenhum paciente mudou de grupo durante o estudo. A tabela 1 mostra as características clínicas da amostra estudada. As variáveis contínuas foram relatadas pela média \pm desvio padrão e as categóricas pelo número absoluto, com o valor percentual entre parênteses.

Tabela 01: Características clínicas da amostra da população estudada

Característica	Número (%)
Número de pacientes	40
Idade Média (anos)	$55,2 \pm 9,3$
Sexo feminino	26 (65%)
Peso (kg)	$66,2 \pm 1,44$
Altura (m)	$1,6 \pm 0,1$
Fase indeterminada da doença de Chagas	15 (37,5%)
IC compensável	11 (27,5%)
IC refratária	4 (10%)

IC: clínica de insuficiência cardíaca

O eletrocardiograma, cujos dados estão relatados na tabela 2, estava alterado em 33 (70,8%) pacientes. As duas alterações mais encontradas foram: bloqueio de ramo direito (BRD) associado ao hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE) em 24 pacientes (60%), seguido de extrassístole ventricular (ESV) em 13 pacientes (32,5%).

O ECO estava alterado em 30 pacientes (75%) e a média da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi de $57,8 \pm 18,3\%$. As alterações mais encontradas

foram: dilatação do VE em 23 (57,5%) pacientes, disfunção segmentar em 22 pacientes (55%) e déficit de relaxamento do VE em 20 (50%) pacientes. A função ventricular esquerda estava normal em 25 (63%) pacientes, levemente deprimida em 3 (10,8%), moderadamente deprimida em 8 (8,3%) e severamente alterada em 9 (8,7%) pacientes. Estes dados estão relatados na tabela 3.

Tabela 02: Características eletrocardiográficas

Característica	Número (%)
Eletrocardiograma alterado	33 (70,8%)
BRD isolado	8 (20%)
HBAE isolado	4 (10%)
BRD + HBAE	24 (60%)
BRE	7 (17,5%)
Área eletronicamente inativa	4 (10%)
ESV	13 (32,5%)
Bigeminismo	6 (15%)
Extrassístole supraventricular	5 (12,5%)
Alterações do segmento ST-T	5 (12,5%)
BAV 1º e 2º	11 (27,5%)
Taquicardia ventricular não sustentada	1 (2,5%)
Fibrilação atrial	2 (5%)

BAV: bloqueio atrioventricular; BAVT: bloqueio atrioventricular total; BRD: bloqueio de ramo direito; BRE: bloqueio de ramo esquerdo; ESV: extrassístole ventricular; HBAE: hemibloqueio anterior esquerdo.

Tabela 03: Características ecocardiográficas

Característica	Número (%)
Ecocardiograma anormal	30 (75%)
Função sistólica global do VE normal	25 (63%)
Disfunção leve do VE	3 (10,8%)
Disfunção moderada do VE	8 (8,3%)
Disfunção grave do VE	9 (8,7%)
Aumento do VE	22 (55%)
Aumento do AE	9 (8,8%)
Hipertofria do VE	4 (10%)
Déficit de relaxamento do VE	20 (50%)
Disfunção segmentar do VE	22 (55%)
Aneurisma do VE	5 (12,5%)
Insuficiência mitral	14 (35%)
Insuficiência tricúspide	5 (12,5%)
Média da FEVE	57,88 ± 18,3%

AE: átrio esquerdo; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VE: ventrículo esquerdo

4.2 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

4.2.1 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT (Figura 03), 1 ano após as determinações iniciais, não apresentou diferença significativa entre os grupos chagásicos, de acordo com o teste de Tukey (embora $p=0,0033$). O grupo I, na determinação inicial, havia mostrado atividade da CAT maior que os demais grupos chagásicos e, à medida que o dano do miocárdio aumenta (grupo I \rightarrow IV), a CAT tendeu a diminuir, o que foi observado pela tendência estatística ($p=0,0660$). O grupo I (função ventricular normal ou apenas discretamente deprimida), após 1 ano, apresentou atividade diminuída em relação à determinação inicial no teste t de Student ($p=0,0250$). Observa-se uma tendência de diminuição nos demais grupos e manutenção do perfil anterior.

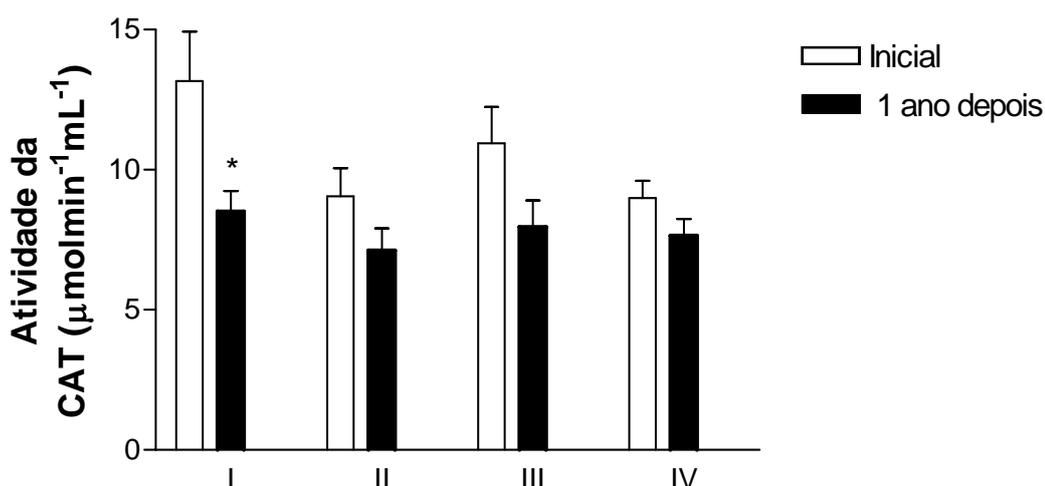


Figura 03 – Atividade da Catalase (CAT) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, através da classificação de Los Andes modificada, no intervalo de 1 ano. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre a determinação inicial e após 1 ano dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

Após a suplementação antioxidante a atividade da CAT não apresentou diferença significativa entre os grupos chagásicos (Figura 04). No entanto, nos pacientes suplementados do grupo II foi observado um aumento significativo da atividade da CAT pelo teste t de Student ($p=0,0306$). Nos outros grupos, à exceção do grupo III houve uma tendência de aumento na atividade da enzima após a

suplementação, recuperando ou superando os valores observados inicialmente (1 ano antes).

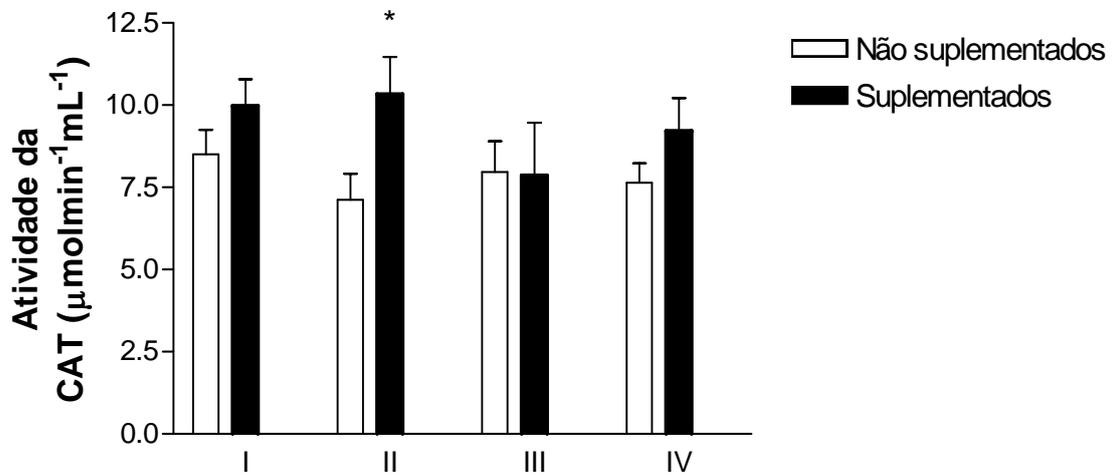


Figura 04 – Atividade da Catalase (CAT) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$.

4.2.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

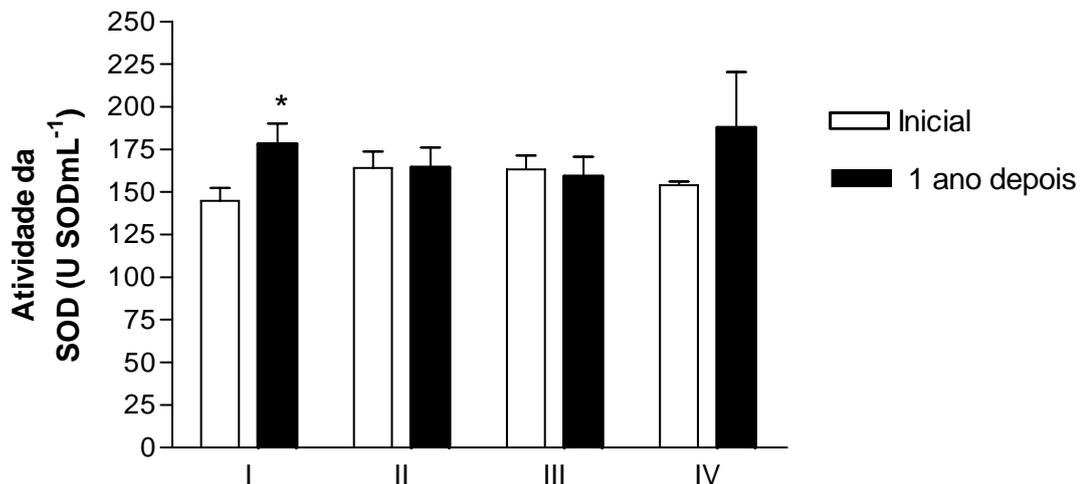


Figura 05 – Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, no intervalo de 1 ano. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre a determinação inicial e após 1 ano dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$.

A atividade da SOD (Figura 05), 1 ano após as determinações iniciais, não apresentou diferença significativa entre os grupos chagásicos. No entanto, de acordo com o teste *t* de Student, houve aumento significativo na atividade desta enzima no grupo I após um ano em relação ao mesmo grupo na determinação inicial, com $p=0,0332$.

Não houve diferença significativa entre os grupos após a suplementação antioxidante, e tampouco comparando os grupos antes e após a suplementação, mas, a exemplo da CAT, houve uma tendência de aumento da atividade em todos os grupos (Figura 06).

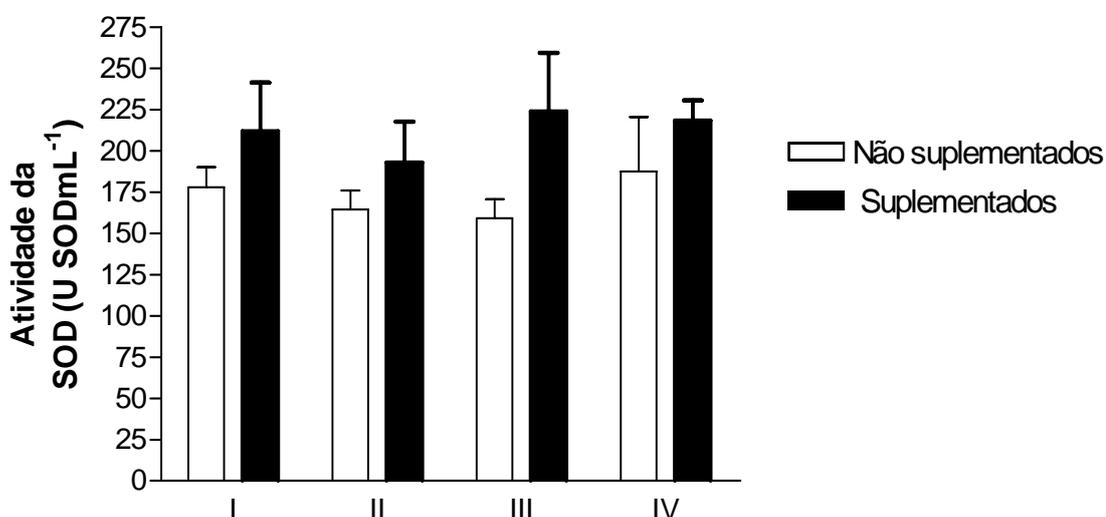


Figura 06 – Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste *t* de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

4.2.3 Atividade da glutatona peroxidase (GPx)

1 ano após as determinações iniciais, a atividade da GPx não apresentou diferença significativa entre os grupos chagásicos (Figura 07). No entanto, de acordo com o teste *t* de Student, houve aumento significativo na atividade desta enzima no grupo II ($p=0,0322$) e diminuição no grupo III ($p=0,005$) após um ano em relação ao mesmo grupo na determinação inicial.

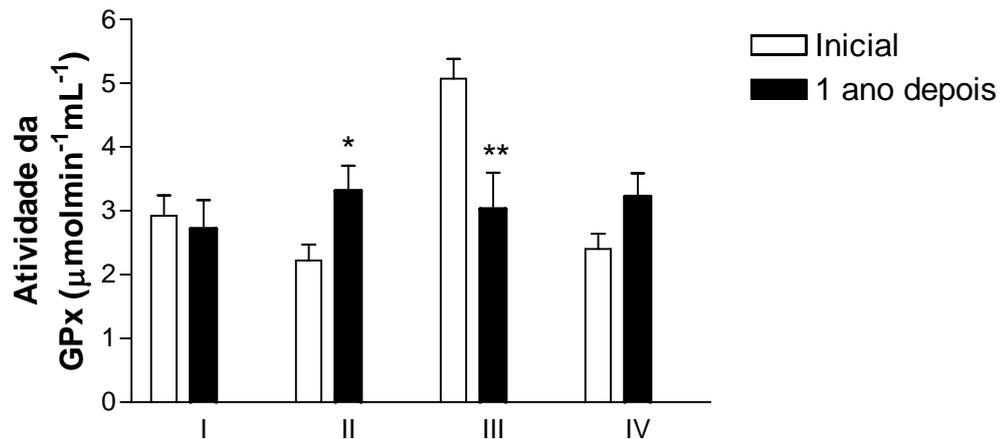


Figura 07 – Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, no intervalo de 1 ano. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste *t* de Student foi realizado entre a determinação inicial e após 1 ano dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando ** $p<0,01$. As letras (a) e (b) representam diferença e semelhança estatística, respectivamente.

Não houve diferença significativa entre os grupos após a suplementação antioxidante, de acordo com o teste de Tukey (embora $p=0,0333$). No entanto, nos pacientes suplementados do grupo I houve aumento significativo da atividade da GPx, verificado pelo pareamento no teste *t* de Student, com $p=0,0097$. Nos grupos II e III ocorreu uma tendência de aumento na atividade desta enzima após a suplementação, com $p=0,0984$ e $p=0,0979$, respectivamente (Figura 08).

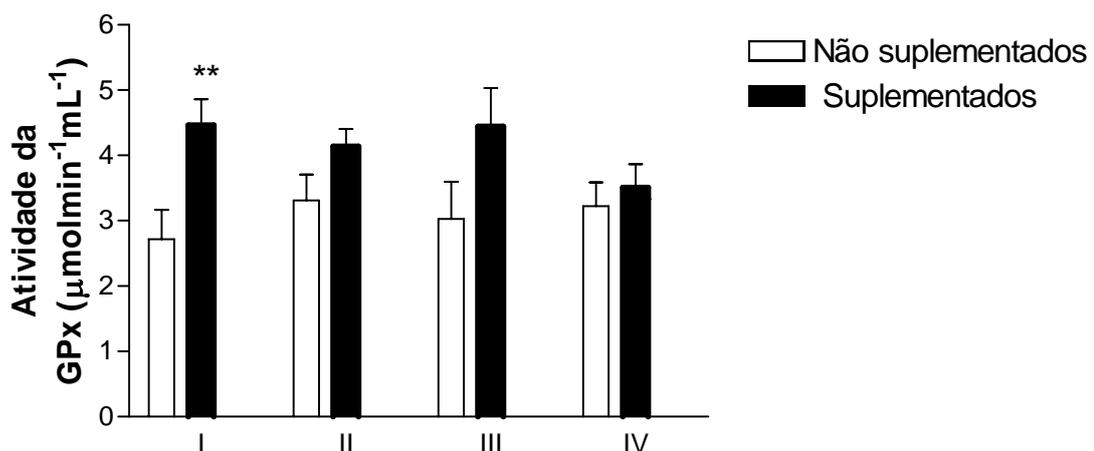


Figura 08 – Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste *t* de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando * $p<0,05$.

4.2.4 Atividade da glutatona redutase (GR)

Na atividade da GR (Figura 09) não ocorreram alterações significativas entre os grupos antes e após um ano de acordo com o teste de Tukey, embora a obtenção de $p=0,0041$. No entanto, de acordo com o teste t de Student, houve aumento significativo na atividade desta enzima nos grupos I e II após um ano em relação aos mesmos grupos na determinação inicial, com $p=0,0087$ e $p=0,0010$, respectivamente. Houve uma tendência de aumento também nos grupos III e IV em relação ao estado inicial.

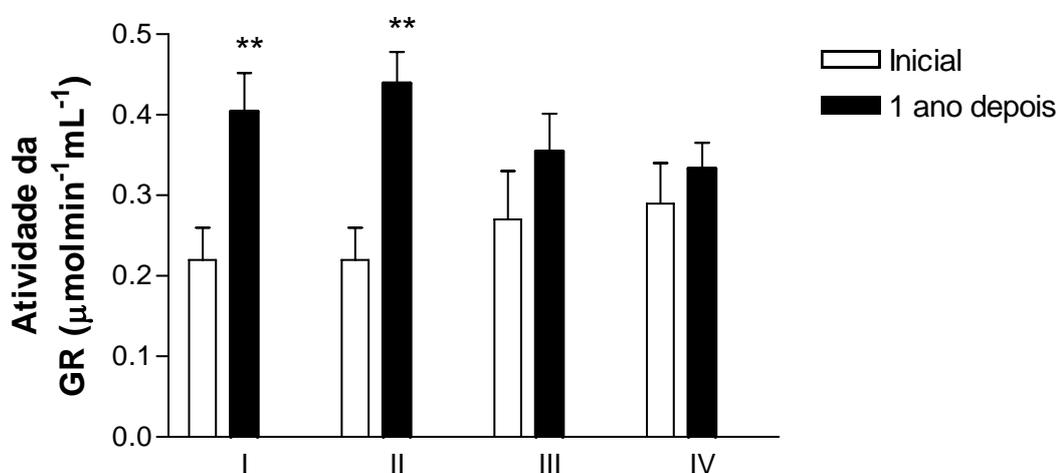


Figura 09 – Atividade da Glutatona redutase (GR) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, no intervalo de 1 ano. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre a determinação inicial e após 1 ano dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando ** $p<0,01$.

A atividade da GR, após a suplementação antioxidante não apresentou diferença significativa entre os grupos (embora $p=0,0005$) (Figura 10). No entanto, nos pacientes suplementados dos grupos I e III houve aumento significativo da atividade da GR, verificado pelo pareamento no teste t de Student, com $p<0,0001$ e $p=0,0324$, respectivamente. Nos outros grupos ocorreu uma tendência, embora não significativa estatisticamente, de aumento na atividade após a suplementação, seguindo o perfil de atividade da CAT, da SOD e da GPx.

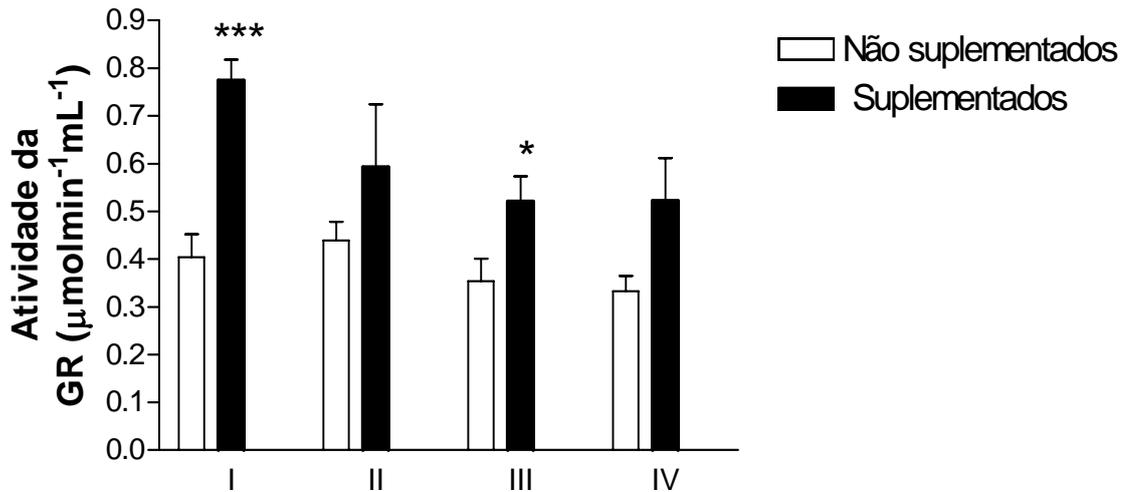


Figura 10 – Atividade da Glutathione redutase (GR) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco quando $*p<0,05$ e $***p<0,001$.

4.2.5 Atividade da glutathione S-transferase (GST)

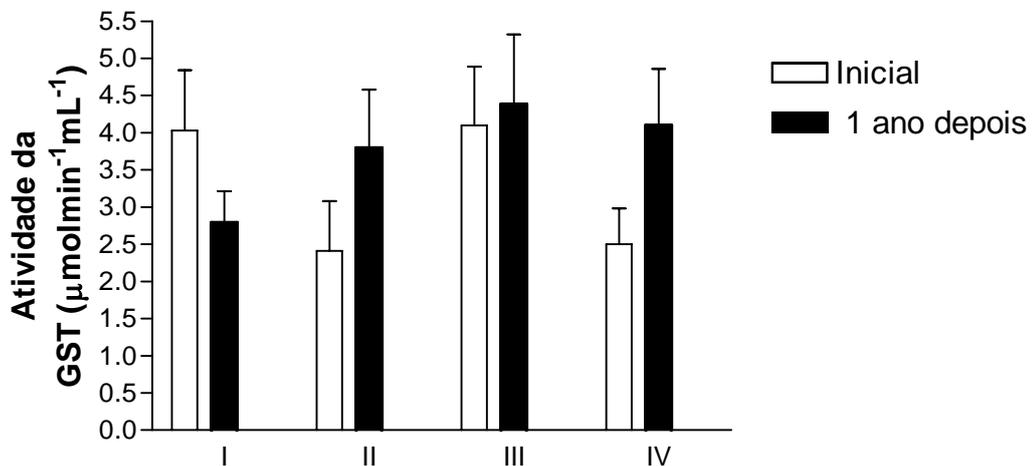


Figura 11 – Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, no intervalo de 1 ano. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre a determinação inicial e após 1 ano dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

Na atividade da GST não ocorreram diferenças significativas entre os grupos antes e após um ano (Figura 11). No entanto, de acordo com o teste t de Student,

observamos no grupo IV uma tendência de aumento na atividade desta enzima após 1 ano em relação à determinação inicial, com $p=0,0920$.

No presente estudo não ocorreu nenhuma diferença significativa na atividade da GST entre os grupos, embora a obtenção de $p=0,0498$ (Figura 12). No entanto, nos pacientes suplementados dos grupos II, III e IV ocorreu uma diminuição significativa na atividade desta enzima após aplicar o teste *t* de Student, com $p=0,0448$, $p=0,0436$ e $p=0,0210$, respectivamente. A resposta da GST após a suplementação foi oposta àquela encontrada nas outras enzimas.

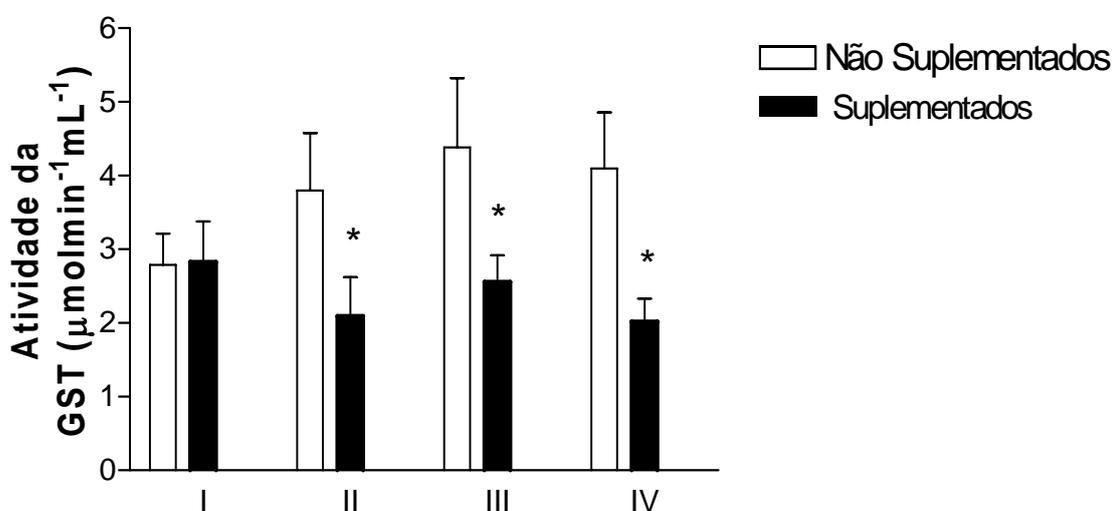


Figura 12 – Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste *t* de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

4.3 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

4.3.1 Glutathione reduzida (GSH)

Os conteúdos de GSH (Figura 13) não mostraram alterações significativas entre os grupos antes e após um ano, de acordo com o teste de Tukey, embora o valor obtido de $p=0,0402$. No entanto, na comparação pareada do teste *t* de Student, houve diminuição significativa na concentração da GSH no grupo I ($p=0,0007$) após

um ano em relação ao mesmo grupo na determinação inicial, acompanhado de uma tendência à diminuição também nos grupos II e III.

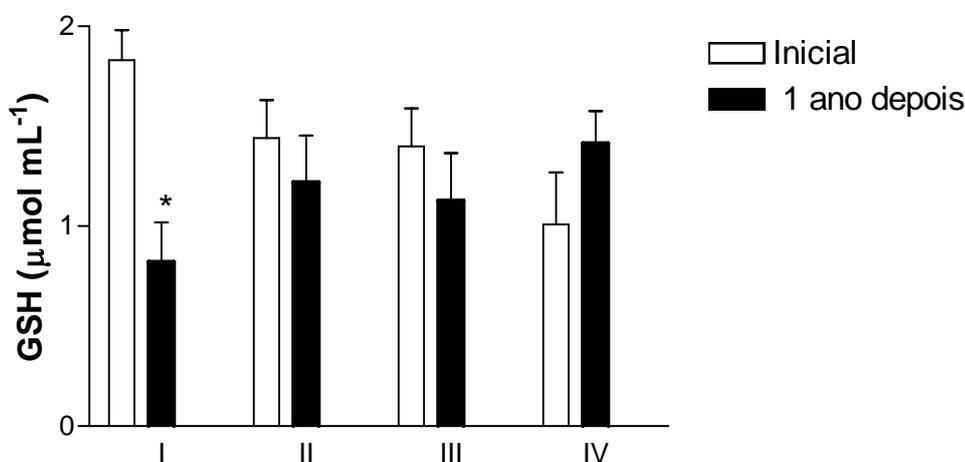


Figura 13 – Concentração da Glutathiona reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, no intervalo de 1 ano. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre a determinação inicial e após 1ano dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando * p<0,05.

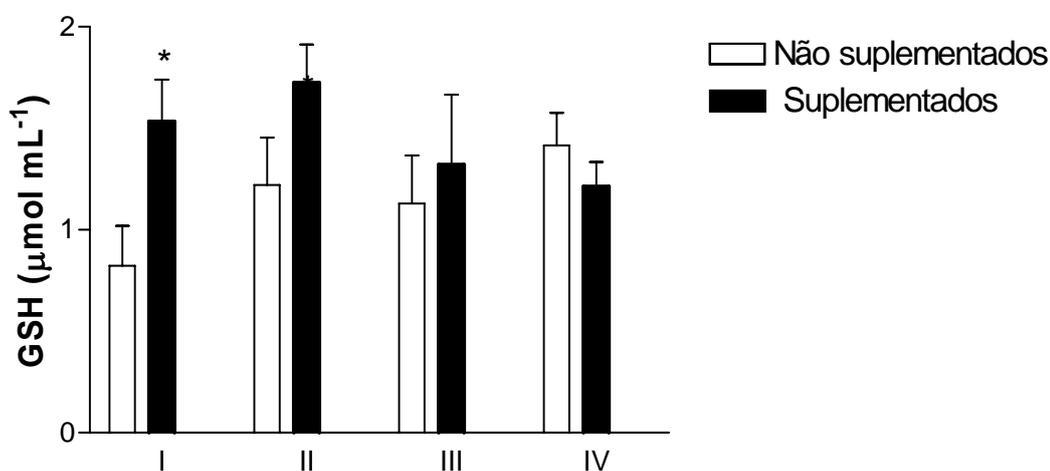


Figura 14 – Concentração da Glutathiona reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando *p<0,05.

No presente estudo não se observou diferença significativa na concentração da GSH entre os grupos suplementados (Figura 14). Por outro lado, comparativamente aos pacientes não suplementados, nos pacientes suplementados

do grupo I ocorreu um aumento significativo ($p=0,0225$) da sua concentração de acordo com o teste t de Student, com tendência a aumento no grupo II ($p=0,055$).

4.3.2 Vitamina E

No presente estudo também não foi observada diferença significativa na concentração de vitamina E entre os diferentes grupos (Figura 15), de acordo com o teste de Tukey, embora a obtenção do $p<0,0003$. Nos pacientes suplementados detectou-se um aumento significativo na concentração de vitamina E, pelo teste t de Student, nos grupos I ($p=0,0119$), II ($p=0,0254$) e III ($p=0,0439$), revelando uma tendência de maior consumo de vitamina E com a progressão da doença. No grupo IV não houve diferença estatística.

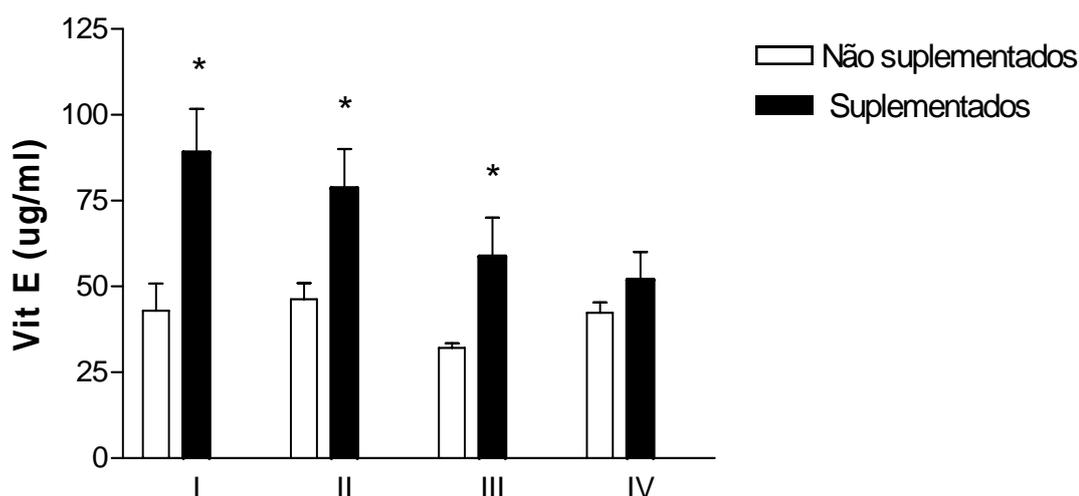


Figura 15 – Concentração da vitamina E no plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

4.3.3 Vitamina C

As determinações de vitamina C plasmática nos pacientes não permitiram sua inclusão no presente trabalho, provavelmente em decorrência de problemas metodológicos. A maioria dos valores estiveram abaixo do limite de detecção, apesar

de todas as amostras terem sido reduzidas antes de sua análise por HPLC. É sabido que a vitamina C é um composto instável e facilmente oxidável, mesmo em amostras de sangue de indivíduos saudáveis. A oxidação da vitamina C durante o teste pode produzir erroneamente baixos valores e interferir nos resultados (Padayatty, 2003).

4.4 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO

4.4.1 Lipoperoxidação tecidual (TBARS)

Não foi detectada nenhuma diferença significativa na concentração de TBARS entre os diversos grupos após a suplementação (Figura 16). Por outro lado, os pacientes suplementados exibiram uma forte diminuição da concentração de TBARS plasmática em todos os grupos, de acordo com o teste *t* de Student: $p=0,0026$ no grupo I, $p=0,0073$ no grupo II, $p<0,0001$ no grupo III e $p=0,0061$ no grupo IV.

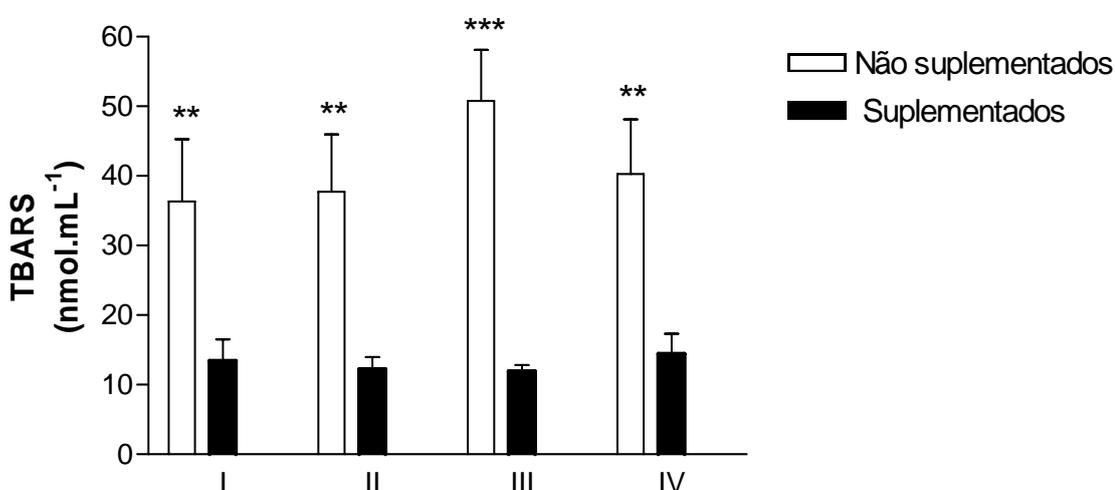


Figura 16 – Concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico TBARS no plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste *t* de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

No estudo anterior (Oliveira, 2004) não foram avaliados os marcadores de dano, impedindo a comparação no período de 1 ano.

4.4.2 Proteína carbonilada

A exemplo dos níveis de TBARS, não foi observada diferença significativa na concentração da proteína carbonilada entre os diferentes grupos (Figura 17). Entretanto, nos pacientes suplementados, seguindo a resposta constatada nos níveis de TBARS, ocorreu uma forte diminuição na concentração de proteína carbonilada em todos os grupos, de acordo com o teste *t* de Student: $p=0,0092$ no grupo I, $p<0,0001$ no grupo II, $p=0,0021$ no grupo III e $p=0,0007$ no grupo IV.

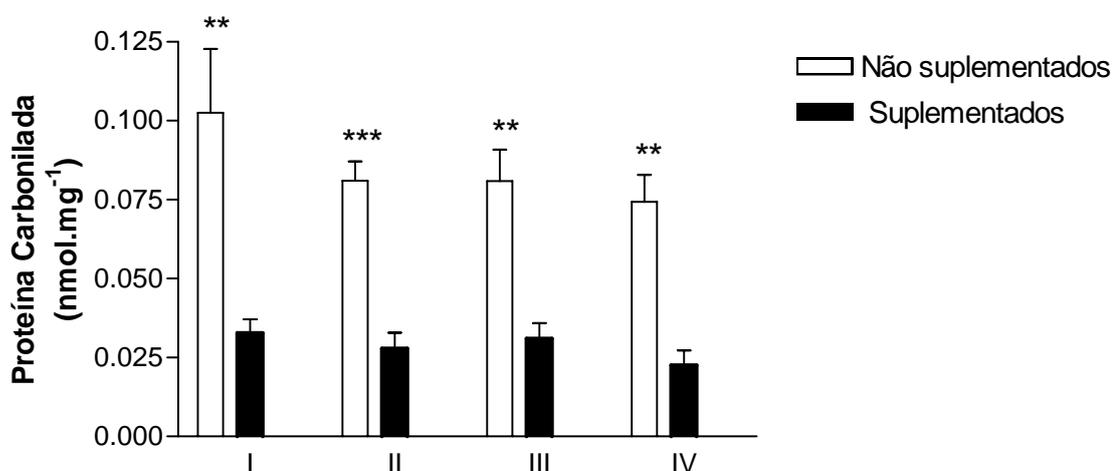


Figura 17 – Concentração de Proteína Carbonilada no plasma de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste *t* de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $**p<0,01$ e $***p<0,001$.

4.4.3 Gama-glutamyltransferase (GGT)

Não houve diferença significativa entre os grupos, na atividade da GGT. Comparando os grupos antes e após a suplementação, também não foi verificada diferença estatística entre as atividades da GGT (Figura 18).

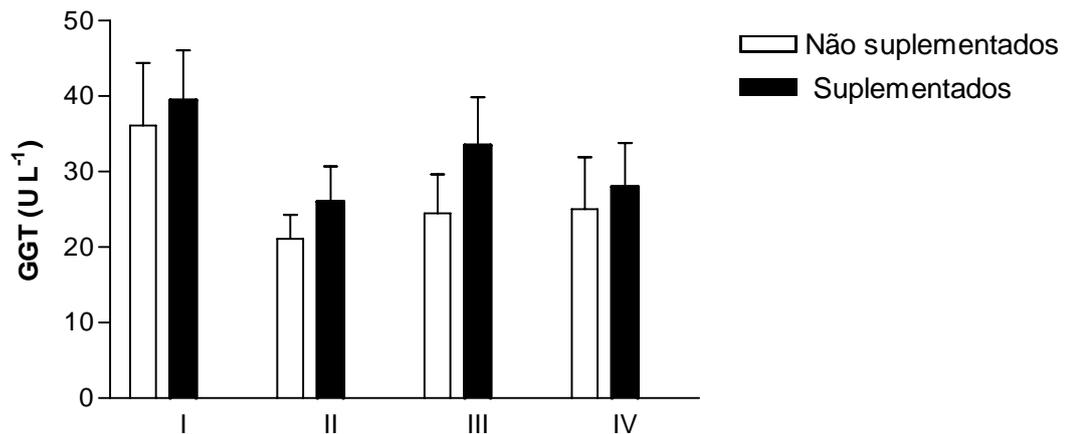


Figura 18 – Atividade da Gama-glutamiltransferase (GGT) no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$.

4.5 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

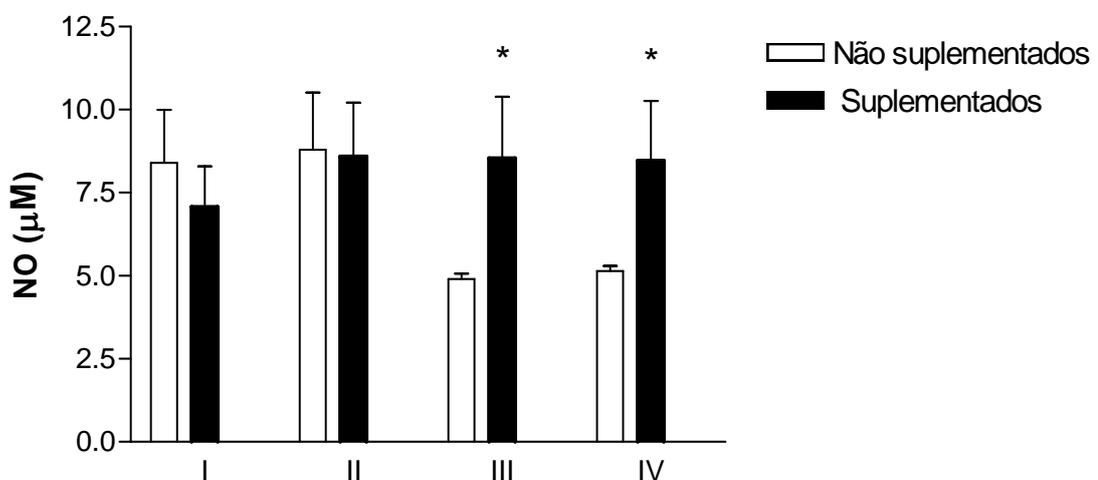


Figura 19 – Concentração de Óxido Nítrico (\bullet NO) no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste t de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$.

Os níveis de \bullet NO após a suplementação antioxidante não apresentaram diferenças significativas entre os grupos chagásicos (Figura 19). No entanto, nos pacientes suplementados pertencentes aos grupos III e IV, ocorreu aumento

significativo na concentração de NO através do teste *t* de Student, com $p=0,0328$ e $p=0,0413$, respectivamente.

4.6 MIELOPEROXIDASE (MPO)

A concentração da MPO, após a suplementação antioxidante não apresentou diferença significativa entre os grupos chagásicos (Figura 20) de acordo com o teste de Tukey, embora o valor de ANOVA foi de $p=0,0477$. No entanto, nos pacientes suplementados dos grupos II e III detectou-se uma diminuição significativa na atividade da MPO através do teste *t* de Student, com valores de $p=0,0205$ e $p=0,0382$, respectivamente.

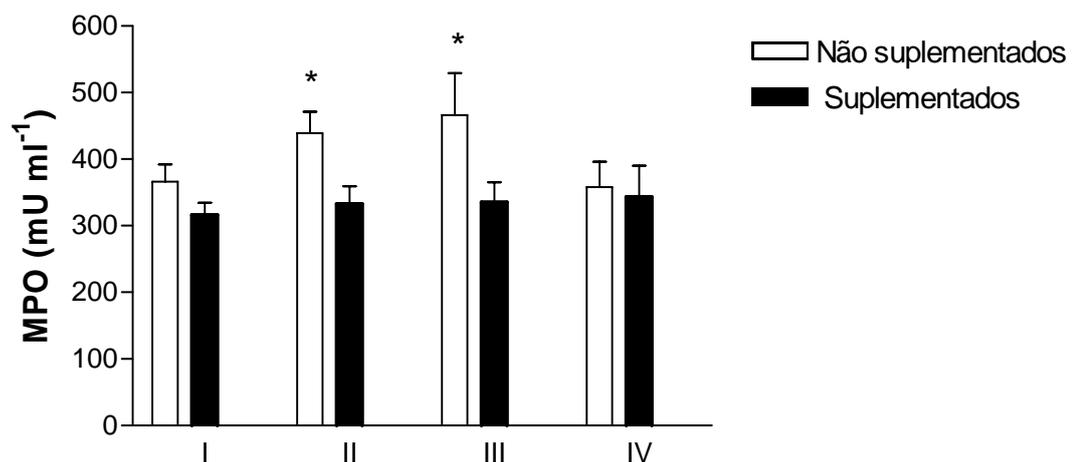


Figura 20 – Concentração da Mieloperoxidase (MPO) no soro de pacientes chagásicos crônicos em quatro estádios de evolução do comprometimento cardíaco, antes e após a administração de vitamina E e C. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos. O emprego do teste *t* de Student foi realizado entre os grupos suplementados e não suplementados dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

5 DISCUSSÃO

Com a implementação de programas de eliminação do vetor e melhoria do controle da transmissão transfusional, a situação epidemiológica da doença de Chagas está sob controle em alguns países, como Chile, Uruguai, Brasil e Argentina (WHO, 2004). Com isso, o foco dos estudos deve, necessariamente, ser direcionado para os pacientes crônicos e para o desenvolvimento das lesões que evoluem durante a fase indeterminada da infecção pelo *T. cruzi*. Mesmo com a quase erradicação da doença, seguramente teríamos, por mais de 30 anos, milhares de pacientes necessitando de cuidados médicos, principalmente na forma crônica cardíaca da doença (Dias *et al.*, 1985; Pedrosa *et al.*, 1996).

A cardiopatia chagásica crônica é a forma da patologia de maior relevância devido à sua alta prevalência, alta mortalidade e morbidade (Prata, 2001). Nesta fase da doença, não existe nenhum tratamento consistente e direto (Brener, 2000). Além disso, deve ser considerado que os mecanismos da cardiopatia chagásica crônica ainda são obscuros e fonte de muita discussão na literatura, o que aumenta a dificuldade de obter um quimioterápico eficaz (Tarleton & Zhang, 1999; Prata, 2001).

Há evidências que sugerem que o miocárdio chagásico está exposto à injúria induzida por estresse oxidativo, aspecto que poderia contribuir para a progressão da doença (Zacks *et al.*, 2005). Em trabalho recente em nosso laboratório, Oliveira (2004) encontrou depleção da GSH, GST e GPx no sangue de pacientes chagásicos, principalmente à medida que o remodelamento ventricular estava avançado (estádio IV), sugerindo fortemente que o quadro de estresse oxidativo aparentemente acentua-se com a progressão da doença. Dessa forma, o presente trabalho pretendeu avaliar o *status* antioxidante do sangue de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos após a suplementação antioxidante das vitaminas E e C, no sentido de verificar sua eficácia em termos de atenuar ou retardar o estresse oxidativo associado a esta doença.

A vitamina E foi o antioxidante escolhido para a suplementação dos pacientes, pois consiste num sequestrador eficaz de radicais peroxil, provavelmente, o mais importante inibidor da cadeia de reação de EROs associado à peroxidação lipídica

em células animais (Halliwell & Gutteridge, 1999). Além disso, existe vasta literatura reportando efeitos benéficos de dosagens supranutricionais de vitamina E em várias doenças, como doenças cardiovasculares, câncer (Halliwell & Gutteridge, 1999), inflamação crônica, doenças neurodegenerativas (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002), artrite reumatóide (Sukkar e Rossi, 2004) e Hanseníase (Vijayaraghavan *et al.*, 2005). Vários autores consideram a vitamina E segura a níveis até 800 UI/dia (Pryor, 2000), embora a meta-análise realizada por Miller e colaboradores (2005) não recomenda o seu uso em doses acima de 800 UI/dia. Vogel e colaboradores (2005), comentando o estudo acima, cita que as principais evidências para o aumento do risco de mortalidade vieram de dois estudos onde a vitamina E estava associada ao beta-caroteno, considerando incerto o risco atribuído à vitamina E.

No presente trabalho, a atividade da CAT nos pacientes não suplementados examinados após 1 ano permaneceu praticamente inalterada quando comparada à progressão da cardiopatia chagásica, mas houve diminuição da atividade desta enzima no grupo I neste período. Nos outros grupos também observou-se uma tendência de queda na atividade da CAT, embora não significativa estatisticamente, após este período. Desse modo, estes pacientes parecem estar gradativamente perdendo a capacidade antioxidante em relação a CAT. Por outro lado, após a suplementação, observou-se um aumento significativo da atividade da CAT no grupo II, indicando que a suplementação antioxidante reverteu a situação neste grupo, acompanhado de uma tendência de recuperação da atividade determinada inicialmente também nos grupos I e IV. Uma diminuição na atividade da CAT foi constatada em hemácias de ratos deficientes em vitamina E (Chow, 1980; 1992), indicando que a vitamina E confere proteção contra inativação da CAT sob condições experimentais (Chow, 1980). A diminuição na atividade da CAT poderia determinar um aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio intracelular, elevando o risco de um estresse oxidativo e desencadeando processos apoptóticos (Boveris & Cadenas, 1997; Nebert *et al.*, 2000). A suplementação antioxidante revelou ser capaz de aumentar a atividade da CAT no grupo II, além de tendência nos pacientes pertencentes aos grupos I e IV, sugerindo uma certa recuperação do poder redutor ao nível eritrocitário.

A SOD apresentou um aumento estatisticamente significativo para o grupo I após 1 ano, o que pode estar refletindo uma necessidade inicial das defesas antioxidantes manterem-se elevadas, para tentar combater a agressão causada pela

doença de Chagas. No trabalho anterior, Oliveira (2004) não observou diferenças na atividade da SOD com a progressão da doença. Já Péres-Fuentes e colaboradores (2003) observaram uma diminuição da atividade da SOD sérica com o desenvolvimento da doença de Chagas. Wen e colaboradores (2004) encontraram um consistente declínio na atividade da MnSOD mitocondrial durante a progressão da infecção no miocárdio chagásico de camundongos infectados. Em estudo com pacientes chagásicos, Wen e colaboradores (2006) observaram também uma diminuição da atividade da SOD no sangue destes pacientes, sugerindo que os pacientes chagásicos estariam expostos a uma progressiva toxicidade do $O_2^{\bullet-}$. Após a suplementação antioxidante foi observada uma tendência de aumento na atividade da SOD em todos os grupos estudados, o que poderia sugerir que a suplementação aumentou, a exemplo do resultado da CAT, o poder redutor no sangue destes pacientes. Segundo Hirose e colaboradores (1990), a indução da SOD também protege as células contra o dano oxidativo associado a citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α .

A GPx não apresentou diferenças entre os diferentes grupos na análise realizada cerca de um ano após a primeira avaliação (Oliveira, 2004). Entretanto, enquanto o grupo II mostrou aumento, pacientes do grupo III mostraram diminuição da atividade após 1 ano. No entanto, em paralelo com os resultados obtidos nas análises da CAT e da SOD, a GPx apresentou atividades aumentadas no grupo I e tendências de aumento nos demais grupos, após a suplementação antioxidante. A GPx possui ação muito semelhante à CAT, no sentido de neutralizar o H_2O_2 , e outros hidroperóxidos, com oxidação da GSH para formar a GSSG (Chance *et al.*, 1979). Além disso, ela pode estar associada às membranas em que atua contra os hidroperóxidos originados pela lipoperoxidação (Gaté *et al.*, 1999). A GPx também tem um papel importante na proteção contra a citotoxicidade do $^{\bullet}NO$, tanto para o hospedeiro quanto para o parasita (Romao *et al.*, 1999; Péres-Fuentes *et al.* 2003). Péres-Fuentes e colaboradores (2003) encontraram depleção nos níveis séricos de GPx em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos com a evolução da doença. Wen e colaboradores (2006) também observaram diminuição na atividade da GPx no sangue periférico de pacientes chagásicos. Resultado semelhante foi observado por Oliveira (2004), que verificou diminuição na atividade desta enzima no grupo IV, mais comprometido pela doença.

Aumento estatisticamente significativo foi constatado para os grupos I e II na atividade da GR após 1 ano. Como há uma tendência de depleção da GSH com a progressão da doença entre os diferentes grupos (Oliveira, 2004), e aparentemente dentro de cada grupo (vide discussão dos níveis de GSH adiante), a GR estaria sendo induzida para compensar este consumo contínuo de GSH, tentando prover os tecidos com um poder redutor maior, evitando aumentos da GSSG, a qual é muito tóxica (Halliwell & Gutteridge, 1999). Esta tendência de aumento acentuou-se após a suplementação, em que foram detectados aumentos estatisticamente significantes para os grupos I e III, e fortes tendências nos grupos II e IV, indicando que a suplementação antioxidante interferiu nos níveis de GR. Estes aumentos na atividade da GR, de forma semelhantes ao verificado nas demais enzimas estaria contribuindo com o aumento do poder redutor do sangue desses pacientes. A GR é uma flavoproteína que permite a contínua conversão de GSSG para GSH via oxidação do NADPH para NADP, reação é importante na biodisponibilidade da GSH (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A enzima GST protege as células contra vários agentes carcinogênicos e toxinas eletrofílicas (Halliwell & Gutteridge, 1999). A GST, após o período de cerca de 1 ano, não mostrou diferença significativa entre os grupos, caracterizando um perfil de contínuo aumento paralelo à progressão da doença, contrariando o perfil observado por Oliveira (2004), que verificou decréscimo na atividade desta enzima no grupo IV. Já no presente trabalho, à exceção do grupo I, foi evidenciada uma consistente diminuição da atividade desta enzima após a suplementação nos demais grupos, revertendo o perfil anterior de aumento paralelo à progressão da doença. A concentração da GSH é um importante fator associado à atividade da GST (Kumaraguruparan *et al.*, 2002; Ouaisi *et al.*, 2002) e, dessa forma, os níveis de GSH também influenciam a expressão da GST. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a tendência de aumento da atividade da GST encontrada em todos os grupos após 1 ano, já que esta tendência também foi observada na GSH, ambas com um perfil muito semelhante. Como a GST está também envolvida na eliminação de hidroperóxidos produzidos pelo processo de lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999), a diminuição acentuada dos níveis de TBARS nos grupos II, III e IV provavelmente estaria relacionada com a diminuição de sua atividade após a suplementação antioxidante. É interessante observar que a única enzima antioxidante aqui analisada que apresentou diminuição após a suplementação

antioxidante foi a GST, comportamento oposto ao encontrado nas demais atividades. Yang e colaboradores (2001) sugeriram que as GSTs da classe Alfa têm um importante papel na regulação das concentrações intracelulares de produtos da peroxidação lipídica, que podem estar envolvidos nos mecanismos sinalizadores da apoptose.

A diminuição da GSH no plasma de pacientes com cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca de etiologia idiopática e isquêmica já foi demonstrada em outros trabalhos (Belch *et al.*, 1991; McMurray *et al.*, 1993). Por outro lado, Yücel e colaboradores (1998) mostraram uma diminuição da GSH no sangue total de pacientes com cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca. A depleção da concentração da GSH poderia estar envolvida com o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , relação já encontrada também em cultura de células (Ishii *et al.*, 1992; Phelps *et al.*, 1995), sendo que de modo coerente, os níveis de TNF- α plasmáticos mostraram-se elevados em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos (Péres-Fuentes *et al.*, 2003). Wen e colaboradores (2006) também observaram níveis diminuídos de GSH no sangue de pacientes chagásicos. A diminuição encontrada na concentração de GSH no grupo I, após o período de um ano, corrobora aqueles dados de literatura. Após a suplementação, o aumento da concentração da GSH verificado no grupo I, seguido por tendência de aumento no grupo II, poderia traduzir uma recuperação parcial do poder redutor no sangue destes pacientes, fortemente ameaçado pela progressão da doença e pela manutenção de um processo inflamatório crônico. Chow (1992) demonstrou que os níveis de GSH diminuíram mais rápido nas células de ratos com dieta deficiente em vitamina E, e no grupo IV (insuficiência cardíaca) houve uma tendência à depleção deste tiol e um maior consumo de vitamina E neste mesmo grupo. Estes resultados combinados sugerem uma ação sinérgica entre os níveis de GSH e vitamina E, aspecto já demonstrado na literatura (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Houve um aumento nas concentrações de vitamina E nos pacientes suplementados, como resultado da suplementação, à exceção do grupo IV. Como os pacientes do grupo IV estão mais comprometidos com a severidade da doença, provavelmente houve uma necessidade maior de consumo destes antioxidantes nutricionais (vitaminas C e E) na tentativa do organismo de reverter ou contornar o quadro de estresse oxidativo sistêmico. Pode-se observar um consumo progressivo de vitamina E após a suplementação, de acordo com a evolução da doença. Em

outras palavras, o perfil de consumo da vitamina E nos pacientes suplementados sugere que este importante antioxidante lipossolúvel mostrou uma depleção diretamente proporcional à gravidade da doença e à progressão do estresse oxidativo. Em trabalho recente, Carvalho e colaboradores (2006) demonstraram que a deficiência de vitamina E em ratos infectados agudamente pelo *T. cruzi* acentuou a miocardite, denervação simpática, leucopenia e diferenciação de monócitos em macrófagos. Vários estudos em outros modelos experimentais têm mostrado que animais suplementados com vitamina E têm diminuído consistentemente o número de monócitos/macrófagos, enquanto que a deficiência de vitamina E aumenta componentes da resposta inflamatória, como a secreção de citocinas próinflamatórias pelos macrófagos (Bech, 1997; Grimble, 1998; Rimbach *et al.*, 2002). O tocoferol, além de um potente antioxidante, como evidenciado pela diminuição da suscetibilidade de oxidação da LDL e F2-isoprostanos, tem um pronunciado efeito antiinflamatório, capaz de diminuir a liberação de citocinas pelos monócitos e diminuir a PCR (proteína-C reativa) no plasma (Singh & Jialal, 2004).

A concentração de TBARS, determinada como avaliação da peroxidação lipídica, mostrou uma queda extremamente significativa nos pacientes suplementados, em todos os grupos, provavelmente como consequência do efeito da suplementação antioxidante em inibir aquele processo oxidativo. A vitamina E é considerada o mais efetivo antioxidante lipossolúvel não enzimático presente nas células aeróbias (Pryor, 2000). Assim, o α -tocoferol, componente predominante da vitamina E, em diversos estudos tem seu papel evidenciado na redução da concentração de TBARS em diferentes modelos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Sutken e colaboradores (2006) encontraram diminuição nos níveis de MDA em jovens hiperlipidêmicos tratados com vitamina E sozinha ou associada ao gemfibrosil. A administração oral de vitamina E também diminuiu o estresse oxidativo em pacientes com Hanseníase, evidenciado pela diminuição da peroxidação lipídica e da proteína carbonilada (Vijayaraghavan *et al.*, 2005). Jialal e colaboradores (1995), verificaram que suplementação com 800 ou 1200 UI/dia de vitamina E diminuiriam significativamente a suscetibilidade do LDL em sofrer oxidação. Um grande número de evidências indica que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias doenças neurodegenerativas, como mal de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (ELA), sendo que a vitamina E poderia bloquear a morte de neurônios *in vitro* e ter propriedades

terapêuticas em modelos animais envolvidos com essas doenças (Esposito *et al.*, 2002).

A exemplo dos níveis de TBARS, o dano oxidativo a proteínas, avaliado pela determinação do conteúdo da proteína carbonilada (Dalle-Donne *et al.*, 2003), igualmente sofreu uma queda acentuada nos pacientes suplementados em todos os grupos. Os resultados conjuntos verificados nos conteúdos de TBARS e proteína carbonilada confirmaram fortemente a eficácia da suplementação antioxidante em diminuir os danos teciduais e moleculares causados pelo estresse oxidativo.

Wen e Garg (2004) demonstraram um aumento substancial na peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em mitocôndria de coração de camundongos infectados por *T. cruzi*, comparados com controles. Aumentos da lipoperoxidação e deposição de proteína carbonilada em mitocôndria paralelos à severidade da doença, além de modificações oxidativas de subunidades do complexo mitocondrial, constituem forte evidência de um quadro sustentado de estresse oxidativo de origem mitocondrial no coração chagásico (Zacks *et al.*, 2005). Apesar de especulativo, é possível sugerir que a suplementação antioxidante provavelmente permitiu reverter este quadro ao nível do miocárdio, pelo menos nos estádios menos avançados da doença.

Estudos recentes têm sugerido que a GGT sérica poderia constituir-se em um marcador precoce de estresse oxidativo (Lim *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Todavia, no presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas entre os diversos grupos estudados, tanto antes como após a suplementação antioxidante. Lim e colaboradores (2004) verificaram que a concentração da GGT foi inversamente proporcional à concentração dos antioxidantes α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina/luteína, licopeno e vitamina C. No entanto, a vitamina E aparentemente não demonstrou associação com o efeito da GGT, o que foi constatado também no presente trabalho. Há evidências que a GGT celular tem um importante papel no sistema de defesa antioxidante (Kugelman *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2004). A GGT celular tem um papel central na homeostase, por iniciar a degradação da GSH extracelular, um antioxidante crítico para o sistema de defesa celular (Lim *et al.*, 2004). Entretanto, o perfil dos níveis de GSH, seja antes ou após a suplementação, comparativamente aos níveis da GGT, prévia ou posteriormente à suplementação antioxidante, não evidenciou nenhuma interação entre ambos parâmetros. Paradoxalmente, há estudos que indicam que a GGT ectoplasmática

também está envolvida na geração de EROs. Este efeito parece ocorrer quando a GGT é expressa na presença de ferro ou outros metais de transição (Stark *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 2004).

O aumento do processo inflamatório em patologias crônicas pode ser ativado pela EROs via modulação de fatores transcripcionais como NF- κ B e AP-1 (Sukkar & Rossi, 2004). Não obstante, o estado de estresse oxidativo na patologia chagásica pode ser importante via de indução inflamatória. A importância da inflamação e da atuação do NF- κ B no desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva de etiologia chagásica foram demonstradas no miocárdio humano com esta insuficiência (Valen *et al.*, 2001). O fator transcripcional AP-1 contribui para o desenvolvimento de fibrose, deposição de colágeno e hipertrofia cardíaca, como observado em miocárdio de camundongos infectados por *T. cruzi* (Huang *et al.*, 2003) e humanos (Zacks *et al.*, 2005).

O \bullet NO tem importância fundamental nas funções do sistema cardiovascular, bem como a regulação do tônus vascular (Palmer *et al.*, 1987) e na manutenção da integridade endotelial (Mellion *et al.*, 1981). Além disso, o óxido nítrico pode reagir com o ânion superóxido e formar peroxinitrito, molécula altamente difusível e reativa envolvida na modificação oxidativa de LDL e proteínas (Beckman *et al.*, 1990; Hogg *et al.*, 1993). Segundo Péres-Fuentes e colaboradores (2003), a concentração de \bullet NO aumenta, induzida pelo aumento dos níveis de TNF- α , com a progressão da cardiopatia chagásica, favorecendo a evolução da doença e agravando o quadro de estresse oxidativo. No presente estudo, não foi verificada diferença estatística nos níveis de \bullet NO entre os pacientes suplementados. Já nos pacientes não suplementados observou-se uma depleção de \bullet NO nos grupos III e IV, que são os mais comprometidos com a progressão da doença, contrariando os dados obtidos por Péres-Fuentes e colaboradores (2003). Segundo Vanderheyden e colaboradores (2004), a insuficiência cardíaca altera os níveis de \bullet NO, sendo que em pacientes com insuficiência cardíaca a expressão da iNOS está associada com a formação de nitrotirosina, caracterizando um aumento do volume do ventrículo esquerdo e função deprimida. Nestes pacientes, a preservação da geração de \bullet NO, mesmo na forma de nitrotirosina, parece estar associada a um maior trabalho cardíaco e uma maior funcionalidade do ventrículo esquerdo. O autor cita, ainda, que há uma relação inversa entre a evolução da insuficiência cardíaca e expressão da iNOS, com uma

diminuição da produção de $\bullet\text{NO}$ durante a transição da fase compensada para a descompensada da doença. Interessante observar que pacientes com cardiopatia de origem orovalvar também mostraram níveis mais elevados de $\bullet\text{NO}$, enquanto os pacientes normais mostraram níveis comparativamente diminuídos (Oliveira, 2004), mas ambos maiores do que os verificados nos pacientes chagásicos do presente trabalho. Coerentemente, Naviliat e colaboradores (2005) também observaram que aumento da nitração de proteínas (3-nitrotirosina), detectadas em processos inflamatórios no miocárdio de camundongos chagásicos, como conseqüência do aumento do $\bullet\text{NO}$, pareceu diminuir o parasitismo, mas promove igualmente aumento do dano colateral ao miocárdio.

A suplementação antioxidante diminuiu a expressão da MPO nos pacientes dos grupos II e III e, mesmo sem ocorrer significância estatística, pode-se observar uma tendência diminuição no grupo I, sugerindo uma atenuação no processo inflamatório, provavelmente como conseqüência da recuperação da capacidade antioxidante após o tratamento com as vitaminas E e C. Curiosamente, os pacientes do grupo IV (insuficiência cardíaca), em que o processo inflamatório deveria ser mais crônico não apresentaram diferença na expressão da MPO. De qualquer modo, a suplementação antioxidante permitiu atenuar o processo inflamatório, notadamente nos grupos II e III, contribuindo, desta forma, para igualmente atenuar o quadro de estresse oxidativo nestes pacientes. A MPO é uma enzima encontrada nos neutrófilos, que apresenta uma atividade peroxidase não-específica, sendo capaz de oxidar um grande número de substratos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Na presença H_2O_2 e do ânion cloreto (Cl^-) ela forma o ácido hipoclorídico (HOCl). O HOCl apresenta intensa ação tóxica sobre as bactérias, sendo que, em muitas patologias inflamatórias, como fibrose cística e artrite reumatóide, também causa lesão tecidual (Goldblum *et al.*, 1985). A MPO depleta moléculas antiinflamatórias, como $\bullet\text{NO}$, e gera pró-oxidantes como HOCl, radicais tirosil ou $\text{NO}^*\text{}_2$, demonstrando propriedades pró-inflamatórias, sendo que estudos recentes a tem considerado criticamente envolvida na patogênese de doenças vasculares inflamatórias, como a aterosclerose (Lau & Baldus, 2006). A MPO, na presença de H_2O_2 , pode oxidar a tirosina em radicais tirosil, o que poderia contribuir para a oxidação da LDL (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Em resumo, um quadro crescente de estresse oxidativo parece acompanhar os pacientes chagásicos crônicos, aspecto já evidenciado em estudo anteriormente realizado por nosso grupo (Oliveira, 2004). Num intervalo de 1 ano as defesas antioxidantes examinadas nos mesmos pacientes deste trabalho anterior estão aparentemente diminuídas, ou seja, seus níveis seriam inversamente correlacionados com a progressão da doença.

Por outro lado, a suplementação antioxidante, utilizando concomitantemente doses de 800 UI diárias de vitamina E e 500 mg de vitamina C, conferiu uma proteção redutora nesses mesmos pacientes, sendo que o perfil de consumo apresentado pela vitamina E foi diretamente proporcional à evolução da doença. Salientamos que o grupo IV (insuficiência cardíaca chagásica), que é o mais comprometido pela gravidade da doença, também foi o menos responsivo à suplementação, apresentando maior consumo de vitamina E, além de uma tendência de queda na concentração da GSH e da atividade da MPO. Ao contrário, os pacientes do grupo I, menos comprometidos com a doença, apresentaram, de uma maneira geral, melhor resposta à suplementação. A suplementação permitiu diminuir os processos de lipoperoxidação e oxidação de proteínas essencialmente em todos os pacientes enquanto que a atividade da MPO ficou diminuída nos grupos II e III, atenuando o processo inflamatório. É importante frisar que todas estas alterações foram detectadas no sangue, implicando que órgãos mais afetados pelo parasita provavelmente estejam expostos a uma condição de maior estresse oxidativo, conforme já demonstrado anteriormente em tecidos necrosados de pacientes crônicos com insuficiência cardíaca (Belch *et al.*, 1991).

Algumas limitações impedem conclusões mais consistentes. Em primeiro lugar, a amostra estudada é pequena. Este tamanho amostral impede a realização de análise multivariável. Seria interessante para afastar a possibilidade de interferência de variáveis confundidoras nos parâmetros analisados. No entanto, a robustez dos resultados ameniza esta limitação. Também não foi possível avaliar padrões de normalidade para os vários exames realizados nos pacientes chagásicos por não haver grupos controle para estes exames. Na verdade este não foi, desde o início, o objetivo do estudo.

Tratou-se de um estudo transversal, em que todos os pacientes foram avaliados em um determinado momento, captando-se assim apenas os resultados naquele instante estudado. É possível que diversos dos parâmetros avaliados

possam sofrer modificações com a evolução da doença. Afinal, a doença de Chagas, em sua fase crônica, é progressiva e pode haver mudanças substanciais com a sua evolução.

Em relação aos testes de estresse oxidativo, a dieta muito provavelmente influenciou os resultados obtidos. Na verdade, não há instrumentos totalmente adequados para populações com nível nutricional tão reduzido. A doença de Chagas é doença da extrema pobreza, atingindo indivíduos excluídos das mínimas condições de assistência do Estado, a começar pelas precárias condições de moradia que propiciaram a infecção. O nível nutricional nas regiões endêmicas da doença de Chagas, como esperado pela ausência do Estado, também é baixo, o que gera cidadãos triplamente excluídos da sociedade.

6 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos 1 ano após a primeira avaliação mostraram que os níveis de algumas enzimas estão aparentemente diminuídos, confirmando dados anteriores de uma progressiva diminuição da atividade enzimática com a evolução da doença de Chagas, notadamente no grupo IV (insuficiência cardíaca).
- De uma maneira geral, observou-se aumento, ou tendência de aumento, das defesas antioxidantes enzimáticas após a suplementação antioxidante, exceto para a GST, nos estádios iniciais da doença (grupos I, II e III), o que sugere que a vitamina E aumentou o poder redutor no sangue destes pacientes.
- A vitamina E foi mais consumida com a progressão da doença de Chagas (grupo IV), em que existe uma menor compensação antioxidante, confirmando uma deficiência do organismo em manter estas defesas face ao estresse oxidativo decorrente da agressão inflamatória crônica.
- A suplementação antioxidante diminuiu os processos de lipoperoxidação e oxidação de proteínas, essencialmente em todos os grupos, atenuando os danos causados pelo estresse oxidativo.
- A diminuição da atividade da MPO nos grupos II e III sugere que a suplementação antioxidante estaria atenuando o processo inflamatório e, conseqüentemente, os danos causados pelo estresse oxidativo.
- A suplementação antioxidante permitiu elevar os níveis de \bullet NO sanguíneo nos estádios mais avançados da doença, provavelmente auxiliando no combate ao parasita.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam várias possibilidades futuras, tanto na melhor avaliação dos efeitos de suplementação antioxidante, como na eventual utilização do BZN associado a esta suplementação. Desta forma, seria oportuno averiguar:

- O efeito de suplementação antioxidante (vitaminas E e C) associada ao tratamento com Benzonidazol em pacientes cardiopatas chagásicos, no sentido de avaliar o quadro de estresse oxidativo provocado pelo próprio fármaco no hospedeiro (modelo animal em ratos; De Bem, 2001; Pedrosa et al., 2001), juntamente com o benefício da terapia antioxidante, conforme verificado neste estudo.
- O dano ao DNA (teste cometa ou aductos de DNA como a 8-oxoguanina) e a nitração de proteínas (níveis de 3-nitrotirosina), como marcadores de dano adicionais.
- As defesas antioxidantes enzimáticas no plasma dos pacientes cardiopatas chagásicos, uma vez que utilizamos os eritrócitos no presente trabalho.
- A capacidade antioxidante total (FRAP) dos pacientes cardiopatas chagásicos, se possível, antes e após a suplementação antioxidante, como ferramenta mais prática e acessível, no sentido de monitorar a evolução da doença e o *status* antioxidante dos pacientes, notadamente em número elevado de amostras.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AVILA, H. A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M. *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplastic minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chaga's disease. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 48. p. 211-221, 1991.

AYAORI, M.; HISADA, T.; SUZUKAWA, M. *et al.* Plasma levels and redox status of ascorbic acid and levels of lipid peroxidation products in active and passive smokers. **Environ. Health Perspect.** v. 108, p. 105-108, 2000.

BECH, M. A. Increased virulence of coxsackievirus B3 in mice due to vitamin E or selenium deficiency. **J. Nutr.** v. 127. n. 5, p. 9665-9705, 1997.

BECKMANN, J. S.; BECKMANN, T. W.; CHEN, J.; *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Nat. Acad. Scienc.** v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BELCH, J. J.; BRIDGES, A. B.; SCOTT, N.; CHOPRA, M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. **Br. Heart J.** v. 65, p. 245-248, 1991.

BELLOTTI, G.; BOCCHI, E. A.; MORAES, A.V.; *et al.* *In vivo* detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with cronic Chagas disease. **Am. Heart J.** v. 131, p. 301-307, 1996.

BENDICH, A.; MACHLIN, L. J. Safety of oral intake of vitamin E. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 48, p. 612-619, 1988.

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.

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

BOCCHI, E.A.; FIORELLI, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Thorac. Surg.** v. 71, p.1833-1838, 2001.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L.W. **Superoxide dismutase**, CRC:Boca Raton, v. 2, p. 159-168, 1982.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression and Cellular**, Marcel Dekker:New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

- BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2ª ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 266-296, 2000.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KELLY F. J.; SALONEN, J. T. *et al.* The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **Amer. J. Clin. Nutr.** v. 76 (4), p.703-716, 2002.
- CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Meth. Enzymol.** v. 113, p. 484-490, 1985.
- CANESIN, M. F.; BARRETO, A. C. P. Tratamento etiológico da doença de Chagas: mito ou realidade? **Rev. Soc. Cardiol. Est. São Paulo.** v.7, n. 2, p. 233-239, 1997.
- CARDONI, R. L.; ROTTENBERG, M. E.; SEGURA, E. L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Invest.** v. 28, p. 257-268, 1990.
- CARRASCO, H. A.; BARBOZA, J. S.; INGLESSIS, G. *et al.* Left ventricular cineangiography in Chagas' disease: detection of early myocardial damage. **Am. Heart J.** v.104, p. 595-602, 1982.
- CARRASCO, H. A. Diagnóstico de daño miocárdico en la enfermedad de Chagas. Textos de la Universidad de Los Andes: Cosenjo de Publicaciones de la Universidad de Los Andes, Merida, 1983.
- CARRASCO, H. A.; PALACIOS-PRÜ, E.; SCORZA C. D. *et al.* Clinical, histochemical and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. **Am. Heart J.** v. 113, p. 716-724, 1987.
- CARVALHO, L. S. C.; CAMARGOS, E. R. S.; ALMEIRA, C. T. *et al.* Vitamin E deficiency enhances pathology in acute *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** v. *in press*, 2006.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** v. 59, p. 527-602, 1979.
- 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.
- Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. SBMT. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.** v. 38 (Suplemento III), 2005.
- CROSS, A. R.; YARCHOVER, J. L.; CURNUTTE, J. T. The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for

distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 21448-21454, 1994.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. In: Towards Prolongation of Healthy Life Span. **New York Acad. Sci.**, v. 854, p. 435-443. 1998.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim. Act.** v. 329, p. 23-38, 2003.

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

DE CAVANAGH, E. M. V.; FERDER, L.; CARRASQUEDO, F.A. *et al.* Higher levels of antioxidant defenses in enalapril-treated versus non-enalapril treated hemodialysis patients. **Am. J. Kidney. Dis.** v. 34, p. 445-455, 1999.

DE CAVANAGH, E. M. V.; INSERRA, F.; FERDER, L.; FRAGA, C. G. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defences in mouse tissue. **Am. J. Physiol.** v. 278, p. R572-R577, 2000.

DE CAVANAGH, E.M.V.; PIOTRKWOSKI, B.; FRAGA, C.G. Concerted action of rennin-angiotensin system, mitochondria and antioxidant defenses in aging. **Mol. Asp. Med.** v. 25, p. 27-36, 2004.

DI ROSA, M.; LALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTENBIN, L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. **Prostag. Leukot. Ess.** v. 54, p. 229-238, 1996.

DIAS, J. C. P. História natural In: CANÇADO, J. R. **Cardiopatia chagásica**. São Paulo:Editora Chuster, p. 99-113, 1985.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas In: CIMERMAN, B. CIMERMANN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo:Editora Atheneu, p. 81-110, 1999.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog. Lip. Res.** v. 43, p. 200-227, 2004.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** v. 82, p. 47-95, 2002.

EPP, O.; LANDENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0,2 nm resolution. **Eur. J. Biochem.** v.133, p.51-69, 1983.

ESPOSITO, E.; ROTILIO, D.; DI MATTEO, V. *et al.* A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. **Neurobiol. Ag.** v. 23, n. 5, p. 719-735, 2002.

EVANS, M. D.; COOKE, M. S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. **Bioassays**. v. 26, p. 533-542, 2004.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. **Nature** v. 408, p. 239-247, 2000.

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

FORMAN, H. J.; LIU, R. M.; TIAN, L. "Glutathione cycling in oxidative stress". **Lung Biol. Health Dis.** v. 105, p. 99-121, 1997.

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

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Adv. Enzymol.** v. 58, p. 62-97, 1986.

FRÖDE-SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. **Peptides** v. 20, p. 259-265, 1999.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN B, G. *et al.* Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed. Pharmacother.** v. 53, p. 169-180, 1999.

GOLDBLUM, S. E.; WU, K. M.; JAY, M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **J. Appl. Physiol.** v. 59(6), p. 1978-85, 1985.

GOW, A. J.; STAMLER J. S. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. **Nature** v. 391, p. 169-173, 1998.

GREEN, I. C.; WAGNER, D. A.; GLOWSKI, J. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury, Part I: Basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS. **Circulation.** v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GRIMBLE, R. F. Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** v. 67, p. 312-320, 1998.

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.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine** 3^a ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet.** v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HIGUCHI, M. L.; DE BRITO, T.; REIS, M. M. *et al.* Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc. Pathol.** v. 2, p. 101-106, 1993.

HIGUCHI, M. L. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 39, p. 53-60, 1997.

HIROSE, K.; LONGO, D. L.; OPPENHEIM, J. J.; MATSUSHIMA, K. Over-expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. **FASEB J.** v.7, p. 361-368, 1990.

HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V.M.; WILSON, M.T.; MONCADA, S. The oxidation of α -tocopherol in human low-density lipoprotein by simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. **FEBS Lett.** v. 326, p. 199-203, 1993.

HUANG, A.; VITA, J. A.; VENEMA, R. C. *et al.* Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 17399-17406, 2000.

HUANG, H.; PETKOVA, S. B.; COHEN, A. W. *et al.* Activation of transcription factors AP-1 and NF- κ B in murine chagasic myocarditis. **Infect. Immun.** v. 71, p. 2859-2867, 2003.

IANNUZZI, A.; CELENTANO, E.; PANICO, S. *et al.* Dietary and circulating antioxidant vitamins in relation to carotid plaques in middle-aged women. **Amer. J. Clin. Nutr.** v.76, p.582-587, 2002.

IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes-Part 4. IFCC Method for γ -Glutamyltransferase. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** v. 21, p. 633-645, 1983.

ISHII, Y.; PARTRIDGE, C. A.; DEL VECCHIO, P. J.; MALIK, A. B. Tumor necrosis factor- α -mediated decrease in glutathione increase the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H_2O_2 . **J. Clin. Invest.** v. 89, p. 794-802, 1992.

JACKSON, T. H.; XU, A.; VITA, J. A. *et al.* Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. **Circ. Res.** v. 83, p. 916-922, 1998.

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

JONES, D.P.; EKLOW, L.; THOR, H.; ORRENIUS, S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2 . **Arch. Biochem. Biophys.** v. 210, p.505-516, 1981.

- JONES, E. M.; COLLEY, D. G.; TOSTES, S. *et al.* A *Trypanosoma cruzi* DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Trans. Assoc. Am. Physicians.** v. 105, p. 182-189, 1992.
- JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology.** Oxford: Oxford University Press, 1997.
- KAPPUS, H.; DIPLOCK, A. T. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. **Free Radic. Biol. Med.** v. 13, p. 55-74, 1992.
- KEHER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.** v. 23, p. 21-48, 1993.
- KETTLE, A. J; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Rep.** v. 3, p. 3-10, 1997.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** Edição 2000-2001, Rio de Janeiro:Guanabara Kogan, 2000.
- KUGELMAN, A.; CHOY, H. A.; LIU, R. *et al.* Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v. 11, p. 586-592, 1994.
- KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; VISWANATHAN, P.; NAGINI, S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clin. Chim. Act.** v. 325, 165-170, 2002.
- LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol. Therap.** v. *in press*, 2006.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** v. 186, p. 464-478, 1990.
- LIM, J. S.; YANG, J. H.; CHUN, B. Y. *et al.* Is serum γ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? **Free Radic. Biol. Med.** v. 37, n. 7, p. 1018-1023, 2004.
- LEE, D. H.; BLOMHOFF, R.; JACOBS JR, D. R. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of oxidative stress? **Free Radic. Res.** v. 38, n. 6, p. 535-539, 2004.
- LOWRY, O. K.; ROSENBROGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 93, p. 265-275, 1951.
- LOSCHEN, G.; FLOHÉ, L.; CHANCE, B. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. **FEBS Lett.** v. 18, p. 261-264, 1971.
- 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.

MACMURRAY, J.; CHOPRA, M.; ABDULLAH, I. *et al.* Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. **Eur. Heart J.** v. 14, p. 1493-1498, 1993.

MAGUIRE, J.H.; SOUSA J.A.A. Eletrocardiografic classification and abbreviated lead system for population based studies of Chagas' disease. **Bull. Pan Am. Health Organization.** v. 16, p. 47, 1982.

MALTA, J. **Doença de Chagas.** 1ª ed, São Paulo: Editora Sarvier, 1996.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; MACIEL, B. C. Aspectos peculiares da fisiopatologia da insuficiência cardíaca na doença de Chagas. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo.** v. 8, n. 2, p.243-252, 1998.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, A. V. L. Forma crônica cardíaca. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2ª ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.266-296, 2000.

MARNET, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis** v. 21, p. 361-370, 2000.

MELLION, B. T.; IGNARRO, L. J. OHLSTEIN, E. H. *et al.* Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'5"- monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. **Blood.** v. 57, p. 946-955, 1981.

MEYDANI, S. M.; MEYDANI, M.; BLUMBERG, J. B. *et al.* Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 68, p. 311-318, 1998.

MILLER, E. R.; PASTOR-BARRIUSO, R.; DALAL, D. *et al.* Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. **Ann. Intern. Med.** v. 142, p. 37-46, 2005.

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, p. 188-192, 1972.

MONCADA, C.; REPETTO, Y.; ALDUNATE, J. *et al.* Role of glutathione in susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 94, p. 87-91, 1989.

NAIDOO, D.; LUX, O. The effect of vitamin C and supplementation on lipid and urate oxidation products in plasma. **Nutr. Res.** v. 18 (6), p. 953-961, 1998.

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.

NEBERT, D. W.; AMY, R. L.; MATTEW, D. Z. *et al.* Role of the aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis. **Biochem. Pharmacol.** v. 59, p. 65-85, 2000.

NICOLETTI, G.; CRESCIBENE, M.; SCORNAIENCHI, M. *et al.* Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. **Arch. Geront. Geriat.** v. 33, p. 7-12, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.** v.31, p.1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, J. S. M.; ARAUJO, R. R. C.; NAVARRO, M. A.; MUCCILO, G. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. **Am. J. Cardiol.** v. 52, p. 147-151, 1983.

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

OLIVEIRA, T. B.; PEDROSA, R. C.; WILHELM FILHO, D. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **Int. J. Cardiol.** v. *in press*, 2006.

OUAISSI, A.; OUAISSI, M.; SERENO, D. Glutathione S-transferase and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. **Imm. Lett.** v. 81, p. 159-164, 2002.

PADAYATTY, S. J.; KATZ, A.; WANG, Y. *et al.* Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. **J. Am. Col. Nutr.** v. 22(1), p. 18-35, 2003.

PALACE, V. P.; MATEHWSKI, H. S.; KLAVERKAMP, J. F. Effects of sampling and storage conditions on the stability of biochemical parameters measured in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. **Comp. Biochem. Physiol.** V. 95, p. 51-55, 1990.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** v. 327, p. 524-526, 1987.

PEDROSA, R. C.; SAAD, E. A.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. M. Resposta proliferativa das células T contra a cruzipaina na cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 29 (4), p. 331-339, 1996.

PEDROSA, R.C.; DE BEM, A.F.; LOCATELLI, C. *et al.* Time-dependent oxidative stress caused by benzimidazole. **Redox Report** v. 6, p. 265-270, 2001.

PENG, S.L. Scleroderma: a disease related to damage proteins? **Nature** v. 3, p. 276-301, 1997.

PÉRES-FUENTES, R.; JUEGAN, J.F.; BARNABÉ, C. *et al.* Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **Int. J. Parasitol.** v. 33, p. 293-299, 2003.

PHELPS, D. T.; FERRO, T. J.; HIGGINS, P. J. *et al.* TNF- α induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. **Am. J. Physiol.** v. 269, p. L551-L559, 1995.

POLLA, A.S.; POLLA, L.L.; POLLA, B.S. Iron as the malignant spirit in successful ageing. **Ageing Res. Rev.** v. 2, p. 25-37, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. **The Lancet Infect. Dis.** v. 1, p. 92-100, 2001.

PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annu. Rev. Physiol.** v. 48, p. 657-667, 1986.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. **Free Radic. Biol. Med.** v. 28, p. 141-164, 2000.

RABINOVICH, J.E.; WISNIVESKY-COLLI, C.; SOLARZ, N.D.; GURTNER, R.E. Probability of transmission of Chagas' disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. **Bull. World Health Org.** v. 68, p. 737-746, 1990.

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

RASSI JUNIOR, A.; MARIN-NETO, J. A. Cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Cardiol. Est. São Paulo.** v. 10, n. 4, p. 06-32. 2000.

RIEMERSMA, R. A.; CARRUTHERS, K. F.; ELTON, R. A.; FOX, K. A. Vitamin C and the risk of acute myocardial infection. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 71, p. 1181-1186, 2000.

RIMBACH, G.; MINIHANE, A. M.; MAJEWICZ, J. *et al.* Regulation of cell signalling by vitamin E. **Proc. Nutr. Soc.** v. 61, p. 415-425, 2002.

RIVERA, M. T.; DE SOUSA, A. P.; MORENO, A. H. M. *et al.* Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 66 (6), p. 706-712, 2002.

ROMAO, P. R.; FONSECA, S. G.; HOTHERSALL, J. S. *et al.* Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. **Parasitology.** v. 118, p. 559-566, 1999.

ROMERO, N.; DENICOLA, A.; RADU, R. Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 368, p. 23-30, 1999.

RHONE, D. P.; WHITE, F. M. Effects of storage in the cold on activity of gamma-glutamyltransferase in serum. **Clin. Chem.** v. 22, p. 103-104, 1976.

ROSE, G.; BLACKBURN, H.; GILLIUM, R. F.; PRINEAS, R. J. Cardiovascular survey methods. World Health Organization, Monograph Series nº 56, 1982.

ROSSI, M. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chaga's disease. **Circulation**. v. 82, p. 1900-1909, 1990.

SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infec. Imm.** v. 69, p.2252-2259, 2001.

SAGARA, Y.; DARGUSCH, R.; CHAMBERS, D. *et al.* Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** v. 24, p. 1375-1389, 1998.

SCANDALIOS, J. G. Introduction to oxyradicals. **Free Radic. Biol. Med.** v. 23, n. 3, p. 471-472. 1997.

SCHMUÑIS, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2 ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.1-15, 2000.

SCHNITTGER, I.; GORDON, E. P.; FITZGERALD, P. J.; POPP R. L. Standardized intracardiac measurements of two-dimensional echocardiography. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 2, p. 934-942, 1983.

SCHOKEN, D. D.; ARRIETA, M. L.; LEAVERTON, P. E.; ROSS, E. A. Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 20, p. 301-306, 1992.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. **Oxidative Stress**, Ed. Academic press, USA, p. 1-7, 1985.

SINCLAIR, A. J.; TAYLOR, P. B.; LUNEC, J. *et al.* Low plasma ascorbate levels in patients with type 2 diabetes mellitus consuming dietary vitamin C. **Diabet. Med.** v. 11, p. 893-898, 1994.

SINGH, U.; JIALAL, I. Anti-inflammatory effects of α -tocoferol. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1031, p. 195-203, 2004.

SOUSA, M. M.; FRANCO, M.; ALMEIDA, D. R. Comparative histopathology of endomyocardial biopsies in chagasic and non-chagasic heart transplant recipients. **J. Heart Lung Trans.** v. 20, p. 534-543, 2001.

SOUZA, M. F. C. G. Estudo da interação parasita-hospedeiro na doença de Chagas: análise da glicemia, produção de insulina, peptídeo C e enzimas antioxidantes (catalase e glutatona redutase). 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular). Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

STANER, S. A.; HUGHES, J.; KELLY, C. N. M.; BUTTRISS, J. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. **Pub. Health Nutr.** v. 7 (3), p. 407-422, 2003.

STARK, A. A.; RUSSEL, J. J.; LANGENBACH, R. *et al.* Localization of oxidative damage by a glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase system in preneoplastic

lesions in section of livers from carcinogen-treated rats. **Carcinogenesis**. v. 15, p. 343-348, 1994.

SUKKAR, S. G.; ROSSI, E. Oxidative stress and nutritional prevention in autoimmune rheumatic disease. **Autoim. Rev.** v. 3, p. 199-206, 2004.

SUTKEN, E.; INAL, M.; OZDEMIR, F. Effects of vitamin E and gemfibrozil on lipid profiles, lipid peroxidation and antioxidant status in the elderly and young hyperlipidemic subjects. **Saudi Med. J.** v. 27, n. 4, p. 453-459, 2006.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas' disease etiology: autoimmunity or parasite persistence. **Parasitol. Today**. v. 15, n. 3, p. 94-99, 1999.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.** v. 31, p. 550-554, 2001.

TEICHOLZ, L.E.; KREULEN, T. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlation in the present or absence of a synergy. **Am. J. Cardiol.** v. 37, p. 7-11, 1976.

VALEN, G.; YAN, Z.Q.; HANSSON, G.K. Nuclear factor kappa-B and the heart. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 38, p. 307-314, 2001.

VANDERHEYDEN, M.; BARTUNEK, J.; KNAAPEN, M. *et al.* Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine generation in heart failure. **J. Heart Lung Transpl.** v. 23, p. 723-728, 2004.

VEPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.** v. 62, p. 5177-5182, 1994.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SURIBABU, C. S.; SEKAR, B. *et al.* Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 59, n. 10, p. 1121-1128, 2005.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long-term follow-up. **Am. Heart J.** v. 127, p. 151-162, 1994.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment. **Ann. Int. Med.** v. 144, p. 724-734, 2006.

VOGEL, R. A.; BOLLING, S. F.; COSTELLO, R. B. *et al.* Integrating Complementary Medicine Into Cardiovascular Medicine. **J. Am. Col. Cardiol.** v. 46, n. 1, p. 184-221, 2005.

WEN, J. J.; GARG, N. Oxidative modifications of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. **Free Radic. Biol. Med.** v. 37, 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, p. 1821-1833, 2004.

WEN, J. J.; YACHELINI, P. C.; SEMBAJ, A. *et al.* Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. **Free Radic. Biol. Med.** v. *in press*, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas' disease.** WHO Tech. Rep. Ser. No. 811, WHO:Genova, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, site: www.who.int/health-topics/chagas.htm acessado em: 15/09/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, site: www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm acessado em: 25/01/2006.

XAVIER, S. S. Estudo longitudinal da morbi-mortalidade cardíaca da doença de Chagas em uma coorte de um grande centro urbano: análise clínica eletrocardiográfica, radiológica e ecocardiográfica de 604 casos. 1999. 181f. Tese. (Doutorado em Cardiologia). Programa de pós-graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

XAVIER, S. S.; SOUSA, A. S.; HASSLOCHER-MORENO, A. Aplicação da nova classificação da insuficiência cardíaca (ACC/AHA) na cardiopatia chagásica crônica: Análise crítica das curvas de sobrevida. **Rev. Socerj.** v. 18, p. 227-232, 2005.

XAVIER, S. S.; HASSLOCHER-MORENO A.; SOUSA, A. S. *et al.* Evaluación y manejo del paciente com cardiopatia chagásica. **Enf. Emerg.** v. *in press*, 2006.

YANG, Y.; CHENG, J.; SINGHAL, S. S. *et al.* Role of Glutathione S-Transferases in Protection against Lipid Peroxidation - overexpression of hGSTa2-2 in k562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits jnk and caspase 3 activation. **J. Biol. Chem.** v. 276, n. 22, p. 19220-19230, 2001.

YÜCEL, D.; AYDOGDU, S.; ÇEHRELI, S. *et al.* Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. **Clin. Chem.** v. 44, p. 44-51, 1998.

ZACKS, M. A.; WEN, J.; VYATKINA, G. *et al.* An overview of chagasic cardiomyopathy. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 77, n. 4, p. 695-715, 2005.

9 ANEXOS

Anexo 1 - PROGRAMA CARDIO/CHAGAS /HU-UFRJ

* IDENTIFICAÇÃO

01- Nome

.....

02- N° Prontuário

03- Data de Nascimento

04-Raça

(1) Negra (2) Outra

05- Sexo

(1) Masculino (2)Feminino

06-Naturalidade

.....

07-Data da Avaliação Inicial

08-Afastado da zona endêmica há.....anos

* SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

09-Diag. de Insuf. Cardíaca Esquerda (escore clínico maior ou igual a 3)

(1)-Sim (2)-Não

Dispnéia / dificuldade de respirar

-caminhando depressa no plano ou em aclive leve **1**

-em passo usual no plano **1**

-obrigado a parar por falta de ar, caminhando no plano, passo normal **2**

-obrigado a parar por falta de ar, ao caminhar 100m no plano **2**

Freqüência cardíaca 91 a 110 bpm **1**

mais de 111 bm **2**

Estertores nas bases pulmonares **1**

Estertores nas bases e ápices pulmonares **2**

Pressão venosa jugular aumentada isolada **1**

Pressão venosa jugular aumentada associada a edema **2**

Pressão venosa jugular aumentada associada a hepatomegalia **2**

Distensão dos vasos dos lobos superiores no Rx de Torax **1**

Edema intersticial pulmonar **2**

Edema intersticial pulmonar + derrame pleural **2**

10-Diag de Insuf. Card. Direita (PVC elevada + 2 e/ou 3)

1-Pressão venosa jugular aumentada isolada

2-Pressão venosa jugular aumentada associada a edema ou ascite

3-Pressão venosa jugular aumentada associada a hepatomegalia

11-Diag. de I C Biventricular (fadiga + PVC ↑ e/ou 1 e/ou 2 e/ou 3)

Presença de fadigabilidade e aumento da pressão venosa jugular associada a:

- 1-edema e/ou ascite
- 2-hepatomegalia
- 3-dispnéia e/ou estertores crepitantes

12-Diag. de Insuficiência Cardíaca Biventricular predominio a Direita

13-Diag. de Insuficiência Cardíaca Biventricular predominio a Esquerda

14-Diag. de Hipoatividade simpática

-ausência de ansiedade, ausência de transpiração, bradicardia, hipotensão

15-Diag. de Hiperatividade simpática

-taquicardia, sudorese, palidez cutâneo-mucosa, pele fria, não-hipotensão

16-Arritmias Cardíacas (presença de uma ou mais resposta positiva)

-*Palpitação*

Você sente ocasionalmente batadeira no coração, mesmo sem estar cansado, em repouso e sem estar nervoso?

-*Pré-síncope*

Você já teve algum desmaio súbito e momentâneo sem perda da consciência e do tônus postural seguido de recuperação espontânea sem seqüelas neurológicas?

-*Síncope*

Você já teve alguma perda súbita e momentânea da consciência e do tônus postural seguido de recuperação espontânea sem seqüelas neurológicas?

-*Morte Súbita Ressuscitada*

Você já teve alguma perda súbita e momentânea da consciência e do tônus postural que necessitou de manobras de ressuscitação?

17-Diagnóstico de Disfunção do Nódulo Sinusal (qualquer um destes)

-*Bradicardia Sinusal persistente e inapropriada*

-*Pausas sinusais prolongadas*

-*Bloqueio sinoatrial*

-*Ritmo juncional de escape*

-*Síndrome taqui-bradicardia*

18-Morte Súbita Ressuscitada (ver definição acima + a presença de uma ou mais resposta positiva)

1-Morte Súbita como primeira manifestação de cardiopatia

2-Portadores de Taquicardia Ventricular Sustentada Recorrente

3-Portadores de ICC que tem a Morte Súbita como evento final

19-Diagnóstico de Embolia Sistêmica ou Pulmonar

20-Diagnóstico de AVC

Presença de inconsciência fugaz associada a sinais neurológicos focais mesmo que transitórios e de curta duração (afasias, paralisias ou parestesias, etc.)

21-Dor torácica

1-Angina Típica: Todas as respostas positivas

2-Angina Atípica : 2 das 3 respostas positivas

3-Dor Não Anginosa: 1 resposta só positiva

-desconforto torácico é sub-esternal e de curta duração ?

-sintomas são previsíveis ?

-sintomas aliviam dentro de 30 minutos após repouso ou nitrato sub-lingual?

22-Comprometimento Digestivo (presença de uma ou mais resposta positiva)

-Odinofagia / Disfagia / soluço

Você sente dor ou dificuldade para engolir alimentos ou soluços?

-Regurgitação

Você costuma trazer de volta para a boca o alimento depois de engolido?

-Tosse

Você costuma tossir muito à noite?

-Constipação

Como é o funcionamento do seu intestino, diariamente, uma a cada 2 dias ou mais de 2 dias sem?

-Sialose

Você costuma ter salivação excessiva principalmente durante alimentação?

-Meteorismo

Presença incômoda de gases/plenitude e/ou distensão abdominal

-Disquezia

Você tem dificuldade para evacuar (sensação de ânus estreitado)

-Dores no Abdome

* HÁBITOS

23-Diagnóstico de Tabagismo

1-Nunca Fumou

2-Fumante (1 ou mais maço/dia)

3-Ex-fumante (não fuma nos últimos 6 meses)

4-Eventualmente

24-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

25-Você atualmente pratica alguma atividade física regular de duração de 20 min por 3 vezes na semana?

26-Você está trabalhando atualmente ?

(1)-Sim (2)-dona de casa (3)-estudante (4)-aposentado
(5)-incapacitado (6)-afastado (em benefício) (7)-desempregado

27-Seu grau de atividade física no trabalho é

(1) leve (2) moderado (3) pesado (4) Não se aplica

28- Você esta fazendo algum tipo de dieta ?

(1)-Sim , com restrição ao sal (2)-Sim , para emagrecer
(3)-Sim , 1+2 (4)-Sim , vegetariana (5)-Sim , de outro tipo
(6)-Não , mas já fez dieta (7)- Nunca fez dieta

* HISTÓRIA DE RESIDÊNCIA

29- Número de Locais de residência

Pergunte sobre os locais de residência desde o nascimento

30-Você já morou em casa com: telhado de palha ou palmeira, chão de terra batida e paredes de barro? (ou similar)

(1) Sim no Rio; (2) Sim em outro estado; (3) Se (1)+(2); (4) Não

* ESCOLARIDADE

31-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

* HISTÓRIA FAMILIAR

32-Familiares que você tem ou teve com :

(1)-Doença do Coração (2)-Acidente Vascular Cerebral

(3)-Dilatação do esofago/ intestino (4)-Alcoolismo (5)-Se 1+2 (6)-Se1+3

(7)-Se 1+4 (8)-Se 2+3 (9)-Se 2+4 (10)-Se 3+4 (11)-Se 1+2+3 (12)-Se

1+2+4 (13)- Se Outra-especifique (14)

33-Na sua família alguém morreu de :

(1)-Doença do Coração (2)-Morte súbita (3)-Derrame (4)-Doença mal

definida (5)-Tem alguém na sua família com marcapasso ?

34-Quantas vezes você recebeu transfusão de sangue ?

(1) Nunca (2) < de 5 (3) > de 5

35-Você se lembra de já ter tido alguma doença depois de uma transfusão de sangue ?

(1)-Não se aplica (2)-Não teve (3)-Hepatite (4)-Doença de Chagas
(5)-HIV (6)-Sífilis (7)-Outra

* MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

36-Peso kg 41 -Altura..... cm

37-Índice de massa corporal (peso/altura²)

(1)-Peso normal (2)-Sobrepeso (3)-Obeso

38-Relação cintura/quadril

39-Pressão arterial sistólica 1a..... mmHg
 “ “ diastólica 1a..... mmHg
 “ “ sistólica 2a..... mmHg
 “ “ diastólica 2a..... mmHg

40-Pressão de pulso

* EXAME FÍSICO

(1) Sim (2) Não

41-Ritmo Cardíaco (ausculta durante 1 min)

(1)-regular (2)-extrasist < 10/min (3)-extrasist > 10/min
(4)-irregular (5)-presença de amplo desdobramento de B₂

42-Sopros regurgitante Mitral e/ou Tricúspideo

* AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

(1) Sim (2) Não

43-Cardiomegalia: Presença dos parâmetros 1+2 ou somente 3 ou 4

1-Índice cardio-torácico $\geq 0,50$

2-Volume cardíaco no homem ≥ 550 e na mulher ≥ 500
ou

3-Índice do diâmetro diastólico final de VE ≥ 34 mm

4-Índice do diâmetro do atrio esquerdo ≥ 25 mm

44-Normal

45-Compatível com ICC

*ALTERAÇÕES NO ECG DE REPOUSO CONVENCIONAL

(1)-Sim (2)-Não

46-Normal

47-BAV 1º grau+Alt de ST-T

48-BRE

49-Área Eletricamente Inativa	<input type="checkbox"/>
50-BRD	<input type="checkbox"/>
51-HBAE	<input type="checkbox"/>
52-Distúrbio condução AV (2 e/ou 3 grau)	<input type="checkbox"/>
53-Bradycardia sinusal	<input type="checkbox"/>
54-Extra-SístolesVentriculares	<input type="checkbox"/>
55-Fibrilação Atrial	<input type="checkbox"/>
56-Sobrecarga Ventricular esquerda	<input type="checkbox"/>
57-Duas alterações eletrocardiográficas no mesmo traçado	<input type="checkbox"/>
58-Três alterações eletrocardiográficas no mesmo traçado	<input type="checkbox"/>

* MONITORIZAÇÃO CONTÍNUA DO ECG DURANTE EXERCÍCIO

(1)-Surgiu (2)-Ausente (3)-Aumentou (4)-Diminuiu (5)-Mantida

59-Ext Vent Polimórfica	<input type="checkbox"/>
60-Ext Vent Pareada	<input type="checkbox"/>
61-Taqui Vent Monomórfica Não Sustentada	<input type="checkbox"/>
62-Bigeminismo Ventricular	<input type="checkbox"/>

*ELETROCARDIOGRAFIA DINÂMICA (HOLTER)

63-Total de batimentos analisados	<input type="checkbox"/>					
64-Total de batimentos não analisados	<input type="checkbox"/>					
65-Minutos analisados	<input type="checkbox"/>					
66-Numero Total de Ext. Vent.	<input type="checkbox"/>					
67-Numero de Ext. Vent. por hora	<input type="checkbox"/>					
68-Numero de Ext. Vent. pareadas.....	<input type="checkbox"/>					
69-Numero de Taquicardia Ventriculares.....	<input type="checkbox"/>					
70-Taqui Ventr-FC Mínima	<input type="checkbox"/>					
71-Taqui Ventr-FC Máxima	<input type="checkbox"/>					
72-Taqui Ventr-FC Mais longa (>5 bts).....	<input type="checkbox"/>					
73-Numero Total de Ext. Supra-Vent	<input type="checkbox"/>					
74-Numero de TPSV	<input type="checkbox"/>					
75-TPSV-FC Máxima	<input type="checkbox"/>					
76-FC Média	<input type="checkbox"/>					
77-FC Mínima	<input type="checkbox"/>					
78-FC Máxima	<input type="checkbox"/>					
79-Bloqueio sinoatrial	<input type="checkbox"/>					
80-Pausa sinusal	<input type="checkbox"/>					
81-Bloqueio AV 2º grau Mobitz Tipo 1	<input type="checkbox"/>					
82-Bloqueio AV 2º grau Mobitz Tipo 2	<input type="checkbox"/>					

* ECOCARDIOGRAMA Bi-Doppler

(1)-Sim (2)-Não

83-Normal	<input type="checkbox"/>
84-Déficit segmentar localizado	<input type="checkbox"/>
85-Déficit segmentar difuso	<input type="checkbox"/>

86-Disfunção sistólica de VE leve	<input type="checkbox"/>
87-Disfunção sistólica de VE moderada	<input type="checkbox"/>
88-Disfunção sistólica de VE grave	<input type="checkbox"/>
89-Regurgitação Mitral	<input type="checkbox"/>
90-Regurgitação Trícuspide	<input type="checkbox"/>
91-Aneurisma Apical	<input type="checkbox"/>
92-Hipertrofia concêntrica	<input type="checkbox"/>
93-Disfunção Diastólica	<input type="checkbox"/>
(1)-Ausente (2)-Padrão de déficit de relaxamento	
(3)-Padrão Restritivo (4)-Padrão Pseudo-normalização	
94-Variabilidade R-R	<input type="checkbox"/>
(1) Baixa (2) Alta	
95-Índices Parassimpáticos	<input type="checkbox"/>
(1) Normais (2) Alterados	
96-Arco Reflexo Baroreceptores (Tilt)	<input type="checkbox"/>
(1) Integros (2) Exarcebados (3) Paradoxal	
97-Cintilografia Miocárdica marcada com leucócitos	<input type="checkbox"/>
(1) Normal (2) Anormal (3) Não Fez	
98-Cintilografia Miocárdica com MIBG	<input type="checkbox"/>
(1) Normal (2) Anormal (3) Não Fez	
99-Eletrocardiograma de Alta Resolução	<input type="checkbox"/>
(1) Normal (2) Anormal (3) Não Fez	
100-Estudo Eletrofisiológico	<input type="checkbox"/>
(1) Normal (2) Anormal	
 *MEDICAMENTOS	
(1)-Sim (2)-Não	
101-Diurético	<input type="checkbox"/>
102-Digital	<input type="checkbox"/>
103-Vasodilatador	<input type="checkbox"/>
104-Espironactona	<input type="checkbox"/>
105-Anticoagulante Oral	<input type="checkbox"/>
106-Antiarrítmico	<input type="checkbox"/>
107-Beta bloqueador	<input type="checkbox"/>
108-Reabilitação Cardíaca	<input type="checkbox"/>
 * Doenças Associadas Cardíacas	
(1)-Sim (2)-Não	
109-Cardiopatía Isquêmica	<input type="checkbox"/>
110-Cardiopatía Hipertensiva	<input type="checkbox"/>
111-Marca-passo	<input type="checkbox"/>
112-Cardio/desfibrilador	<input type="checkbox"/>
113-Valvopatias	<input type="checkbox"/>
114-Cardiopatía Dilatada Não Chagas	<input type="checkbox"/>
115-Cardiopatía Congênita	<input type="checkbox"/>
 * Doenças Associadas Não Cardíacas	
116-Diabetes	<input type="checkbox"/>

117-Disfunção Tireoidiana	<input type="checkbox"/>
118-Disfunção Respiratória	<input type="checkbox"/>
119-Doença péptica	<input type="checkbox"/>
120-Nefropatia	<input type="checkbox"/>
121-Neoplasias	<input type="checkbox"/>
122-Dislipidemia	<input type="checkbox"/>

* EXAMES LABORATORIAIS :

123-Hematócrito (%)	<input type="checkbox"/>
124-Sódio (mEq/l)	<input type="checkbox"/>
125-Glicose(mEq/l)	<input type="checkbox"/>
126-Creatinina (mEq/l)	<input type="checkbox"/>
127-Colesterol Total (mEq/l)	<input type="checkbox"/>
128-HDL-Colesterol	<input type="checkbox"/>
129-LDL-Colesterol	<input type="checkbox"/>
130-Triglicérideo	<input type="checkbox"/>
131-Albuminas	<input type="checkbox"/>
132-Globulinas	<input type="checkbox"/>

133- Via de infecção	<input type="checkbox"/>
(1)-Natural (2)-Transusão (3)-Congênita (4)-Laboratório (5)-Outros	
134-Diagnóstico laboratorial	<input type="checkbox"/>
(1)-Imunofluorescência (2)-Hemaglutinação (3)-Elisa (4) Se 1+2 (5) Se 1+3 (6) Se 2+3	

* IMPRESSÃO FINAL

(1)-Sim (2)-Não

135-Cardiopatía Chagásica Dilatada	<input type="checkbox"/>
136-Cardiopatía Chagásica Não-Dilatada	<input type="checkbox"/>
137-Esôfagopatía	<input type="checkbox"/>
138-Colopatía	<input type="checkbox"/>

139-Forma Clínica	<input type="checkbox"/>
1-Crônica Indeterminada	
2-Cardiopatía Crônica sem ICC (Disfunção de VE)	
3-Cardiopatía Crônica com ICC	

140-Classificação de Los Andes (estádio evolutivo)	<input type="checkbox"/>
--	--------------------------

- 1- Grupo IA
- 2- Grupo IB
- 3- Grupo II
- 4- Grupo III

Comentários:

Anexo 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Determinação do estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica após terapêutica antioxidante

Instituição: Hospital Universitário C.F.F-UFRJ-Serviço de Cardiologia

Investigador: Dr. Roberto Coury Pedrosa (Inscrição no CRM n° 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 outros tratamentos que você poderá utilizar, bem como, 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 avaliar se você que recebeu a terapia antioxidante (Suplementação de vitaminas E e C) ao final de 6 meses de acompanhamento terá uma atenuação ou retardo do estresse oxidativo (relação entre o dano no seu coração e as suas defesas antioxidantes).

Desenho do estudo/duração/número de pacientes

Esse estudo caracteriza-se por ser um estudo clínico, prospectivo, aberto (tanto seu médico quanto você terão conhecimento sobre qual tratamento você estará tomando). 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. Podemos antecipar que aproximadamente 40 pacientes irão participar deste estudo.

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 é elegível para entrar nesse 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 termo de consentimento antes que qualquer teste específico do estudo possa ser realizado. O seu médico precisará obter uma amostra de sangue antes de iniciar o tratamento, outra no meio do tratamento e finalmente uma terceira amostra ao final do tratamento, ou seja, ao final de 6 meses. 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.

Na visita de avaliação inicial, serão coletadas aproximadamente três colheres de sopa de sangue de uma de suas veias para realizar os testes de laboratório. 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 em nitrogênio líquido e usado 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.

Durante os 7 dias anteriores à tomada da sua primeira dose do tratamento do estudo, uma avaliação de sua saúde será realizada, incluindo exame físico como também uma análise do seu estado geral. 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. Também será solicitado que você responda uma série de perguntas relacionadas à sua saúde e ao seu bem-estar global.

Tratamento

Caso você se qualifique para o estudo e concorde em participar, você receberá o seguinte tratamento: vitamina E 800UI/dia + vitamina C 500mg/dia, tomada única, por 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 a vitamina C ou sobre a vitamina E fornecida a você. Você deve tomar as doses da 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

No final de 3 meses será coletado amostras de seu sangue, para monitorar sua contagem de células sanguíneas. Aproximadamente uma colher de sopa de sangue será coletada de uma de suas veias. Nesta data, você também terá uma consulta com seu médico de estudo. Após esta coleta de sangue, você terá uma nova coleta de sangue ao final de 6 meses para monitorar sua contagem sanguínea e verificar seu status oxidativo (relação dano no seu coração/suas defesas antioxidantes. Nesta data você também será avaliado clinicamente pelo seu médico do estudo (Dr Roberto Coury Pedrosa). O seu médico do estudo pode solicitar testes de sangue adicionais, a qualquer momento, se ele achar que é necessário.

A partir do dia de sua primeira dose de medicação do estudo, você terá visitas programadas a cada 2 meses enquanto estiver participando do estudo.

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, 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 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 alguns dos efeitos colaterais observados foram: 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, 800UI/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 si sentir mal ou desenvolver infecção no local da punção da agulha. È 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/controle da natalidade

Por não se ter muitas informações sobre os efeitos 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 contatar seu médico de 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 2562-2436.

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