



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PGFAR

CARINE MUNIZ RIBEIRO

**Efeito do Tratamento do Benzonidazol e da Terapia Antioxidante na
Cardiopatia Chagásica Crônica**

Florianópolis
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PGFAR

CARINE MUNIZ RIBEIRO

**Efeito do Tratamento do Benzonidazol e da Terapia Antioxidante na
Cardiopatia Chagásica Crônica**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Farmácia.

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

Florianópolis
2009

Dedicatória:

À Deus por me dar força para superar obstáculos e proporcionar momentos de aprendizado e crescimento profissional.

Ao meu marido Fernando pelo carinho, compreensão e paciência nos momentos difíceis. Meu companheiro que foi fundamental por essa conquista.

Aos meus pais pelo apoio e carinho e principalmente pelo exemplo de vida.

Agradecimentos

- À Deus por me ajudar em momentos de dificuldade, além de me permitir essa oportunidade de estudar e concluir o curso tão almejado.
- Ao meu marido Fernando pela imensa paciência durante esses dois anos e por me apoiar e ajudar nos momentos em que mais precisei de auxílio. Por ser meu companheiro, meu incentivador, meu conselheiro e minha alegria sempre. Essa conquista também é sua.
- Aos meus pais, pelo carinho e apoio durante as fases de dificuldades. Por serem a minha principal fonte de inspiração e os principais responsáveis por todos os meus objetivos até hoje alcançados.
- Às minhas amigas e companheiras de laboratório Patrícia Budni e Mirele Sifroni Farias pelos momentos bons e ruins, preocupações, alegrias, dúvidas, confidências, enfim, obrigado pela amizade e companheirismo. Fica desde já uma saudade grande dos momentos que passamos e enfrentamos juntas.
- Ao ex “gerente” do laboratório Eduardo Parisotto (Bene) que me ajudou muito nas análises, sendo fundamental nos resultados desse trabalho. Pela disposição em ajudar, além de ser um grande parceiro de bancada.
- Ao Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho pela orientação, amizade, confiança e compreensão. Por todos os ensinamentos fundamentais na formação de um pesquisador e por ter aberto as portas para essa oportunidade de aprendizagem dentro do seu laboratório.
- Ao Prof. Dr. Roberto Coury Pedrosa, por ter coordenado tão competentemente a parte clínica do estudo, além de passar seu grandioso conhecimento sobre a área médica, mais especificamente sobre a cardiopatia chagásica.
- Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo que me proporcionou a oportunidade de realizar algumas análises em seu laboratório de Bioquímica na USP-SP.
- Ao doutorando Eduardo Dalmarco e a Prof. Dra. Tânia Fröde pela colaboração com a análise dos marcadores inflamatórios realizados nesse estudo.
- Ao grupo EMS Sigma Pharma que nos forneceu gentilmente as vitaminas para a suplementação, fundamental para o desenvolvimento do estudo.
- Às bolsistas do laboratório de Ecofisiologia Respiratória (Ana, Débora e Thaís), que também contribuíram para o desenvolvimento das análises.
- Enfim, a todos que de alguma maneira participaram direta ou indiretamente da realização desse estudo.

Resumo

Existem evidências sugerindo que o coração de pacientes chagásicos crônicos está exposto ao estresse oxidativo, e que este fator contribui para a progressão da doença. O benzonidazol (BZN) é a única terapia etiológica disponível no Brasil, sendo que seu mecanismo de ação reside na modificação covalente de macromoléculas do parasita através de espécies reativas geradas durante seu metabolismo nitroreductor. Entretanto, além do mecanismo tripanocida, seu metabolismo pode acarretar efeitos oxidativos deletérios ao hospedeiro. O presente projeto é uma seqüência de estudos anteriores, realizado nos mesmos pacientes chagásicos crônicos, os quais demonstraram um aumento do estresse oxidativo proporcional ao grau de severidade da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2007), o qual foi atenuado através da suplementação com vitaminas E e C (MAÇAO *et al.*, 2007). Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação antioxidante com vitamina E (800 UI/dia) e vitamina C (500 mg/dia), após a terapia com BZN durante 2 meses (5 mg/Kg/dia), com o intuito de minimizar os efeitos deletérios que essa terapia ocasiona no hospedeiro. Os pacientes foram classificados e divididos em quatro grupos, de acordo com a classificação clínica e hemodinâmica de Los Andes modificada, em grupos IA (n=10); IB (n=20); II (n=7) e III (n=4). As atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase (GST) e glutathione reductase (GR), além dos conteúdos de glutathione reduzida (GSH), vitaminas E e C, os marcadores de estresse oxidativo, como as substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonilada (PC), e os marcadores inflamatórios adenosina deaminase (ADA), mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (NO), foram determinados no sangue dos pacientes, antes e após a terapia com BZN, e após a suplementação com a terapia antioxidante. Comparações entre os 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, antes e após alguma intervenção, admitindo um nível mínimo de significância de $p < 0,05$. Os resultados revelaram que após dois meses de tratamento com BZN, as atividades das enzimas antioxidantes: GPx aumentaram em todos os grupos IA ($p=0,0004$), IB ($p < 0,0001$), II ($p=0,0087$) e III ($p=0,0008$); da enzima SOD nos grupos IA ($p < 0,0001$), IB ($p=0,0007$) e II ($p=0,0087$), CAT (IA ($p=0,0390$), IB ($p=0,0001$) e II ($p=0,0068$) e

GST nos grupos IA ($p < 0,0001$), IB ($p < 0,0001$), II ($p = 0,0090$), foram aumentadas em todos os grupos, exceto no grupo III; e os níveis de PC foram elevados nos grupos IA ($p = 0,0046$), IB ($p = 0,0025$) e II ($p = 0,0041$), novamente exceto o grupo III, além da depleção de vitamina E nos grupos IA ($p = 0,0057$), IB ($p = 0,0137$) e II ($p = 0,0230$). Após a suplementação antioxidante, a atividade da SOD nos grupos IA ($p < 0,0001$); IB ($p < 0,0001$); II ($p = 0,0002$); da GPx nos grupos IA ($p = 0,0064$), IB ($p = 0,0003$), II ($p < 0,0001$) e III ($p = 0,0108$) e da GR nos grupos IA ($p = 0,0395$) e IB ($p = 0,0345$) foram diminuídas; os conteúdos de PC nos grupos IA ($p = 0,0034$), IB ($p = 0,0003$) e II ($p = 0,0014$); TBARS nos grupos IA ($p < 0,0001$), IB ($p = 0,0007$), II ($p = 0,0011$) e III ($p = 0,0341$); NO nos grupos IA ($p = 0,0443$), IB ($p = 0,0214$) e II ($p = 0,0402$); ADA nos grupos IA ($p = 0,0113$) e IB ($p = 0,0022$); e GSH nos grupos IA ($p = 0,0002$), IB ($p = 0,0006$), II ($p = 0,0211$) foram diminuídos, enquanto que os níveis de vitamina E foram aumentados nos grupos IA ($p = 0,0006$), IB ($p = 0,0118$) e II ($p = 0,0061$). Em resumo, o tratamento com BZN promoveu um insulto oxidativo em pacientes chagásicos crônicos demonstrado através dos aumentos das atividades de enzimas antioxidantes, aumentos dos níveis de PC e depleções de vitamina E, os quais foram atenuados através da suplementação antioxidante com vitaminas E e C durante seis meses, demonstrado pela diminuição das atividades das enzimas SOD, GPx e GR, menores níveis de PC, além de restaurar e aumentar os níveis de vitamina E. Além disso, a suplementação também diminuiu os níveis de TBARS e marcadores inflamatórios (NO e ADA) nos estágios com menor comprometimento cardíaco.

Palavras-chave: cardiopatia chagásica crônica, benzonidazol, estresse oxidativo, suplementação antioxidante

Abstract

Effect of benznidazole treatment and antioxidant therapy in chagasic chronic cardiopathy

There is evidence to suggest that chagasic myocardial patients are exposed to oxidative stress that contributes to the disease progression. Benznidazole (BZN) is the only etiologic treatment available in Brazil and its action involves the covalent modification of parasite macromolecules by reactive species generated during the nitroreductor drug metabolism. However, beside to its tripanocide mechanism, its metabolism generates deleterious oxidative effects in the host. The present study is a sequence of related publications on the same subjects, who showed an increased oxidative stress associated with the severity of the disease (OLIVEIRA *et al.*, 2007), which was attenuated by supplementation of vitamins E and C (MAÇAO *et al.*, 2007). The objective of the present study was to evaluate the effect of antioxidant supplementation with vitamins E (800 UI/day) and C (500 mg/day) during six months, after BZN therapy (5 mg/Kg/day) during two months, in order to minimize the deleterious effects that this therapy promotes in the host. Patients were classified and divided according to the modified Los Andes clinical hemodynamic classification, in groups IA (n=10), IB (n=20), II (n=7) and III (n=4). The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR), as well as the contents of reduced glutathione (GSH), vitamin E and C, biomarkers of oxidative stress such as thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyls (PC), and the inflammatory markers myeloperoxidase (MPO), nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) and adenosine deaminase (ADA), were all determined in the blood of patients. Comparisons among the different chagasic groups were carried out by ANOVA, with *post hoc* analysis using the Tukey test, and the Student *t*-test was used to compare each chagasic group before and after the treatments. The results revealed that after two months of BZN treatment the antioxidant enzymes activities of GPx were enhanced in all groups: IA (p=0.0004), IB (p<0.0001), II (p=0.0087) and III (p=0.0008); the enzymes SOD in groups IA (p<0.0001), IB (p=0.0007) and II (p=0.0087), CAT IA (p=0.0390), IB (p=0.0001) and II (p=0.0068) and GST IA (p<0.0001), IB (p<0.0001) and II (p=0.0090) were enhanced in all groups, except in group III; PC levels were elevated in all groups, IA (p=0.0046), IB (p=0.0025) and II (p=0.0041), except in group III;

vitamin E contents were decreased in groups IA ($p=0.0057$), IB ($p=0.0137$) and II ($p=0.0230$). After supplementation, the activities of SOD in groups IA ($p<0.0001$); IB ($p<0.0001$) and II ($p=0.0002$); GPx in groups IA ($p=0.0064$), IB ($p=0.0003$), II ($p<0.0001$) and III ($p=0.0108$); GR in groups IA ($p=0.0395$) and IB ($p=0.0345$) were decreased. The contents of PC were decreased in groups IA ($p=0.0034$), IB ($p=0.0003$) and II ($p=0.0014$); TBARS in groups IA ($p<0.0001$), IB ($p=0.0007$), II ($p=0.0011$) and III ($p=0.0341$); NO in groups IA ($p=0.0443$), IB ($p=0.0214$) and II ($p=0.0402$); ADA in groups IA ($p=0.0113$) and IB ($p=0.0022$); and GSH levels were decreased in groups IA ($p=0.0002$), IB ($p=0.0006$) and II ($p=0.0211$), while vitamin E levels were enhanced in groups IA ($p=0.0006$), IB ($p=0.0118$) and II ($p=0.0061$). In conclusion, BZN treatment promoted an oxidative insult in chronic chagasic patients with cardiopathy demonstrated through enzymatic activity enhancements of antioxidant enzymes, increased PC and decreased levels of vitamin E contents, which were all attenuated by the antioxidant supplementation with vitamins E and C, evident by the decreased activities of SOD, GPx and GR, lowered levels of PC and restoring of vitamin E levels. In addition, the antioxidant supplementation also decreased TBARS levels and inflammatory markers such as *NO and ADA, mainly at stages with lower cardiac commitment.

Key words: chronic chagasic cardiopathy, benznidazole, oxidative stress, antioxidant supplementation

Sumário

Resumo	V
Abstract.....	VII
Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	XIV
1.Introdução.....	16
1.1. Doença de Chagas.....	16
1.1.1. Considerações Gerais	16
1.1.2. Agente Etiológico e Formas de Transmissão	16
1.1.3. Formas Clínicas.....	17
1.2.Cardiopatia Chagásica Crônica	18
1.2.1. Hipótese da Auto Imunidade	19
1.2.2. Hipótese da Persistência do Parasito.....	20
1.2.3. Hipótese neurogênica	20
1.2.4. Hipótese de Alterações Microvasculares	20
1.2.5. Classificação Clínica.....	21
1.2.6. Tratamento Etiológico - Benzonidazol	22
1.2.6.1. O tratamento com benzonidazol na fase crônica	22
1.2.6.2. Farmacocinética	23
1.2.6.3. Mecanismo de ação	23
1.2.6.4. Efeitos adversos e toxicidade.....	25
1.3.Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs).....	25
1.4.Antioxidantes.....	27
1.4.1. Antioxidantes Enzimáticos	27
1.4.2. Antioxidantes Não Enzimáticos.....	28
1.4.3 Antioxidantes Nutricionais	29
1.5.Estresse Oxidativo	30
1.5.1. Dano ao DNA	30
1.5.2. Dano protéico	30
1.5.3. Dano lipídico	31
1.6.O Estresse Oxidativo na Cardiopatia Chagásica Crônica	32
1.6.1. Estresse Oxidativo e Disfunção Mitocôndrial	32
1.6.2. Estresse Oxidativo e Processo Inflamatório.....	33
1.6.3. Diminuição das Defesas Antioxidantes	33
2. Objetivos	35
2.1.Objetivo Geral.....	35
2.2.Objetivos Específicos	35
3. Casuística e Métodos	36

3.1. Delineamento do estudo	36
3.2. Seleção de Pacientes	36
3.2.1. Critérios de inclusão.....	36
3.2.2. Critérios de exclusão.....	37
3.2.3 Dados obtidos dos pacientes	38
3.2.4. Avaliação Clínica.....	39
3.2.5. Definições	39
3.2.6. Exames Adicionais.....	40
3.2.7. Acompanhamento Clínico	40
3.2.8. Estágios evolutivos na cardiopatia chagásica crônica.....	41
3.2.9. Acompanhamento durante o Tratamento e Coleta de Amostras	42
3.4. Considerações Éticas	44
3.5. Protocolo Experimental	44
3.6. Fármaco e Vitaminas	45
3.7. Interesse de conflitos	45
3.8. Equipamentos	45
3.9. Reagentes	46
3.10. Defesas Antioxidantes e Marcadores de Estresse Oxidativo	46
3.10.1. Defesas antioxidantes enzimáticas	46
3.10.1.1. Catalase (CAT)	46
3.10.1.2. Superóxido dismutase (SOD)	46
3.10.1.3. Glutaciona peroxidase (GP _x).....	47
3.10.1.4. Glutaciona redutase (GR).....	47
3.10.1.5. Glutaciona S-transferase (GST)	47
3.10.2. Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas	48
3.10.2.1. Glutaciona reduzida (GSH).....	48
3.10.2.2. Vitamina E	48
3.10.2.3. Vitamina C	49
3.10.3. Determinação dos marcadores de dano.....	49
3.10.3.1. Lipoperoxidação tecidual – TBARS	49
3.10.3.2. Proteína carbonilada.....	49
3.10.4. Determinação dos Marcadores Inflamatórios.....	50
3.10.4.1. Determinação de Adenosina Deaminase.....	50
3.10.4.2. Análise quantitativa do óxido nítrico (*NO).....	50
3.10.4.3. Determinação da Mieloperoxidase	51
3.11. Análise Estatística	51
4. Resultados	52
4.1. Característica da Amostra da População Estudada	52
4.3. Determinações das enzimas antioxidantes	54
4.3.1. Atividade da Glutaciona Peroxidase.....	54
4.3.2. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	55
4.3.3 Atividade da catalase (CAT).....	56
4.3.4. Atividade da Glutaciona Redutase (GR)	57
4.3.5. Atividade da Glutaciona Transferase (GST)	58
4.4. Determinações dos antioxidantes não enzimáticos e nutricionais	59
4.4.1. Concentrações de Pequenos Tióis Não Protéicos (GSH).....	59
4.4.3. Concentração de vitamina C	61

4.5.Determinação de marcadores de dano oxidativo.....	61
4.5.1. Lipoperoxidação Tecidual – Determinação de TBARS	61
4.5.2. Proteína Carbolinada (PC)	62
4.6.Determinação de Marcadores Inflamatórios	63
4.6.1. Atividade da Adenosina Deaminase (ADA).....	63
4.6.2. Concentração de Óxido Nítrico (•NO).....	64
4.6.3. Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	65
5. Discussão	67
6. Conclusões	77
7. Perspectivas.....	78
8. Referências	79
9. Anexos.....	94
Anexo 1 – Ficha de Dados do Paciente	94
Anexo 2 – Ficha de acompanhamento nutricional e físico do paciente..	100
Anexo 3 – Aprovação do Conselho de Ética.....	102
Anexo 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	103

Lista de Figuras

Figura	Página
01-Estrutura química do Benzonidazol	22
02- Regeneração do alfa-tocoferol pelo ácido ascórbico	29
03 - Fluxograma -fluxo dos participantes	44
04 - Atividade da GPx após o tratamento com BZN	54
05 - Atividade da GPx após a suplementação antioxidante	55
06 - Atividade da SOD após o tratamento com BZN	55
07 - Atividade da SOD após a suplementação antioxidante	56
08 - Atividade da CAT após o tratamento com BZN	56
09 - Atividade da CAT após a suplementação antioxidante	57
10 - Atividade da GR após o tratamento com BZN	57
11 - Atividade da GR após a suplementação antioxidante	58
12 - Atividade da GST após o tratamento com BZN	58
13 - Atividade da GST após a suplementação antioxidante	59
14 - Níveis de GSH após o tratamento com BZN	59
15 - Níveis de GSH após a suplementação antioxidante	60
16 - Níveis de Vitamina E após o tratamento com BZN	60
17 - Níveis de Vitamina E após a suplementação antioxidante	61
18 - Níveis de TBARS após o tratamento com BZN	62
19 - Níveis de TBARS após a suplementação antioxidante	62
20 - Níveis de PC após o tratamento com BZN	63
21 - Níveis de PC após a suplementação antioxidante	63
22 - Atividade de ADA após o tratamento com BZN	64
23 - Atividade de ADA após a suplementação antioxidante	64
24 - Níveis de NO após o tratamento com BZN	65
25 - Níveis de NO após a suplementação antioxidante	65
26 - Atividade de MPO após o tratamento com BZN	66
27 - Atividade de MPO após a suplementação antioxidante	66

Lista de Tabelas

Tabela	Página
01 -Características demográficas e laboratoriais dos pacientes	52
02 -Variáveis radiológicas, eletrocardiográficas e ecocardiográficas	53
Esquema	
01 -Mecanismo de ação do Benzonidazol	24

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA	Adenosina Deaminase
BZN	Benzonidazol
CAT	Catalase
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
DNPH	2,4-dinitro fenil hidrazina
ECG	Eletrocardiograma
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas do Nitrogênio
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
GST	Glutaciona Transferase
HPLC	Cromatografia Líquida de alta pressão
HOCl	Ácido hipocloroso
IC	Insuficiência Cardíaca
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
ICT	Índice cárdio-totácico
IFN- γ	Interferon gamma
IMC	Índice de massa corporal
LPO	Lipoperoxidação
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LO \cdot	Radicais alcóxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
4-HNE	4-hidroxi-2-noneal
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO \cdot	Óxido nítrico
iNOS	NO sintase
NOOO \cdot	Peroxinitrito
PC	Proteína Carbonilada

PKC	Proteína quinase C
$O_2^{\bullet-}$	Ânion Superóxido
$\bullet OH$	Radical hidroxil
1O_2	Oxigênio singlete
$ROO\bullet$	Radicais peroxil
SOD	Superóxido dismutase
α -TTP	Proteína hepática de transferência de α - tocoferol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF α	Fator de necrose tumoral

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

1.1.1. Considerações Gerais

A Doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo médico sanitário Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, durante as pesquisas realizadas em uma campanha contra a malária no Estado de Minas Gerais. Também denominada de Tripanossomíase Americana é uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano e está distribuída desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile (REY, 2001).

Segundo dados dos 21 países onde a doença é endêmica, cerca de 15 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasita, deixando cerca de um quarto da população da América Latina) de pessoas sob o risco de contaminação. A ocorrência de novos casos anuais é de cerca de 41.200 casos, com cerca de 12.500 mortes anuais decorrentes dessa enfermidade (VINHAES;DIAS,2000; GUHL,G.;LAZDINS-HELDS, 2006). Segundo dados epidemiológicos, a endemia teve uma diminuição desde o ano de 1990, porém, dentre as doenças tropicais de ocorrência nas Américas, ainda é a segunda patologia com maior frequência, sendo este, um dado considerado extremamente significativo. No Brasil, a doença está disseminada em 2.450 municípios, sendo que, a população infectada chega a 4,3% da população total, ou seja, aproximadamente 7 milhões, sendo que 60% presentes na área urbana (DIAS, 2000).

1.1.2. Agente Etiológico e Formas de Transmissão

O agente causal *Trypanossoma cruzi*, é um protozoário hemoflagelado da família: Tripanosomatidae, ordem: Kinetoplastida. A enfermidade é transmitida por insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros. Na luz do intestino médio do inseto vetor, o *T. cruzi* diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem. Os tripomastigotas metacíclicos invadem diversos tipos de células do hospedeiro, transformam-se em amastigotas, multiplicam-se e, após um período aproximado de quatro dias, se diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e

são liberados no meio extracelular. Esses tripomastigotas podem invadir células adjacentes ou cair na circulação sanguínea, onde serão ingeridos pelo inseto vetor durante a alimentação, mantendo o ciclo doméstico da doença, ou irão iniciar novos ciclos multiplicativos em outros tecidos. Em humanos, o parasita mostra preferência por células musculares e nervosas. Esse tropismo preferencial parece estar associado tanto a características intrínsecas das células invadidas, como também ao tipo de cepa do parasita (TANOWITZ *et al.*, 1992).

As formas habituais de transmissão humana são aquelas ligadas diretamente ao vetor, que ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do repasto sanguíneo, à transfusão de sangue, à via congênita, e mais recentemente, as que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados. Mecanismos menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos e pelo leite materno (GONTIJO; SANTOS, 2009).

1.1.3. Formas Clínicas

Na fase aguda da doença, os sinais clínicos são usualmente brandos e inespecíficos tais como: febre, mal estar, mialgia, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, miocardite e menos frequentemente meningoencefalite (PUNUKOLLU *et al.*, 2007). Nesta fase ocorre uma característica típica da doença, a inflamação no sítio da picada do inseto denominado de chagoma (pele) ou sinal de Romana (conjuntiva ou pálpebra), além da elevada concentração de parasitas na corrente sanguínea (GIORDANENGO *et al.*, 2002; ZACKS *et al.*, 2005).

A fase subsequente é denominada de indeterminada, a qual pode apresentar uma miocardite focal branda durante anos sem sinais de danos acumulativos ou apenas assintomática (ANDRADE, 1999). Cerca de 30% destes pacientes chagásicos desenvolvem sintomas da fase crônica da doença, caracterizada pela presença de miocardite ou distúrbios patológicos no sistema nervoso periférico e sistema gastrointestinal. As manifestações intestinais são aumento progressivo do esôfago ou cólon, causado por inflamação crônica e destruição de neurônios parassimpáticos (DIAS, 2006). Nos pacientes que desenvolvem os sintomas da fase crônica, há um decréscimo da expectativa de vida de aproximadamente nove anos (PRATA, 2001, BERN *et al.*, 2007).

1.2. Cardiopatia Chagásica Crônica

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a forma mais grave da doença e manifesta-se em cerca de 20 a 30% dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (SOARES *et al.*, 2001). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, a miocardite chagásica é a principal causa de morte por doenças do miocárdio na América Latina (DIAS, 1993; WHO, 2002; TDR, 2003). Apesar da incidência da doença de Chagas ter diminuído nas últimas duas décadas, a questão prioritária hoje está voltada para o contingente de pessoas já infectadas, do qual uma parcela importante irá desenvolver a cardiopatia chagásica crônica, maior determinante de gravidade da doença (DIAS, 1993, 2002; DIAS; SCHOFIELD, 2002; TDR, 2003; GUH *et al.*, 2007). Com isso, o foco dos estudos deveria ser direcionado para os pacientes crônicos e para o desenvolvimento das lesões que evoluem durante a fase indeterminada e crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

No Brasil estima-se de 3 a 5 milhões o número de pacientes chagásicos crônicos (TDR, 2003; DIAS, 2007). Acredita-se que 10% a 40% dos pacientes soropositivos apresentem alterações eletrocardiográficas compatíveis com a cardiopatia chagásica crônica (MARIN-NETO *et al.*, 1999; WHO, 2002; DIAS, 2002; TDR, 2003; DIAS, 2007) e, em algumas áreas, a prevalência dessa cardiopatia dentre os infectados pode chegar a 50% (MAGUIRE *et al.*, 1982; MOTA *et al.*, 1990). Para 2000, estimava-se que no Brasil existiam mais de 191.000 cardiopatas chagásicos, sendo que 19.100 com quadro grave (SCHMUNIS, 2000).

A história natural da cardiopatia chagásica na doença de Chagas inicia quando há uma destruição de fibras miocárdicas pelo processo inflamatório e a sua substituição por tecido fibroso atingem um limite crítico, obrigando os ventrículos a remodelar-se frente à perda gradativa dos elementos contráteis (GUIMARÃES, 1997). Uma inflamação crônica (miocardite) progressiva e fibrosante é o substrato morfológico fundamental dos mecanismos patogênicos responsáveis pela miocardite. Os três folhetos cardíacos e o sistema de condução ficam comprometidos na doença de Chagas (ANDRADE, 1999), sendo que, inúmeros achados na doença de Chagas experimental e humana sugerem o envolvimento de linfócitos T na formação da lesão chagásica, associado à presença do parasita e/ou seus antígenos (GUIMARÃES, 1997), sendo que, a atividade da adenosina deaminase (ADA) está relacionada com a proliferação e diferenciação linfocítica, sendo considerada um marcador de imunidade celular, já que está elevada em

doenças com uma resposta imune celular predominante. Logo, em se tratando de CCC, a atividade dessa enzima poderia ser um indicativo de progressão da doença, no que se refere à imunidade celular (EREL *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2007).

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

Embora a doença tenha sido intensamente estudada, tanto em seres humanos como em modelos animais, o mecanismo de patogênese da CCC ainda não é completamente elucidado (SOARES *et al.*, 2001). Sendo assim, surgiram hipóteses para explicar a patogenia da cardiopatia associada à doença de Chagas, porém, ainda que existam dados e argumentos suportando estas teorias, elas não são mutuamente excludentes e os mecanismos imunopatogênicos que as sustentam podem contribuir coletivamente para o quadro final da CCC (ZACKS *et al.*, 2005; VIEIRA, 2007).

1.2.1. Hipótese da Auto Imunidade

A gravidade das lesões cardíacas durante a fase crônica e a baixa concentração parasitária sanguínea e tecidual, levantou a possibilidade de que existam outros fatores além da resposta imune diretamente contra a infecção (DUTRA *et al.*, 2005).

Foi sugerido que há um mimetismo molecular, onde, o parasita apresenta epítomos similares aos componentes do hospedeiro, especialmente do tecido cardíaco, desencadeando uma produção de anticorpos e células efectoras com reatividade cruzada entre parasita e hospedeiro, sendo esse o mecanismo

responsável pelas lesões cardíacas (PEDROSA, 1998; ANDRADE, 1999; CUNHA-NETO *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 2005; MEDEI *et al.*, 2007; VIEIRA, 2007).

1.2.2. Hipótese da Persistência do Parasito

A ligação entre a persistência do parasito e os sítios inflamatórios da fase crônica é sustentada através de estudos que mostraram a presença de DNA do *T. cruzi* em amostras cardíacas de pacientes que tiveram CCC e a ausência de DNA em amostras de pacientes soropositivos que não tinham sinais de cardiopatia (TARLETON, 2001). Outros estudos também mostraram em pacientes que tiveram falência cardíaca e que foram submetidos ao transplante de coração, o desenvolvimento de miocardite no coração transplantado, com parasitas *T. cruzi* novamente detectados no sangue e tecidos, após a imunossupressão, com reativação da doença (BESTETTI *et al.*, 2004; FAVALORO *et al.*, 2006). Benvenuti e colaboradores (2008) mostraram em biópsias cardíacas de pacientes com CCC, que houve associação significativa entre persistência do parasita e alto grau de miocardite.

1.2.3. Hipótese neurogênica ou acometimento do sistema nervoso autônomo

A teoria neurogênica parte da premissa que na fase aguda da doença há um dano irreversível nos neurônios parassimpáticos e conseqüentemente, uma ativação excessiva permanente do sistema simpático, promovendo efeitos cardiotoxícos pelas catecolaminas, com progressão para o dano crônico e remodelamento cardíaco (DÁVILA *et al.*, 2002; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

1.2.4. Hipótese de Alterações Microvasculares

Segundo essa hipótese, é possível que alterações microvasculares que resultem de processos trombo-embólicos desempenhem papel relevante na gênese da doença. Segundo Higuchi e colaboradores (2003), as alterações microvasculares poderiam ser conseqüência da ação de substâncias vasodilatadoras como resultado do processo inflamatório ou da presença do parasito, levando a processos isquêmicos, ocasionando as lesões fibróticas (MARIN-NETO *et al.*, 2007).

1.2.5. Classificação Clínica

As manifestações cardíacas geralmente iniciam com alterações no sistema de condução, mais freqüentemente com bloqueio do ramo direito ou bloqueio fascicular anterior e anormalidades vasculares do segmento ventricular esquerdo. Posteriormente, manifestações tardias incluem extra sístoles complexas ventriculares e taquicardia ventriculares, disfunção e/ou doença do nodo sino atrial, alto grau de bloqueio cardíaco, fenômeno tromboembólico pulmonar e sistêmico devido à formação de trombos no ventrículo dilatado esquerdo ou aneurisma e, finalmente, a cardiomiopatia progressiva dilatada com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (BERN *et al.*, 2007). Essas anormalidades desencadeiam palpitações, pré síncope, síncope e alto risco de morte súbita (RASSI, 2007). Em vista desse polimorfismo clínico, vários esquemas de classificação são utilizados na América Latina para facilitar o manejo clínico desses pacientes, bem como para a avaliação prognóstica e terapêutica, sendo que, as mais importantes discriminam alterações no eletrocardiograma (ECG) e presença ou ausência de ICC (BERN *et al.*, 2007). A classificação adotada para o presente trabalho é a Classificação de Los Andes Modificada por Xavier (1999), a mesma classificação utilizada pelos trabalhos anteriores desenvolvidos com esses mesmos pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2007 MAÇAO *et al.*, 2007).

A classificação de Los Andes modificada por Xavier (1999) define estágios evolutivos de acometimento cardíaco na doença de Chagas, baseado na análise clínica, eletrocardiográfica e ecocardiográfica, conforme segue:

- Grau IA: infecção com ECG normal ou borderline, função ventricular normal ou apenas discretamente deprimida;
- Grau IB: infecção com ECG anormal e disfunção sistólica ventricular esquerda moderada;
- Grau II: infecção com ECG anormal e disfunção sistólica ventricular esquerda grave;
- Grau III: infecção com insuficiência cardíaca.

Nesta classificação, os pacientes com eletrocardiograma normal e os com evidências clínicas de insuficiência cardíaca (IC) são classificados nos grupos IA e III, 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 IA, em função de suas curvas de sobrevivência semelhantes. Os pacientes com disfunção moderada constituem o grupo IB, e aqueles com disfunção grave, o grupo II (XAVIER, 1999; BERN *et al.*, 2007).

1.2.6. Tratamento Etiológico - Benzonidazol

No Brasil, o Benzonidazol (BZN) é a única terapia atualmente disponível para o tratamento etiológico, que possui ação direta contra as formas tripomastigotas circulantes e amastigota intracelulares, sendo que sua eficácia varia em relação ao tempo e dose do medicamento, bem como a fase da doença (MARIN-NETTO *et al.*, 2008).

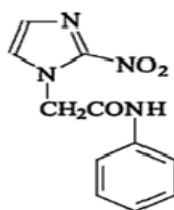


Figura 1: Estrutura química do Benzonidazol (BUSCHINI *et al.*, 2007)

1.2.6.1. O tratamento com benzonidazol na fase crônica da doença de Chagas

Na fase crônica, estudos experimentais em camundongos demonstraram que a terapia com BZN promoveu diminuição de alterações eletrocardiográficas, além de diminuir áreas de fibrose no tecido cardíaco em relação ao grupo controle (GARCIA *et al.*, 2005; BUSTAMANTE *et al.*, 2007). Viotti e colaboradores (2006) em ensaio terapêutico controlado em chagásicos, monitorados em média durante oito anos, demonstrou que o tratamento específico com BZN diminuiu o aparecimento de novas lesões eletrocardiográficas no grupo tratado em relação ao grupo controle, diminuindo também a frequência de pacientes com deterioração clínica cardíaca. Outro estudo demonstrou que após o tratamento com BZN, houve uma negatização de 88,8% das hemoculturas durante um período de dois anos, em pacientes com CCC, indicando seu efeito tripanocida nessa fase (CASTRO *et al.*, 2006).

1.2.6.2. Farmacocinética

O BZN é administrado por via oral, é rápida e quase completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, sua ligação a proteínas plasmáticas é da ordem de 44%, atingindo sua concentração máxima (2,22 a 2,8µg/ml) em 2 a 4 horas. Sua biotransformação é parcial, sendo que a principal forma encontrada no organismo é a sua forma inalterada; sua meia vida plasmática é de aproximadamente 12 horas, sendo excretado pela urina e fezes tanto na forma inalterada como de seus metabólitos (KOROLKOVAS, 1997).

1.2.6.3. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação específico do BZN ainda não é completamente elucidado, porém, vários estudos evidenciaram que o mecanismo consiste na redução do grupamento nitro, resultando na formação do radical nitroânion (esquema nº1), através do sistema NADPH citocromo P-450, e sua re-oxidação em menor proporção, resulta em formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (esquema nº2), os quais, podem fazer ligações covalentes com macromoléculas vitais do parasita e promover dano oxidativo ao *T. cruzi* (TEMPERTON *et al.*, 1998; PEDROSA *et al.*, 2001). Alguns estudos comparativos entre o BZN e o nifurtimox (NFX), um outro fármaco anti chagásico, mostraram que o NFX produz EROs em uma proporção muito maior que o BZN, através do processo de ciclização *redox* (*redox cycling*), o que, provavelmente justificaria a grande intensidade de efeitos colaterais relacionados à sua terapia, a qual não é mais utilizada em nosso país devido à sua alta toxicidade. Portanto, o principal mecanismo atribuído à ação do BZN seria a formação de derivados reativos intermediários, ou seja, a formação do radical nitroânion e compostos eletrofílicos (derivados nitroso e hidroxilamina) (esquemas nº 3 e 4), os quais, também são espécies tóxicas tanto para o parasita quanto para o hospedeiro. Desta forma a formação de EROs ocorreria em menor proporção como processo secundário ao processo de biotransformação via sistema citocromo P₄₅₀ (MORENO, 1982; DOCAMPO; MORENO, 1984; MAYA *et al.*, 2007). No entanto, a formação conjunta dessas espécies deletérias é responsável por danos celulares e geração de estresse oxidativo, tanto no parasita quanto no hospedeiro (PEDROSA *et al.*, 2001; HANEL; RAETHER, 2003).

1. $\text{RNO}_2 + \text{NADPH} \rightarrow \text{RNO}_2^\bullet + \text{H}^+$ (Geração do radical nitroânion, sendo que, o NADPH é o doador de elétrons)
2. $\text{RNO}_2^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{RNO}_2^- + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^\bullet$ (Geração de EROs \rightarrow processo secundário, em menor proporção)
3. $\text{RNO}_2^- + \text{RNO}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{RNO}_2 + \text{RNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (Geração de derivado nitroso)
4. $\text{RNO} + 2\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{RNHOH} + 2\text{NAD(P)}^+ \rightarrow \text{RNH}_2$ (Geração de amina correspondente: hidroxilamina)

Esquema 1: Mecanismo de ação do benzonidazol

Outro mecanismo atribuído ao BZN que vem sendo estudado, é a inibição da enzima NADH-fumarato redutase, a qual está presente no *T. cruzi* e catalisa a redução do fumarato gerando succinato. A atividade dessa enzima é importante no processo de geração de energia do parasita e também na eliminação de equivalentes redutores. Tem sido demonstrado que, na ausência de fumarato, essa enzima produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ e que a inibição incompleta da enzima pode transferir elétrons para reagir com oxigênio molecular e gerar EROs (TURRENS *et al.*, 1996; CHRISTMAS; TURRENS, 2000).

A sensibilidade dos parasitas às EROs freqüentemente depende de uma deficiência nas defesas bioquímicas contra o dano provocado pelas mesmas (LOCATELI *et al.*, 2004; TURRENS, 2004). Aparentemente, o *T. cruzi* apresenta baixos níveis de glutathiona reduzida e carece de catalase e glutathiona peroxidase, tornando o parasita extremamente vulnerável ao ataque das EROs, com capacidade limitada de detoxificar o peróxido de hidrogênio (BOVERIS *et al.*, 1980). A defesa antioxidante do *T. cruzi* é mediada pela enzima triptonina redutase, que é uma flavoenzima NADPH-dependente que cataliza a redução do antioxidante triptonina. Esse sistema é responsável por combater o estresse oxidativo intracelular do parasita. Além disso, vários estudos genéticos associaram essa enzima com fatores de virulência e de crescimento do parasita (JOCKERS-SCHERUBL *et al.*, 1989; CZECHOWICZ *et al.*, 2006).

Portanto, a interação destes metabólitos e espécies reativas com DNA, proteínas, lipídios e outros componentes celulares promovem seus efeitos quimioterapêuticos contra o *T. cruzi*, entretanto, tais mecanismos são responsáveis também pelos efeitos adversos que esta terapia pode acarretar no hospedeiro (PEDROSA *et al.* 2001; CASTRO *et al.*, 2006).

1.2.6.4. Efeitos adversos e toxicidade

As manifestações mais comuns incluem tremores, náuseas, vômitos, cefaléia, anorexia, perda de peso, eritema, depleção das células vermelhas, podendo até levar ao desenvolvimento de discrasia sanguínea, com quadros de leucopenia (STOPPANI, 1999).

Sua toxicidade foi comprovada em modelos experimentais, sendo mutagênico em bactérias e tóxicos para protozoários (GOIJMAN *et al.*, 1985; NAGEL, 1987), além de apresentar efeito clastogênico em macrófagos de animais (LACAVA; LUNA, 1994). Além disso, há várias evidências de carcinogenicidade ligadas a este fármaco, devido à relação de seu uso com o aparecimento de neoplasias malignas em corações chagásicos transplantados (BOCCHI *et al.*, 1994) e, em animais, foi observado alta prevalência de linfomas malignos em coelhos infectados com *T. cruzi* após o tratamento com BZN (TEIXEIRA *et al.*, 1990).

Neste sentido, Pedrosa e colaboradores (2001) demonstraram que hepatócitos de ratos tratados com BZN, sofrem um estresse oxidativo, proporcional ao tempo do tratamento.

Em estudo realizado em nosso grupo de pesquisa por Oliveira (2004), foi verificado que durante a CCC (em seres humanos), há um estresse oxidativo proporcional ao grau de comprometimento da doença. Portanto, é possível que o tratamento com BZN, através de seu metabolismo oxidativo, acentue o estresse oxidativo que os pacientes já apresentam em virtude do próprio processo inflamatório crônico ligado ao desenvolvimento da CCC.

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs)

As espécies reativas são moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus últimos orbitais atômicos, sendo essa, a característica que confere sua alta reatividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas através da redução parcial do oxigênio até a água, constituindo a classe mais importante de espécies radicalares geradas em organismos aeróbicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; INOUE *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2007). A redução univalente do O_2 produz o primeiro intermediário reativo, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), sendo que, sua geração ocorre principalmente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, onde cerca de 2% dos elétrons que

participam das reações de transferência, escapam dos complexos mitocondriais e acabam reagindo com o oxigênio molecular gerando esta espécie reativa, constituindo a principal fonte de EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

Outras fontes incluem a ativação inflamatória através da enzima NADPH oxidase na membrana de fagócitos, ativação da enzima xantina oxidase durante a produção de ácido úrico, através das oxigenases dependentes do citocromo P450 durante a metabolização de xenobióticos, entre outros processos (PUNTARULO; CEDERBAUM, 1998; BERRY; HARE, 2004; CATHCART, 2004). O $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer dismutação espontânea ou mediada pela enzima superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, embora não seja uma espécie radicalar, ou seja, não apresenta elétrons desemparelhados em seu último orbital, apresenta uma meia vida longa e um alto poder de difusão em grandes distâncias celulares antes de sofrer uma reação (JENSEN, 2003). Além dos sítios que formam o $O_2^{\bullet-}$, os peroxissomas são grande fonte de produção de H_2O_2 (VALKO *et al.*, 2007). A quebra das ligações do H_2O_2 entre os átomos de O_2 forma o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), catalisada por metais de transição (reação de Fenton), ou pela combinação do $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 (reação de Haber Weiss) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). O radical hidroxil é a ERO que apresenta a mais alta reatividade contra constituintes celulares, e possui destarte menor meia-vida. Durante a ativação inflamatória a enzima mieloperoxidase converte o H_2O_2 e cloreto em ácido hipocloroso (HOCl), sendo que essa espécie também em combinação com o $O_2^{\bullet-}$ dá origem ao $^{\bullet}OH$ (CANDEIAS *et al.*, 1993; WINTERBOURN; KETTLE, 2000).

O oxigênio singlete (1O_2) é um estado eletrônico excitado do oxigênio molecular, que também possui capacidade oxidante e está envolvido principalmente nas reações de fotossensibilidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

A ação dessas EROs promove oxidação de carboidratos, resíduos de aminoácidos, alterando forma e funcionalidade de proteínas e enzimas, e também levar a uma alteração química das bases púricas e pirimídicas, promovendo mutações ou até ruptura da fita de DNA. Pode ainda atacar os lipídios de membrana, produzindo uma peroxidação lipídica, alterando assim a organização da membrana celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

O óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) é um importante sinalizador celular que participa de vários processos fisiológicos, tais como: vasodilatação, inibição da agregação

plaquetária, neurotransmissão e regulação imune. Além disso, essa molécula também possui um elétron não pareado em seu orbital mais externo, constituindo uma espécie radicalar. Assim sendo, o $\cdot\text{NO}$ é o principal representante e precursor de compostos coletivamente denominados de espécies reativas de nitrogênio (ERN). O peroxinitrito (NOOO^\cdot), apesar de não ser um radical por não apresentar elétrons desemparelhados, é a ERN mais reativa e altamente difusível, sendo formado através da reação do $\cdot\text{NO}$ com o O_2^\cdot , promovendo dano através de oxidação e nitração de ácido nucléicos, proteínas e lipídios, apresentando assim potencial patogênico em doenças inflamatórias (NAVILIAT *et al.*, 2005, SAWA; OHSHIMA, 2006).

Além desses mecanismos endógenos de geração de EROS e ERNS, existem fontes exógenas tais como: fármacos, poluentes ou xenobióticos, tabagismo, radiação, além de toxinas bacterianas e fúngicas, entre outras (CECARINI *et al.*, 2007).

1.4. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que quando presentes em baixas concentrações, comparada com a concentração do substrato oxidável, evita ou previne significativamente a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). A exposição a uma variedade de radicais livres tem levado ao longo do tempo, os organismos a desenvolver uma série de mecanismos de defesas antioxidantes, sendo que, esses mecanismos podem ser enzimáticos e não enzimáticos (endógenos ou nutricionais) (CADENAS, 1997).

1.4.1. Antioxidantes Enzimáticos

A enzima superóxido dismutase (SOD) promove a dismutação do O_2^\cdot à H_2O_2 e O_2 , conferindo proteção celular contra essa espécie reativa, constituindo umas das mais importantes e primeiras linhas de defesa antioxidante do organismo (McCORD; FRIDOVICH, 1969). A SOD compreende uma família de enzimas divididas em três isoformas, de acordo com a localização: Cu, Zn-SOD (mitocondrial), a Mn-SOD (citossólica) e a EC-SOD (extracelular) (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A catalase (CAT) é uma enzima localizada principalmente nos peroxissomas da célula e é responsável pela detoxificação específica de H_2O_2 à água e O_2 ,

apresentando uma das mais altas taxas de *turnover*, comparado às demais enzimas. De modo semelhante, a glutathiona peroxidase (GPx), além do H₂O₂, metaboliza outros hidroperóxidos orgânicos que também podem servir como substrato para a reação de Fenton, além de fosfolípidios hidroperóxidos, inibindo a reação de peroxidação lipídica em membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; VALKO *et al.*, 2006). Existem quatro isoformas de GPx selenoproteínas, as quais são: a fração gastrointestinal (GI-GPx), fração plasmática (pGPx), a fosfolípido hidroperóxido glutathiona peroxidase (PHGPx) e a clássica GPx (cGPx) (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). A enzima glutathiona S-transferase metaboliza também hidroperóxidos orgânicos, pois participa da biotransformação de xenobióticos, conjugando glutathiona reduzida (GSH) a esses compostos, conferindo menor reatividade e maior solubilidade para sua excreção renal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; BURAK ÇIMEN, 2008). A enzima glutathiona redutase (GR) é a enzima responsável pela regeneração da glutathiona reduzida (GSH) de sua forma oxidada (GSSG), promovendo a manutenção das concentrações ideais desse tripeptídeo em sua forma reduzida e mantendo o *status* redox celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; PASTORE *et al.*, 2003).

1.4.2. Antioxidantes Não Enzimáticos

A GSH é o antioxidante não enzimático mais importante envolvido na defesa celular antioxidante, apresentando altas concentrações intracelulares em todos organismos aeróbicos (0,1 a 10mM) (WILHELM FILHO *et al.*, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). A relação GSH/ GSSG é um determinante crítico para as células, sendo a GSH um indicador sensível de função e viabilidade celular. Além de atuar diretamente contra espécies químicas reativas, também é o substrato de enzimas antioxidantes como a GPx e GST (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; PASTORE *et al.*, 2003).

Outros antioxidantes não enzimáticos produzidos *in vivo* incluem a bilirrubina, os α -cetoácidos, hormônios sexuais, hormônio melatonina, ácido lipóico, coenzima Q e, notadamente, o ácido úrico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

1.4.3 Antioxidantes Nutricionais

Os antioxidantes nutricionais são representados principalmente pelas vitaminas E e C, os carotenóides e os flavonóides.

A vitamina E é o mais importante antioxidante celular lipossolúvel, abrangendo um grupo de tocoferóis ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) e tocotrienóis ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), sendo o α -tocoferol, sua forma mais abundante em mamíferos, sendo também forma majoritária encontrada em tecidos e plasma humano, já que essa é a única forma reconhecida pela proteína hepática de transferência de α -tocoferol (α -TTP), a qual é responsável pela manutenção de seus níveis séricos. (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999; MUSTACICH *et al.*, 2007). Sua atividade antioxidante consiste principalmente em seqüestrar radicais peroxil (ROO^\bullet) junto às membranas, mais rapidamente do que esses radicais podem reagir com ácidos graxos adjacentes ou com membranas protéicas, inibindo as reações em cadeia de peroxidação lipídica, impedindo a auto-oxidação de ácidos graxos poliinsaturados em membranas celulares ou lipoproteínas (TRABER, 2007). Em adição, os tocoferóis reagem e eliminam o $^1\text{O}_2$, conferindo proteção ao organismo contra essas espécies (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

A vitamina C possui sua principal propriedade antioxidante ao fato de ser um doador de elétron, regenerando potentes antioxidantes como a vitamina E e GSH para suas formas reduzidas, atuando na manutenção de seus níveis séricos e prevenindo processos oxidativos (WINKLER; ORSELLI; REX, 1994; HALPNER *et al.*, 1998).

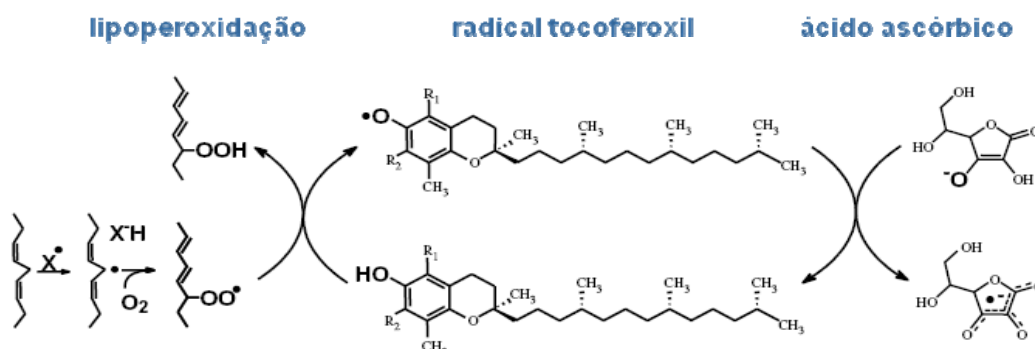


Figura 2: α -tocoferol inibe a reação em cadeia de propagação de lipoperoxidação, neutralizando os radicais peroxil e gerando o radical tocoferoxil. Este, por sua vez é regenerado pelo ácido ascórbico à sua forma reduzida.

1.5. Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e das defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (SIES, 1985; SCANDALIOS, 1997). A citotoxicidade do estresse oxidativo está relacionada ao potencial de EROs e ERNs em oxidar os constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, os quais levam à deterioração da estrutura e função e até à morte celular (WEN *et al.*, 2004). Essas alterações ao longo do tempo estão associadas ao desenvolvimento de muitas condições patológicas, destacando as seguintes: câncer, arterosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias crônicas, cardiomiopatia chagásica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; ZACKS *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

1.5.1. Dano ao DNA

O radical $\cdot\text{OH}$ é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA, causando alterações tanto em bases púricas e pirimídicas, quanto na fita de desoxirribose, podendo ocasionar defeitos no processo de replicação de DNA, levando a mutações e erros de transcrição (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). Essa alteração permanente no material genético resultante de dano oxidativo, representa o primeiro passo envolvido em mutagênese, carcinogênese e processo de envelhecimento. A reação de $\cdot\text{OH}$ com a guanina, dá origem à 8-hidroxi guanina, sendo que, sua dosagem urinária é um excelente marcador de estresse oxidativo e indicador de carcinogênese (ZACKS *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

1.5.2. Dano protéico

Algumas diferentes modificações oxidativas em proteínas podem ser induzidas por ataque direto e indireto de EROS e ERNS e produtos secundários de estresse oxidativo (ZACKS *et al.*, 2005). A oxidação de proteínas ocorre principalmente pelo ataque de radicais $\text{O}_2\cdot^-$ e $\cdot\text{OH}$ e pode ocorrer através de mecanismos, tais como: oxidação do sítio catalítico, oxidação induzindo a quebra da cadeia polipeptídica, oxidação de aminoácidos e conjugação de produtos de peroxidação lipídica. A principal consequência da oxidação protéica é a geração de proteína carbonilada (PC), podendo ocorrer reações com produtos de

lipoperoxidação lipídica, açúcares ou metabólitos oxidados, sendo que, a principal consequência é que esse grupamento pode promover a ligação intra ou intermolecular e formar agregados protéicos. Esses agregados são incapazes de sofrer degradação via mecanismos proteolíticos, causando inibição desses processos e consequentemente promover acúmulo de proteínas oxidadas com aumento de disfunção celular, afetando processos como sinalização celular, estrutura celular e processos enzimáticos. A determinação de proteína carbonilada é um marcador de estresse oxidativo proteico (BERLETT; STADTMAN,1997; CECARINI *et al.*, 2007, VALKO *et al.*, 2007). Outro importante marcador de estresse nitro-oxidativo é a mensuração de nitrotirosina, que é uma modificação pós translacional, durante o ataque de ERNs, especialmente o NOOO⁻ em resíduos de tirosina (NAVILIAT *et al.*, 2005).

1.5.3. Dano lipídico

O processo de oxidação de lipídios é denominada de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), constituindo o maior evento consequente do estresse oxidativo de lipídios poliinsaturados em membranas celulares. Esse processo pode causar alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática, alterações de transporte iônico e inibição de processos metabólicos (NIGAM; SCHEWE, 2000). A LPO começa com a fase de iniciação, onde uma espécie reativa ataca o ácido graxo poliinsaturado, abstraindo um átomo de hidrogênio do grupamento metileno, formando um radical de carbono (L[•]). Em meio aeróbico, o radical alquila, inicialmente formado, se combina com o oxigênio formando o radical peroxil (ROO[•]), o qual pode abstrair um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando um hidroperóxido lipídico (LOOH), este, ainda pode sofrer quebra por metais produzindo radicais alcoxil (LO[•]), sendo que ambos os radicais promovem a etapa de propagação, seqüestrando hidrogênios de ácidos graxos adjacentes. A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pelo desmembramento dos radicais formados originando aldeídos reativos, com grande capacidade de difusão, como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-noneal (4-HNE), 4-hidro-2-hexenal (CATALÁ, 2006; 2009).

1.6. O Estresse Oxidativo na Cardiopatia Chagásica Crônica

1.6.1. Estresse Oxidativo e Disfunção Mitocôndrial

Na doença de Chagas, o estresse oxidativo é um mecanismo de defesa empregado pelo hospedeiro para controlar a parasitemia na fase aguda, entretanto, existem evidências que demonstram que o estresse oxidativo prolongado também contribui para o desenvolvimento da CCC (WEN; VYATKINA; GARG, 2004; ZACKS *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A mitocôndria representa 30% do volume total de cardiomiócitos e fornece em torno de 90% da energia celular através da fosforilação oxidativa (ZACKS *et al.*, 2005). Inicialmente, com a entrada do parasita na célula cardíaca, há uma elevação dos níveis de cálcio (Ca^{2+}), promovendo a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial, levando a dissipação do gradiente de prótons e causando comprometimento da organela (KANNO *et al.*, 2002; ZACKS *et al.*, 2005). Estudos anteriores em modelos animais mostraram que há a repressão da expressão de genes relacionados à função mitocondrial, com acúmulo de mitocôndrias aberrantes na célula cardíaca inflamada (GARG; POPOV; PAPAConstantinou, 2003). Análises posteriores demonstraram que os complexos I e III das mitocôndrias foram identificados como os principais sítios de liberação de elétrons que reagem com o oxigênio para dar origem às EROs e que a taxa de produção de EROs aumenta exponencialmente quando os níveis desses complexos não estão em concentrações ideais (IDE *et al.*, 1999; LESNEFSKY *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003).

Adicionalmente, Vyatkina e colaboradores (2004) demonstraram em corações de animais infectados com *T. cruzi*, um declínio das atividades dos complexos I (NADH-ubiquitona oxiredutase) e III (Ubiquinol-citocromo c redutase), sugerindo que os corações chagásicos estão mais expostos à toxicidade de EROs, via mitocondrial. As lesões desses complexos mitocondriais podem ainda ser decorrentes de estresse oxidativo que ocorre em resposta da infecção ao *T. cruzi*, promovendo modificações oxidativas nas suas subunidades, comprometendo suas atividades (WEN; GARG, 2004). Além disso, Wen, Vyatkina e Garg (2004), demonstraram que as defesas antioxidantes diminuem ao longo da progressão da doença, logo, a diminuição de MnSOD aumenta ainda mais a liberação de EROs via mitocondrial, ultrapassando a

capacidade antioxidante das células cardíacas, promovendo a manutenção de estresse oxidativo e contribuindo assim, para a progressão das lesões cardíacas.

1.6.2. Estresse Oxidativo e Processo Inflamatório

O estresse oxidativo é o principal mecanismo do sistema imune contra infecções parasitárias (SCHIRMER *et al.*, 1987). Estudos histopatológicos demonstraram que as principais células envolvidas na CCC são as células T CD 8+ seguidas pelas CD4+ e os macrófagos, linfócitos B, células NK e polimorfonucleares (HIGUCHI, 1993; 2003; LANNES-VIEIRA, 2009).

As propriedades de defesa dos macrófagos envolvem em parte, a expressão da NO sintase (iNOS), a qual é principalmente estimulada por interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF α), levando a uma subsequente produção de óxido nítrico (\cdot NO) por essas células (TARLETON, 1991; PEREZ, 2005). Abel e colaboradores (2001) demonstraram que durante a CCC há um aumento significativo de IFN- γ , indicando que essa citocina pode ter um papel relevante na suscetibilidade ao desenvolvimento da forma crônica cardíaca. Conforme já mencionado, o \cdot NO em combinação com $O_2^{\cdot-}$ leva à formação do NOOO \cdot , um potente oxidante biológico que elimina o *T. cruzi* em um mecanismo dose-dependente (DENICOLA *et al.*, 1993). Além disso, os granulócitos apresentam a enzima NADPH oxidase que catalisa a formação do $O_2^{\cdot-}$, a partir de O_2 e NADPH, como mecanismo de defesa do sistema imune contra agentes patogênicos ao organismo (BABIOR, 2004). A mieloperoxidase é uma enzima presente principalmente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos, a qual participa das reações de defesa imune, através da formação do radical ácido hipocloroso (HOCl) como mecanismo de defesa (NICHOLLS; HAZEN, 2005).

Esses potentes oxidantes formados durante a ativação celular inflamatória podem contribuir coletivamente para o desenvolvimento de lesões celulares que atuam na progressão da CCC.

1.6.3. Diminuição das Defesas Antioxidantes

As células do miocárdio quando sofrem dano oxidativo, podem exibir diminuição das defesas antioxidantes, perda da homeostasia redox intracelular,

alteração na sinalização celular e indução de processos patológicos (ZACKS *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos mais recentes têm demonstrado em modelos animais e também pacientes que desenvolveram a CCC, uma menor capacidade antioxidante, demonstrada pela baixa atividade enzimática antioxidante ou por níveis reduzidos de antioxidantes não enzimáticos, que é proporcional à progressão da doença (PÉREZ-FUENTES *et al.*, 2003; WEN *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Pesquisas recentes demonstraram que os biomarcadores de estresse oxidativo no sangue e coração de camundongos infectados, apresentam as mesmas tendências patológicas (WEN *et al.*, 2008). Como já citado anteriormente, Oliveira e colaboradores (2007), de nosso grupo de pesquisa, verificaram que há um aumento do estresse oxidativo em eritrócitos de pacientes chagásicos crônicos que é proporcional ao grau de comprometimento da doença. Posteriormente, para dar continuidade ao projeto, Maçao e colaboradores (2007) demonstraram que a terapia antioxidante é capaz de atenuar o quadro de estresse oxidativo nesses mesmos pacientes, principalmente naqueles incluídos nos estágios mais iniciais da doença. Visando dar continuidade às etapas anteriormente bem sucedidas de nosso grupo de pesquisa, o presente trabalho avaliou os biomarcadores de estresse oxidativo após a terapia com BZN e, em continuidade, após a terapia antioxidante, instituída com o intuito de amenizar os danos oxidativos que o tratamento com BZN causa ao hospedeiro, através de seu metabolismo nitroreductor, no sangue de pacientes com CCC divididos em quatro grupos evolutivos, de acordo com o grau de comprometimento cardíaco.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar o efeito do tratamento com benzonidazol (BZN) e posteriormente à terapia antioxidante com vitaminas E e C, nas defesas antioxidantes e no estresse oxidativo associados a diferentes estágios evolutivos da cardiopatia chagásica crônica.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar as diferenças das defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GPx, GR e GST) intraeritrocitárias de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, divididos em diferentes estágios evolutivos, através da classificação de Los Andes modificada, antes e depois da administração do fármaco BZN (2 meses), e posteriormente à suplementação com as vitaminas E e C (6 meses).

- Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH e vitaminas E), presentes respectivamente no sangue e plasma desses pacientes, antes e depois da administração do fármaco BZN (2 meses) e posteriormente, das vitaminas E e C (6 meses).

- Avaliar indicadores de estresse oxidativo como proteínas carboniladas, bem como nos níveis de lipoperoxidação (concentração de TBARS), presentes no plasma desses pacientes, antes e depois da administração do fármaco BZN (2 meses) e posteriormente, das vitaminas E e C (6 meses).

- Avaliar os níveis de óxido nítrico, mieloperoxidase e adenosina deaminase no soro destes pacientes, antes e depois da administração do fármaco BZN (2 meses) e posteriormente das vitamina E e C (6 meses).

3. Casuística e Métodos

3.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de intervenção terapêutica de uma amostra pertencente a uma coorte aberta constituída de pacientes, acompanhados no Instituto do Coração Edson Saad (ICES)-Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-UFRJ desde Janeiro de 1990 até Janeiro de 2008.

3.2. Seleção de Pacientes

Os pacientes selecionados para o presente trabalho são os mesmos que participaram de avaliações em trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAÇAO *et al.*, 2007). Os pacientes são provenientes do Ambulatório de Cardiopatia Chagásica do ICES/HUCFF-UFRJ. O ambulatório é de responsabilidade do Dr. Roberto Coury Pedrosa constituído de cerca de 280 pacientes com sorologia positiva para doença de Chagas.

Durante o processo de seleção, os pacientes 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). Após enquadramento quanto aos critérios de inclusão/exclusão, os pacientes eram informados sobre o estudo e o consentimento livre esclarecido era obtido.

3.2.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos principalmente os pacientes que tiveram o estresse oxidativo estudado previamente no ano de 2003 com os seguintes critérios:

- Homens ou mulheres com idade entre 21 a 75 anos, afastados da zona endêmica há mais de 20 anos, sem outras doenças associadas;
- Em acompanhamento ativo e regular em serviço de cardiologia com diagnóstico etiológico de doença de Chagas.
- Pacientes que não se utilizaram de tratamento específico para doença de Chagas.
- Caso do sexo feminino, o sujeito não pode ter potencial de engravidar, obedecendo aos seguintes critérios: pós menopausa por pelo menos um ano,

cirurgicamente estéril (ligadura tubária bilateral, ooforectomia bilateral ou hysterectomia) ou teste de gravidez negativo na ocasião da seleção, caso ainda tenha potencial de engravidar.

A inclusão ou não no projeto foi de espontânea responsabilidade do paciente, quando este assinava o termo de consentimento livre e esclarecido apresentado por uma pessoa sem interesse direto no projeto (profissionais da enfermagem participantes da equipe do Dr. Roberto Coury Pedrosa-HUCFF-UFRJ).

3.2.2. Critérios de exclusão

Os pacientes eram excluídos do presente estudo se apresentassem alguma das seguintes características:

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

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

B- Critérios de exclusão cardiovascular

- pressão sistólica mantida abaixo de 90mmHg e/ou sintomas de hipotensão arterial, tais como síncope, tonteira, fraqueza;

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

C- Critérios biológicos de exclusão

- níveis de creatinina 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).

3.2.3 Dados obtidos dos pacientes

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, 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 - Bases de dados padronizada de exames complementares:

Hemograma, glicemia, creatinina, ácido úrico, potássio, proteínas totais e fracionadas, exame parasitológico de fezes, urinálise, 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).

3.2.4. Avaliação Clínica

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

Insuficiência Cardíaca foi definida segundo os critérios da Sociedade Européia de Cardiologia (The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, 2001):

- 1-Sinais e sintomas de insuficiência cardíaca (em repouso e com exercício);
- 2-Evidência objetiva de disfunção cardíaca (em repouso);
- 3-Resposta ao tratamento direcionado para insuficiência cardíaca.

Os pacientes foram examinados por uma única pessoa durante as consultas ambulatoriais (Dr. Roberto Coury Pedrosa).

3.2.5. Definições

O diagnóstico etiológico de doença de Chagas na fase crônica é realizado pela presença de sorologia positiva.

Avaliação sorológica:

A avaliação sorológica dos pacientes foi realizada no setor de imunologia do laboratório do ICES/HUCFF-UFRJ. O soro dos pacientes foram testados independentemente para anticorpos (IgG) contra o *T. cruzi*, pela imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta. A soropositividade de cada paciente foi confirmada 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.

3.2.6. Exames Adicionais

Na semana de inclusão para o presente estudo, todos os pacientes fizeram uma avaliação laboratorial incluindo: hemograma completo, glicemia, uréia e creatinina, ácido úrico, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídios, sódio, cálcio e potássio, proteínas totais e frações, provas de função hepática e tireoidiana, exame parasitológico de fezes e exame parcial de urina. Nos 30 primeiros dias após a inclusão foram realizados os seguintes exames: o ECG convencional de repouso com 12 derivações; monitorização eletrocardiográfica ambulatorial dinâmica de 24 horas (sistema Holter); telerradiografia de tórax pósterio-anterior e perfil, o ecocardiograma uni e bidimensional com Doppler. Todas as informações foram obtidas, diretamente dos pacientes ou de seus prontuários.

3.2.7. Acompanhamento Clínico

As intervenções diagnósticas e terapêuticas seguiram as recomendações das diretrizes específicas para acompanhamento e tratamento das complicações da cardiopatia chagásica crônica, atualizadas pelo Consenso Brasileiro de doença de Chagas (2005) no que se refere à insuficiência cardíaca.

➤ Eletrocardiograma

O ECG foi realizado com 12 derivações, em repouso, analisado conforme os critérios da NYHA, utilizando-se o código de Minnesota (ROSE *et al.*, 1982) modificado para a cardiopatia chagásica (MAGUIRE *et al.*, 1982), a fim de padronizar a interpretação do ECG, sendo classificados como normal, anormal ou limítrofe.

➤ Eletrocardiograma dinâmico contínuo (sistema Holter)

Todos os pacientes do estudo foram submetidos à monitorização eletrocardiográfica contínua por 24 horas, como parte da avaliação clínica rotineira no ambulatório de cardiopatia chagásica. A leitura do Holter foi feita duas vezes, em momentos diferentes, sendo que a primeira, logo após a realização dos exames e os

resultados foram utilizados para a condução clínica dos pacientes. A segunda foi realizada durante a coleta de dados para este estudo, quando as fitas foram reavaliadas, para diagnóstico das arritmias ventriculares.

➤ **Avaliação Radiológica**

A radiografia de tórax foi realizada nas posições pósterio-anterior e perfil esquerdo. A identificação de cardiomegalia foi feita pelo índice cárdio-totácico (ICT) superior a 0,50. O diâmetro da artéria pulmonar e o padrão de distribuição vascular pulmonar foram avaliados. A análise das radiografias foi realizada por um observador independente, radiologista, de forma cega, sem conhecimento de dados clínicos ou de outros métodos complementares.

➤ **Ecocardiograma (ECO)**

A avaliação da ecocardiografia consistiu na análise da função cardíaca segmentar dos pacientes, e foi expressa em termos de afinamento ou déficit de espessamento sistólico (SCHNITTGER *et al.*, 1983). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi calculada pelo método de Teicholz e 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.

3.2.8. Estágios evolutivos na cardiopatia chagásica crônica

Neste trabalho, utilizou-se a classificação de Los Andes (CARRASCO *et al.*, 1982; CARRASCO, 1983; CARRASCO *et al.*, 1987; BERN *et al.*, 2007), modificada por Xavier (1999), definindo o acometimento cardíaco na doença de Chagas como sendo constituído de quatro estágios descritos abaixo:

- Grupo IA: eletrocardiograma normal e ecocardiograma normal. Função ventricular normal ou apenas discretamente deprimida;
- Grupo IB: eletrocardiograma anormal e ecocardiograma normal. Disfunção sistólica ventricular esquerda moderada;
- Grupo II: eletrocardiograma anormal e ecocardiograma anormal. Disfunção sistólica ventricular esquerda grave, sem relato de ICC .

- Grupo III: eletrocardiograma anormal e ecocardiograma anormal. Disfunção sistólica ventricular esquerda grave e insuficiência cardíaca congestiva compensada.

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, perfazendo um total de 41 pacientes no presente estudo, conforme o grau de comprometimento cardíaco, através da classificação de Los Andes modificada (XAVIER, 1999; BERN *et al.*, 2007;). Devido à ocorrência de óbitos de alguns pacientes durante o estudo iniciado em 2003, sete pacientes que ainda não tinham sido avaliados, foram recrutados para fazer parte desse estudo, sendo que os demais pacientes eram aqueles que haviam participado de trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAÇAO *et al.*, 2007). Considerando que os pacientes avaliados anteriormente não alteraram sua classificação de acordo com comprometimento cardíaco desde o início do projeto, e a inclusão de sete novos indivíduos, os grupos ficaram divididos em:

- Grupo IA: 10 pacientes;
- Grupo IB: 20 pacientes
- Grupo II: 7 pacientes;
- Grupo III: 4 pacientes

3.2.9. Acompanhamento durante o Tratamento e Coleta de Amostras

Um esquema de consultas médicas foi determinado para monitorar o acompanhamento dos pacientes durante o tratamento, sendo que foram realizadas visitas médicas após: 11 ± 2 dias, 3 semanas ± 3 dias, 2 meses (final do período de tratamento com benzonidazol) e 6 meses (final do período de tratamento com Vitaminas E e C). Além disso, amostras de sangue para exame hematológico (hemograma) foram realizadas a cada duas ou três semanas durante o tratamento com BZN e marcadores de avaliação da função hepática, e da função renal (AST, ALT, bilirrubinas, creatinina, uréia) foram coletadas nas visitas de três semanas e dois meses iniciais correspondente ao período de tratamento com o benzonidazol. Os pacientes foram monitorados para evitar a ocorrência de dermatite durante 10

dias após o início do tratamento com BZN e foi orientado evitar a utilização de álcool, para evitar reações tipo dissulfiram/álcool. Todos estes exames foram executados nos laboratórios do ICES/HUCFF-UFRJ.

Na ocasião da coleta de amostras para a determinação dos biomarcadores, todos os pacientes em uso de medicamentos tiveram os mesmos suspensos 48 horas precedendo os exames.

As defesas antioxidantes e os biomarcadores de estresse oxidativo no presente trabalho foram determinados em três ocasiões, ou seja: a primeira determinação precedendo o tratamento com BZN; a segunda determinação após 2 meses de tratamento com BZN (5mg/kg/dia); e, finalmente, a última após 6 meses de terapia antioxidante com vitaminas E 800UI/dia e C 500 mg/dia.

Foram coletadas amostras de sangue em um tubo seco para a obtenção de soro e dois tubos com heparina para a obtenção de plasma e sangue total nas três ocasiões. O material biológico, após processado (obtenção imediata de extratos ácidos e separação de plasma e eritrócitos; ver adiante), foi armazenado em nitrogênio líquido e usado apenas para realização dos exames propostos. Foram observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial final. Esta etapa, foi realizada no ICES/HUCFF-UFRJ, sob a responsabilidade do Dr. Roberto Coury Pedrosa (co-orientador do projeto).

3.3. Fluxo de Participantes

Dos 200 pacientes acompanhados no ambulatório de cardiopatia chagásica do ICES/HUCFF-UFRJ, 77 foram excluídos do presente estudo por fazerem uso prévio de carvedilol. Dos 123 pacientes restantes, 21 pacientes após a realização dos exames admissionais optaram por não manter acompanhamento no ICES/HUCFF-UFRJ (6 devido a dificuldades financeiras, 5 retornaram ao serviço médico de origem), 7 pacientes solicitaram o desligamento da coorte por motivos pessoais ou mudança para outro estado, 3 pacientes tiveram o diagnóstico de insuficiência renal crônica sendo 2 em programa de diálise, 18 pacientes tiveram o diagnóstico de diabetes mellitus tipo II, 24 pacientes tiveram evidências de cardiopatia hipertensiva (diagnóstico por dados clínicos e ecocardiográficos). Cinquenta pacientes tiveram previamente estabelecidos o estresse oxidativo no ano

de 2003. Houve 8 óbitos informados pelos familiares e confirmados pelo banco de dados do SUS-2005 e 1 desistência. O presente trabalho foi constituído por 41 pacientes dos quais 7 pacientes tiveram seu estresse oxidativo estabelecido no presente ano. Não houve mudança de grupo entre os 41 pacientes do estudo. A seguir o fluxograma que descreve o fluxo dos participantes em cada etapa do estudo.

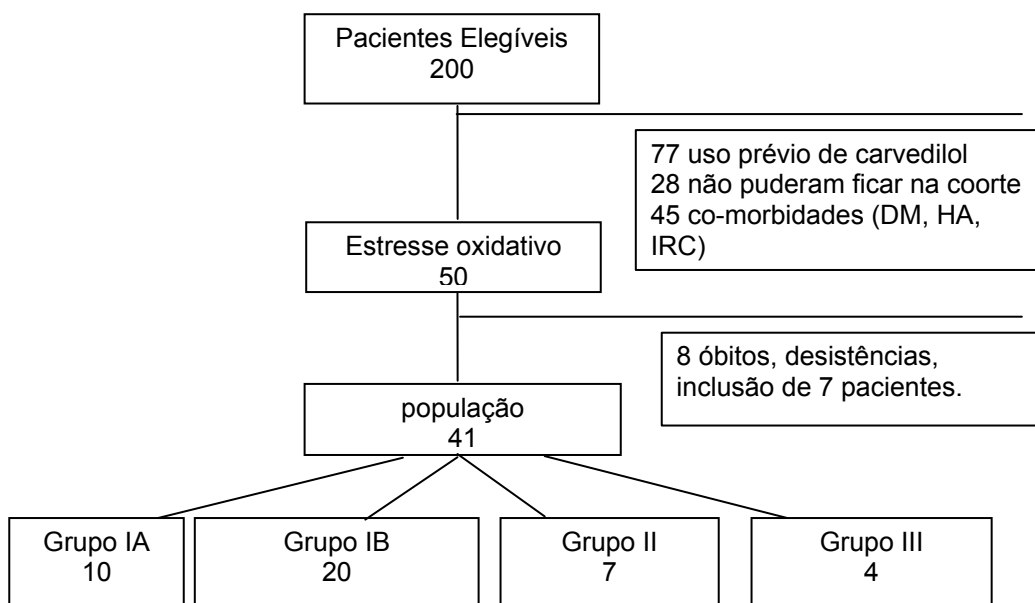


Figura 3: Fluxograma com a seleção e o fluxo dos participantes em cada etapa do estudo.

3.4. Considerações Éticas

Para a realização deste ensaio clínico, o presente trabalho foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em 12 de abril de 2007, protocolo N°. 053/07-CEP (Anexo III). 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 IV).

3.5. Protocolo Experimental

Primeiramente, logo após a coleta de amostra venosa, em tubo contendo heparina (ou tubo seco para obtenção do soro), alíquotas de sangue total foram

precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:4, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C) para a análise de GSH. Em seguida, foi realizada através de centrifugação (3000 g durante 3 min) a separação dos eritrócitos, plasma e soro, os quais foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo/defesas antioxidantes e marcadores inflamatórios. As amostras foram estocadas em nitrogênio líquido até seu envio para o laboratório de Ecofisiologia Respiratória, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram analisadas. Esta etapa de preparação das amostras foi realizada no ICES/Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela equipe do Dr. Roberto Coury Pedrosa.

Após a chegada das amostras no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, o hemolisado foi preparado através de lavagem com água destilada 2 vezes e posteriormente centrifugados (3000 g por 3 min) para então, sofrerem lise por sucessivos congelamentos e descongelamentos.

3.6. Fármaco e Vitaminas

O fármaco Benznidazol (N-benzyl-2-nitro-1-imidazole acetamide), caixas com 100 cápsulas (100mg), foi comprado diretamente do LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes). As vitaminas E e C (E-Tabs e Energil C respectivamente) foram gentilmente fornecidas pelo grupo EMS Sigma Farma.

3.7. Interesse de Conflitos

Não houve interesse de conflitos no presente trabalho por parte dos membros participantes e nem das empresas fornecedoras dos medicamentos e reagentes para execução de análises.

3.8. Equipamentos

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. 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). As determinações de NO, ADA e MPO foram realizadas em Leitor de ELISA Plate Reader 210 (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.)

3.9. Reagentes

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

3.10. Defesas Antioxidantes e Marcadores de Estresse Oxidativo

3.10.1. Defesas antioxidantes enzimáticas

3.10.1.1. Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), o qual, baseia-se na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 mL desta solução em cubeta, com acréscimo de 20 μ L do lisado para realizar a leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 20 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em mmol. min⁻¹. ml⁻¹.

3.10.1.2. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada 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, o qual é mensurado em 480 nm. A amostra adicionada na cubeta com a solução de adrenalina retardou a oxidação e conseqüentemente a produção de adrenocromo através da enzima SOD. Em uma cubeta contendo 1,95 ml de glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 μ l de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar). A velocidade inicial de formação do adrenocromo foi monitorada durante cerca de 100s do início da reação, com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15s em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar a alíquota da amostra, geralmente em torno de 20 a 50 μ l, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota, totalizando um tempo de aproximadamente 3 min. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD

(U SOD ml⁻¹) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo. As amostras foram previamente lavadas com solução de clorofórmio:etanol (3:5 v:v), com o intuito de eliminar a interferência da hemoglobina e impedir a geração do ânion superóxido artefactual no ensaio.

3.10.1.3. Glutathione peroxidase (GP_x)

Para a análise enzimática de GP_x, o método de Flohé & Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução de o tBuOOH pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GP_x, e conseqüente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GP_x na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM pH 7,0, 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 10 µl de amostra e 10 µl de *tert*-butilhidroperóxido (t-BuOOH) em 1 ml de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em µmol. min⁻¹. ml⁻¹. KCN 50 mM foi adicionado ao ensaio para evitar superavaliação da enzima devido à oxidação da hemoglobina presente nos lisados.

3.10.1.4. Glutathione reductase (GR)

A GR foi determinada pelo método de Calberg & Mannervick (1985), o qual, verifica em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutathione oxidada e DPTA 5 mM, foi adicionado na cubeta (0,95ml), e a adição de 50µl de amostra deu início a reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em µmol.min⁻¹. ml⁻¹.

3.10.1.5. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig e colaboradores (1976). A reação baseia-se na capacidade da GST em

conjugar GSH no substrato, formando uma substância mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada a um meio contendo 10 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), 10 μl de GSH 0,1 M e 970 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, além da cubeta de referência, na qual foram adicionados os mesmos reagentes, com exceção da amostra. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol. min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$. O hemolisado utilizado para a determinação dessa enzima foi diluído 1:10, diferentemente das demais, para evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que interferia na avaliação da cinética enzimática.

3.10.2. Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas

3.10.2.1. Glutationa 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 e colaboradores (1963), onde a adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCL 0,2M pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permite, após cerca de 3 min e agitação da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato de cor amarela, mensurável em A_{412} . Os valores foram expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

3.10.2.2. Vitamina E

A determinação dos níveis de α -tocoferol foi realizada através de quantificação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com detecção UV, em 292 nm, pelo método descrito por Nicoletti e colaboradores (2001). Inicialmente, foram adicionados 100 μl de plasma em 100 μl de etanol e agitado em vórtex por 10s. Em seguida, foi adicionado 100 μl de hexano e agitado em vórtex por mais 45s, seguido de uma centrifugação a 800 g por 5 min. Posteriormente, 75 μl do sobrenadante (fase hexano) foi transferida para um tubo e o hexano foi evaporado em nitrogênio. Foram adicionados 25 μl de dietileter e 75 μl de metanol, com injeção desse extrato no sistema cromatográfico. As colunas foram eluídas isocriticamente com metanol e o fluxo foi de 1 ml/min. A concentração plasmática de α -tocoferol foi

determinada através de uma curva-padrão, sendo que os valores foram expressos em $\mu\text{mol l}^{-1}$.

3.10.2.3. Vitamina C

A determinação quantitativa do ácido ascórbico foi realizada através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção eletroquímica, segundo o método descrito por Lykkesfeldt e colaboradores (1995). Além da mensuração (DHAA) de ácido ascórbico total, foi necessário reduzir o dehidroascorbato presente nas amostras. Uma alíquota do plasma foi misturada com igual volume de ácido metafosfórico 10% no momento da coleta. Durante o ensaio, essa alíquota foi centrifugada a 4000 g por 10 min, em 4 °C. O ácido ascórbico total foi medido após redução do DHAA (forma oxidada do ácido ascórbico), por adição de 100 μl da amostra a 50 μl de tampão Tris 0,5 M, pH 9,0, contendo dithiothreitol 10 mM, resultando em um pH de 6,1 a 6,2, a 25 °C por 5 min. Adicionou-se 50 μl de H_2SO_4 0,2 M à amostra resfriada e 20 μl da mistura foi injetada no HPLC. A fase móvel foi fosfato de hidrogênio dissódico (Na_2HPO_4) 0,1 M, EDTA 2,5 mM e cloreto de dodeciltrimetilamônio 2,0 mM, pH 3,0. O fluxo foi 1,2 ml/min.

3.10.3. Determinação dos marcadores de dano

3.10.3.1. Lipoperoxidação tecidual – TBARS

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

3.10.3.2. Proteína carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Inicialmente foram adicionados 100 μL do plasma em 600 μL de DNPH (2,4-dinitro fenil hidrazina), seguido de uma

incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação a cada 15 min. Seguidamente, foi adicionado 600 μL de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 800 g). O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 800 g), com 600 μL de etanol-acetato de etila. Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados de 600 μL de guanidina, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C por 60 min, para posteriormente proceder à leitura a 360 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Lowry *et al.*, (1951), usando como padrão a albumina. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol mg^{-1} .

3.10.4. Determinação dos Marcadores Inflamatórios

3.10.4.1. Determinação de Adenosina Deaminase

Para a determinação da atividade da enzima, adenosina deaminase, inicialmente, amostras padrões para a curva padrão foram preparadas em diferentes concentrações: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e NH_3SO_4 (15 mM), variando a entre 10–50 U/l. Em seguida, alíquotas de 20 μl de soro foram adicionadas ao tampão adenosina fosfato pH 6,5 (500ml), composto por $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5mM), seguido de uma incubação durante 1 hora a 37°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de uma solução de fenol (1mM), nitroprussiato (0,17mM) e tampão alcalino (1000 ml: NaOCl, 11 mM). Finalmente, a leitura foi realizada em 630 nm, os valores foram calculados através da curva padrão e expressos em UI^{-1} .

3.10.4.2. 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). Inicialmente, as amostras foram 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. Após a incubação durante 2 horas, em estufa à 37°C, e seguida centrifugação (2500 g por 5 min), 250 μL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, onde 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 540 nm. A curva-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_3^- e NO_2^- (0-150 μM) foi preparada para a quantificação dos valores de nitrato/nitrito (*NO) em μM . (FRÖDE-SALEH *et al.*, 1999).

3.10.4.3. Determinação da Mieloperoxidase

A determinação da atividade de MPO foi realizada segundo o método descrito por Rao e colaboradores (1993). Inicialmente, 40 μL da amostra ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos 0,7-140 mU mL^{-1}) foram transferidos para cubetas e a reação 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%. A seguir, as amostras foram centrifugadas (3000 g , por 5 min), e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas a 450 nm. A curva-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140 mU mL^{-1}) foi determinada, permitindo a quantificação. Os valores da MPO foram expressos em mU mL^{-1} , com o auxílio da equação de reta (FRÖDE; MEDEIROS, 2001).

3.11. Análise Estatística

Comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios 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, antes e após alguma intervenção, admitindo um nível mínimo de significância de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Característica da Amostra da População Estudada

Os 41 pacientes com diagnóstico de doença de Chagas crônica apresentaram idade média de $58,8 \pm 10,3$ anos (31 a 67 anos), sendo 16 pacientes do sexo masculino (39%) e 25 do sexo feminino (61%). O índice de massa corporal (IMC) foi $24,3 \pm 5,1$ Kg/m². Quando comparados os 4 grupos, em relação à atividade física, o grupo III apresentou uma proporção maior de indivíduos sedentários, com significância estatística ($p=0,030$), podendo ser justificada pela limitação da condição clínica dos mesmos. A tabela 1 mostra as características demográficas e laboratoriais dos 4 grupos. As variáveis contínuas foram relatadas pela média \pm desvio padrão e as categóricas pelo número absoluto ou percentual.

Tabela 1 – Características demográficas e laboratoriais dos pacientes chagásicos nos quatro grupos de comprometimento cardíaco

Variável	IA (n=10)	IB (n=20)	II (n=8)	III (n=4)
Idade	58,9 \pm 10,2	61,8 \pm 11,2	58,8 \pm 11,1	59 \pm 10,6
Sexo Masculino	5 (50%)	6 (30%)	4 (57%)	1(25%)
Sexo Feminino	5 (50%)	14 (79%)	3 (43%)	3 (75%)
IMC (Kg/m ²)	25,5 \pm 4,2	24,1 \pm 3,1	24,3 \pm 4,3	23 \pm 3,8
Atividade física	78%	75%	60%	25%
Constipação>3 dias	0%	12,5%	35%	42%
Disfagia	47,8%	37%	88%	91%
Hemoglobina(g/dl)	13,3 \pm 1,2	13,8 \pm 1,1	12,8 \pm 1,6	10 \pm 1,8
Creatinina(mg/dl)	0,9 \pm 0,6	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,4	1,0 \pm 0,3
TSH(UI/ml)	2 \pm 1,2	2,8 \pm 0,9	3,2 \pm 0,7	3,1 \pm
Leucócitos(cel/mm ³)	12x10 ³ \pm 1,2	11x10 ³ \pm 1,1	13x10 ³ \pm 0,9	13x10 ³ \pm 0,8
Medicamentos				
Amiodarona (n)	0	0	2	2
Captopril (n)	0	20	8	4

Sintomas potencialmente relacionados à esofagopatia ocorreram com maior frequência nos grupos II e III, com significância estatística ($p<0,001$). Em relação ao sintoma potencialmente relacionado à colopatia (constipação intestinal > 3 dias) só

houve diferença significativa do grupo IA (no qual 100% dos indivíduos não apresentavam tal sintoma) em relação aos grupos II e III.

A avaliação radiológica mostrou que o índice cardio-torácico aumentou à medida do avanço no grau de comprometimento cardíaco ($p=0,0001$). Não foram realizadas radiografias de esôfago e/ou enema opaco. O ecocardiograma mostrou que fração de ejeção (FEVE) nos pacientes do grupo III foi significativamente menor do que nos demais grupos ($p=0,0001$). O diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo foi corrigido para a área da superfície corporal, e valores acima de 32 mm/m^2 foram considerados anormais. Com base nesse critério, 12 pacientes apresentaram dilatação do ventrículo esquerdo. O comprometimento miocárdio à direita, expressado pela hipertensão pulmonar, esteve presente nos pacientes do grupo II e III. O monitoramento eletrocardiográfico dinâmico ambulatorial (Holter) mostrou instabilidade elétrica proporcional ao comprometimento miocárdico. Os dados referentes à radiologia, eletrocardiografia e ecocardiograma estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 – Variáveis radiológicas, eletrocardiográficas e ecocardiográficas dos pacientes nos quatro grupos de comprometimento cardíaco

Variável	IA (n=10)	IB (n=20)	II (n=8)	III (n=4)
Radiografia de Tórax				
-Índice cardiotorácico($m \pm dp$)	0,45 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02	0,48 \pm 0,04	0,52 \pm 0,02
-Compatível com ICC	0%	0%	20%	100%
Eletrocardiograma				
-repouso 12 derivações				
BRD	0%	55,7%	62,3%	97,8%
BRD+HBAE	0%	68,9%	72,1%	99,1%
Área inativa	0%	2%	55%	89,3%
-ambulatorial de 24h				
ESV isoladas (n/24h)	417 \pm 213	678 \pm 411	1423 \pm 899	2841 \pm 121
TVMNS	0%	4%%	41%	93%
Ecocardiograma				
FEVE	65,2%	61,6%	42,4%	37,6%
IDdfVE (mm/m^2)	28,3 \pm 1,8	29,2 \pm 1,2	32,3 \pm 4,8	35,9 \pm 1,9
Hipertensão pulmonar	0%	0%	25%	44%

4.3. Determinações das enzimas antioxidantes

4.3.1. Atividade da Glutathiona Peroxidase

A atividade da GPx foi aumentada após a terapia com BZN em todos os grupos: IA (92,3%; $p=0,0004$), IB (102,2%; $p<0,0001$), II (113,1%; $p=0,0087$) e III (140,6%; $p=0,0008$), através do teste t de Student pareado (figura 4).

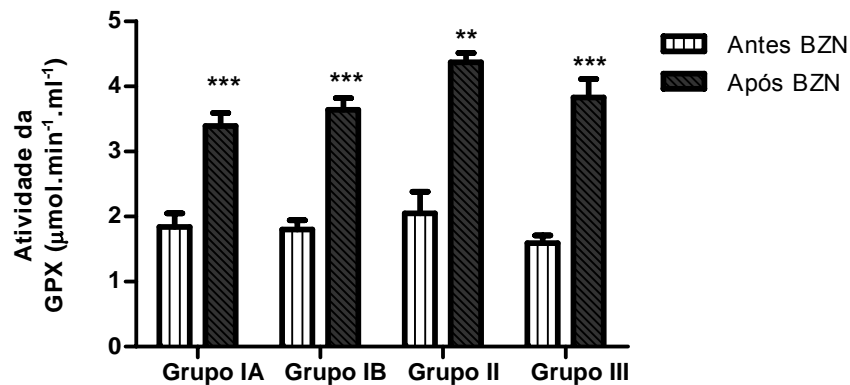


Figura 4 - Atividade da GPx no hemolisado de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante dois meses. O emprego do teste t de Student foi realizado entre a determinação antes e após suplementação dentro de cada grupo e a diferença estatística foi simbolizada por * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$). O teste para comparação entre os 4 grupos foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, e a diferença estatística foi simbolizada por $^{\alpha}$ ($p<0,05$), $^{\alpha\alpha}$ ($p<0,01$) e $^{\alpha\alpha\alpha}$ ($p<0,001$) para as diferenças em relação ao grupo IA, por $^{\beta}$ ($p<0,05$), $^{\beta\beta}$ ($p<0,01$) e $^{\beta\beta\beta}$ ($p<0,001$) para as diferenças em relação ao grupo IB e por $^{\gamma}$ ($p<0,05$) para as diferenças em relação ao grupo II.

Após a suplementação, a atividade da GPx previamente aumentada, foi significativamente diminuída, em todos os grupos: IA (24,3%; $p=0,0064$), IB (26,4%; $p=0,0003$), II (33,1%; $p<0,0001$) e III (31,7%; $p=0,0108$) (figura 5).

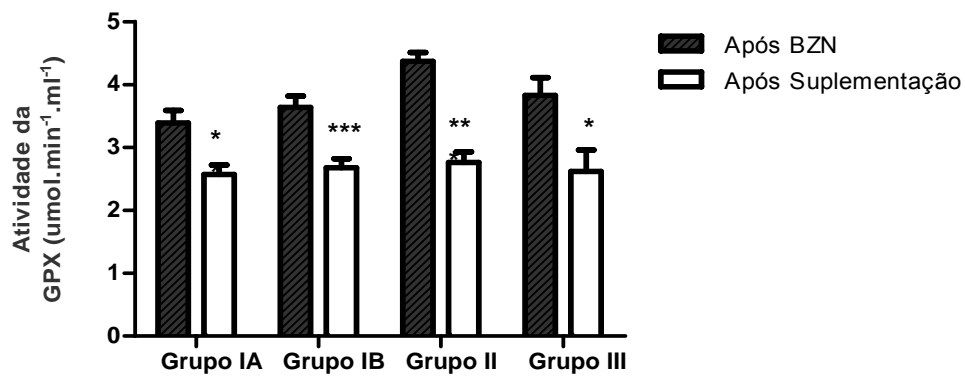


Figura 5 - Atividade da GPx no hemolisado de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante com vitaminas E e C durante 6 meses.

4.3.2. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Da mesma forma, a SOD, não mostrou diferença estatística entre os 4 grupos nos três momentos de análise, através do emprego da ANOVA. Entretanto, a atividade de SOD após a terapia com BZN, aumentou significativamente nos grupos IA (98,1%; $p < 0,0001$), IB (56,2%; $p = 0,0007$) e II (59,5%; $p = 0,0087$), através do pareamento do teste *t*. O grupo III, apesar de uma tendência de elevação, não apresentou diferença estatística (figura 6).

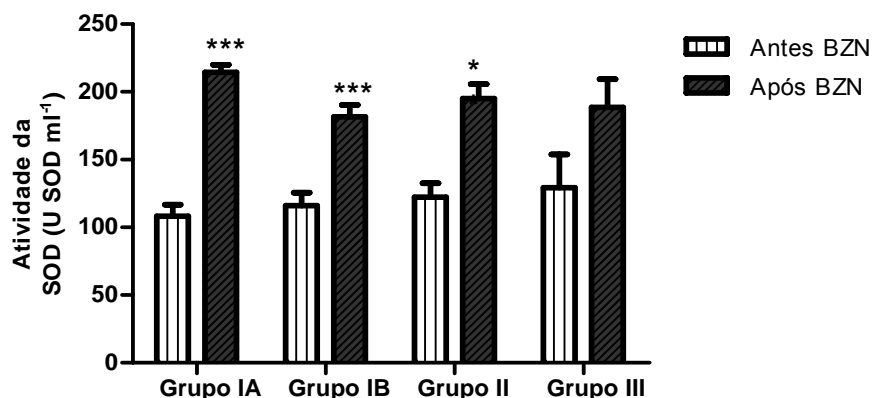


Figura 6 - Atividade da SOD no hemolisado de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

A suplementação antioxidante diminuiu significativamente o aumento da atividade enzimática da SOD, promovida pelo tratamento com BZN, ou seja,

reconstituiu os valores basais nos grupos IA (48,0%; $p < 0,0001$); IB (39,2%; $p < 0,0001$); II (42,1%; $p = 0,0002$), além de uma forte tendência de diminuição no grupo III, com $p = 0,0561$ (figura 7).

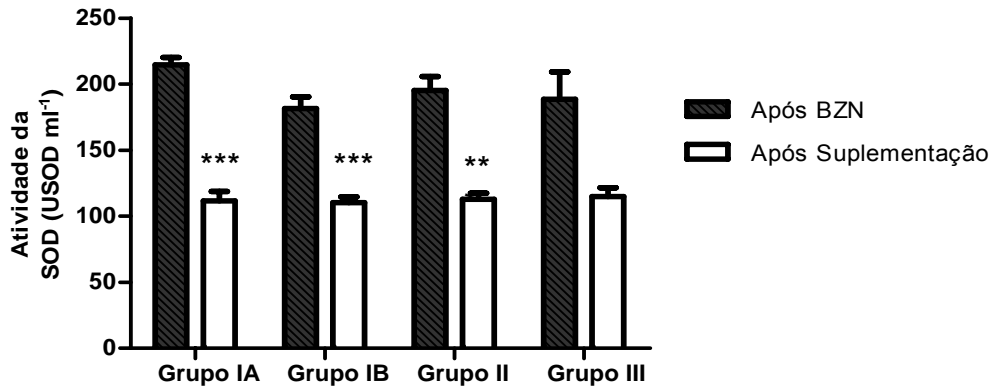


Figura 7 - Atividade da SOD no hemolisado de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante com vitaminas E e C durante 6 meses.

4.3.3 Atividade da catalase (CAT)

Após o tratamento com BZN, a atividade da CAT mostrou aumento significativo, segundo o teste *t* de Student pareado, nos grupos IA (35,3%; $p = 0,0390$), IB (54,8%; $p = 0,0001$) e II (44,2%; $p = 0,0068$) (figura 8)

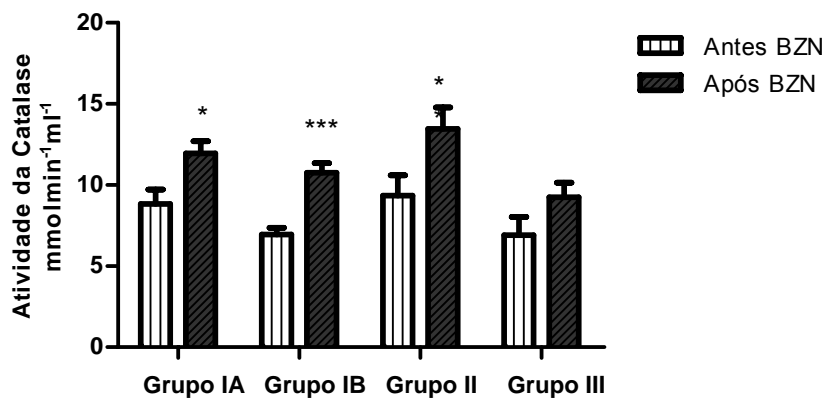


Figura 8 – Atividade da CAT no hemolisado de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a Classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Contrariamente, após a terapia antioxidante, a atividade da CAT foi a única enzima que mostrou aumento significativo nos grupos IA (17,5%; $p = 0,0020$) e grupo IB (26,0%; $p = 0,0095$) através do teste *t* de Student pareado (figura 9).

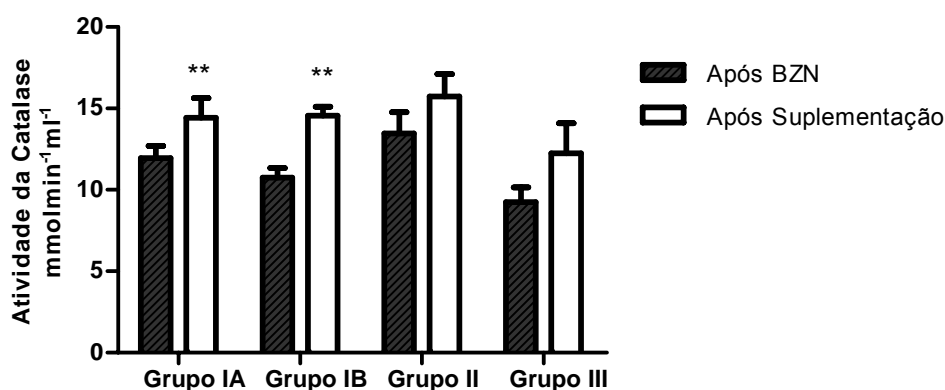


Figura 9 – Atividade da CAT no hemolisado de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a Classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.3.4. Atividade da Glutaciona Redutase (GR)

A atividade da GR foi aumentada apenas no grupo IB (26,8%; $p=0,0076$), com uma tendência de elevação no grupo IA ($p=0,0522$), após o tratamento com BZN (figura 10).

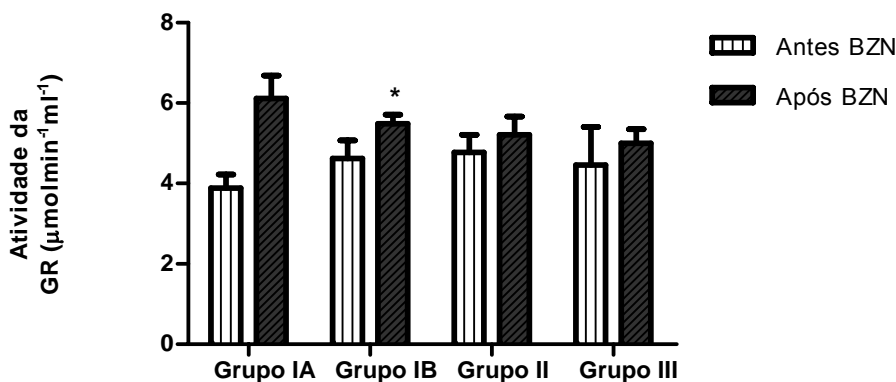


Figura 10 – Atividade da GR no hemolisado de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a Classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Interessantemente, nesses mesmos grupos, nos quais ocorreu o aumento de atividade enzimática de GR com o tratamento etiológico, foi observada uma inibição significativa após a terapia antioxidante, reconstituindo os valores basais da atividade enzimática (IA: 19,2%; $p=0,0395$ e IB:13,8%; $p=0,0345$), segundo teste t de Student. (figura 11).

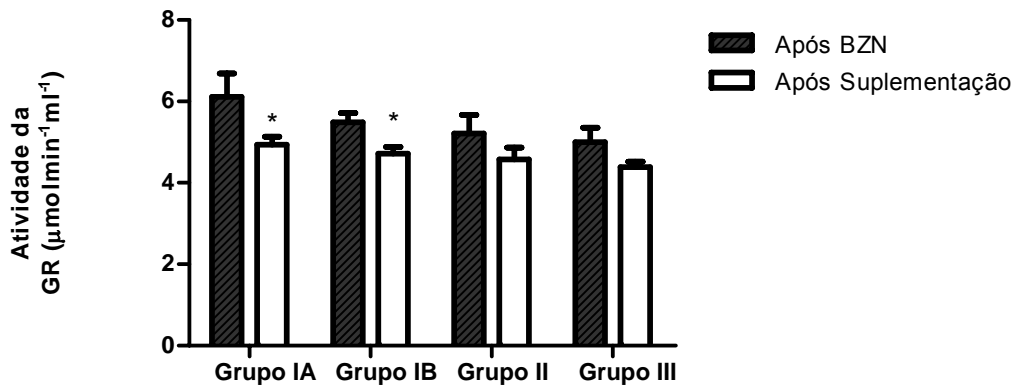


Figura 11 – Atividade da GR no hemolisado de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.3.5. Atividade da Glutathiona Transferase (GST)

Similarmente, o pareamento do teste *t*, mostrou que a atividade da GST foi fortemente aumentada após a terapia com BZN nos grupos IA (123,4%; $p < 0,0001$), IB (105,3%; $p < 0,0001$), II (137,1%; $p = 0,0090$), porém, o grupo III apresentou elevação sem significância ($p = 0,1043$) (figura12).

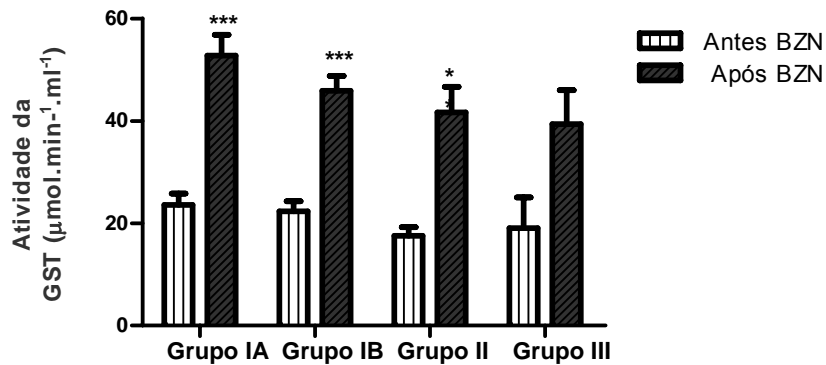


Figura 12 – Atividade da GST no hemolisado de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Entretanto, após a suplementação antioxidante, a atividade da GST não foi diminuída, ou seja, não apresentou diferenças significativas com a atividade determinada após a terapia com BZN, apenas tendências de diminuição (figura 13).

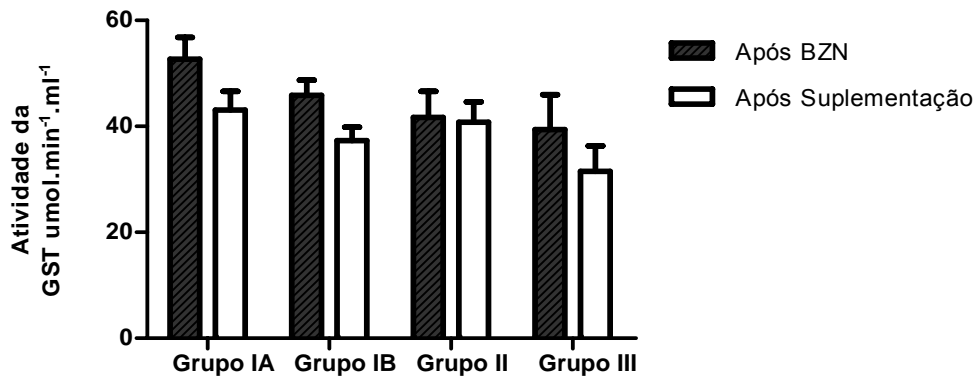


Figura 13 – Atividade da GST no hemolisado de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.4. Determinações dos antioxidantes não enzimáticos e nutricionais

4.4.1. Concentrações de Pequenos Tióis Não Protéicos (GSH)

Os níveis de GSH após a terapia com BZN não apresentaram diferença estatística entre o pareamento de grupos, porém, após a terapia, o grupo III apresentou níveis significativamente menores em relação ao grupo IA, segundo análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey (figura 14).

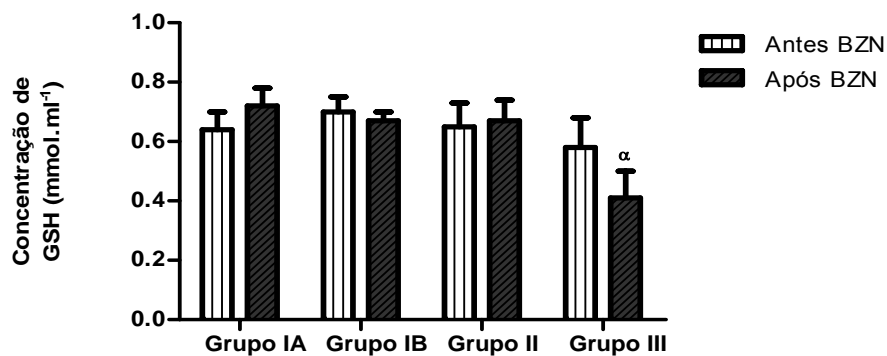


Figura 14 – Níveis de GSH em sangue total de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Contudo, após a suplementação antioxidante, os níveis de GSH apresentaram-se diminuídos nos grupos IA (35,9%; $p=0,0002$); IB (29,6%; $p=0,0006$); II (26,0%; $p=0,0211$), segundo o teste t de Student (figura 15).

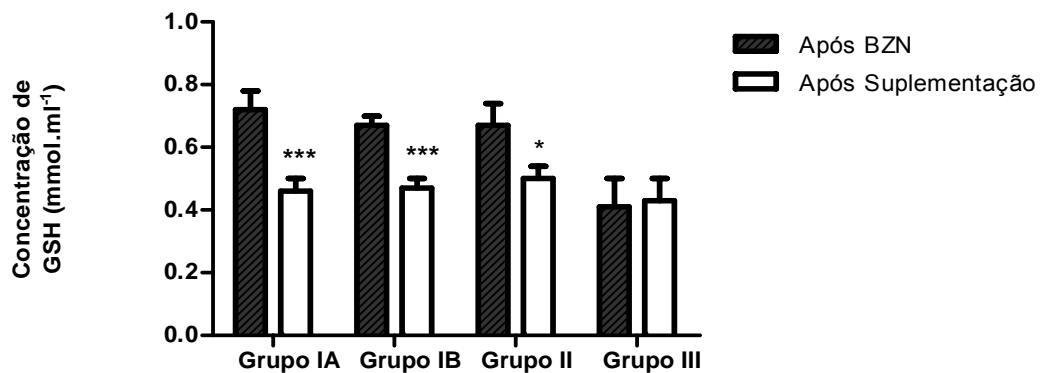


Figura 15 – Níveis de GSH em sangue total de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.4.2. Concentração de vitamina E

O tratamento com BZN promoveu uma depleção da vitamina E com significância, nos grupos IA (27,00%; $p=0,0057$), IB (20,30%; $p=0,0137$) e II (44,2%; $p=0,0230$). A análise de variância entre grupos, a exemplo do trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório (MAÇAO *et al.*, 2007), mostrou que os grupos II e III (com maior comprometimento cardíaco), apresentam níveis menores de vitamina E em relação aos grupos IA e IB (figura 16).

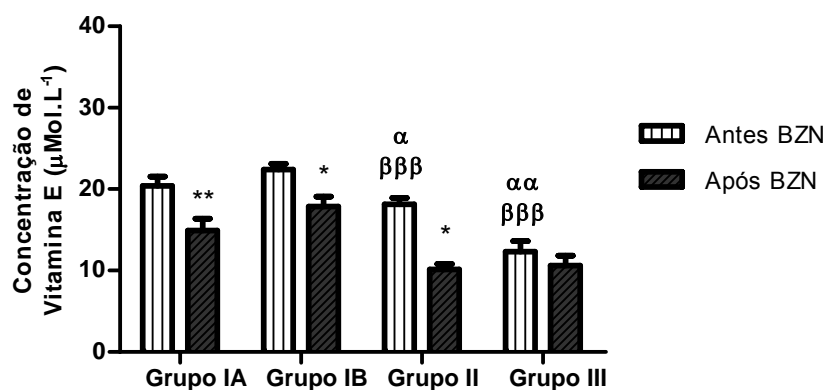


Figura 16– Níveis de Vitamina E em plasma de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

A terapia antioxidante foi capaz de restaurar e aumentar os níveis de vitamina E, com aumentos significativos nos grupos: IA (43,8%; $p=0,0006$); IB (24,0%; $p=0,0118$); II (63,3%; $p=0,0061$), sem apresentar esse efeito no grupo III com maior

comprometimento cardíaco, o qual novamente mostrou menores níveis através da ANOVA seguida pelo teste de Tukey, comparado aos demais grupos (figura 17).

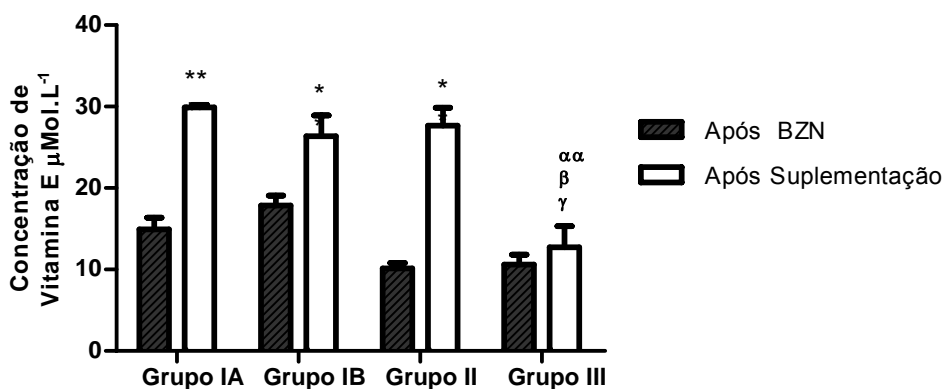


Figura 17 – Níveis de Vitamina E em plasma de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.4.3. Concentração de vitamina C

As concentrações de vitamina C não permitiram sua inclusão nos resultados, devido a problemas da reprodução da metodologia no HPLC com detector eletroquímico. O método de escolha inicial foi o descrito por Lykkesfeldt e colaboradores (1995), porém, o protocolo de extração ou a própria composição da amostra, ocasionou problemas durante a corrida analítica no equipamento, impossibilitando analisar as amostras. Maçao e colaboradores (2007), também não conseguiram reproduzir a técnica, pois níveis de vitamina C eram muito baixos ou indetectáveis nas amostras, apesar da redução prévia das amostras para contornar eventuais oxidações das mesmas.

4.5. Determinação de marcadores de dano oxidativo

4.5.1. Lipoperoxidação Tecidual – Determinação de TBARS

A análise pareada não mostrou diferenças significativas nos níveis de TBARS após a terapia com BZN, bem como diferenças entre os diferentes grupos pela ANOVA (figura 18).

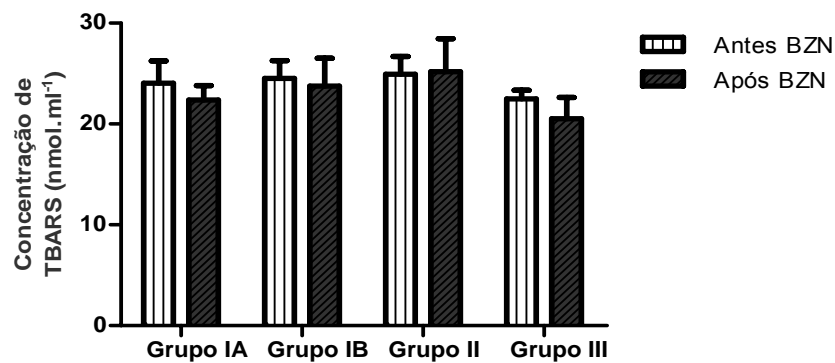


Figura 18 – Níveis de TBARS em plasma de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Semelhante à última suplementação nos mesmos pacientes em estudo anterior (MAÇAO *et al.*, 2007), os níveis de TBARS diminuíram significativamente em todos os grupos: IA (64,0%; $p < 0,0001$); IB (64,5%; $p = 0,0007$); II (71,6%; $p = 0,0011$) e III (61,4%; $p = 0,0341$), através do teste *t* de Student (figura 19).

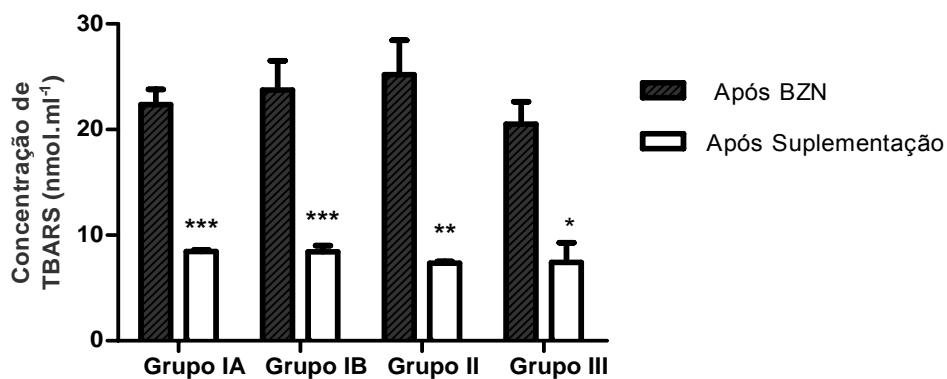


Figura 19 – Níveis de TBARS em plasma de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.5.2. Proteína Carbolinada (PC)

O pareamento com teste *t* revelou que os níveis de PC foram elevados significativamente, após o tratamento etiológico nos grupos: IA (61,8%; $p = 0,0046$), IB (64,6%; $p = 0,0025$), group II (100%; $p = 0,0041$), e novamente não significativa no grupo III (figura 20).

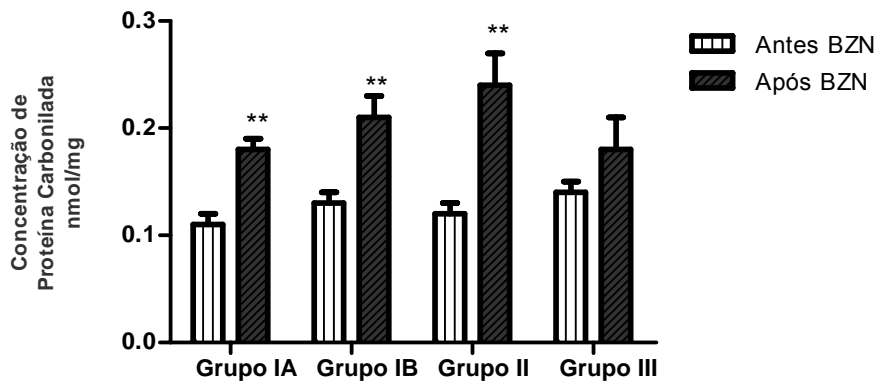


Figura 20 – Níveis de PC em plasma de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

O aumento nos níveis de dano protéico promovido pelo tratamento com BZN foi minimizado significativamente com a terapia antioxidante, nos grupos IA (20,5%; $p=0,0034$); IB (35,0%; $p=0,0003$) e II (35,94%; $p=0,0014$) e novamente sem significância no grupo III (figura 21).

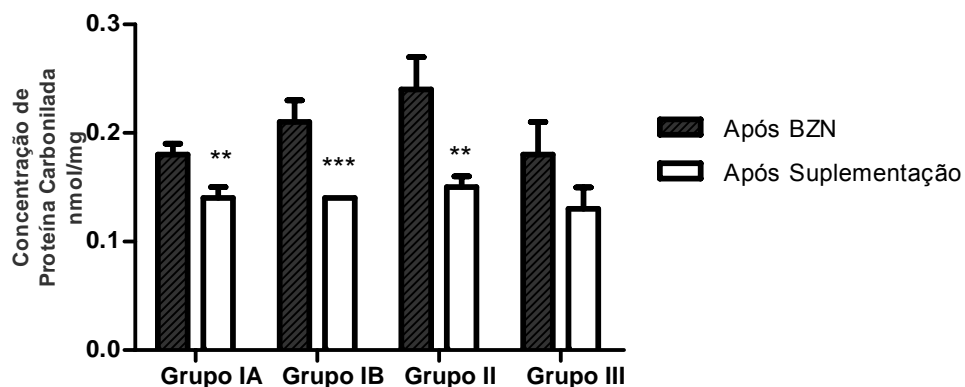


Figura 21 – Níveis de PC em plasma de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.6. Determinação de Marcadores Inflamatórios

4.6.1. Atividade da Adenosina Deaminase (ADA)

A determinação da ADA não sofreu alteração significativa após o tratamento com BZN (figura 22).

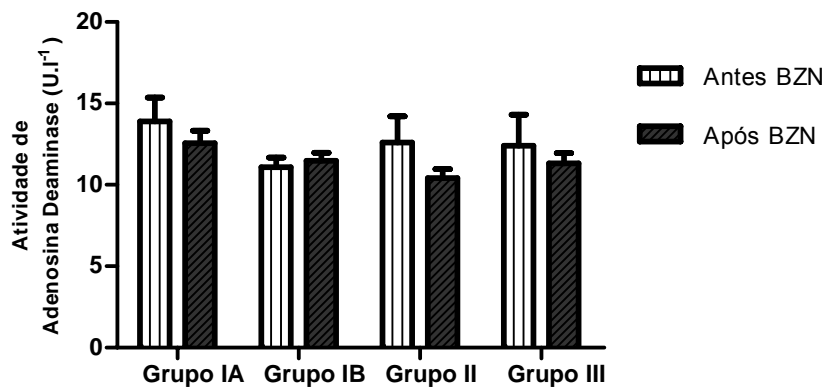


Figura 22 – Atividade da ADA no soro de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Entretanto, pelo teste *t* de Student, após a terapia antioxidante, a atividade de ADA diminuiu nos grupos IA (40,7%; $p=0,0113$) e IB (28,0%; $p=0,0022$) (figura 23).

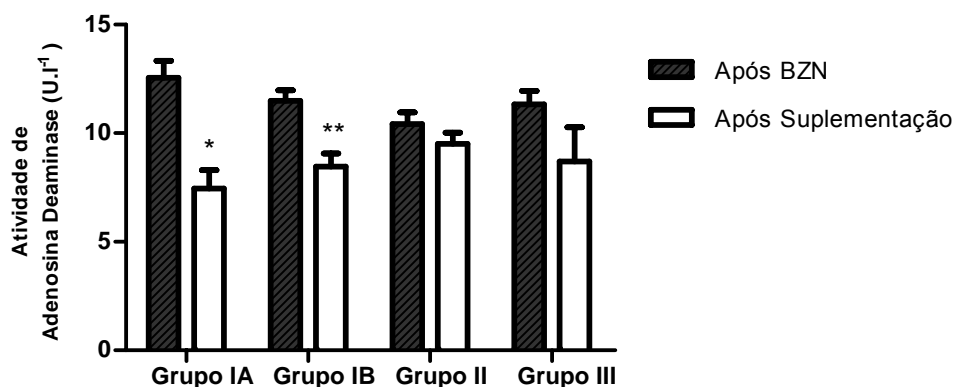


Figura 23 – Atividade da ADA no soro de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.6.2. Concentração de Óxido Nítrico (*NO)

A determinação de *NO não foi alterada após o tratamento com BZN, porém, apesar da ausência de significância estatística pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey, foi possível observar uma tendência de aumento de *NO proporcional ao grau de comprometimento cardíaco nas duas determinações ($p=0,0966$, após BZN) (figura 24).

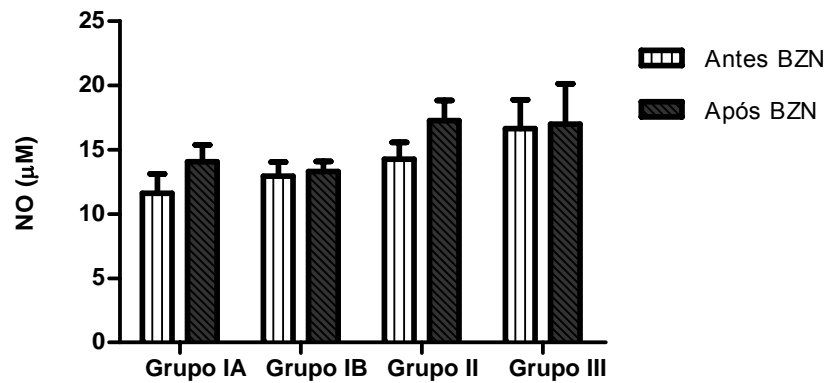


Figura 24 – Níveis de NO em soro de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Por outro lado, após a terapia antioxidante, a análise pareada demonstrou um decréscimo significativo nos níveis de NO nos grupos: IA (32,5%; $p=0,0443$); IB (33,4%; $p=0,0214$) e II (28,9%; $p=0,0402$) (figura 25).

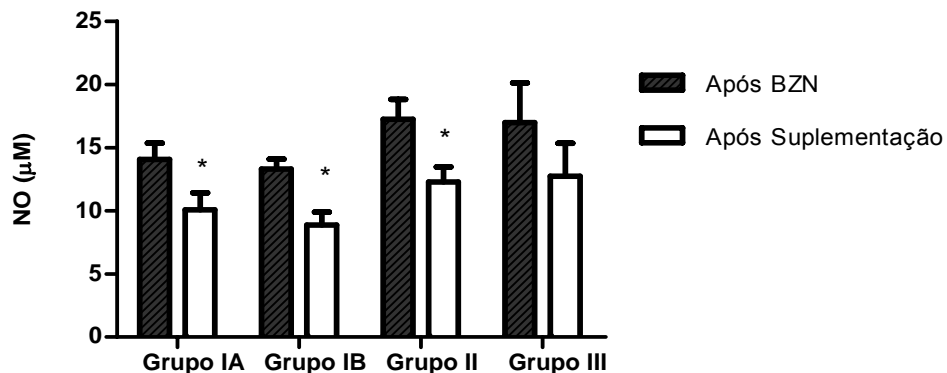


Figura 25 – Níveis de NO em soro de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 6 meses.

4.6.3. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO não evidenciou diferenças após o tratamento com BZN (figura 26).

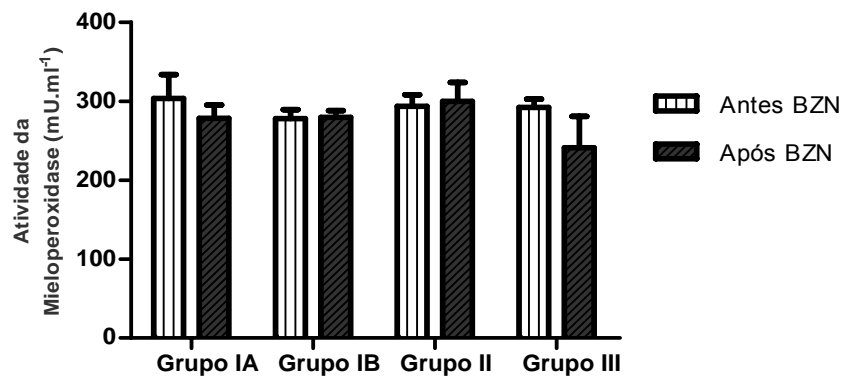


Figura 26 – Atividade da MPO no soro de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, antes e depois da terapia com BZN durante 2 meses.

Da mesma maneira, após a suplementação não houve interferência dessa terapia na atividade de MPO, porém, a análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Tukey entre grupos mostrou que o grupo II apresentou maior atividade comparada ao grupo IA. Seguindo o mesmo perfil, apesar de não ser significativo, o grupo III também teve uma tendência menor de atividade, comparada ao grupo IA (figura 27).

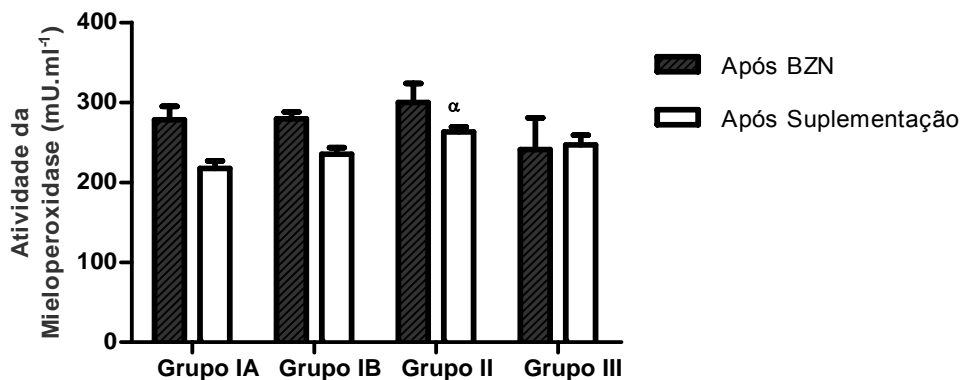


Figura 27 – Atividade da MPO no soro de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos divididos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco, segundo a classificação de Los Andes modificada, pós BZN e depois da terapia antioxidante durante 2 meses.

5. Discussão

Nossos resultados mostraram que o tratamento com BZN promoveu um aumento das atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GST e GR (apenas no grupo IB), principalmente nos estágios mais iniciais da doença, já que o grupo III só apresentou aumento significativo na atividade da enzima GPx. Aumentos enzimáticos frente à terapia com BZN, caracterizam um mecanismo compensatório devido à provável elevação da geração de EROs e ERNs, decorrente do metabolismo oxidativo do BZN, provavelmente através do sistema microsomal P450 (MASANA; TORANZO; CASTRO, 1984). As enzimas do CYP450 têm grande importância no metabolismo oxidativo de xenobióticos, sendo que, a utilização do oxigênio molecular combinado com a oxidação do NADPH reflete o mecanismo pelo qual estes compostos são biotransformados, sendo as EROs um produto secundário deste processo enzimático (SEVANI *et al.*, 1990). Hepatócitos de ratos tratados com BZN mostraram uma indução do sistema P450, sub-família fase IAI (CYP1A1), com indução de estresse oxidativo, sendo que esse processo foi revertido pela administração de um inibidor de CYP1A1, indicando que o estresse oxidativo mediado pelo tratamento com BZN ocorreu através da metabolização do fármaco através desse sistema enzimático (DE BEM, 2001; BOTELHO, 2003).

Adicionalmente, um estudo mostrou que o aumento da expressão da isoenzima Fe-SOD B1 em *T.cruzi* aumenta a sensibilidade de medicamentos como BZN e violeta genciana, devido ao acúmulo de H₂O₂, indicando a importância do papel da geração de EROs na biotransformação e na atividade antiparasitária de BZN (TEMPERTON *et al.*, 1998).

Os aumentos concomitantes da CAT e GPx, provavelmente refletem uma compensação à elevada produção de H₂O₂, e outros hidroperóxidos, pois em eritrócitos a GPx é responsável pela detoxificação de H₂O₂, enquanto que o aumento da atividade da CAT só ocorreria quando altas concentrações de H₂O₂ são produzidas sistemicamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

Além disso, outra possível fonte de geração de espécies reativas durante o tratamento etiológico com BZN poderia residir na ativação fagocitária, pois alguns estudos recentes mostraram que o BZN promoveu um efeito de ativação celular com geração de EROs, a partir da ativação de NADPH-oxidase, além de ERNs, com ativação de macrófagos e subsequente da enzima óxido nítrico sintase e produção

de citocinas pró/anti inflamatórias, sendo esse efeito atribuído como um mecanismo responsável pelo benefício do tratamento etiológico (SATHLER-AVELAR, 2006; 2007).

Por outro lado, a relativa incapacidade dos pacientes pertencentes ao grupo III, o qual compreende indivíduos com maior comprometimento cardíaco e insuficiência cardíaca, em compensar o estresse oxidativo através de enzimas antioxidantes, já havia sido demonstrada em estudos prévios (PÉREZ-FUENTES *et al.*, 2003), e inclusive pelos trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa com esses mesmos pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAÇAO *et al.*, 2007).

Paralelamente a esse aumento das atividades das enzimas antioxidantes após a terapia com BZN, houve um aumento nas concentrações de oxidação de proteínas (PC), novamente com exceção do grupo III, o qual apresentou apenas uma tendência de elevação. Pedrosa e colaboradores (1997) mostraram que em pacientes chagásicos em fase avançada de comprometimento cardíaco, houve um aumento do metabolismo anaeróbico, com menor utilização de oxigênio, paralelo ao aumento de remodelamento ventricular (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Considerando que a geração de EROs é diretamente proporcional quase linear à utilização de oxigênio (BOVERIS; CHANCE, 1973; WILHELM FILHO *et al.*, 2000), é esperado uma diminuição da geração de EROs nesses indivíduos, sendo que esse mecanismo pode ser uma justificativa para a ausência de elevação significativa de PC nesse grupo de maior comprometimento. Entretanto, há certa limitação relativamente às inferências ao grupo III, no que se refere ao número amostral, o qual é consideravelmente menor em relação aos demais grupos (devido principalmente aos óbitos ocorridos ao longo do projeto), sendo isso umas das possíveis causas para a menor significância estatística observada tanto para a proteína carbonilada, como para algumas atividades enzimáticas analisadas, onde se observam diferenças que não apresentaram significância estatística. Mais especificamente, no início do projeto no ano de 2003, o grupo III era composto por dez pacientes. Entretanto, ao longo desses últimos quatro anos, alguns pacientes foram a óbito ou abandonaram o projeto, diminuindo consideravelmente a sua amostragem, sendo que, devido à resposta limitada desse grupo frente à terapia antioxidante (MAÇAO *et al.*, 2007), não foram recrutados mais pacientes classificados com grau III para o presente estudo.

Com relação ao aumento de PC nos demais grupos, este biomarcador estaria refletindo o aumento na oxidação protéica promovido pelo tratamento com BZN no hospedeiro. A elevação de níveis de PC é observada em vários animais e culturas celulares, seguido de sua exposição a condições que desencadeiam o estresse oxidativo (BERLETT; STADTMAN, 1997). Alguns trabalhos em modelos animais mostraram que metabólitos reativos de BZN ligam-se covalentemente em diferentes tecidos para provocar injúria celular em órgãos como: testículos, ovários, adrenais, colón, esôfago, com aumento de dano oxidativo em organelas e proteínas devido ao seu metabolismo nitroreductor (CASTRO *et al.*, 1989; CASTRO *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2006). Destarte, a toxicidade do BZN seria consequência da interação de seus metabólitos reativos com DNA, proteínas, lipídios, além de outros componentes celulares (CASTRO *et al.*, 2006). Independentemente do mecanismo envolvido na ação deste fármaco, o tratamento com BZN promoveu um dano oxidativo protéico no hospedeiro.

Contrariamente, o processo de lipoperoxidação avaliado pela determinação de TBARS, não apresentou diferença após o tratamento com BZN. É provável que os aumentos nas atividades das enzimas GPx, GST e CAT foram responsáveis por evitar o aumento de dano lipídico mensurado através do níveis de TBARS. A via primária de detoxificação de aldeídos citotóxicos, tais como o 4-hidroxi-trans-2-nonenal, produzidos durante o processo de peroxidação lipídica é a sua conjugação com GSH catalisada pela enzima GST (TJALKENS *et al.*, 1998; LIU; TSAI, 2002). Além disso, a glutathione peroxidase fosfolipídio hidroperóxido, é uma fração enzimática da GPx que é capaz de reagir com fosfolipídios, inibindo o processo de lipoperoxidação de membranas (ARTHUR, 2000; IMAI; NAKAGAWA, 2003). Contrariamente, em hepatócitos de ratos tratados com BZN, houve uma diminuição da atividade de GST ao longo de um mês de tratamento (PEDROSA *et al.*, 2001). Além disso, houve também inibição das atividades de GR e CAT e não ocorreu alteração na atividade de SOD, ao final do tratamento. Estes resultados em conjunto evidenciaram que o perfil dos biomarcadores de estresse oxidativo em sangue de pacientes chagásicos crônicos após o tratamento com BZN não foi semelhante ao perfil dos mesmos biomarcadores em hepatócitos de ratos tratados com o mesmo fármaco (PEDROSA *et al.*, 2001). Como consequência, inferências a partir de modelos animais aparentemente não são necessariamente validadas para humanos quanto ao uso deste fármaco anti-chagásico.

Após o tratamento com BZN, repetindo a exceção envolvendo o grupo III, os níveis de vitamina E foram consumidos significativamente, indicando que a terapia com BZN promoveu uma diminuição desse antioxidante nutricional. Esse consumo também poderia ter sido responsável pela manutenção dos níveis de TBARS, já que a vitamina E é o principal antioxidante lipossolúvel com capacidade de inibir as reações de propagação da lipoperoxidação (BURTON;JOYCE;INGOLD, 1982; TRABER; ATKINSON, 2007). A análise estatística antes da terapia com BZN revelou que os grupos II e III apresentaram níveis mais baixos de vitamina E, quando comparados aos grupos com menor comprometimento cardíaco. Esses grupos com estágios mais avançados de comprometimento cardíaco apresentaram um grau de estresse oxidativo maior em relação aos demais grupos, aspecto já demonstrado anteriormente nestes pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Deste modo, confirmaria a inferência já levantada neste estudo anterior, de que o consumo de antioxidantes nutricionais é proporcionalmente mais acentuado em estágios mais avançados, no sentido de minimizar os efeitos oxidativos deletérios que acompanham a progressão da doença. Reiterando, o decréscimo dos níveis de vitamina E foi correlacionado ao grau de severidade da doença, corroborando os resultados do estudo realizado anteriormente com esses mesmos indivíduos (MAÇAO *et al.*, 2007).

Com relação às concentrações de GSH, após a terapia com BZN, a única diferença estatística encontrada foi em relação ao grupo III, o qual apresentou níveis significativamente menores em relação ao grupo IA. Esses resultados sugerem uma relação sinérgica entre vitamina E e GSH em pacientes com um elevado grau de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

Da mesma maneira, após a suplementação antioxidante com as vitaminas E e C, todos os grupos apresentaram uma elevação das concentrações de vitamina E, com exceção do grupo III, que apresentou níveis significativamente menores em relação aos demais grupos. O comprometimento esofágico e intestinal mais acentuado nos pacientes pertencentes ao grupo III, também poderia acarretar em menor absorção da vitamina E, o que justificaria a manutenção da vitamina E nesse grupo após a suplementação.

A importância da vitamina E na doença chagásica foi mostrada em um estudo, onde ratos infectados com *T. cruzi* que apresentavam deficiência de vitamina E, apresentaram aumento de miocardite, denervação simpática, leucopenia e aumento de diferenciação de monócitos em macrófagos (CARVALHO *et al.*, 2006).

Além disso, vários estudos em diferentes países tem demonstrado uma correlação inversa entre os níveis de vitamina E e o risco para desenvolvimento ou morte de doenças cardiovasculares (KUSHI *et al.*, 1996; BOAZ *et al.*, 2000; PRYOR, 2000; SIDANI; ZIEGLER, 2008). Logo, considerando que a suplementação foi capaz de restaurar os níveis de vitamina E depletados pela terapia com BZN, essa associação de suplementação após a terapia com BZN poderia, adicionalmente, além de diminuir a agressão oxidativa causada pelo tratamento, restaurar os níveis de alfa tocoferol depletados, e ainda, promover uma diminuição do risco desses pacientes com menor comprometimento cardíaco ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares mais graves.

Da mesma forma, o aumento das concentrações de PC promovido pelo tratamento com BZN foi atenuado pela suplementação, com diminuição significativa em todos os grupos com exceção do grupo III, sendo que, a terapia antioxidante também foi efetiva em diminuir os níveis de PC e TBARS nesses mesmos pacientes dois anos atrás, durante a avaliação de seu efeito isolado na CCC (MAÇAO *et al.*, 2007). A repetição deste resultado é um forte indício de que a associação da suplementação antioxidante com vitaminas E e C após a terapia com BZN, pode atenuar os efeitos deletérios do metabolismo nitroreduzidor que o BZN gera no hospedeiro, e igualmente, assegurando a eficácia do efeito protetor desta forma de suplementação antioxidante. Um estudo citogenético mostrou um aumento de aberrações cromossômicas em macrófagos de animais tratados com BZN, sendo que a terapia antioxidante com vitamina E diminuiu significativamente essas aberrações, indicando que esse efeito clastogênico do BZN provavelmente ocorreu através de processos oxidativos, que podem ser prevenidos pelo α -tocoferol (LACAVA; LUNA, 1994).

Apesar de não haver um aumento do processo de lipoperoxidação após o tratamento com BZN, os resultados obtidos mostraram que novamente a terapia antioxidante foi capaz de diminuir os níveis de TBARS em todos os grupos, reforçando o papel protetor da vitamina E contra o processo de oxidação de lipídios. Considerando os biomarcadores de estresse oxidativo, a terapia com vitaminas E e C novamente foi capaz de minimizar o insulto oxidativo lipídico e protéico inerente aos pacientes chagásicos cardiopatas crônicos, resultado já obtido anteriormente por nosso grupo (MAÇAO *et al.*, 2007).

Com relação às enzimas antioxidantes, o aumento de suas atividades, provavelmente promovidos pelo tratamento com BZN, foi atenuado pela suplementação antioxidante. Mais especificamente, isto ficou evidenciado pela diminuição da atividade das enzimas GPx (em todos os grupos) SOD (todos os grupos, com exceção do grupo III), e GR (grupos IA e IB), sugerindo que o provável mecanismo responsável pela suas elevações, foi a produção maior de EROs ocorrida durante o tratamento com o fármaco. O ácido ascórbico é um agente antioxidante fraco (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001) que, todavia, pode neutralizar várias EROs, além de atuar no processo de regeneração de outros antioxidantes, notadamente o radical tocoferoxil, conforme já mencionado (PADAYATTY *et al.*, 2003). O alfa tocoferol, além de suas propriedades antioxidantes, causa inibição da proteína quinase C (PKC), comprometendo a liberação de NADPH-oxidase e inibindo a produção de $O_2^{\bullet-}$ por monócitos e macrófagos (REITER; JIANG; CHRISTEN, 2007). Como discutido anteriormente, a estimulação de produção de EROs por fagócitos via NADPH-oxidase, é um dos mecanismos que poderia elevar a produção de tais espécies durante o tratamento com BZN, além da sua produção durante seu metabolismo. Devaraj e Jialal (2000) mostraram que monócitos ativados de indivíduos com diabetes tipo II suplementados com vitamina E, produziram menor quantidade de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 .

Por outro lado, a atividade da enzima GST, não exibiu diferença estatística após a suplementação. Um trabalho recente mostrou que camundongos suplementados com vitamina E (1000 UI) durante 4 meses, apresentaram aumento da expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo e excreção de xenobiontes, incluindo a GST, modulando suas próprias concentrações no organismo. Embora especulativo, é possível sugerir que a atividade de GST, que também foi aumentada após o tratamento com BZN, não apresentou diminuições significativas após a suplementação através desse provável efeito atribuído ao α -tocoferol (MUSTACICH *et al.*, 2008).

Contrariamente, a CAT foi a única enzima que apresentou aumento de sua atividade nos grupos IA e IB, após a suplementação. Um experimento realizado em ratos mostrou que eritrócitos deficientes de vitamina E apresentaram grande deficiência de CAT. Após a suplementação com vitaminas E, houve um aumento da atividade da CAT, sem, entretanto, alterar as atividades de SOD e GPX. Corroborando nossos resultados, esses dados indicam que a suplementação com

vitamina E aparentemente fornece uma proteção contra a inativação da CAT em condições experimentais (CHOW, 1980; 1992). Além disso, um estudo demonstrou que o alfa e o gama-tocoferol podem aumentar a expressão do receptor ativador de proliferação do peroxissoma (PPAR- γ e PPAR- α), os quais estão envolvidos na ativação da β -oxidação lipídica em peroxissomas. Levando em consideração que durante o processo de β -oxidação de lipídios nessa organela, ocorre a produção de H_2O_2 , com conseqüente aumento da atividade da CAT, esse também poderia ser um mecanismo envolvido no aumento da atividade dessa enzima após a suplementação antioxidante nesses pacientes (LATRUFFE *et al.*, 2000; CAMPBELL *et al.*, 2003; GONZÁLEZ *et al.*, 2007).

Os níveis de GSH diminuíram após a suplementação com as vitaminas E e C nos grupos IA, IB e II. Pesquisas em cobaias oxidativamente estressados, mostraram que a ingestão de vitamina C diminuiu, compensatoriamente as concentrações de GSH pulmonar e hepática (SHANG *et al.*, 2002). Em outro trabalho desenvolvido por esses mesmos pesquisadores, a incubação de células deficientes de GSH com vitaminas E e C promoveu uma tendência a diminuição de GSH, e, paralelamente, diminuiu significativamente a concentração de GSSG, aumentando o *status* redox celular. Esses pesquisadores sugeriram que a suplementação com vitaminas E e C poderia suprimir a síntese endógena de GSH, afetando a expressão da atividade da enzima gamaglutamilmcisteína sintetase, a qual promove a síntese de GSH, sugerindo que esse é um mecanismo celular que manteria a homeostase antioxidante. Esses dados sugerem que células e tecidos podem regular os níveis de GSH adaptativamente, em resposta a mudanças em sua capacidade intracelular antioxidante (SHANG *et al.*, 2003, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

Em revisão recente, Brigelius-Flohé (2009) sugeriu que as propriedades benéficas da vitamina E provavelmente não estariam relacionadas à sua atividade antioxidante, devido à falta de evidências científicas *in vivo* que comprovem a eficácia dessa suplementação em relação ao estresse oxidativo. O presente trabalho apresenta resultados concretos de que o efeito protetor da vitamina E provavelmente está relacionado com a sua capacidade antioxidante em pacientes com CCC após a terapia com BZN. Além disso, os resultados obtidos com os mesmos pacientes em estudo anterior (MAÇAO *et al.*, 2007), quando foi avaliado o efeito isolado dessa terapia antioxidante, de forma semelhante ao presente estudo,

mostrou que o tratamento com a suplementação com vitaminas E e C, promoveu uma atenuação do dano oxidativo no sangue nesses pacientes relacionada com a progressão da doença. De forma análoga, outro trabalho recente realizado por nosso grupo de trabalho, mostrou a eficácia da combinação das vitaminas E e C em atenuar o estresse oxidativo relacionado com o tratamento de pacientes com hepatite C tratados com ribavirina e interferon (FARIAS, 2009).

Além de suas propriedades antioxidantes, vários trabalhos têm ressaltado as propriedades anti-inflamatórias da vitamina E (SINGH; DEVARAJ; JIALAL, 2005; REITER; JIANG; CHRISTEN, 2007). Após a suplementação com vitaminas E e C, as concentrações de $\bullet\text{NO}$ foram diminuídas nos grupos IA, IB e II. Embora as análises entre grupos, nas determinações basal e após BZN, não tenham demonstrado diferença estatística, houve uma tendência de aumento de $\bullet\text{NO}$, proporcional ao comprometimento da doença. Pérez-Fuentes e colaboradores (2003), reportaram o aumento de $\bullet\text{NO}$ paralelo ao grau de comprometimento cardíaco em pacientes chagásicos crônicos. Naviliat e colaboradores (2005) observaram que o aumento da nitração de proteínas (3-nitrotirosina), detectadas em processos inflamatórios no miocárdio de camundongos chagásicos, que ocorrem em consequência do aumento de $\bullet\text{NO}$, pareceu diminuir o parasitismo, mas promoveu igualmente dano colateral ao miocárdio. Da mesma maneira, Dhiman e colaboradores (2008), mostraram que animais infectados com *T. cruzi* apresentam aumento da expressão de $\bullet\text{NO}$ e estresse nitrosativo, demonstrado pelo aumento da nitração de proteínas, proporcional ao grau de comprometimento do miocárdio. Assim sendo, essa propriedade da suplementação em diminuir os níveis de $\bullet\text{NO}$, poderia resultar numa menor formação de ERNs e minimizar seus efeitos deletérios ao miocárdio, nos grupos com menor comprometimento cardíaco.

Paralelamente, a atividade da enzima ADA apresentou uma diminuição nos grupos IA e IB. A ADA é considerada um indicador inespecífico de ativação de linfócitos T (LEE *et al.*, 2007). Considerando a importância dessas células na progressão da CCC (GUIMARÃES, 1997), é possível sugerir através dos resultados obtidos, que a terapia antioxidante foi capaz de minimizar o processo inflamatório mediado por células T, nos estágios mais iniciais de comprometimento cardíaco.

Entretanto, a atividade da enzima MPO não foi alterada após a suplementação. Porém é importante ressaltar que a análise de variância entre os

grupos mostrou que o grupo II apresentou valores de atividade de MPO maiores em relação ao grupo IA. A MPO, assim como seus derivados reativos, está implicada em condições inflamatórias. Além disso, alguns estudos já mostraram que essa enzima poderia estar envolvida em disfunções do miocárdio e remodelamento anormal ventricular após lesões isquêmicas (NICHOLLS; HAZEN, 2005). Houve uma tendência de aumento do grupo III em relação ao grupo IA, sendo assim, em estágios mais comprometidos da doença, essa enzima aparentemente possui maior atividade. Contrariamente aos nossos resultados, a determinação da MPO, realizada após a suplementação desses mesmos pacientes há dois anos, mostrou uma diminuição dessa enzima. É possível que este tipo de parâmetro analisado sofra modificações com a evolução da doença. Afinal, a doença de Chagas, em sua fase crônica é uma doença progressiva, podendo ocorrer mudanças em sua evolução, e que a mesma necessite de uma massa crítica de comprometimento para ter manifestações laboratoriais. Apesar disso, os dados do presente trabalho confirmam, em geral, aqueles resultados anteriormente obtidos nesses pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAÇAO *et al.*, 2007), no sentido de um progressivo aumento do estresse oxidativo relacionado com o fator temporal na cardiopatia chagásica crônica.

Em resumo, o tratamento com BZN promoveu dano oxidativo, evidenciado pelo aumento das concentrações de PC, além do consumo de vitamina E e pelo aumento da atividade de várias enzimas antioxidantes. Provavelmente, os aumentos das atividades da GPx e GST foram capazes de evitar aumento do processo de lipoperoxidação (TBARS) relacionado com o tratamento com o BZN. Entretanto, os marcadores GSH, *NO, MPO e ADA permaneceram inalterados após o tratamento.

Por outro lado, a terapia antioxidante com vitaminas E (800UI/dia) e vitamina C (500mg/dia), foi capaz de minimizar esse dano oxidativo, através da diminuição dos níveis de PC, aumento dos níveis plasmáticos de vitamina E, e a diminuição das atividades de algumas das enzimas que foram aumentadas após o tratamento etiológico. Além disso, como evidenciado com a mesma suplementação há dois anos nesses pacientes (MAÇAO *et al.*, 2007), os níveis de TBARS, mesmo tendo permanecido inalterados com a terapia com BZN, diminuíram acentuadamente com a suplementação.

Coerentemente, o grupo III, a exemplo dos outros trabalhos desenvolvidos por nosso grupo (OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAÇAO, 2006; MAÇAO *et al.*, 2007), na determinação basal, apresentou níveis de vitamina E mais baixos em

relação aos grupos IA e IB, e após a terapia com BZN, níveis de GSH menores em relação ao grupo IA, só apresentando resposta compensatória frente à terapia com BZN, através de aumento da atividade enzimática da GPx. Da mesma forma, esse grupo, constituído por pacientes com insuficiência cardíaca, após a suplementação com vitamina E e C, apresentou níveis mais baixos de vitamina E em relação aos demais grupos, e, com exceção da inibição da enzima GPx e da diminuição dos níveis de TBARS, os demais parâmetros não obtiveram resposta nesse grupo com a suplementação antioxidante, na mesma proporção que os demais grupos menos comprometidos.

Não foi possível avaliar os padrões de normalidade para os parâmetros analisados, pela falta de um grupo controle, no entanto, este não foi, desde o princípio, o objetivo do presente estudo, tampouco daquele anteriormente desenvolvido em nosso laboratório (MAÇAO, 2006). Trata-se de um estudo de intervenção terapêutica de uma amostra pertencente a uma coorte aberta constituída de pacientes, acompanhados no ICES/Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-UFRJ. Logo, o objetivo do estudo foi avaliar a intervenção em um dado momento, e não o de comparar estes pacientes com um grupo de indivíduos saudáveis, aspecto que foi contemplado no trabalho inicial do projeto sobre Chagas (OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo analisados, a dieta é um fator determinante para os resultados, bem como sua interpretação. Porém, nesse caso, há uma carência de instrumentos adequados para populações com nível nutricional tão reduzido. A doença de Chagas atinge indivíduos excluídos das mínimas condições de assistência do Estado, a começar pelas precárias condições de moradias, aspecto que muito caracteriza o perfil sócio-econômico da doença, e que provavelmente podem ter contribuído para a infecção.

6. Conclusões

1. O tratamento com BZN promoveu um dano oxidativo evidenciado pelo aumento das concentrações de PC, além da depleção de vitamina E e aumentos das atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST, principalmente nos grupos com menor comprometimento cardíaco.
2. A suplementação antioxidante foi capaz de atenuar o dano oxidativo em proteínas, causado pelo tratamento com BZN, evidenciado pela diminuição de PC, além de restaurar e aumentar os níveis de vitamina E, com exceção do grupo III e diminuir a atividade das enzimas, SOD, GPx e GR, portanto, sendo eficaz em atenuar o dano oxidativo causado por aquele tratamento, principalmente nos estágios iniciais da doença. Além disso, da mesma maneira que o projeto anterior (MAÇAO *et al.*, 2007), a suplementação causou uma diminuição do processo de lipoperoxidação, através da diminuição dos níveis de TBARS, e, no que se refere aos marcadores inflamatórios, essa terapia também promoveu uma diminuição dos níveis de NO e ADA nos estágios menos comprometidos da doença..
3. Conjuntamente, esses dados sugerem que a associação da terapia antioxidante após o tratamento etiológico da Doença de Chagas com BZN, é eficaz em atenuar os efeitos deletérios que a terapia acaba gerando no hospedeiro, provavelmente devido a mecanismos oxidativos, principalmente em pacientes incluídos nos estágios de menor comprometimento cardíaco.

7. Perspectivas

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam possibilidades futuras, tanto na melhor avaliação dos efeitos de suplementação antioxidante, como na utilização de outros medicamentos que possam ter ação antioxidante, associados ou não a essa suplementação. Conseqüentemente, seria oportuno:

- Realizar uma análise geral do perfil desses pacientes que estão sendo estudados desde o ano de 2003, e verificar as mudanças ocorridas dentro desse período, bem como o efeito a longo prazo dessas intervenções antioxidantes.
- Verificar o efeito do β -bloqueador do carvedilol isoladamente, o qual apresenta evidências de possuir atividade antioxidante, no sentido de avaliar sua ação nos biomarcadores de estresse oxidativo, uma vez que esse fármaco é utilizado como terapêutica para a cardiopatia.
- Verificar a associação desse fármaco com a terapia antioxidante com vitaminas E e C para avaliar a existência de eventual sinergismo entre as duas terapias.
- Determinar biomarcadores de estresse oxidativo mais sensíveis e específicos tais como: malondialdeído como determinação de lipoperoxidação lipídica, 3-nitrotirosina, para avaliação de nitração de proteínas, bem como avaliação de dano ao DNA (teste do cometa ou aductos de DNA, como a 8-oxoguanina). Realizar a técnica de FRAP, o qual é um importante indicador de estresse oxidativo, quando associado aos demais parâmetros analisados.
- Melhorar a extração e padronização do procedimento para a determinação de vitamina C, que se adapte às características das amostras e determinação deste analito.
- Devido à menor resposta, novamente comprovada nos indivíduos classificados como grupo III, verificar a possibilidade da exclusão desse grupo nos próximos projetos.

8. Referências

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 204, p. 234-254, 1984.
- ABEL, L.C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**. v. 17, p. 99–108, 2001.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 71–80, 1999.
- ARGOLO, A.M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. Rio de Janeiro:Ed. Imperial Novo Milênio, 2008. 63 p.
- ARTHUR, J.R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.57, p.1825–1835, 2000.
- AZZI, A.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J.M. Non-antioxidant molecular functions of K-tocopherol (vitamin E). **FEBS Letters**. v. 519, p. 8-10, 2002.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**. v. 16, p.42–47, 2004.
- BENVENUTI, L.A.; ROGGÉRIO, A.; FREITAS, H.F.G. *et al.* Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v.102, nº 6, p. 481-487, 2008.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 20313–20316, 1997.
- BERN, B.; MONTGOMERY, S.P.; HERWALDT, B.L. *et al.* Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: A Systematic Review. **JAMA**. v. 298, p. 2171-2181, 2007.
- BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **The Journal of Physiology**. v.555, p. 589-606, 2004.
- BESTETTI, R.B.; CURY, P.M.; THEODOROPOULOS, T.A.D. *et al.* Trypanosoma cruzi myocardial infection reactivation presenting as complete atrioventricular block in a Chagas' heart transplant recipient. **Cardiovascular Pathology**, v.13, p. 323– 326, 2004.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.
- BEYER, R. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v. 26, nº 4, p. 349-358, 1994.

BOAZ, M.; SMETANA, S.; WEINSTEIN, T. *et al.* Secondary prevention with antioxidant vitamins of cardiovascular disease in end stage renal disease (SPACE): randomized placebo-controlled trial. **The Lancet** . v.356, p.1213–1218, 2000.

BOCCHI, E.A.; HIGUSHI, M.L.; FIORELLI, A. *et al.* Higher incidence of malignant neoplasma after heart transplantation for treatment of Chagas's heart disease. **European Heart Journal**. v.15, p.179, 1994.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**. v. 34, p. 707–717, 1973.

BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.E. *et al.* Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 188, p. 643-648, 1980.

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.

BOTELHO, T.K.R. Indução do estresse oxidativo em ratos expostos a antiparasitários imidazólicos e correlação com a expressão do citocromo P4501A. 2003. 90 f. Dissertação. (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 13, p. 1145-1155, 1999.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 27, nº 9/10, p. 951–965, 1999.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 46, nº 5, p. 543-554, 2009.

BURAK ÇIMEN, M.Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**. v. 390, p.1–11, 2008.

BURTON, G.W.; JOYCE, A.; INGOLD, K. U. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. **Lancet**. p. 8293- 8327, 1982.

BUSCHINI, A.; GIORDANI, F.; ALBUQUERQUE, C.N. *et al.* Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. **Biochemical Pharmacology**. v.73, p. 1537– 1547, 2007.

- BUSTAMANTE, J.M.; LOPRESTI, M.S.; RIVAROLA, H.W. *et al.* Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 29, nº 6, p. 733-737, 2007.
- CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**. v.6, p. 391–397, 1997.
- CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.
- CAMPBELL, S.E.; STONE, W.L.; WHALEY, S.G. *et al.* Gamma (γ) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (γ) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**. v.3, p.25-50, 2003.
- CANDEIAS, L.P.; PATEL, K.B.; STRATFORD, M.R. *et al.* Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species Superoxide anion and hypochlorous acid. **FEBS LETTERS**. v. 333, p. 151-153, 1993.
- CASTRO, A.M.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. *et al.* Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**. v. 99, p. 379–383, 2006.
- CASTRO, J.A.; MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human and Experimental Toxicology**. v. 25, p. 25: 471- 479, 2006.
- CASTRO, C.R.; MECCA, M.M.; FANELLI, S.L. *et al.* Benznidazole-induced ultrastructural and biochemical alterations in rat esophagus. **Toxicology**. v. 191, p. 189-198, 2003.
- CARRASCO, H.A.; BARBOZA, J.S.; INGLESSIS, G. *et al.* Left ventricular cineangiography in Chagas' disease: detection of early myocardial damage. **American Heart Journal**. 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. **American Heart Journal**. 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.100, nº11, p.1025–1031, 2006.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 38, p.1482–1495, 2006.

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 157, p.1–11, 2009.

CATHCART, M.K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 24, p. 23–28, 2004.

CECARINI, V.; GEE, J.; FIORETTI, E. *et al.* Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1773, p. 93–104, 2007.

CHEN, Q.; VAZQUEZ, E. J.; MOGHADDAS, S. *et al.* Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 36027–36031, 2003.

CHOW, C.K. Glucose and dietary vitamin E protection against catalase inactivation in the red cells of rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**. v. 50, nº4, p. 364–369, 1980.

CHOW, C.K. Oxidative damage in the red cells of vitamin E-deficient rats. **Free Radical Research Communications**. v. 16, nº4, p.247–58, 1992.

CHRISTMAS, P.B.; TURRENS, J.F. Separation of NADH-fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**. v.183, p. 225-228, 2000.

Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. v.38, 2005.

COSTA, J.; ALMEIDA, C.E.; DONSTON, E. *et al.* The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 443-449, 2003.

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' heart disease. **Revista Paulista de Medicina**. v.113, p. 757-766, 1995.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L. *et al.* Autoimmunity in Chagas' disease: identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **The Journal of Clinical Investigation** v. 98, nº 8, p.1709–1712, 1996.

CZECHOWICZ, J.A.; WILHELM, A.K.; SPALDING, M.D. *et al.* Inhibitory activity of dethiotrypanothione and analogues against trypanothione reductase. **Journal of Organic Chemistry**. v. 72, p. 3689-3693, 2006.

DÁVILA, D.F.; ROSSELL, O.; BELLABARBA, G.A. Letter to the Editor: Pathogenesis of chronic chagas heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation. **International Journal for Parasitology**. v.32, p.107–109, 2002.

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

DENICOLA, A.; RUBBO, H.; RODRIGUEZ, D. *et al.* Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *T. cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 304, p. 279–87, 1993.

DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation. **Circulation**. v.102, nº 2, p.191–196, 2000.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL, M.N. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-74.

DIAS, J.C.P. The treatment of Chagas disease (South American Trypanosomiasis). **Annals of Internal Medicine**. v. 144, p. 772-774, 2006.

DIAS, J.C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. "The impact of Chagas disease control in Latin America: a review", **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 97, nº5, p. 603-612, 2002.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas, ambiente, participação e estado. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 2, p.19-26, 2007.

DIAZ, E.G.; CASTRO, C.R.; MECCA, M.M. *et al.* Benznidazole-induced ultrastructural and biochemical alterations in rat colon. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 21, p. 961-966, 2001.

DIOTAIUTI, L.; AZEREDO, B.V.; BUSEK, S.C. *et al.* Controle de Triatoma sordida em ambiente peridoméstico no Município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v. 3, p. 21-25, 1998.

DI ROSA, M.; LALENTI, A.; IANARO, A. *et al.* Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 54, p. 229-238, 1996.

DHIMAN, M.; NAKAYASU, E.S.; MADAIHAH, Y.H. *et al.* Enhanced nitrosative stress during trypanosoma cruzi infection causes nitrotyrosine modification of host proteins implications in chagas' disease. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n° 3, 2008.

DoCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Free-radical intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells. **Free Radicals in Biology**. v. 6, n° 2, p. 223-238, 1984.

DUTRA, W.O.; ROCHA, M.O.C.; TEIXEIRA, M.M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**. v.21, p. 581-586, 2005.

EREL, O.; KOCYIGIT, A.; GUREL, M.S. *et al.* Adenosine deaminase activities in sera, lymphocytes and granulocytes in patients with cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, n° 4, p. 491-494, 1998.

FARIAS, M.S. Avaliação da intervenção nutricional com vitaminas E e C, e o mineral zinco no estresse oxidativo de pacientes com hepatite c em tratamento com interferon associado à ribavirina. 2009. 100 f. Dissertação. (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FAVALORO, L.; DIEZ, M.; SCHIJMAN, A. *et al.* Reactivation of *T. cruzi* infection after heart transplant. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 25, n° 2, p.104-105, 2006.

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

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.

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

GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F. *et al.* Treatment with Benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1521-1528, 2005.

GARG, N.; POPOV, V.L.; PAPAConstantinou, J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in Trypanosoma cruzi-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1638, p. 106– 120, 2003.

GIORDANENGO, L.; GUINAZU, C.; STEMPIN, R. *et al.* Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi antigen, conditions the host immune response in favor parasite. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 1003-1011, 2002.

GOIJMAN, S.G.; FRASCH, A.C.C.; STOPPANI, A.O.M. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. **Biochemical Pharmacology**. v.34, p. 1457-1461, 1985.

GONTIJO, E.D.; SANTOS, S.E., **Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas**, 2009. Disponível em :<<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em 10/01/2009.

GONZÁLEZ, R.; COLLADO, J.A.; NELL, S. *et al.* Cytoprotective properties of α -tocopherol are relates to gene regulation in cultured d-galactosamine-treated human hepatocytes. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 43, p. 1439-1452, 2007.

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

GUHL, G.; LAZDINS-HELDS, K.J. Grupo de trabalho científico sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires. Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR). Patrocinado por UNICEF, PNUD, Banco Mundial and WHO, 2007.

GUIMARÃES, A.C. Cardiopatia crônica: insuficiência cardíaca Em: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (orgs). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral**, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1997. p: 223-233.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p.7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

HALLIWELL, B; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 57,p. 715S- 725S, 1993.

HALPNER, A.D.; HANDELMAN, G.J.; HARRIS, J.M. *et al.* Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 359, p. 305–309, 1998.

HANNEL, H.; RAETHER, W. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**. v. 90, p. S19–S39, 2003.

HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.M. *et al.* Correlation between T. cruzi parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light

microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovascular Pathology**. v. 2, p.101-106, 1993.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; REIS, M.M. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**. v. 60. p. 96–107, 2003.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S. *et al.* Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. **Circulation Research**. v. 85, p. 357– 363, 1999.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 34, nº 2, p. 145–169, 2003.

INOUE, M.; SATO, E.F; NISHIKAWA, M. *et al.* Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life, **Current Medicinal Chemistry**. v.10, p. 2495 – 2505, 2003.

JENSEN, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure**. v. 666–667, p. 387–392, 2003.

JOCKERS-SCHERUBL, M.C.; SCHIRMER, R.H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 180, p. 267-272 , 1989.

KANNO, T.; FUJITA, H.; MURANAKA, S. *et al.* Mitochondrial swelling and cytochrome c release: sensitivity to cyclosporin A and calcium. **Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR**. v. 34, p.91–102, 2002.

KOROLKOVAS, A, **Dicionário Terapêutico Guanabara**, Editora Guanabara Koogan, Ed. 1997/1998.

KUSHI, L.H.; FOLSOM, A.R.; PRINEAS, R.J. *et al.* Dietary antioxidants and death from coronary heart disease in postmenopausal women. **The New England Journal of Medicine**. v. 334, p. 1156–1162, 1996.

LACAVA, Z.G.M.; LUNA, H. The anticlastogenic effect of tocopherol in peritoneal macrophages of benznidazole-treated and ovariectomized mice. **Mutation Research**. v. 305, nº. 2, p. 145-150, 1994.

LANNES-VIEIRA, J. **Forma cardíaca: Cariopatia Chagásica**. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>>. Acesso em 22/01/2009.

LATRUFFE, N.; MALKI, M.C.; NICOLAS-FRANCES, V. *et al.* Regulation of the Peroxisomal β -Oxidation-Dependent Pathway by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and Kinases. **Biochemical Pharmacology**. v. 60, p. 1027–1032, 2000.

LEE, S.J.; HWANG, H.S.; KIM, B.N.R. *et al.* Changes in serum adenosine deaminase activity during normal pregnancy. **Journal of Korean Medical Science**. v. 22, p. 718-722, 2007.

LESNEFSKY, E. J.; GUDZ, T. I.; MIGITA, C. T. *et al.* Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.385, p.117– 128, 2001.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 464-478, 1990.

LIU,C.S.; TSAI, C.S. Enhanced lipid peroxidation in epileptics with null genotype of glutathione-S-transferase m1 and intractable seizure. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 90, p. 291-294, 2002.

LOCATELLI, C.; DE BEM, A.F.; HESS, L.R. *et al.* Effect of albendazole and mebendazole on antioxidants and glutathione-S-transferase. **Redox Report**, v. 9, p. 89-95, 2004.

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? **Analytical Biochemistry**. v. 229, p. 329-335. 1995.

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

MAÇAO, L.B.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R.C. *et al.* Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **International Journal of Cardiology**. v.123, p. 43-49, 2007.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 244, nº 22, p. 6049-6065, 1969

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

MARIN-NETO, J.A.; SIMÕES, M.V.; SARABANDA, A.V.L. Cardiopatia chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 72, p. 247-263, 1999.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**. v. 115, p. 1109–1123, 2007.

MARIN-NETO, J.A.; RASSI, JR, A.; MORILLO, C.A. *et al.* Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American Heart Journal**. p. 37-42, 2008.

MASANA, M.; TORANZO, E.G.D.; CASTRO, J.A. Reductive metabolism and activation of benznidazole. **Biochemical Pharmacology**. v.33, nº7, p. 1041-1045, 1984.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K. ; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 601–620, 2007.

MEDEI, E.; PEDROSA, R.C.; BENCHIMOL, P.R.B. *et al.* Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. **International Journal of Cardiology**. v. 115, p. 373-380, 2007

MENDEZ, G.F.; COWIE, M.R. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. **International Journal of Cardiology**. v. 80, p.213–219, 2001.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 188-192, 1972.

MUSTACICH, D.J.; GOHIL, K.; BRUNO, R.S. *et al.* Alpha-tocopherol modulates genes involved in hepatic xenobiotic pathways in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. *in press*, 2008.

MUSTACICH, D.J.; VO, A.T.; ELIAS,V.D. *et al.* Regulatory mechanisms to control tissue α -tocopherol. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 610–618, 2007.

NAGEL, R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. **Mutation Research**. v. 191, p. 17-20, 1987.

NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A. *et al.* Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.38, p. 1825-1834, 2005.

NICHOLLS, S.J.; HAZEN , S.L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 25, p. 1102-1111, 2005.

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

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1488, p.167–181. 2000.

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. **International Journal of Cardiology**, v.116, Issue 3, 4. p. 357-363, 2007.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E. *et al.* Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**. v.333. p.19–39, 2003.

PADAYATTY, S.P.; KATZ, A.; WANG, Y. *et al.* Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 22, nº 1, p.18–35, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**. v.1, p. 92–100, 2001.

PEDROSA, R.C.; MELO, M.F.V.; SAAD, E.A. Limiar anaeróbio detectado pela “análise da curva-V” na cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30, p.129–138, 1997.

PEDROSA, R.C.; DE BEM, A.F.; LOCATELLI, C. *et al.* Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Report**. v. 6, nº 4, p. 265-270, 2001.

PEDROSA, R. C. Contribuição ao estudo da etiopatogenia do distúrbio de condução e da eletrogenese na cardiopatia chagásica crônica: efeitos de anticorpos IgG de pacientes chagásicos crônicos na eletrogenese e no sistema de condução do coração isolado de mamíferos. 1998. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PÉREZ, A.Z.; TAMAE-KAKAZU, M.; PASCUTTI, M.F. *et al.* Deficient control of *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is related to a delayed specific IgG response and increased macrophage production of pro-inflammatory cytokines. **Life Sciences**, v. 77, p. 1945–1959, 2005.

PÈREZ-FUENTES, R.; GUEGAN, J.F.; BARNABE C, E.T. *et al.* Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **International Journal of Parasitology**. v.33, p. 293-299, 2003.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 28, nº 1, p. 141–164, 2000.

PUNTARULO, S.; CEDERBAUM, A.I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome p450 enzymes. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 24, p. 1324–1330, 1998.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.M.; KHAN, I.A. *et al.* Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**. v.115, p. 279–283, 2007.

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

RASSI JR, A.; RASS, I.A.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**. v. 23, nº 12, p. 883-889., 2000.

REMME, W.J.; SWEDBERG, K. Task force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure, European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. **European Heart Journal**. v. 22, p.1527-1560, 2001.

REITER, E.; JIANG, Q.; CHRISTEN, S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 28, p. 668-691, 2007.

REY, L. 2001. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.

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

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D.M.; MASSARA, R.L. *et al.* Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes and Infection**. v.10, p.103-113, 2008.

SATHLER-AVELAR, R. ;VITELLI-AVELAR, D.M.; MASSARA, R.L. *et al.* Benznidazole Treatment during early-indeterminate chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 64, p. 554-563, 2006.

SCANDALIOS, J. G. Introduction to Oxyradicals. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 23, nº 3, p. 471-472, 1997.

SAWA ,T. OHSHIMA, H. Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. **Nitric Oxide**. v.14, p. 91–100, 2006.

SCHIRMER, R.H.; SCHOLLHAMMER, T.; EISENBRAND, G. *et al.* Oxidative stress as a defence mechanism against parasitic infections. **Free Radical Research Communications**. v. 3, p. 3–12, 1987.

SCHNITTGER, I.; GORDON, E.P.; FITZGERALD, P.J. *et al.* Standardized intracardiac measurements of two-dimensional echocardiography. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 2, p. 934-942, 1983.

SEVANI, A. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cythochrome P450. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 8, p. 145-52, 1990.

SHANG, F.; GONG, X.; EGTESADI, S. L. *et al.* Vitamin C prevents hyperbaric oxygen-induced growth retardation and lipid peroxidation and attenuates the oxidation-induced upregulation of glutathione in guinea pigs. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, p. 307–313, 2002.

SHANG, F.; LU, M.; DUDEK, E. *et al.* Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH depleted lens cells to H₂O₂. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 34, n°5, p. 521–530, 2003.

SIDANI, M.; ZIEGLER, C. Preventing heart disease: who needs to be concerned and what to do. **Primary Care: Clinics in Office Practice**. v. 35, p. 589–607, 2008.

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

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annual Review of Nutrition**. v. 25, p. 151–174, 2005.

SOARES, M.B.P.; CARVALHO, L.P; SANTOS, R.R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 73, p. 547-559, 2001.

SCHUMUNIS, G.A. Tripanossomiase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: Andrade, B.; Melo, M. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1-16.

STOPPANI, A.O.M. Quimioterapia de La enfermedad de Chagas. **Medicina**. v. 59, p. 147-165, 1999.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, S.A. *et al.* Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 400-419, 1992.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas' disease. **International Journal for Parasitology**. v.31. p. 550-554, 2001.

TEMPERTON, N.J.; WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J. *et al.* Molecular and biochemical parasitology overexpression of superoxide dismutase in Trypanosoma cruzi results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.96 p.167–176, 1998.

TESSIER, D.M.; KHALIL, A.; TROTTIER, L. *et al.* Effects of vitamin C supplementation on antioxidants and lipid peroxidation markers in elderly subjects with type 2 diabetes. **Archives of Gerontology and Geriatrics**. v. 48, p. 67–72, 2009.

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

TEIXEIRA, A.R.L.; CORDOBA, J.C.; SOUTO MAIOR, I.C. *et al.* Chagas's disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.43, p. 146-158, 1990.

TJALKENS, R.B.; VALERIO JR, L.G.; AWASTHI, Y.C. *et al.* Association of Glutathione S-transferase isozyme-specific induction and lipid peroxidation in two inbred strains of mice subjected to chronic dietary iron overload. **Toxicology And Applied Pharmacology**. v. 151, p. 174–181, 1998.

TORANZO, E.G.; BERNACCHI, A.S. *et al.* Ultrastructural alterations in ovaries from nifurtimox or benznidazole-treated rats: their relation to ovarian nitroreductive biotransformation of both drugs. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 50, p. 385-397. 1989.

TRABER, M.G; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant e nothing more. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 43, p. 4-15, 2007.

TRABER, M.G. Vitamin E regulatory mechanisms. **Annual Review of Nutrition**. v.27, p.347–62, 2007.

TURRENS, J.F.; WATTS JR, B.P.; ZHONGB, L. *et al.* Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 82, p.125-129, 1996.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 25, p. 211–220, 2004.

VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GERSTNER, A. *et al.* Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1689, p.162–173, 2004.

VALKO, M. ; RHODES,C.J.; MONCOL,J. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**.v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 44–84, 2007.

VIEIRA,J.L. **Cardiopatia chagásica**. <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 03/01/2009.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.16,Sup. 2, p. 7-12, 2000.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B. *et al.* A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 724-34, 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.

ZACKS, M.A.; WEN, J.J.; VYATKINA, G. *et al.* An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 77, n°4, p. 695-715, 2005.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 33, n° 3, p. 337–349, 2002.

WEN, J.J.; VYATKINA, G.; GARG, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p.1821–1833, 2004.

WEN, J.J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma Cruzi infection. **Free Radical Biology and Medicine**.v. 37, p. 2072–2081, 2004.

WEN, J.J.; DHIMAN, M.; WHORTON, E.B. *et al.* Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during Trypanosoma cruzi infection in mice. **Microbes and Infection**. v. 10. p.1201-1209, 2008.

WILHELM FILHO, D.; MARCON, J.L.; TORRES, M.A. *et al.* Antioxidant defenses in vertebrates: emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 7, p. 33–45, 2000.

WHO. 2002. Control of Chagas' disease: Second report of the WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland: World Health Organization; Technical Report Series.

WINKLER, B.S.; ORSELLI, S.M.; REX, T.S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 17, p. 333–349, 1994.

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A.J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 29, n° 5, p. 403–409, 2000.

9. Anexos

Anexo 1 – Ficha de Dados do Paciente

PROGRAMA CARDIO/CHAGAS /HU-UFRJ

- IDENTIFICAÇÃO

01 - Nome.....

02- N° Prontuário

03- Data de Nascimento

04-Etnia (1) Negra (2) Branca (3) Mulata (4) Outra

05- Sexo (1) Masculino (2)Feminino

06-Naturalidade.....

07-Data da Avaliação Inicial

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

- * HISTORIA CLÍNICA RELEVANTE

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

(1)-Sim (2)-Não (3) Ignora

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
Dificuldade de respirar / falta de ar	2
Frequência cardíaca 91 a 110 bpm	1
mais de 111 bpm	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- Classe Funcional da NYHA

(1) Classe I (2) Classe II (3) Classe III (4) Classe IV

11-Internação prévia devido a Insuficiência Cardíaca

12-Desfibrilador Cardiaco Intracavitário

13-Taquicardia Ventricular Sustentada

14-Diag de Disautonomia (necessário presença dos 3 itens

a-ausência de ansiedade

b-ausência de transpiração

c-bradicardia e/ou hipotensão

15-Morte Súbita Ressuscitada

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

A-Taquicardia Ventricular Sustentada

B-Fibrilação Ventricular

C-Assistolia

D-Atividade elétrica sem pulso-a-BAV 3° grau

b-outra bradiarritmia

c-outro ritmo

16-Diagnóstico de Embolia Pulmonar

17-Diagnóstico de Embolia Sistêmica

18-Diagnóstico de AVC / TIA

19-Sincope

20-Marca-passo

21-Fibrilação Atrial

***DOENÇAS ASSOCIADAS NÃO CARDÍACAS**

22-Diabetes

23-Doença vascular periférica

24-Disfunção Respiratória

- 25-Doença coronariana
- 26-Insuficiência Renal Crônica
- 27-Doença vascular cerebral
- 28-Dislipidemia
- 29-Cancer
- 30-Hipertensão
- 31-Outros

* HABITOS

- 32-Diagnóstico de Tabagismo

a-Nunca Fumou

b-Fumante (1 ou mais maço/dia)

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

d-Eventualmente

- 33-Alcoolismo Crônico (presença de duas ou mais respostas positivas)

(1)-Sim (2)-Não

-Se alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ou parar de beber

-Se as pessoas o aborrecem porque criticam o seu modo de beber

-Se se sente culpado pela maneira com que costuma beber

-Se costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou ressaca

* ESCOLARIDADE

- 34-Que nível de escolaridade você chegou a completar?

1-Analfabeto|

2-Nunca foi a escola mas sabe ler e escrever

3-Primeiro grau incompleto

4-Primeiro grau completo

5-Segundo grau incompleto

6-Segundo grau completo

7-Terceiro grau (curso universitário) completo

* MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Pes. |__|__|__| kg

Altura |__|__|__| cm

35-Relação cintura |__|__|__| cm

36-Pressão arterial sistólica|__|__|__|mmHg diastólica|__|__|__|
mmHg

* AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

(1) Sim (2) Não

37-Normal

38- Índice cardio-torácico $\geq 0,50$

39-Sinais de congestão pulmonar

*ALTERAÇÕES NO ECG DE REPOUSO CONVENCIONAL

(1)-Sim (2)-Não

40-Normal

41-Bradycardia sinusal $<50\text{bpm}$ ou pausa sinusal $> 3,0\text{ seg}$

42-BAV 1º grau

43-Distúrbio condução AV (2 e/ou 3 grau)

44-Alterações primárias de ST-T

45-Baixa voltagem ($<0,5\text{ Mv}$ todas as derivações frontais)

46-Fibrilação Atrial

47-Extra-SístolesVentriculare

48-BRE

49-Área Eletricamente Inativa ($Q > 40\text{ms}$ 2 derivações contínuas)|__|

(a) anterior (b) inferior (c) posterior (d) lateral (e) antero-lateral

50-BRD

51-HBAE

52-Marcapasso

* MONITORIZAÇÃO CONTÍNUA DO ECG DURANTE EXERCÍCIO

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

• Considerar o maior nº de arritmias durante 30 segundos qualquer de registro

53-Ext Vent

54-Taqui Vent Monomórfica Não Sustentada

55-Distúrbio de condução atrioventricular

- 56-Distúrbio de condução intraventricular
- *ELETROCARDIOGRAFIA DINÂMICA (HOLTER)
- (1) Sim (2) Não
- 57-Taquicardia com QRS estreito ≥ 150 bpm > 30 seg
- 58-Taquicardia com QRS estreito ≥ 150 bpm < 30 seg
- 59-Taquicardia com QRS estreito < 150 bpm > 30 seg
- 60- Taquicardia com QRS estreito < 150 bpm < 30 seg
- 61-Taquicardia com QRS alargado ≥ 150 bpm duração \geq bat
- 62-Taquicardia com QRS alargado < 150 bpm duração ≥ 4 bat
- 63-Bradicardia sustentada < 35 bpm
- 64-Bloqueio sinoatrial
- 65-Pausa sinusal ≥ 3 segundos
- 66-Ritmo escape juncional
- 67-Bradicardia sinusal inapropriada
- 68-Taqui-bradicardia
- 69-Bradiarritmia pós-parada cardíaca
- 70-Bloqueio AV 2° grau Mobitz Tipo 1
- 71-Bloqueio AV 2° grau Mobitz Tipo 2
- 72-Bloqueio AV 3° grau
- 73-Fibrilação e/ou Flutter atrial
- 74-Distúrbio de condução intraventricular
- 75-Falha de marcapasso
- 76-Desfibrilador - qualquer documentada descarga
- 77-Sincope - qualquer relato
- 78-Arritmia ventriculares complexa multiforme > 10 /hora
- * ECOCARDIOGRAMA Bi-Doppler
- (1)-Sim (2)-Não
- 79-Normal
- 80-Evidência de anormalidade contrátil segmentar
- (a) anterior (b) inferior (c) posterior (d) lateral (e) apical
- 81-Alteração de contratilidade difusa
- 82-Disfunção sistólica de VE leve
- 83-Disfunção sistólica de VE moderada

- 84-Disfunção sistólica de VE grave
- 85-Trombo em VE
- 86-Aneurisma
(a) anterior (b) inferior (c) posterior (d) lateral (e) apical
- 87-Diâmetro diastólico de VE mm
- 88-Diâmetro sistólico de VE mm
- 89-FEVE %
- 90-Disfunção Diastólica

(a)-Ausente (b)-Padrão de Deficit de Relaxamento (c)-Padrão Restritivo
(d)-Padrão Pseudo-normalização

*MEDICAMENTOS

(1)-Sim (2)-Não

- 91-Diurético de alça
- 92-Diuréticos outros
- 93-Digital
- 94-IECA
- 95-ARBs
- 96-Espironactona
- 97-Anticoagulante Oral
- 98-Amiodarona
- 99-Outros antiarritmico
- 100-Aspirina
- 101-Beta bloqueador

* IMPRESSÃO FINAL

- 102-Forma Clínica Cardíaca (estágios evolutivos)
- 1-Cardiopatia Chagásica Crônica leve (grupo IA)
- 2-Cardiopatia Chagásica Crônica moderada (grupo IB)
- 3-Cardiopatia Chagásica Crônica grave sem ICC (grupo II)
- 4-Cardiopatia Chagásica Crônica grave com ICC (grupo III)

(1) Sim (2) Não

- 103-Esôfagopatia
- 104-Colopatia

Comentários:

Anexo 2 – Ficha de acompanhamento nutricional e físico do paciente

PROGRAMA CARDIO/CHAGAS /HU-UFRJ

• IDENTIFICAÇÃO

- 01- Nome.....
- 02- N° Prontuário
- 03- Data de Nascimento
- 04-Etnia
- (1) Negra (2) Branca (3) Mulata (4) Outra
- 05- Sexo (1) Masculino (2)Feminino
- 06-Naturalidade.....
- 07-Data da Avaliação Inicial
- 08-Afastado da zona endêmica há.....anos

HISTORIA ALIMENTAR

09-Quantas refeições você faz regularmente?. Lembre-se de todas as refeições-café da manhã, almoço,janta e lanches que você faz em casa ou fora de casa:

()2 ()3 ()4 ()5 ()6 ou mais

10-Você tem uma alimentação saudável?

()Sim ()Não ()as vezes

Justifique:

11-Marque com (X) nos alimentos que você gosta de comer ou beber:

- | | | |
|-----------------|-----------------|--------------------|
| ()frango | ()legumes | ()bolo |
| ()peixe | ()verduras | ()pão |
| ()carne de boi | ()frutas | ()hamburger |
| ()ovo | ()suco | ()pizza |
| ()feijão | ()leite | ()cachorro-quente |
| ()arroz | ()queijo | ()biscoito |
| ()macarrão | ()danone | ()doce/chocolate |
| ()angu | ()refrigerante | ()pipoca |

12-Marque um (X) nos alimentos que você come sempre (pelo menos uma vez por semana):

- | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> frango | <input type="checkbox"/> legumes | <input type="checkbox"/> bolo |
| <input type="checkbox"/> peixe | <input type="checkbox"/> verduras | <input type="checkbox"/> pão |
| <input type="checkbox"/> carne de boi | <input type="checkbox"/> frutas | <input type="checkbox"/> hamburger |
| <input type="checkbox"/> ovo | <input type="checkbox"/> suco | <input type="checkbox"/> pizza |
| <input type="checkbox"/> feijão | <input type="checkbox"/> leite | <input type="checkbox"/> cachorro-quente |
| <input type="checkbox"/> arroz | <input type="checkbox"/> queijo | <input type="checkbox"/> biscoito |
| <input type="checkbox"/> macarrão | <input type="checkbox"/> danone | <input type="checkbox"/> doce/chocolate |
| <input type="checkbox"/> angu | <input type="checkbox"/> refrigerante | <input type="checkbox"/> pipoca |

13-Você come com mais frequência alimentos:

- fritos cozidos grelhados ou assados
 alterando todas as formas de preparo

14-Com que frequência mensal você costuma comer fast foods (Mac Donalds, Bobs etc)

- nunca quase nunca 1 2 3 4 5 ou mais

15-O que você costuma levar de lanche para o trabalho?

16-Você come doce com frequência?

- todo dia uma vez por semana 2 vezes por semana
 3 vezes por semana nunca

17-Você se acha:

- gordo magro no peso ideal acima do peso ideal (
 abaixo do peso ideal

18-Você pratica atividade física?

- sim não Qual? Quantas vezes por
semana?

Anexo 3 – Aprovação do Conselho de Ética

DE : CARDIOLOGIA HUCFF

FAX : 25622759

09 MAI. 2007 11:31 Pág. 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

- Coordenador:**
 Alice Helena Dutra Violante
 Médico - Prof.ª Associada
- Secretário:**
 Mario Teófilo Antonio
 Farmacólogo - Especialista
- Membros Titulares:**
 Beatriz Maria Akashi de Holanda
 Prof.ª Associada
 Fernando Jorge Resto Cúmis
 Médico - Prof. Assistente
 Elina Regina Ambrósio
 Assessoria Social - Mestre
 Helena Warynsky
 Representante dos Acadêmicos
 Luiz Carlos Duarte de Miranda
 Médico - Prof. Adjunto
 Lúcia da Conceição de Araújo Marques
 Enfermeiro - Mestre
 Paulo Felix Branco
 Médico - Prof. Adjunto
 Rogério de Fátima Rivali
 Farmacologia - Doutoranda
 Roberto Coury Pedrosa
 Médico - Doutor
 Zuzara Rodrigues da Silva
 Professora
- Membros Suplentes:**
 Beatriz Moritz Impe
 Médico - Doutor
 Cecília de Assis Martinsou
 Jornalismo
 Carlos Alberto Guimarães
 Médico - Prof. Adjunto
 Lucia Helena Luiza Vianna Amari
 Médico - Doutoranda
 Maria de Fátima Gustavo Lopes
 Representante dos Acadêmicos
 Mariângela Oliveira de Silva
 Enfermeira
 Miru Foryvndo Puzhvid
 Engenheiro - Doutor
 Otávio Nunes Cozerza
 Sociólogo - Doutor
 Vivian Dias de Oliveira
 Assessoria Social

CEP - MEMO - n.º 319/07

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2007.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dr. Roberto Coury Pedrosa

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: n.º 053/07- CEP

Título: "Efeito do tratamento com o benzonidazol e da terapia antioxidante na cardiopatia chagásica crônica"

Pesquisador (a) responsável: Dr. Roberto Coury Pedrosa

Data de apreciação do parecer: 12/04/2007

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 12/10/2007, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof.ª. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

Anexo 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Efeito do tratamento com o benzonidazol e da terapia antioxidante na cardiopatia chagásica crônica

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 o seu direito de deixar o estudo a qualquer momento. Nenhuma promessa ou garantia sobre resultados dessa pesquisa pode ser feita. Por favor, pergunte quantas vezes você achar necessário para decidir se você quer participar deste estudo. Se estiver de acordo com as informações deste documento, você irá assiná-lo e receberá uma das cópias assinadas para que possa guardá-la com você.

Descrição/objetivos do estudo

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico porque você tem uma doença chamada doença de Chagas com grau de comprometimento variável nos diferentes órgãos, principalmente o coração. O objetivo deste estudo é verificar se a administração do benzonidazol, um medicamento antiparasitário (capaz de matar o parasita) vai ajudar você que já têm problemas no coração. Isto é, se matando o parasita, você ficará com a doença paralisada, podendo até mesmo apresentar melhora de seu quadro clínico. Também, o estudo vai verificar se a administração das vitaminas C e E (medicamentos antioxidantes) vão te ajudar aumentando suas defesas antioxidantes (defesas contra os radicais livres-substâncias que são prejudiciais ao seu corpo). Atualmente, o benzonidazol é utilizado nos raros casos em que a pessoa procura o médico na fase aguda da doença (logo após ser picado pelo barbeiro ou logo após

transfusão de sangue contaminado). O tratamento também é realizado quando o paciente adquiriu o parasita há poucos anos e ainda não apresenta lesões no coração; por exemplo, em crianças. Nessas situações o índice de cura é de 60-70%. Para os pacientes adultos que já têm alterações no coração como você, os médicos geralmente não receitam este remédio porque não se sabe se ele ajuda ou não. Apenas com uma investigação como esta, que incluirá 45 chagásicos com comprometimento no coração, será possível determinar se o Benzonidazol assim como as vitaminas C e E serão benéficas ou não nesta fase da doença.

Desenho do estudo/duração/número de pacientes

Esse estudo caracteriza-se por ser um estudo clínico, observacional, 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 outros 45 pacientes como você 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 perguntará sobre a sua história médica. Isto pode incluir doenças que você teve no passado, doenças diferentes da doença de Chagas que você tem atualmente (por exemplo, diabetes, hipertensão, asma) e todos os medicamentos que você tomou nas últimas semanas. A história de tratamento anteriores que você utilizou para o tratamento da sua doença de Chagas bem como quaisquer efeitos colaterais em andamento desses tratamentos anteriores serão registrados. Serão também

realizados: exame físico (incluindo a medida do seu peso, altura, pressão arterial sanguínea, frequência cardíaca e temperatura corporal), um eletrocardiograma (ECG- um teste que produz um quadro gráfico da atividade elétrica de seu coração), ecocardiograma (um teste que mede a função de bombeamento de sangue do seu coração). Radiografias de torax serão realizados caso não tenham sido realizadas recentemente. Ao longo do curso do estudo, serão obtidas e enviadas para o seu prontuário cópias dessas avaliações. Após esta consulta inicial, será coletado sangue de uma veia (10 ml de sangue igual a quantidade de 1 colher de sopa) e aí então você deverá iniciar o medicamento (benzonidazol) durante 60 dias, duas vezes ao dia. Nesse período você deverá retornar em consulta médica 3 vezes. A primeira vez depois de 11 dias que estiver tomando os comprimidos, uma segunda vez depois de 3 semanas e uma terceira vez depois de 60 dias (final do tratamento com o benzonidazol). Na segunda e terceira consultas será coletado sangue de uma veia de seu braço para verificar se surgem complicações nos glóbulos brancos causados pelo benzonidazol. Caso ocorram alterações importantes, o tratamento poderá ser suspenso. Nova consulta médica será marcada após 6 meses da administração das vitaminas C e E. Nesta visita de final do tratamento com as vitaminas será novamente coletado sangue de uma veia de meu braço.

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.

Alguns exames de sangue, realizados na visita de avaliação inicial, podem precisar ser repetidos, mas apenas caso o seu médico avalie que esses exames são necessários. Será solicitado a você que informe qualquer medicamento que você esteja tomando na semana anterior à primeira dose do tratamento.

Tratamento

Caso você se qualifique para o estudo e concorde em participar, você receberá o seguinte tratamento: Benzonidazol 5mg/kg/dia em duas tomadas no dia durante 60 dias seguido de 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 o benzonidazol, a vitamina C ou sobre a vitamina E fornecida a você. Você deve tomar as doses do benzonidazol e das vitamina C e E imediatamente antes da sua principal alimentação.

Você também será solicitado a trazer todos os frascos de tratamento deste estudo a cada visita. Se você continuar no andamento do estudo, então você receberá uma nova prescrição através do consultório de seu médico

Procedimento do estudo

Enquanto estiver tomando a medicação do estudo você será solicitado a seguir a programação de visitas clínicas do estudo para monitorar sua segurança e se os tratamentos estão funcionando

Durante cada visita você irá realizar as seguintes avaliações:

- Exame físico que inclui a medida do seu peso, pressão arterial sangüínea, frequência cardíaca e temperatura corporal e uma avaliação de sua progressão no estudo
- Você deve informar quaisquer sintomas que você desenvolver desde o início do estudo ou qualquer mudança nos sintomas que você relatou durante as visitas prévias
- Você também deve informar sobre quaisquer medicamentos que você tomou desde o início do estudo ou sobre qualquer mudança no medicamento que você tenha relatado nas visitas anteriores
- Depois que você interromper sua participação no estudo, o seu médico assistente (Dr Roberto Coury Pedrosa) continuará seu acompanhamento clínico.

Se, em qualquer momento, você desenvolver efeitos colaterais (efeitos não desejáveis), você deve deixar que o seu médico do estudo saiba o mais cedo possível para que a assistência médica possa ser fornecida, caso necessária

Riscos associados com o estudo

O principal risco para você nesse estudo é que pode receber um medicamento em que nós não conhecemos todos os efeitos colaterais do mesmo ou todos os efeitos colaterais que poderiam acontecer quando o medicamento do estudo é combinado com outros medicamentos ou com álcool. Reações podem acontecer com este medicamento. Dessa forma você deve discutir sempre a possibilidade de uso de álcool ou de quaisquer outros medicamentos (que não necessitam de prescrição, que necessitam de prescrição) ou uso de drogas ilícitas com o seu médico enquanto você estiver participando deste estudo. Você também deve notificar qualquer outro profissional da área de saúde que o examine, que você está participando deste estudo, especialmente caso você esteja a ponto de realizar um procedimento cirúrgico, um procedimento dental ou qualquer outro tratamento medicamentoso.

O risco do benzonidazol

Todos os medicamentos podem causar efeitos colaterais. O medicamento deste estudo (benzonidazol) pode causar reações alérgicas na pele, problemas de estômago, principalmente ânsia de vômito, formigamentos em braços e pernas e febre. Também não existem benefícios clínicos garantidos com a minha participação nesse estudo e que, independentemente ou não de fazer parte do mesmo, receberei o tratamento médico padrão que meu médico julgar apropriado.

O risco da vitamina C

Alguns efeitos colaterais podem ser preditos, mas nem todos os efeitos colaterais que você poderia ter podem ser preditos. Em estudos prévios realizados em voluntários saudáveis que receberam a vitamina C, a maioria dos efeitos colaterais foi leve e com pouca inconveniência. Alguns dos efeitos colaterais observados foram: dor de cabeça, sintomas gastrointestinais (flatulência, inchaço, náuseas, vômitos, diarreia, constipação, indigestão), erupção cutânea, cansaço, perda de apetite, sintomas de gripe, insônia,

vermelhidão na face, aftas orais, gosto metálico e aumento nos testes que medem as funções normais do fígado

O risco da vitamina E

Os efeitos colaterais relacionados a vitamina E podem também ser leves e com pouca inconveniência. Em estudos prévios realizados em voluntários saudáveis que receberam a vitamina E foram observados alguns efeitos colaterais tais como: cansaço, perda de apetite, sintomas de gripe, insônia e as vezes flatulência

Tendo em vista que a vitamina E teve sua dose aumentada, isto é, 800mg/dia e não sendo a dose usualmente usada, podem ser observados outros efeitos colaterais dos quais ainda não se tem conhecimento até esse momento. Você será acompanhado de perto em relação a qualquer efeito colateral e o medicamento será interrompido caso ocorram efeitos colaterais graves.

Riscos associados com procedimentos

Alguns dos testes que serão realizados em você (radiografias) irão lhe expor a quantidades controladas de radiação. A coleta de sangue pode causar dor, edema, trauma local, irritação ou vermelhidão local; você pode se sentir mal ou desenvolver infecção no local da punção da agulha. É importante que você informe qualquer efeito colateral o mais cedo possível ao seu médico do estudo. Você não deve esperar até a sua próxima visita agendada

Enquanto participar neste estudo, você não deve doar sangue. O seu médico do estudo revisará a lista de medicamentos que você está tomando atualmente para determinar se algum destes medicamentos não pode ser tomado em combinação com o medicamento do estudo. Caso você queira quaisquer destes medicamentos e um substituto satisfatório não seja identificado, você não será elegível para participar neste estudo. Não será solicitado que você deixe de tomar qualquer medicamento de que você necessite. Você deve relatar qualquer uso de medicamentos (que não necessite de prescrição, que necessite de prescrição) ou uso de drogas ilícitas, que você esteja tomando em qualquer momento durante este estudo.

Gravidez/controle da natalidade

Por não se ter muitas informações sobre os efeitos do benzonidazol, da vitamina C e E em crianças ainda por nascer ou crianças em amamentação, você não será incluída no estudo se estiver grávida ou amamentando ou planejando ficar grávida durante o estudo. Se você tiver potencial de engravidar e decidir participar neste estudo, você deve aderir a métodos aceitáveis de controle de natalidade enquanto estiver participando do estudo.

Se a qualquer momento durante o estudo, você engravidar ou achar que está grávida, ou descobrir mais tarde que engravidou durante o estudo, você deve contactar seu médico do estudo imediatamente para receber instruções de como proceder.

Possíveis benefícios associados com o estudo

Não há nenhuma garantia de que você se beneficiará ao fazer parte neste estudo. Um possível benefício para você em participar neste estudo pode incluir a melhoria dos seus sintomas e/ou de sua doença. Nenhum benefício adicional será fornecido a você como resultado dos testes de pesquisa realizados em suas amostras de sangue. Entretanto, caso você não seja beneficiado pessoalmente, o conhecimento acumulado com a sua participação neste estudo pode beneficiar outros pacientes no futuro

Confiabilidade

As informações de seu histórico médico são confidenciais e serão tomadas todas as precauções para preservá-las. A menos que requerido judicialmente, apenas o investigador, e auditores terão acesso a dados confidenciais de seu prontuário médico e dados que o identifiquem pelo nome.

Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

Assinando este consentimento você estará autorizando para estas pessoas o acesso ao seu prontuário médico e aos seus dados

Todo o material biológico coletado será utilizado apenas neste estudo para realização dos exames laboratoriais específicos no próprio protocolo. Este material não será utilizado em outros estudos ou para outros fins.

Novos achados

Durante o estudo você será informado de qualquer nova descoberta significativa sobre os resultados de exames, que possa alterar sua vontade de continuar participante deste estudo.

Respostas às perguntas sobre este estudo

Se durante o estudo clínico você tiver problemas ou queira esclarecer alguma dúvida sobre a conduta deste estudo, entre em contato com o: Dr.Roberto Coury Pedrosa - pelo telefone: _2562-2618 ou 2562-2436

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