



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

TIAGO BITTENCOURT DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CARDIOPATIA
CHAGÁSICA CRÔNICA

Florianópolis - Santa Catarina – Brasil

2004

Folha de Aprovação



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

Avaliação do estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica

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

Aluno: Tiago Bittencourt de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Co-orientador: Prof.^a Dr. Roberto Coury
Pedrosa

Florianópolis, SC, Brasil

Dezembro, 2004

Aos meus pais, Adroaldo e Tânia,
e ao meu irmão Leandro,
pela ajuda incontestável e
pelo exemplo de vida e de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Danilo Wilhelm Filho pela orientação, amizade, estrutura e tempo dedicado para que eu pudesse desenvolver e concluir este trabalho, também agradeço por ter-me aberto as portas onde todos as fechavam, Danilo mostrou ter confiança em mim. Foi uma honra tê-lo tido como orientador e amigo.

Ao professor Roberto Coury Pedrosa, pela fundamental co-orientação nesta pesquisa e por compartilhar sua sabedoria com nossas poucas mas longas conversas, algumas vezes por telefone. Roberto mostrou ser um profundo conhecedor da cardiopatia chagásica, sem sua ajuda e competência clínica nunca conseguiríamos realizar este trabalho, também teve contribuição para um melhor entendimento da clínica desta doença.

Aos professores Tânia Silva Fröde e Rosangela Curi Pedrosa pela carinhosa acolhida em seu laboratório e pela disposição em compartilhar suas experiências e apoio necessário para a realização deste trabalho.

Ao pessoal de casa, Patrik e Luisa, pelo apoio, amizade e compreensão durante todo o tempo que estivemos juntos. As longas discussões sobre a farmácia enfim lograram êxito.

Aos queridos colegas de laboratório Fabíola, Gustavo, Leonilda, Mariana, Maria Cláudia, Luziane e Cíntia pela ajuda, prestatividade, companheirismo e os inesquecíveis momentos de festa.

A todo o pessoal do Mestrado, pela troca de experiências científicas. Agradeço os bons momentos em que a amizade, companheirismo e alegria fizeram parte do nosso dia a dia no laboratório e em aula, valeu estar com vocês.

Ao amigos Álvaro, Rober, Téó e Alexandre “físico” pela disposição e prestatividade em dividir seus conhecimentos sobre as técnicas e pelos churras.

À Band e a Regina dupla perfeita nas horas de solidão no Laboratório.

À professora Tânia Pasa pela competência com que desempenha a difícil tarefa de coordenar este programa de pós-graduação.

Ao professor Mário Steindel por ter aceitado prontamente fazer parte da banca examinadora.

A Deus por todas as oportunidades, por ser a luz que ilumina meu caminho, refúgio nos momentos difíceis e fonte de renovação para seguir em frente.

Enfim, a todos aqueles aqui não declinados nominalmente, que com seus conhecimentos, comentários, sugestões e apoio tornaram possível a realização deste trabalho.

“... melhorar a resistência humana e não mais consentir que o nosso camponês tenha como abrigo a cafua primitiva, infestada pelo inseto que lhe suga o sangue e lhe injeta o parasito, cafua às vezes imprestável como habitação de suínos e de todo incompatível com a civilização de um povo...”

Carlos Chagas, 1934

RESUMO

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e as defesas antioxidantes provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo. A cardiopatia chagásica é uma patologia com características de inflamação crônica muito próxima a uma doença auto-imune que tem mecanismo de ação ainda obscuro. O objetivo deste trabalho foi analisar as enzimas antioxidantes nos eritrócitos de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos puros, classificados em 4 grupos nomeados de I à IV (cada grupo contendo n=10), variando entre estes grupos o grau de comprometimento cardíaco, segundo classificação de Los Andes modificada. Cada um dos quatro grupos chagásicos foi igualado a indivíduos saudáveis pela idade, formando 4 grupos-controle, e ainda, um grupo V formado por 10 pacientes não chagásicos com insuficiência cardíaca de etiologia orovalvar com sobrecarga de pressão e volume, perfazendo um total de 90 pacientes. Foram examinadas as enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) e ainda os tióis não proteicos (GSH), (GT) e (GSSG). As atividades da SOD, CAT, GR e os níveis de GT e GSSG essencialmente não apresentaram diferenças entre os grupos chagásicos. A concentração de GSH diminuiu com a progressão da doença e apresentou aumento em relação aos controles nos grupos I, II e III. As atividades da GST e GPx estiveram aumentadas no grupo III e diminuídas no grupo II e IV, indicando uma diminuição destes antioxidantes com a progressão da doença. O grupo V, exceção às atividades da SOD e da CAT que foram semelhantes, mostrou aumentos das enzimas em relação ao grupo IV, constituindo um comportamento diferenciado neste sentido. Esses resultados sugerem a existência de um quadro de estresse oxidativo com o aumento das condições oxidativas paralelamente à evolução da doença, ou seja, pacientes com grau mais elevado de acometimento cardíaco têm uma capacidade antioxidante diminuída, o que sugere uma perda grande das defesas antioxidantes. Os dados do presente trabalho têm grande importância quanto ao sistema antioxidante relacionado com os mecanismos de agressão do parasita nesta patologia crônica.

Palavras chaves: doença de Chagas, estresse oxidativo, defesas antioxidantes.

ABSTRACT

The imbalance between prooxidants and antioxidant defenses is known as oxidative stress, and is a common phenomenon associated with inflammatory processes of many diseases. Chagas' disease is a pathology characterized by chronic inflammation similar to autoimmune pathologies, the ultimate mechanisms of which are unknown. The present work measured some components of antioxidant systems present in the blood of patients with chagasic cardiopathy. Antioxidant enzymes in erythrocytes and contents of reduced and total glutathione were analyzed in four groups of chagasic cardiopathy patients (n=10 each group) with different degrees of severity of the disease, according to the classification of Los Andes. Each group was compared to four groups of healthy subjects and one more group (called group V) composed of 10 patients with heart failure of orovalve origin with significant pressure and volume overload, in a total of 90 subjects. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione reductase (GR) activities as well as total and oxidized glutathione (GT and GSSG) concentrations showed essentially no significant differences among the four groups. However, the reduced glutathione (GSH) concentration exhibited lowered values with the progression of Chagas' disease but was higher in groups I, II and III compared to controls. In addition, the glutathione S-transferase and glutathione peroxidase (GPx) activities were higher in group III and lower in groups II and IV, suggesting an antioxidant depletion with the progression of the disease. Except in SOD and CAT activities, the other antioxidants showed higher levels compared to group IV. The results indicate an increase in oxidative conditions with the severity of Chagas' disease, the patients with higher disease severity showing generally a decreased antioxidant capacity. These results have great importance regarding the antioxidant system which is affected by parasite aggression in this chronic pathology.

Key words: Chagas' disease, oxidative stress, antioxidant defenses.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01- Ônus de doenças em AVAI (anos de vida ajustados por incapacidade).....	3
02- Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas.....	14
03- As principais fontes e as respostas celulares das EROS (espécies reativas de oxigênio).....	23
04- Diagrama da classificação de Los Andes modificada.....	31
05- Perfil da idade de todos os pacientes chagásicos.....	42
06- Atividade da Superóxido dismutase (SOD).....	43
07- Atividade da Catalase (CAT).....	44
08- Atividade da glutationala peroxidase (GPx).....	45
09- Atividade da glutationala S-transferase (GST).....	46
10- Atividade da glutationala redutase (GR).....	47
11- Concentração da glutationala reduzida (GSH).....	49
12- Concentração da glutationala oxidada (GSSG).....	49
13- Concentração da glutationala total (GT).....	50
14- Concentração do óxido nítrico (NO).....	51
15- Concentração da proteína C-reativa (PCR).....	52

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabelas e quadro	Página
01- Principais antioxidantes endógenos.....	13
02- Exemplo de condições clínicas das quais as EROs estão envolvidas.....	18
03- Os mecanismos patológicos e agressivos que podem levar ao estresse oxidativo.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Ativador transcricional - 1
BZN	Benzonidazol
CAT	Catalase
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
GR	Glutaciona redutase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
GT	Glutaciona total
HO [•]	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HClO ⁻	Ácido hipocloroso
LOOH	Hidroperóxido lipidíco.
NO [•]	Óxido nítrico
NF-κB	Fator nuclear Kappa-B
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PCR	Proteína-C-reativa
SOD	Superóxido dismutase

IFN- γ	Interferon gama
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina.
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS E QUADRO	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1 INTRODUÇÃO	1.
1.1 Doença de Chagas	1.
1.1.1 História	1.
1.1.2 Transmissão	3.
1.1.3 Formas clínicas de apresentação da doença de Chagas.....	5.
1.1.4 Estágios clínicos evolutivos da cardiopatia chagásica crônica.....	6.
1.1.5 Mecanismos propostos para explicar a evolução da insuficiência cardíaca nos pacientes chagásicos.....	6.
1.1.6 Tratamento	9.
1.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	10.
1.3 Espécies reativas de nitrogênio (ERN).....	12.
1.4 Defesas antioxidantes.....	12.
1.5 Estresse oxidativo.....	15.
1.6 Efeito de dano celular e sua relação com patologias humanas	15.
1.6.1 DNA.....	16.
1.6.2 Lipídios.....	16.
1.6.1 Proteínas	17.
1.7 Mecanismos patológicos e estresse oxidativo.....	19.
1.8 Estresse oxidativo e doença de Chagas	22.
2 OBJETIVO GERAL	25.
2.1 Objetivos Específicos.....	25.
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26.
3.1 Seleção dos pacientes	26.
3.1.1 Critérios de inclusão	26.
3.1.2 Critérios de exclusão	27.
3.1.3 Dados a serem obtidos	28.
3.1.4 Definições.....	29.
3.1.5 Estágios evolutivos na cardiopatia chagásica	30.
3.1.6 Avaliação ecocardiográfica	30.
3.1.7 Diagnóstico da insuficiência cardíaca congestiva	31.
3.1.8 Exame clínico	33.
3.1.9 Seleção dos pacientes após realização dos exames complementares ...	33.

3.2	Análise Estatística.....	34.
3.3	Considerações éticas.....	35.
3.4	Protocolo experimental	35.
3.5	Equipamentos	36.
3.6	Reagentes	36.
3.7	Atividade das defesas antioxidantes e dos marcadores inflamatórios	35.
3.7.1	Defesas antioxidantes enzimáticas.....	37.
3.7.1.1	Catalase (CAT).....	37.
3.7.1.2	Superóxido Dismutase (SOD)	37.
3.7.1.3	Glutathione Peroxidase (GPx).....	38.
3.7.1.4	Glutathione Redutase (GR).....	38.
3.7.1.5	Glutathione S-Transferase (GST).....	39.
3.7.2	Análise dos antioxidantes não enzimáticas.....	39.
3.7.2.1	Glutathione Reduzida (GSH).....	39.
3.7.2.2	Glutathione Total (GT) e Glutathione Oxidada (GSSG).....	40.
3.7.3	Determinação de marcadores inflamatórios.....	40.
3.7.3.1	Análise quantitativo do óxido nítrico (NO) pelo nitrito/nitrato.....	40.
3.7.3.2	Análise da proteína C-reativa (PCR)	41.
4	RESULTADOS.....	42.
4.1	Perfil da idade dos pacientes	42.
4.2	Determinação das defesas antioxidantes enzimáticas	43.
4.2.1	Atividade da Superóxido Dismutase	43.
4.2.2	Atividade da Catalase.....	44.
4.2.3	Atividade da Glutathione Peroxidase	45.
4.2.4	Atividade da Glutathione S-transferase.....	46.
4.2.5	Atividade da Glutathione Redutase.....	47.
4.3	Determinação dos antioxidantes não enzimáticos.....	48.
4.3.1	Concentração da Glutathione reduzida (GSH), Glutathione Oxidada (GSSG) e da Glutathione Total (GT).....	48.
4.4	Determinação de marcadores inflamatórios	51.
4.4.1	Concentração do óxido nítrico (NO).....	51.
4.4.2	Concentração da proteína C-reativa (PCR)	52.
5	DISCUSSÃO.....	53.
6	CONCLUSÕES.....	61.
7	PERSPECTIVAS	62.
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63.
9	ANEXOS.....	77.

1 INTRODUÇÃO:

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1 HISTÓRIA:

A doença de Chagas (tripanossomíase americana) é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Cohen & Gürtler, 2001). A tripanossomíase americana foi descoberta em 1909 no Brasil pelo médico e pesquisador Dr. Carlos Ribeiro Justiano Chagas (Chagas, 1909), integrante da equipe de Oswaldo Cruz. Carlos Chagas foi encarregado de chefiar os trabalhos de combate à malária em Minas Gerais, onde estava sendo construída a Estrada de Ferro Central do Brasil. Entre 1907 e 1909, Chagas ficou morando em um vagão de trem onde também era seu laboratório e consultório. Como bom cientista e em busca de informações sobre patologia na região, investigou o sangue de animais e pessoas. Em um mico (*Callithrix penicillata*) encontrou um hemoflagelado e, posteriormente encontrou, o mesmo em “chupões” ou “barbeiros” (inseto comum na região). No laboratório de Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, alguns barbeiros conseguiram infectar os micos, comprovando a suspeita de Chagas que esse hemoflagelado chamado “Trypanosoma” era uma espécie nova que circulava entre barbeiros, mamíferos e, talvez, até no homem.

Dois anos mais tarde, em 14 de abril de 1909 e, após uma busca incessante do protozoário no homem, encontrou o mesmo hemoflagelado ao examinar uma criança febril de 2 anos de idade. A mãe informou que sua filha tinha sido picada por um barbeiro. A sintomatologia conferia com os animais infectados no laboratório, o grande cientista ainda estudou a morfologia e a biologia do parasito no hospedeiro vertebrado e invertebrado, e denominou-o de *Tripanosoma cruzi*. (Lana & Tafuri, 2003)

A doença de Chagas começou sua expansão no fim do século XIX e alcançou seu pico na metade do século XX. Hoje, a doença de Chagas é endêmica na maioria dos países do continente americano (América do Sul e Central), a tal ponto que estimativas apontam entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Kirchoff et

al., 1987; Moncayo, 1999; WHO, 2000). Estima-se que estão infectados por *T. cruzi* 7% da população na Argentina, 22% na Bolívia, e 1,3% do total da população no Brasil, sendo 4,2% da população rural em 1995 (Schmuñis, 2000).

Dados do Ministério da Saúde indicam que aproximadamente 30% das pessoas infectadas desenvolvem cardiopatias, destas 10% na forma grave. Nos anos 80 estavam estimados em 1200000 pacientes com problemas cardíacos e 200000 com megaesôfago e/ou megacolon. No Brasil nesta mesma década a mortalidade da doença de Chagas chegava 1 a 5 por 100000 habitantes (Prata, 2001), nos anos 90 a mortalidade foi de 3,9/100000 (Schmuñis, 2000). O Banco Mundial estima que a doença de Chagas é responsável pela morte de 23000 pessoas todo o ano (WHO, 1991; Prata, 2001). O grau de incapacitação que a enfermidade causa em comparação com a perda de vida foi medido para criar o ônus da doença em AVAI (anos de vida ajustado por incapacidade) (figura 01). Neste critério o custo da enfermidade produzido pela doença de Chagas é maior que o produzido pela leishmaniose, tripanossomíase africana, hanseníase, filaríose ou oncocercose (Schmuñis, 2000). Na América Latina somente infecções respiratórias agudas, diarreia e AIDS produzem maior gasto socioeconômico (Prata, 2001).

Com ajuda da Organização Mundial da Saúde na implementação de programas de eliminação do vetor (uso de inseticidas) e melhoria do controle da transmissão transfusional, a situação epidemiológica da doença está sob controle em alguns países como o Chile, o Uruguai, Brasil e Argentina (WHO, 2004). No entanto, a vigilância epidemiológica deve ser constante e, em função do ciclo silvestre e do grande número de vetores e reservatórios naturais, a tripanossomíase ainda não foi erradicada e novos casos de infecção humana podem ocorrer sempre que houver um deslocamento do homem em direção ao parasita no seu *habitat* natural (Coura et al., 2002).

Com as campanhas de erradicação do vetor, os casos agudos tornaram-se raros e praticamente inexistentes em centros urbanos de áreas originalmente não endêmicas (Xavier, 1999). Com isso, o foco dos estudos deve, necessariamente, ser direcionado para os pacientes crônicos e para o desenvolvimento das lesões que evoluem durante a fase indeterminada da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Mesmo com a quase erradicação da doença, seguramente teríamos, por mais de 30 anos, milhares de pacientes necessitando de cuidados médicos, principalmente na forma crônica cardíaca da doença (Dias et al., 1985; Higuchi, 1995; Pedrosa et al., 1996), essencialmente pela

sua alta prevalência e alta morbi-mortalidade (Malta, 1996; Prata, 2001). Estima-se que no Brasil, em 1995, de um total de 1,91 milhão de contaminados, cerca de 10% seriam com cardiopatia e aproximadamente 1% com cardiopatias graves (Schmuñis, 2000).

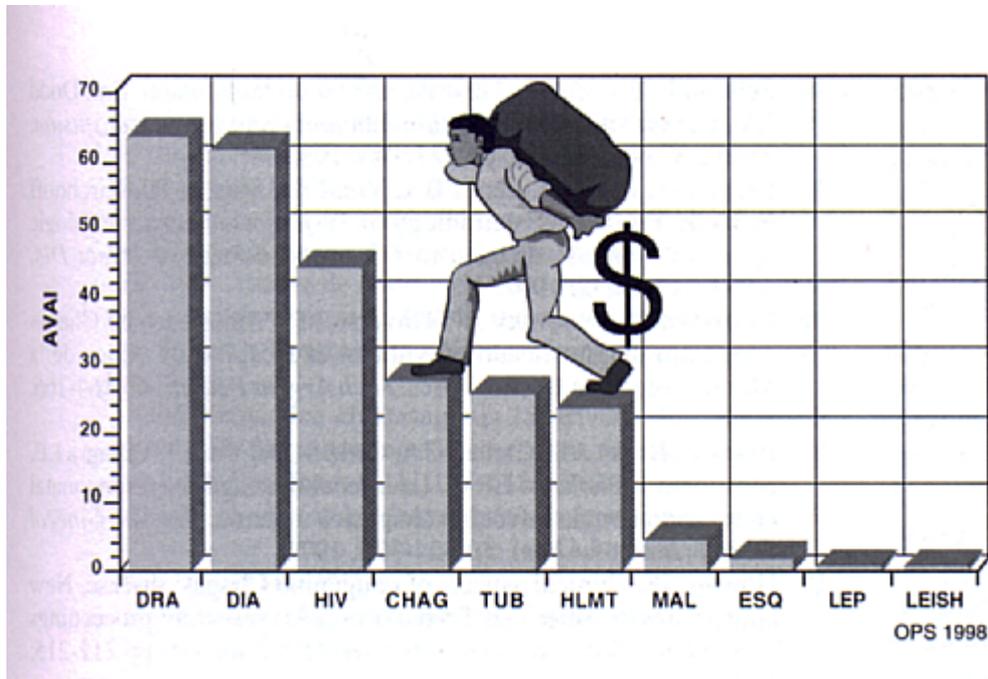


Figura 01 - Ônus de doença em AVAI (anos de vida ajustados por incapacidade) para distintas enfermidades transmissíveis nas Américas. DRA = doença respiratória, DIA = diarreia, HIV = SIDA, CHAG = doença de Chagas, TUB = tuberculose, HTML = helmintíase intestinal, MAL = malária, ESQ = esquistossomose, LEP = hanseníase, LEISH = leishmaniose. Fonte: Schmuñis, 2000.

1.1.2 TRANSMISSÃO:

A doença de chagas caracteriza-se por três fases: aguda, indeterminada e crônica, e é transmitida pelo hemíptero hematófago da família dos Reduviidae, um vetor natural, bem como pela transfusão, pela forma congênita, oral e acidentes laboratoriais (Rabinovich et al., 1990).

A transmissão natural ou primária da doença de Chagas é vetorial. Os triatomíneos vetores infectam-se ao ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. No estômago do inseto eles se transformam em formas arredondas e epimastigostas. No intestino médio, os epimastigotas multiplicam-se por divisão binária simples. No reto, porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas (infectantes para os vertebrados). A infecção do *T. cruzi*

ao homem, um hospedeiro acidental, ocorre pelos tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o repasto sangüíneo, geralmente à noite (Prata, 2001; Lana & Tafuri, 2003).

O tripanossoma, um parasita intracelular obrigatório, estava primitivamente restrito aos pequenos mamíferos das matas e campos da América (desde o México, ao norte, até Argentina e Chile, ao sul). Esses animais (tatus, gambás, roedores, morcegos, entre outros) conviviam com os vetores “barbeiros” silvestres e, entre eles, circulava o *Tripanosoma cruzi*, constituindo uma zoonose (ciclo selvagem). Com a chegada do homem e os processos de colonização, em muitos lugares aconteceram desequilíbrios ecológicos (desmatamentos, queimadas), os barbeiros foram desalojados, invadindo as habitações rústicas e pobres dos lavradores, permitindo que a doença chegasse ao homem e aos mamíferos domésticos (ciclo domiciliar) (Dias, 1999; Cohen & Gürtler, 2001).

Quando o processo migratório das populações rurais para as cidades se intensificou, o parasita acompanhou o homem e a forma de transmissão passou a ser, com freqüência, pelo sangue transfundido. A transfusão sangüínea é a segunda via de transmissão mais importante (Schmuñis, 1999), responsável por aproximadamente 10% dos casos da doença (Prata, 2001). Em 1995, considerando todos os países da América Latina, 1 de cada 240 doações originou 1 nova unidade contaminada e 1 de cada 1255 produziu infecção, mesmo com a implementação da triagem para doença de Chagas em bancos de sangue por muitos países latinos (Schmuñis, 2000). O intenso fluxo migratório ocorrido nos últimos anos de países da América Latina para países mais desenvolvidos tem colaborado com o aparecimento da doença de Chagas na América do Norte, Europa e Ásia, o que tem preocupado as autoridades sanitárias de países como os Estados Unidos com a possibilidade de transmissão transfusional em bancos de sangue. Estes países não usam a triagem sorológica para doença de Chagas no banco de sangue (Kirchoff et al., 1987, Schmuñis, 1999). A Organização Mundial de Saúde recomenda que o diagnóstico sorológico da doença de Chagas seja realizado utilizando sempre dois testes sorológicos diferentes para obtenção de resultados mais precisos (Lana & Tafuri, 2003).

1.1.3 FORMAS CLÍNICAS DE APRESENTAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

Logo após a infecção do hospedeiro, a fase aguda da doença tem início. A principal característica desta fase é a presença de altos níveis de parasitos circulantes e tissulares. Os pacientes infectados apresentam sintomas gerais como febre, tonteados, dor de cabeça e mal estar. Uma característica marcante apresentada por parte dos pacientes é o sinal de Romaña, que consta de edema subcutâneo na pálpebra, embora a infecção possa também ocorrer em outras regiões de picada no corpo, o que é conhecido como chagoma de inoculação. Dentre as alterações sistêmicas observadas destacam-se: o edema subcutâneo, o aumento do volume dos linfonodos, a hepatomegalia e a esplenomegalia, manifestações de comprometimento cardíaco, e a meningoencefalite também podem ser descritas (Marcondes & Rassi, 1994).

Terminada a fase aguda, que tem duração entre dois a quatro meses, observa-se a fase crônica. Esta fase é marcada inicialmente por um período latente, o período indeterminado, onde não são detectadas alterações clínicas através da utilização de técnicas convencionais como o eletrocardiograma, o raio X e o exame clínico. Entretanto, vários estudos já detectam neste período da doença a miocardite focal, bem como alterações no sistema excito-condutor cardíaco e deficiência de contratilidade. Alterações estas que podem ser evidenciadas com o uso de testes mais sensíveis como o exame eletrocardiográfico de longa duração, o teste de esforço ou o ecocardiograma (Ribeiro & Rocha, 2000).

Seguindo deste período indeterminado, observa-se um retorno à sintomatologia em aproximadamente 35% dos pacientes infectados. Esse retorno ocorre mesmo na ausência ou escassez de observação de parasitos nos órgãos internos que são acometidos como o esôfago, cólon, o sistema nervoso e, predominantemente, o coração (Brener, 2000).

1.1.4 ESTÁGIOS CLÍNICOS EVOLUTIVOS DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

Existe uma grande variabilidade de critérios de classificação da doença usada nos trabalhos de pesquisa, tanto básica como clínica, citados como mais de 25 por Storino (1994). Em 1974, a OMS propôs uma classificação da cardiopatia em 4 graus, mas esses critérios não incorporam informações sobre a função ventricular, hoje considerada bastante relevante (Xavier, 1999), pois a curva de sobrevida do paciente diminui à proporção que sua função ventricular decresce (Guimarães, 1997; Xavier, 1999).

Os quase mil trabalhos que podem ser encontrados na literatura estudando pacientes chagásicos utilizam estes critérios de modo arbitrário. A falta de um referencial comum dificulta a interpretação global dos resultados. Para efeito do presente trabalho, utilizou-se a classificação de Los Andes, modificada por Xavier (1999), definindo os vários estágios evolutivos de acometimento cardíaco na doença de Chagas como:

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

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

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

Grau IV: infecção com insuficiência cardíaca.

Nessa classificação os pacientes dos grupos I e IV são identificados pelo ECG normal, sem necessidade de ecocardiograma ou pela presença de insuficiência cardíaca, respectivamente. Os pacientes dos grupos II e III (com ECG alterado e sem clínica de insuficiência cardíaca) são classificados de acordo com sua função ventricular, avaliada pelo ecocardiograma (Xavier, 1999).

1.1.5 MECANISMOS PROPOSTOS PARA EXPLICAR A EVOLUÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA NOS PACIENTES CHAGÁSICOS

A história natural da insuficiência cardíaca na cardiopatia chagásica começa quando a destruição de fibras miocárdicas pelo processo inflamatório e a sua substituição por tecido fibroso atinge um limite crítico, obrigando os ventrículos a remodelar-se frente à perda gradativa dos elementos contráteis (Guimarães, 1997). Uma inflamação crônica (miocardite) progressiva e fibrosante é portanto o substrato morfológico fundamental dos mecanismos patogênicos responsáveis pela miocardite. Os três folhetos cardíacos e o sistema de condução ficam comprometidos (Andrade, 1991), e inúmeros achados na doença de Chagas experimental e humana sugerem o envolvimento de mononucleares (linfócitos T) na formação da lesão chagásica, associado à presença do parasita e/ou seus antígenos. O remodelamento ventricular ocorre de duas maneiras: hipertrofia extrínseca das fibras íntegras e dilatação da cavidade ventricular (Guimarães, 1997). Essa chamada hipertrofia extrínseca restaura temporariamente o volume sistólico já comprometido, mas a dinâmica do processo leva à dilatação cardíaca crescente, com perda progressiva da capacidade de ejeção ventricular, em virtude da evolução da miocardite e da sobrecarga mecânica. Nos estágios mais avançados, além do componente sistólico, também se intensifica um componente de restrição diastólica, devido à grande dilatação e ao enrijecimento pela fibrose. Contribuem ainda para o agravamento da insuficiência cardíaca as arritmias ventriculares complexas, o tromboembolismo pulmonar repetitivos, e a dilatação dos anéis valvares traduzidos clinicamente por insuficiência das válvulas mitral e tricúspide.

Para explicar a destruição de cardiomiócitos e a fibrose progressiva, quatro teorias principais encontram suporte anátomo-patológico em pacientes e em modelos experimentais (Rossi, 1995; Pedrosa, 1998): (1) destruição direta pelo *T. cruzi*; (2) teoria neurogênica, com destruição de células ganglionares e lesões do sistema de condução (D'Ávila et al., 2002); (3) reações auto-imunes anti-coração (humorais e/ou celulares); (4) comprometimento microvascular (microespasmos, microtrombos, disfunção de células endoteliais e aumento de atividade plaquetária). Rossi (1995) acredita que o desenvolvimento da miocardite dependa de processos focais de necrose celular, sucessivos e progressivos, que levam a uma fibrose miocárdica reativa e reparativa, com hipertrofia de cardiomiócitos adjacentes. Essa necrose poderia ser iniciada e perpetuada

por fatores imunes e/ou alterações isquêmicas da microcirculação.

A detecção de amastigotas ou de antígenos do parasita é mais freqüente no septo intracavitário e pode estar associada a infiltrados inflamatórios de diferentes intensidades (Higuchi, 1999). Isso favorece a idéia de que os antígenos do parasita disparam uma resposta de hipersensibilidade contra fibras do coração. Por outro lado, quando muitos ninhos de amastigotas são encontrados, não estão associados a infiltrado inflamatório, sugerindo mecanismos de redução ou controle da resposta imune naquele microambiente. O grupo de Teixeira da UnB defende a hipótese de que o parasita integra parte de seu DNA ao genoma da célula hospedeira, de modo que antígenos do parasita poderiam permanecer no hospedeiro, mesmo depois de um controle da carga parasitária com atividade proliferativa e imunogênica (Teixeira et al., 1987, 1989, 1994; Simões-Barbosa et al., 1999; Nitz et al., 2004).

A chamada hipótese do “mimetismo molecular”, na qual o parasita apresenta muitos epítomos similares a componentes do hospedeiro (especialmente dos tecidos cardíaco, muscular e nervoso), propõe explicar a existência, tanto de anticorpos como de células efectoras com reatividade cruzada entre parasita e hospedeiro, e possui muita base experimental de suporte, mas ainda não recebeu comprovação direta pela transferência de doença por meio de tais elementos (Tarleton & Zhang, 1999; Andrade, 2000).

Higuchi (1999) defende a idéia de que a cardiopatia é resultante de uma íntima interação entre o parasita e o hospedeiro, onde as lesões dependem de uma resposta imune exacerbada contra o parasita, causando lesão ao miocárdio. Segundo esta autora, uma resposta hiperérgica induz certa imunodepressão no paciente, com conseqüente recirculação periódica dos parasitas e forte resposta de hipersensibilidade retardada, com manutenção de miocardite e fibrose gradativa. Como resultado da inflamação, ocorre um acúmulo denso de colágeno em torno de cada fibra ou grupo de fibras e um remodelamento da matriz extracelular, que permite dilatação na microcirculação miocárdica e lesões isquêmicas devido à estase e áreas de hipoperfusão, podendo gerar necrose em zonas específicas, como a ponta e a parede posterior do ventrículo esquerdo, os nódulos sino-atrial e átrio-ventricular e o feixe de His, com comprometimento do sistema de condução e a gênese de arritmias.

O comprometimento do sistema de condução pode ser estrutural, pela perda das células do sistema marca-passo, ou funcional, pelo efeito de anticorpos anti-receptores

cardíacos. Além disso, o comprometimento do sistema nervoso autônomo, conhecido como disfunção autonômica, é uma das características marcantes da cardiopatia chagásica crônica, por lesões que ocorrem nos corpos celulares intracardíacos e dos plexos cervico-torácicos, levando à despopulação neuronal (Bestetti, 1997).

A unificação das diferentes teorias explicam melhor os eventos fisiopatológicos da cardiopatia. No entanto, a base da miocardite chagásica, que implica na lise de miócitos normais associada à inflamação e fibrose e à ausência de lise em fibras infectadas, continua a colocar as seguintes questões para a pesquisa básica nos dois processos celulares centrais: como morrem os cardiomiócitos e demais células do coração, por qual ou quais mecanismos? Anticorpos estão envolvidos? (Tarleton & Zhang, 1999).

1.1.6 TRATAMENTO

Com base nas evidências atuais da participação do parasita na patogenia da cardiopatia chagásica, tem-se dado ênfase à terapêutica parasiticida. A fase aguda é a ocasião onde o tratamento é realmente efetivo, sendo consenso de que o mesmo deve ser instituído nessa fase, uma vez que cerca de 50% a 70% dos pacientes podem ser efetivamente curados (Brener, 1979; Malta, 1996; Dias, 1999; Brener, 2000). O único parasiticida atualmente no mercado é o benzonidazol (BNZ), já que o nifurtimox (NFX) está fora do mercado brasileiro devido à sua alta toxicidade. Além da fase aguda, o BNZ é utilizado em pacientes imunossuprimidos (AIDS) com reativação parasitária, e em pré-operatório para transplantes cardíacos. Na fase crônica da doença o mesmo não é eficiente, portanto não utilizado (Brener, 2000).

A insuficiência cardíaca chagásica é tratada de acordo com as regras desta síndrome, isto é, restrição de sódio e uso de diuréticos e digitálicos. O uso de inibidores da ECA é a base do tratamento de outras doenças cardíacas, e alguns investigadores o recomendam para cardiopatia chagásica, porém, somente quando livres de moderada disfunção ventricular (Marin-Neto et al., 2000; Prata, 2001).

O transplante de coração, apesar da reativação e possibilidade de neoplasias (Bocchi et al., 1994; Bocchi et al., 2001) e rejeição (Sousa et al., 2001), tem demonstrado benefícios aos pacientes chagásicos crônicos quando comparado com outras cardiopatias (Prata, 2001).

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Acredita-se que há cerca de 3 bilhões de anos atrás o oxigênio molecular não existia em nossa atmosfera e que os seres vivos que habitavam a Terra naqueles primórdios eram essencialmente anaeróbios (Gilbert, 1981). A existência do oxigênio parecia ser possível somente através de moléculas como monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), dióxido de silício (SiO₂) ou formando vapor (H₂O) com o hidrogênio (Fridovich, 1997). Posteriormente, surgiram organismos fotossintetizantes, as cianofíceas, e possivelmente pela falta de outra fonte de energia, estas células usaram a energia solar para quebrar a molécula de H₂O. Com a fotossíntese instalada na natureza houve condições para o aparecimento do oxigênio molecular em maior abundância (Fleschin et al., 2000).

O oxigênio tornou-se indispensável para a grande maioria dos seres vivos na biosfera. Através das mitocôndrias, esta molécula permite obtenção de energia, convertida quase universalmente em forma de ATP. O ATP majoritariamente é formado pela redução do O₂ em H₂O no metabolismo oxidativo. Paradoxalmente esta molécula que sustenta a vida em organismos aeróbios é também tóxica (Fridovich, 1997). Conforme originalmente descrito pela pesquisadora argentina Rebeca Gershan e colaboradores (1954), a toxicidade do oxigênio é um fenômeno complexo que ocorre associado aos estados de hiperóxia e radiação ionizante. Este estudo foi duramente criticado por anos, mas em 1969, quando McCord & Fridovich descobriram a função da enzima superóxido dismutase, ficou bastante evidente o paradoxo desta molécula essencial para o organismo humano e sua importância biológica e clínica. Posteriormente ficou evidente que esta toxicidade é um fenômeno contínuo e presente nos estados de normóxia em organismos aeróbios saudáveis (Wilhelm Filho, 1994).

A relatada toxicidade do oxigênio é devida aos seus intermediários reativos, ou às suas espécies reativas de oxigênio (EROs), formadas pelas chamadas reações de iniciação. A primeira espécie a ser formada pela adição de um elétron é o O₂^{•-} (ânion superóxido), e seqüencialmente, pela adição de mais um elétron ou pela ação enzimática da superóxido dismutase (SOD), temos o H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), e este, por nova adição de um elétron, ou catalizado pelo sistema Fe⁺²/Fe⁺³ ou Cu⁺²/Cu⁺³, forma o [•]OH (radical hidroxil).

Das espécies acima mencionadas, duas são formas radicalares: $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$; o H_2O_2 é uma ERO pouco reativa não radicalar (pois não possui um elétron desemparelhado no seu último orbital como as duas outras mencionadas), atuando quimicamente como um redutor suave, enquanto o radical hidroxil (HO^{\bullet}) é a ERO de maior reatividade química e capaz de proporcionar as principais reações de propagação (como a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e dano ao DNA), possibilitando até a desintegração e morte das células. O H_2O_2 é uma molécula bastante difusível e estável, e, conforme já mencionado, tem capacidade de reagir com metais de transição como o Fe^{2+} livre nos sistemas biológicos, produzindo o radical hidroxil através da reação de Fenton:



devendo, por isso, ser considerado um radical livre “encoberto”. Outra ERO importante é o oxigênio singlete (1O_2), um estado eletrônico excitado do oxigênio molecular que possui alta reatividade e capacidade oxidante. Paralelo e mais recentemente, ficou evidenciada a contribuição deletéria de espécies reativas de nitrogênio (ERN) nos sistemas biológicos, pela ação do monóxido de nitrogênio, ou mais conhecido como óxido nítrico (NO), principalmente através de sua combinação com o $O_2^{\bullet-}$ formando peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual, mesmo não sendo um radical, é uma forma muito difusível e reativa (Halliwell & Gutteridge, 1999; Nordberg & Arnér, 2001). O $ONOO^-$ é um importante mediador da peroxidação lipídica e nitração de proteínas, incluindo a oxidação da LDL (Romero et al., 1999; Griendling & FitzGerald, 2003).

Há vários sítios de geração destas espécies reativas, sendo que alguns deles merecem atenção especial, como majoritariamente, a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, e, secundariamente o sistema de β -oxidação peroxissomal, as reações do citocromo P-450 (CYP 450) e a geração de NO^{\bullet} e $HOCl$ nos processos inflamatórios através das enzimas NADPH-oxidase (na membrana dos fagócitos) e da mieloperoxidase. Outras enzimas que produzem ânion superóxido são lipoxigenases, ciclooxygenases e xantina oxidases (Boveris & Cadenas, 1982; Finkel & Holbrook, 2000), além da oxidação de diversas moléculas como a adrenalina e diversos aminoácidos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERN)

O radical NO^\bullet (óxido nítrico) é produzido pela oxidação de um grupamento terminal guanido-nitroso do átomo de nitrogênio da L-arginina (Palmer et al., 1988; Dröge, 2002). Este processo é catalisado pela enzima NOS (NO sintase). Dependendo do microambiente onde este radical NO^\bullet se encontra, ele pode se converter em outras espécies reativas de nitrogênio (ERN), tais como, cátion nitroso (NO^+), ânion nitroxil (NO^-) ou peroxinitrito (ONOO^-) (Gow & Stamler, 1998). O NO^\bullet possui efeitos fisiológicos importantes no organismo humano, tais como relaxamento da musculatura lisa (antigamente conhecido como fator relaxante endotelial no controle do tônus vascular), regulação da pressão arterial, molécula microbicida junto a macrófagos, fator importante na agregação plaquetária, no balanço entre crescimento e diferenciação das células vasculares da musculatura lisa, e outras funções GMPc-dependentes (como um regulador de fatores transcricional) (Palmer et al., 1987; Griendling & FitzGerald, 2003). Os mecanismos para regular fatores transcricionais poderiam ocorrer através da diminuição de ligantes em regiões promotoras via dano oxidativo no DNA (Nordberg & Arnér, 2001). Conforme acima referido, um dos papéis importantes do NO^\bullet junto com outras espécies reativas ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HClO^-), é a destruição de patógenos por ativação das células fagocíticas, o que é conhecido, como “respiratory burst” (Keher, 1993; Dröge, 2002).

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As defesas antioxidantes dos sistemas biológicos são moléculas capazes de inibir ou desativar a ação das EROs, assim diminuindo ou evitando o efeito lesivo decorrente das mesmas. Para controlar a condição deletéria inerente aos processos oxidativos, existe um sistema antioxidante endógeno complexo (Nordberg & Arnér, 2001) em todos organismos aeróbios (Wilhelm Filho et al., 2000). Como antioxidante entende-se qualquer molécula capaz de, mesmo em concentrações relativamente baixas, neutralizar ou diminuir a ação das EROs (Halliwell & Gutteridge, 1999). Os antioxidantes endógenos são divididos, classicamente, em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos (vide Tabela 01). Suas principais funções estão esquematizadas na figura 02.

Tabela 01. Principais antioxidantes endógenos (adaptado de Yoshida, 1996).

ANTIOXIDANTES	MODO DE AÇÃO
<p>1. Endógenos enzimáticos</p> <p>Superóxido dismutase (SOD)</p> <p>Catalase (CAT)</p> <p>Glutaciona Peroxidase (GPx)</p> <p>Glutaciona Redutase (GR)</p> <p>Glutaciona S-Transferase (GST)</p>	<p>Neutraliza o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) à H_2O_2 e O_2.</p> <p>Neutraliza o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à H_2O e O_2.</p> <p>Neutraliza os hidroperóxidos.</p> <p>Recicla glutaciona reduzida (GSH).</p> <p>Neutraliza carbono eletrofilico; conjuga e excreta xenobióticos transformados.</p>
<p>2. Endógenos não enzimáticos</p> <p>2.1 Lipossolúveis</p> <p>Tocoferóis</p> <p>Carotenóides</p> <p>Bilirrubinas</p> <p>2.2 Hidrossolúveis</p> <p>Glutaciona reduzida (GSH)</p> <p>Ácido ascórbico</p> <p>Ácido Úrico</p> <p>Transferrina</p> <p>Lactoferrina</p> <p>Haptoglobina</p> <p>Albumina</p>	<p>Interrompem a peroxidação lipídica (reação de propagação das EROs).</p> <p>Tripeptídeo tiol (L-glutamil-L-cisteinil-L-glicina) está envolvido na redução de LOOH e H_2O_2 à H_2O.</p> <p>Conjugado à xenobióticos pela GST.</p> <p>Neutraliza oxigênio singlete, EROs, recicla o tocoferol e atua sinergicamente com ele.</p> <p>Neutraliza EROs em meio aquoso.</p> <p>Remove Fe livre das soluções.</p> <p>Igual a transferrina.</p> <p>Liga-se à hemoglobina livre e impede esta de reagir com H_2O_2.</p> <p>Liga-se ao cobre e à bilirrubina</p>

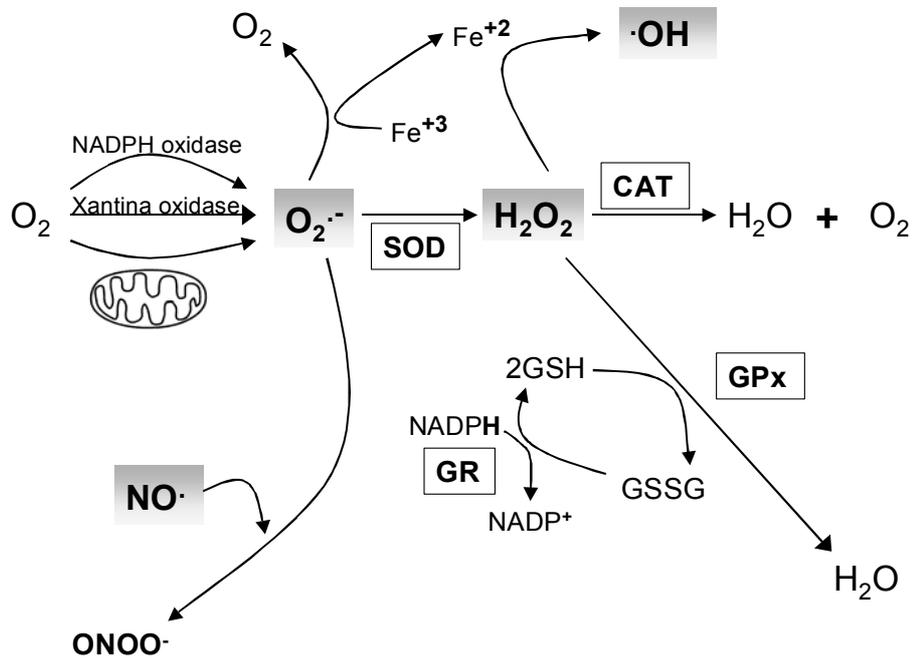


Figura 02. Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas (em cinza). Mitocôndria, NADPHoxidase ou xantina oxidase e outros sistemas convertem O_2 em $O_2^{\cdot-}$, o qual é dismutado pela superóxido dismutase (SOD). H_2O_2 pode ser convertido em H_2O pela catalase (CAT) e ou glutatona peroxidase (GPx), ou o H_2O_2 pode formar radical hidroxil ($\cdot OH$) após reação com o Fe^{+2} . A glutatona peroxidase (GPx) reduz todos os hidroperóxidos além do H_2O_2 utilizando glutatona reduzida (GSH), um doador de hidrogênio. Outra enzima, a glutatona redutase (GR), mantêm o equilíbrio entre glutatona reduzida ($GSH \approx 99\%$) e glutatona oxidada ($GSSG \approx 1\%$). O $O_2^{\cdot-}$ se não retirado do meio, pode reagir rapidamente com o óxido nítrico ($NO\cdot$) para formar peroxinitrito ($ONOO\cdot$). Adaptado de Griendling & FitzGerald, 2003.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um conceito relativamente recente criado para demonstrar o distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes. Este distúrbio ocorre pelo aumento dos pró-oxidantes (ERO) sem o concomitante aumento das defesas antioxidantes, porém em outras situações, as defesas podem estar reduzidas sem o aumento das EROs; ou ainda, uma situação muito mais crítica, pode ocorrer o aumento da concentração de EROs acompanhado de uma redução da proteção antioxidante (Sies, 1985; Sies, 1993; Dotan et al., 2004).

O estado de estresse oxidativo está relacionado com diversos processos patológicos como a carcinogênese, a mutagênese, lipoperoxidação, oxidação e fragmentação de proteínas, envelhecimento, entre outros. (Sies, 1986). Mesmo assim, nem sempre é possível relacionar este estado com dano, pois a extensão e o tipo de lesão irão depender muito da qualidade e da natureza dos mesmos a que as células estão expostas, e, também, da condição de suas defesas antioxidantes (Keher, 1993). O uso deste conceito depende de critérios estabelecidos, e nem sempre é utilizado de maneira correta, já que, o uso de associações de técnicas de dano com análises das defesas antioxidantes leva à inferência do dito critério (Dotan et al., 2004).

1.6 EFEITO DE DANO CELULAR E SUA RELAÇÃO COM PATOLOGIAS HUMANAS

Em quantidades relativamente pequenas, as EROs são um produto biológico do metabolismo celular. Em baixas concentrações, elas podem atuar como segundos mensageiros, reguladores de genes e mediadores da ativação celular (Dröge, 2002; Griendling & FitzGerald, 2003; Polla et al., 2003). Muitas citocinas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores usam EROs e ERNs como segundo mensageiro na sinalização intracelular (Nordberg & Arnér, 2001; Dröge, 2002).

Entretanto, as EROs em estado de estresse oxidativo ou em altas concentrações, devido à sua alta reatividade, podem causar danos irreparáveis, mutagênese e carcinogênese, e têm envolvimento em mais de duas centenas de processos patológicos.

(Haliwell & Gutteridge, 1999; Nordberger & Arnèr, 2001; Griending & FitzGerald, 2003). Os alvos deste dano incluem grupos de biomoléculas como:

1.6.1 DNA

Os efeitos mutagênicos das EROs são derivados da modificação estrutural no DNA. As alterações são inúmeras (quebra do DNA, oxidação de purinas, uniões DNA-proteínas indesejáveis, entre outras), especialmente devido ao radical hidroxil. Se não existisse o sistema de reparo que rapidamente regenera o DNA (Nordberger & Arnèr, 2001), haveria mutações aos milhares durante a replicação. Este mecanismo poderia, parcialmente, explicar porque indivíduos cronicamente expostos ao estresse oxidativo têm alta prevalência de câncer (Gaté et al., 1999; Nijveldt et al., 2001). A sinalização de apoptose nas células poderia estar relacionada com o dano que as EROs e seus derivados medeiam no DNA, influenciada também por outros fatores, como o aumento da permeabilidade mitocondrial, liberação de citocromo C, aumento intracelular de Ca^{+2} e outros efeitos decorrente da apoptose (Nordberger & Arnèr, 2001). Desta forma a alteração do DNA está envolvida em diversos processos patológicos e no próprio envelhecimento (Haliwell & Gutteridge, 1999).

1.6.2 LIPÍDIOS

A peroxidação lipídica é provavelmente a maior consequência da ação deletéria das EROs. Os ácidos graxos poliinsaturados são, por causa de suas múltiplas duplas ligações, excelente alvos para o ataque das EROs (Sies, 1985; Nordberger & Arnèr, 2001). O processo é iniciado quando o radical HO^{\bullet} captura um átomo de hidrogênio do carbono metileno na cadeia do ácido graxo. Este ácido graxo agora torna-se radical alquil (L^{\bullet}), e este, com a presença de O_2 , gera radical peroxil (LOO^{\bullet}), que por sua vez é muito instável e captura um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo adjacente (reação de propagação na peroxidação lipídica) (Pryor, 1986; Gaté et al., 1999). Durante este processo, estas moléculas são decompostas em aldeídos, e o principal deles é o

malondialdeído (MDA), altamente reativo (Dotan et al., 2004). O MDA pode reagir com várias estruturas biológicas e modificar as moléculas ao seu redor, as estruturas induzidas pelo MDA (estruturas não-próprias) podem levar a uma resposta autoimune.

As oxidações aos lipídios pelas EROs constituem a base da formação da placa de aterosclerose. O mecanismo de formação da placa de aterosclerose envolve oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), captação destas partículas pelos fagócitos nos espaços subendoteliais, e finalmente, acumulação destes fagócitos neste espaço, onde estimulam a formação da placa de ateroma. Este mecanismo consiste no principal constituinte da formação de doenças cardiovasculares, tornando a prevenção ou diminuição da lipoperoxidação como fator importante na prevenção desta patologia (Nordberger & Arnèr, 2001). Inúmeras patologias como a diabetes, hiperlipidemia, apoplexia, doenças hepáticas, cardiovasculares, neurodegenerativas entre outras mostram níveis aumentados de lipoperoxidação (vide tabela 02) (Halliwell & Gutteridge, 1999; Polla et al., 2003).

1.6.3 PROTEÍNAS

As EROs podem reagir *in vitro* com muitos resíduos de aminoácidos, processo conhecido como carbonilação de proteínas (proteína carbonilada), gerando modificações na atividade enzimática, desnaturação, ou destruição da função das proteínas. Este dano oxidativo às proteínas tem grande importância *in vivo*, já que pode causar perda de receptores, interferência na via de transdução de sinal, alteração no transporte de proteínas e enzimas que mantêm os níveis baixos de Ca^{+2} (intracelular) (Gaté et al., 1999; Nordberger & Arnèr, 2001; Dröge, 2002). Modificações de enzimas e proteínas podem ter papel importante na etiologia de doenças. A carbonilação de actina em células intestinais humanas pode modificar toda a interação com o citoesqueleto (Milzani, 2000). Danos podem ocorrer com interações com outras biomoléculas e estas proteínas oxidadas podem ser reconhecidas como estranhas ao sistema imune e levar à formação de anticorpo ou até de autoimunidade, por exemplo, na artrite reumatóide e escleroderma (Peng, 1997; Dolle-Donne, 2003). A oxidação de proteínas pode ainda estar relacionada com aterosclerose, isquemia-reperfusão e associada com o envelhecimento (Gaté et al., 1999).

Tabela 02. Exemplo de condições clínicas nas quais as EROs estão envolvidas. Adaptado de Halliwell & Gutteridge, 1999; Polla et al., 2003.

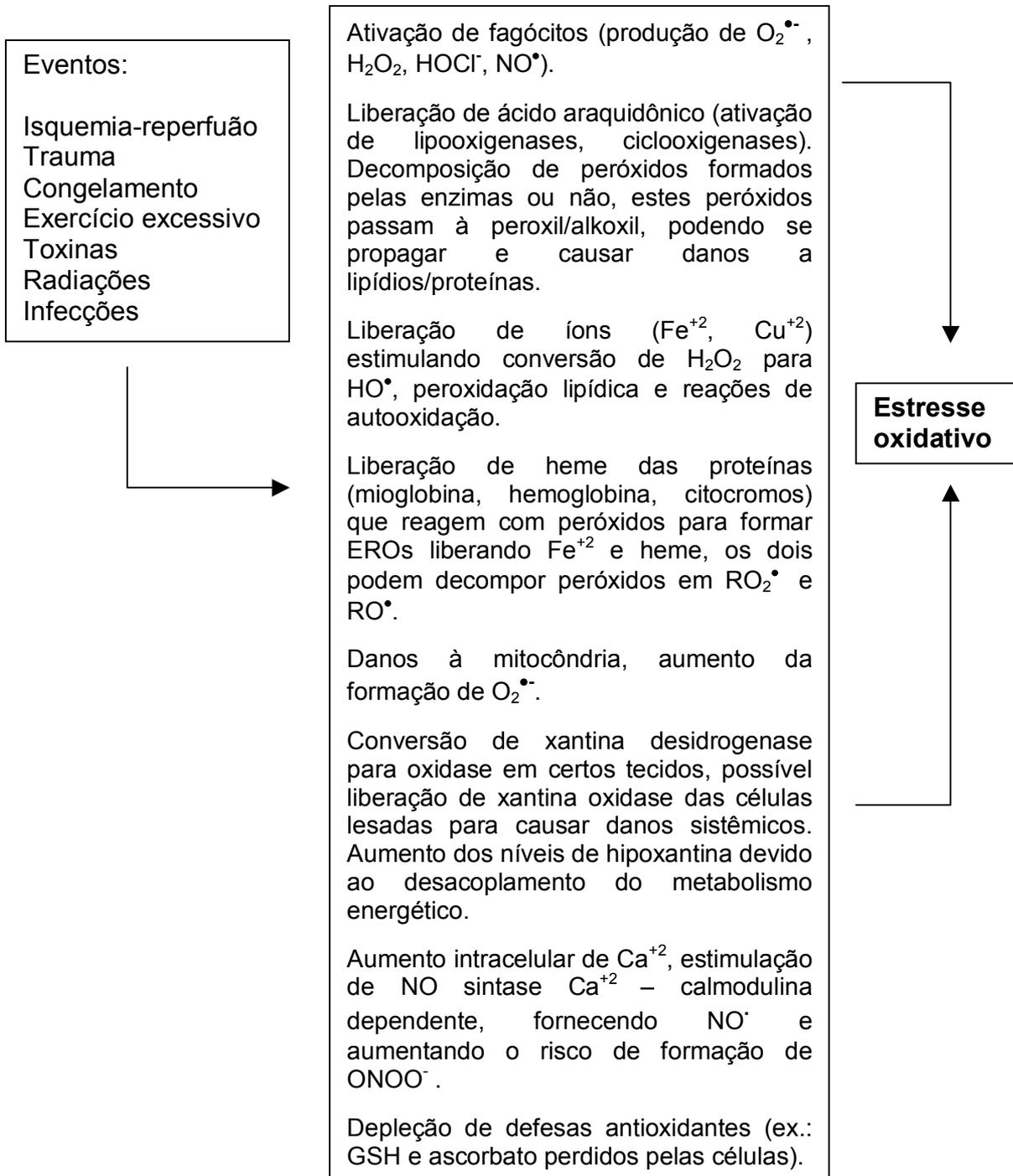
Categoria:	Exemplos:
Processos inflamatórios Doenças auto-imunes	Glomerulonefrite, vasculite, doenças autoimunes, artrite reumatóide, hepatite, doença de Crohn.
Estados de isquemia-reperfusão	Choque, infarto do miocárdio, arritmias, angina, transplantes.
Reações induzidas por drogas e toxinas	
Excesso de ferro	Hemocromatose idiopática, dieta com sobrecarga de ferro, talassemia, deficiências nutricionais (kwashiorkor), alcoolismo, quimioterapia/radioterapia.
Exposição à radiação	Exposição acidental, conseqüências da explosão nuclear, câncer, radioterapia.
Envelhecimento	Desordens prematuras do envelhecimento, doenças relacionadas com a idade, exemplo: câncer.
Trato respiratório	Tabagismo, enfisema, hiperóxia, asbesto carcinogênico, displasia broncopulmonar, asma, fibrose cística, toxicidade ao paraquat, à bleomicina.
Coração e sistema cardiovascular	Cardiomiopatia alcoólica, doença de Keshan (deficiência de selênio), aterosclerose.
Rim	Síndrome nefrótica autoimune, nefrotoxicidade a aminoglicosídeo, a metais pesados, rejeição a transplantes.
Sistema nervoso/ neuromusculares	Desordens Deficiência de vitamina E, doença de Alzheimer, Parkinson, exposição a neurotoxinas, epilepsia, doença de Huntington, encefalomielite alérgica, distrofia muscular, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica.
Olhos	Catarata, hemorragia ocular, dano da retina degenerativo/degeneração macular.
Pele	Radiação ultra-violeta, porfiria, escleroderma, fotoenvelhecimento, dermatite de contato, câncer de pele.
Trato gastrointestinal	Dano hepático causado por endotoxinas, hidrocarbonetos halogênicos, exposição a agentes diabetogênicos, pancreatite.

1.7 MECANISMOS PATOLÓGICOS E ESTRESSE OXIDATIVO

Os mecanismos relacionados com lesão tecidual que podem caracterizar o dano oxidativo estão listados na tabela 03. Em certas situações, EROs e ERNs contribuem significativamente para uma determinada patologia. Na maioria das patologias o estresse oxidativo é uma consequência e não uma causa do processo. Embora nestes casos o estresse oxidativo tenha um papel secundário, a importância das EROs e ERNs é de suma relevância, como na resposta inflamatória por infecção, trauma, toxinas e outros, que geralmente liberam “mediadores”, tais como prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas e citocinas, como os TNFs (fatores de necrose tumoral). Estes “mediadores” podem ativar reações que liberam EROs ou o oposto, as EROs podem estimular a produção dos mediadores inflamatórios (Halliwell & Gutteridge, 1999; Dröge, 2002). A afinidade de certos fatores transcricionais pelo seus cognatos ligantes no DNA pode ser diretamente modificada por EROs, particularmente NF-kB (fator nuclear kB) e proteína ativadora-1 (AP-1). As EROs regulam muitas classes de genes, incluindo moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, enzimas antioxidantes e substâncias vasoativas. Um exemplo é a resposta adaptativa da indução de superóxido dismutase e catalase pelo H_2O_2 (Griendling & FitzGerald, 2003).

O estresse oxidativo está relacionado como um importante fator no desenvolvimento de doenças auto-imunes (Ahsan et al., 2003). No lupus eritomatoso sistêmico e na artrite reumatóide o estado de estresse oxidativo pode desencadear atividade inflamatória e então induzir a exacerbação da doença. O estresse oxidativo favorece uma seqüência de eventos pró-aterogênicos como a produção de citocinas inflamatórias, ativação de macrófagos, proliferação celular, ativação endotelial e formação de LDL oxidada e indução de iNOS (NO sintase induzida), além de osteoporose. A excessiva produção de EROs na artrite reumatóide e lupus tem, portanto, um papel principal na patogênese de complicações como aterosclerose e osteoporose (Sukkar & Rossi, 2004).

Quadro 03. Os mecanismos patológicos e agressivos que podem levar ao estresse oxidativo, fonte: Halliwell & Gutteridge, 1999.



Outro exemplo de doença auto-imune é a Doença de Graves, onde o estresse oxidativo aparece como uma relação do estado metabólico da tireóide, e não somente pela ação do fator autoimune (Bednarek et al., 2004).

Na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, uma doença em que o NADPH está baixo em células maduras, é possível que a hemólise seja derivada da inibição da catalase com uma relação de atividade diminuída de GR/GPx (Nordberger & Arnèr, 2001).

Outro exemplo é a malária, onde o *Plasmodium* é muito vulnerável à geração de EROs durante parte de seu ciclo de vida. Evidências mostram que fármacos antimaláricos conhecidos, como a primaquina, induz formação de EROs (Clark et al., 1989; Turrens, 2004). Pode-se ainda citar a participação de EROs em patologias como a doença hemolítica induzida por fármacos, a catarata, degeneração macular e o enfisema.

Algumas doenças são causadas diretamente pelo estresse oxidativo, como por exemplo, a radiação ionizante que gera HO[•], ou os sintomas produzidos pela dieta crônica deficiente de selênio (Doença de Keshan), ou a deficiência de absorção dos tocoferóis (desordens neurológicas vistas em pacientes com defeito na absorção de gordura no intestino). Na Doença de Keshan atribui-se a cardiomiopatia correspondente à falta da atividade de GPx (Halliwell & Gutteridge, 1999). Na esclerose lateral amiotrófica familiar a causa reside na mutação de genes reguladores da SOD citosólica (Cu,Zn-SOD), aumentando a atividade peroxidásica da enzima (Nordberger & Arnèr, 2001). Um aumento na produção de superóxido (O₂^{•-}) tem sido observado em pacientes portadores de diabetes tipo I. Produtos da peroxidação lipídica estão aumentadas no cérebro de ratos com diabetes tipo II, enquanto que as atividades de enzimas antioxidantes como CAT e SOD estão diminuídas (Reagan et al., 2001).

Um dos principais desafios nos dias atuais nesta área em particular consiste em desenvolver terapias antioxidantes eficientes, demonstrando seus benefícios para os pacientes e provando que estes mecanismos antioxidantes estão envolvidos no processo terapêutico (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Resumidamente, o estresse oxidativo pode resultar, em três processos (figura 03): adaptação e ajuste das defesas antioxidantes, lesão tecidual (dano ao DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas), ou morte celular (através de necrose ou apoptose). No primeiro caso da adaptação, o sistema de defesa gera diferentes respostas como proteção completa e adequada contra o dano. No segundo caso, de proteção incompleta

contra a lesão ou “sub-proteção”, as células são relativamente resistentes ao alto nível de geração de oxidantes. Como consequência, quando a agressão é prolongada e constituindo o terceiro caso a morte celular pode ocorrer por dois mecanismos, necrose ou apoptose, ambos processos envolvidos com o estresse oxidativo. Na necrose a célula entumece e rompe, liberando seus conteúdos, o que afeta as células adjacentes, já que estes conteúdos podem conter oxidantes (cobre ou ferro livre, por exemplo), e isto pode impor agressão nas células vizinhas e amplificar a lesão tecidual. Já na apoptose ou “suicídio celular”, a própria célula se ativa para morte sem liberar seus conteúdos para as células vizinhas, o que diminui o dano adjacente, sendo a mitocôndria o principal sítio desencadeador do processo apoptótico (Boveris & Cadenas, 1997; Orrenius, 2004). Nas doenças neurodegenerativas o processo de apoptose encontra-se acelerado (Halliwell & Gutteridge, 1999; Halliwell, 2000).

1.8 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA DE CHAGAS

Os artigos científicos que ligam a formação de EROs à doença de Chagas estão de uma maneira geral vinculados a duas estratégias: a) o processo no qual o hospedeiro gera EROs, principalmente NO^* , como agente microbicida que mata o parasita (Vepa et al., 1994; Chandrasekar et al., 2000; Saefel et al., 2001); b) outra estratégia é estudar as diferenças entre as defesas antioxidantes dos mamíferos e do *Trypanosoma*, diferenças estas que são bastante sensíveis. A limitação do sistema bioquímico das defesas antioxidantes do parasita fornece um valioso alvo para o desenvolvimento de um quimioterápico eficiente (Turrens, 2004).

O possível mecanismo de ação dos fármacos antichagásicos NFX e BNZ é via geração de EROs capaz de matar o tripanosoma (Docampo & Stoppani, 1979; Moncada et al., 1989; Maya et al., 1997; Brener, 2000). Também foram desenvolvidos trabalhos relacionando aos efeitos tóxicos de EROs pelo benzonidazol que induz o sistema CYP4501A1 e leva o hospedeiro (modelo animal, ratos) a um estado de estresse oxidativo (De Bem, 2001; Pedrosa et al., 2001).

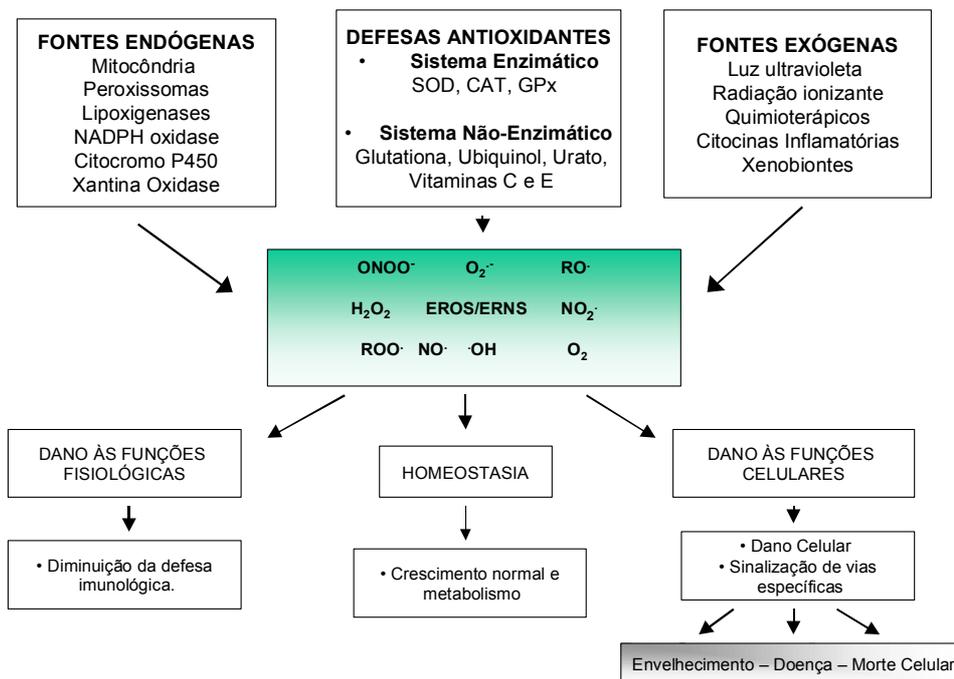


Figura 03. As principais fontes e as respostas celulares das EROs e ERNs. Os oxidantes podem ser formados pela mitocôndria e peroxissomos resultado de um metabolismo intracelular normal. Outros fatores exógenos ao organismo podem gerar EROs como a radiação ultravioleta. As defesas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutaciona peroxidase (GPx) atenuam diretamente nos níveis de EROs para manter a homeostasia. Por outro lado, com a perda da homeostasia, ocorre o dano às funções fisiológicas como a morte celular, a diminuição das defesas imunológicas, o estado de doença e o processo de envelhecimento. Fonte: Finkel & Holbrook, 2000.

Artigos abordando o estresse oxidativo no hospedeiro, fonte de um processo inflamatório, são portanto escassos na literatura pertinente, Cardoni e colaboradores (1990) encontraram um estado de estresse oxidativo em ratos infectados com *T. cruzi*, porém apenas trataram da infecção na fase aguda. Um dos dois únicos trabalhos disponíveis na literatura que relaciona a fase crônica à dosagem das defesas antioxidantes em humanos (Péres-Fuentes et al., 2003) relata uma associação entre o aumento de NO e TNF- ∞ em relação à diminuição das atividades de GPx e SOD plasmáticas com o avanço da patologia, sugerindo que a queda do poder antioxidante poderia também ser responsável pela severidade da doença de Chagas. Por outro lado, na outra referêncica disponível (Rivera et al., 2002) tentaram-se inutilmente associar em

pacientes chagásicos cardiopatas a deficiência de selênio à diminuição da atividade da GPx.

Como decorrência destas premissas acima citadas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar como a evolução da cardiopatia chagásica interfere nas defesas antioxidantes do sangue de pacientes humanos acompanhados clinicamente no Hospital Universitário Clementino Fraga da UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro), levando em consideração sua importância para o entendimento da suscetibilidade do hospedeiro ao estresse oxidativo vinculado ao desenvolvimento da severidade da patologia crônica.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar as defesas antioxidantes e o estresse oxidativo vinculados à cardiopatia chagásica crônica.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS:

1. Verificar as diferenças nos níveis intraeritrocitários das defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) e não enzimáticas (glutathione reduzida, total e glutathione oxidada) nos diferentes estágios evolutivos da cardiopatia chagásica crônica através da classificação de Los Andes modificada.
2. Verificar as diferenças nos níveis intraeritrocitários enzimáticos da glutathione S-transferase (Sistema de Fase II) nos estágios evolutivos da cardiopatia chagásica crônica através da classificação de Los Andes modificada.
3. Tentar correlacionar a progressão da cardiopatia chagásica crônica com o *status* antioxidante sanguíneo dos pacientes.
4. Avaliar o processo inflamatório e as defesas antioxidantes em pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia orovalvar com sobrecarga de pressão e volume, para efeito comparativo com a cardiopatia chagásica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1-SELEÇÃO DOS PACIENTES

Os pacientes considerados no presente estudo mantiveram-se estáveis clinicamente durante 15 a 21 dias anteriores à sua inclusão. Os pacientes estão vinculados ao Ambulatório de Cardiopatia Chagásica do Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ). O referido ambulatório foi criado em 1990 e atende cerca de 250 pacientes com sorologia positiva para doença de Chagas, encaminhados pelo ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias e pelo serviço de clínica médica do HUCFF-UFRJ. O banco de sangue, o serviço de proctologia e o serviço de gastroenterologia também enviam seus pacientes a este ambulatório.

Durante este período de 21 dias, exames laboratoriais foram realizados para satisfazer os critérios biológicos de exclusão e confirmar os critérios de inclusão (biológicos e clínicos). Radiografias de tórax foram realizadas para excluir doenças pulmonares significativas e para medir o índice cardiorácico. Da mesma forma, hemogramas completos foram também realizados para excluir doenças sistêmicas significativas. Após enquadramento quanto aos critérios de inclusão/exclusão, os pacientes eram informados sobre o estudo e o consentimento livre esclarecido era obtido.

3.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A-Homens ou mulheres com idade entre 21 a 75 anos afastados da zona endêmica há mais de 20 anos.

B-Sorologia positiva para doença de Chagas, conforme descrito no item a seguir sob a denominação avaliação sorológica.

C-Pacientes considerados portadores de cardiopatia chagásica crônica de acordo com os critérios da UDNP/WORLD BANK/WHO-TRD (ver definições, abaixo), que não se utilizaram de tratamento específico para doença de Chagas.

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

3.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

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

- presença de outras afecções patológicas sistêmicas associadas, tais como infecções ou neoplasias, desordens auto-imunes, doenças neurodegenerativas;
- o fato de algum exame da fase de seleção demonstrar qualquer achado não compatível com seu diagnóstico cardiovascular;
- insuficiência cardíaca aguda ou descompensada agudamente;
- pacientes agudamente doentes;
- doenças hematológicas prévias;
- dados clínicos ou biológicos sugestivos de doença renal grave ou hepática;
- história prévia de doença pulmonar obstrutiva crônica (todas as formas);
- alcoolismo crônico;
- mulheres em fase fértil;
- pacientes que estejam participando de outros estudos;
- utilização prévia do tratamento específico para doença de Chagas.

B- Critérios de exclusão cardiovascular

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

C- Critérios biológicos de exclusão

- níveis de creatinina sangüinea > 2 mg/100ml;
- potássio sérico > 5.5 mEq/L ou < 3.5 mEq/L;
- anemia (hemoglobina < 9 g%);
- disglicemias (níveis alterados de glicemia) em dois exames consecutivos.

3.1.3 DADOS A SEREM OBTIDOS:

A- Anamnese e exame físico completos:

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

B- Base de dados padronizada de exames complementares:

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

3.1.4 DEFINIÇÕES

De acordo com os critérios da UDNP/WORLD BANK/WHO-TRD (1983, 1986) considerou-se a presença de cardiopatia chagásica crônica com base em:

A- Avaliação sorológica:

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

Os pacientes incluídos no presente estudo tiveram seu sangue coletado por uma mesma pessoa, no mesmo dia da semana e no horário de 9 às 11h, com o objetivo de respeitar o ciclo circadiano, e padronizar os procedimentos na coleta.

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

B- Eletrocardiograma:

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

3.1.5 ESTÁGIOS EVOLUTIVOS NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

Os quase mil trabalhos que podem ser encontrados na literatura que estudaram pacientes chagásicos utilizaram critérios de avaliação de modo arbitrário. A falta de um referencial comum dificulta a interpretação global dos resultados. Neste trabalho, utilizou-se a classificação de Los Andes (Carrasco et al., 1982; Carrasco, 1983; Carrasco et al., 1987), modificada por Xavier (1999), definindo o acometimento cardíaco na doença de Chagas como sendo constituído de quatro estágios, a saber:

- a) Grupo I: infecção com ECG normal ou borderline, função ventricular normal ou apenas discretamente deprimida;
- b) Grupo II: infecção com ECG anormal e disfunção sistólica ventricular esquerda moderada;
- c) Grupo III: infecção com ECG anormal e disfunção sistólica ventricular esquerda grave;
- d) Grupo IV: infecção com ECG anormal e disfunção sistólica ventricular esquerda grave e insuficiência cardíaca congestiva compensada.

3.1.6 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

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 colaboradores (1976). Os pacientes com eletrocardiograma normal e os com evidências clínicas de insuficiência cardíaca foram classificados nos grupos de I a IV respectivamente, sem necessidade de realização de estudo ecocardiográfico. Os pacientes restantes (com eletrocardiograma alterado e sem manifestação clínica de insuficiência cardíaca), foram classificados de acordo com a sua função ventricular, avaliada a ecocardiografia (ver figura 04) (Xavier, 1999).

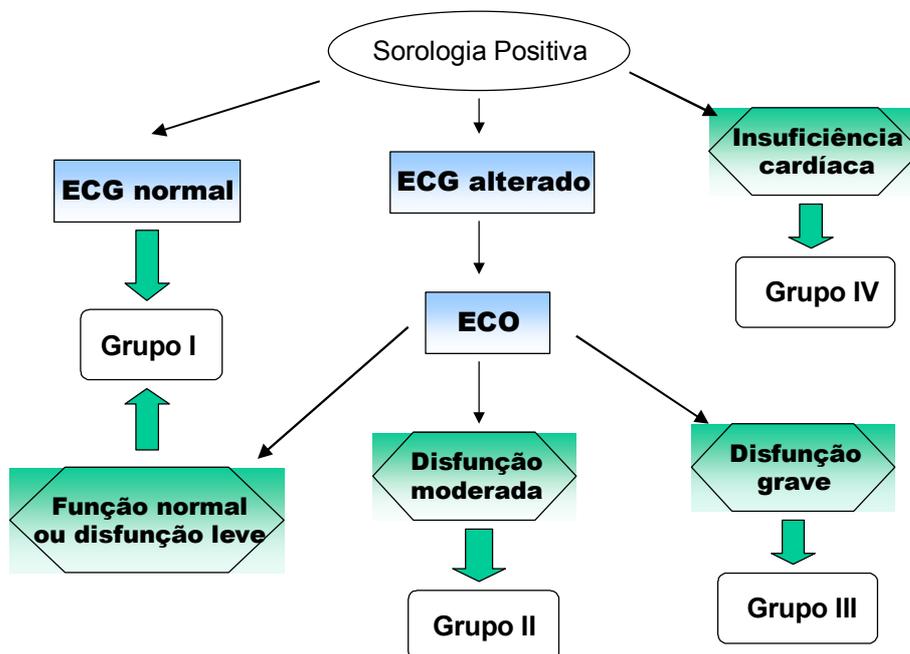


Figura 04 - Diagrama da Classificação de Los Andes modificada por Xavier, 1999.

3.1.7 DIAGNÓSTICO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA

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

Parâmetros utilizados:

Dispneia / dificuldade de respirar

- | | |
|--|----------|
| a) Caminhando depressa no plano ou em aclive leve | 1 |
| b) Em passo usual no plano | 1 |
| c) Obrigada a parar por falta de ar, caminhando no plano, passo normal | 2 |
| d) Obrigada a parar por falta de ar, ao caminhar 100m no plano | 2 |

e) Frequência cardíaca 91 a 110 bpm	1
mais de 111 bpm	2
f) Estertores nas bases pulmonares	1
g) Estertores nas bases e ápices pulmonares	2
h) Pressão venosa jugular aumentada isolada	1
i) Pressão venosa jugular aumentada associada a edema	2
j) Pressão venosa jugular aumentada associada à hepatomegalia	2
k) Distensão dos vasos dos lobos superiores no Rx de tórax	1
l) Edema intersticial pulmonar	2
m) Edema intersticial pulmonar + derrame pleural	2

3.1.8 EXAME CLÍNICO

A realização do exame clínico permitiu a verificação de sinais e sintomas cardiovasculares e digestivos relacionados à doença de Chagas, assim como a interpretação da história patológica de cada indivíduo para um diagnóstico diferencial com outras doenças cardiovasculares. Os sintomas relacionados ao aparelho cardiovascular, como dispnéia, lipotímia, palpitações, síncope, dor precordial, e aqueles relacionados ao aparelho digestivo referentes à doença de Chagas, como constipação, disfagia e regurgitação, foram registrados em um questionário padrão (ver anexo no final).

3.1.9 SELEÇÃO DOS PACIENTES APÓS A REALIZAÇÃO DOS EXAMES COMPLEMENTARES

Após a confirmação do diagnóstico de cardiopatia chagásica sem qualquer outra cardiopatia associada, os pacientes realizaram o ecocardiograma, com finalidade de estabelecer o estágio evolutivo da cardiopatia chagásica crônica (ver acima descrição dos estágios evolutivos, classificação de Los Andes modificada). Os pacientes chagásicos foram classificados em quatro grupos distintos, cada um composto de 10 pacientes perfazendo um total de 40 pacientes, conforme o grau de comprometimento cardíaco, através da classificação de Los Andes modificada (Xavier, 1999). Cada grupo de 10 pacientes chagásicos (grupos I, II, III e IV) teve 10 indivíduos normais igualados para idade e sexo na relação 1:1. Além destes, os 10 pacientes chagásicos do grupo IV segundo classificação de Los Andes modificada foram igualados com um grupo de 10 de cardiopatas não chagásicos (grupo V), com o mesmo grau de comprometimento cardíaco e mesma classe funcional (III e/ou IV da NYHA), e que tiveram sorologia negativa para doença de Chagas. Todos os pacientes em uso de medicamentos tiveram os mesmos suspensos 48 horas precedendo os exames. Aqueles pacientes que não suportaram esta suspensão (maioria do grupo IV chagásico e do grupo V) foram mantidos com inibidores da enzima de conversão da angiotensina (captopril) e diurético (furosemida ou espironolactona). O captopril interfere no sistema antioxidante (De Cavanagh et al., 1999,

2000, 2004) e tem uma meia vida de 2 h, a furosemida tem meia vida de 1 h. Mais de 95% do captopril é excretado no período de 24 horas e a ação diurética da furosemida dura entre 6 à 8 horas (Korokolvas, 2000). Não houve nenhuma complicação atribuída a esta estratégia.

O grupo V possui a mesma característica clínica do grupo IV, porém de etiologia diferente. Nos pacientes do grupo IV verificou-se insuficiência cardíaca de origem chagásica, enquanto que o grupo V a insuficiência cardíaca de origem orovalvar era provavelmente provocado por febre reumática, que produz fisiologicamente à sobrecarga de pressão e/ou volume. No momento da coleta de sangue, os pacientes do grupo V estavam sob medicação e insuficiência cardíaca compensada, porém sob medicação diferente ao grupo IV, utilizou-se no grupo V captopril e espironolactona como intervenção medicamentosa.

3.2- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo nos diferentes grupos foram realizadas usando ANOVA (análise de variância), complementada pelo teste de Tukey–Kramer. O teste t de Student foi usado para comparação dos grupos chagásicos e respectivos controles. Para determinações não paramétricas, usou-se o teste de Mann-Whitney. O software GraphPad Prism versão 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), foi empregado. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

A fim de avaliar os resultados obtidos em todas as análises, adotou-se as seguintes convenções de notação: as letras (a) e (b) representam diferença estatística significativas para o ANOVA realizado apenas entre os 4 grupos chagásicos. O asterisco (*) representam diferença estatística entre o controle e seu grupo chagásico respectivo e, também entre o grupo V (insuficiência cardíaca de origem não chagásica), e grupo IV (insuficiência cardíaca de origem chagásica).

3.3- CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização deste ensaio clínico, o presente protocolo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em 11 de fevereiro de 2004, protocolo N°.168/03-CEP. 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 consoante com os padrões de aceitação internacional para ensaios clínicos (normas de “Good Clinical Practice”) (ver Anexo).

3.4-PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Imediatamente após a coleta de amostra sangüínea de cada indivíduo (via venosa, em tubo com EDTA), alíquotas de sangue foram precipitadas em ácido tricloroacético 12% (1:5, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH e GT. A separação dos eritrócitos e plasma que foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo/defesas antioxidantes, foi realizada através de centrifugação (5000g durante 3 min) do sangue total, para obtenção da fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido até sua posterior análise. Esta etapa de preparação das amostras foi realizada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela equipe do Dr. Roberto Coury Pedrosa. Posteriormente, este material foi enviado para o laboratório de Ecofisiologia Respiratória, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), acondicionado em botijão de transporte contendo nitrogênio líquido, o que confere integridade às amostras, já que estudos mostram que tióis não protéicos e enzimas antioxidantes permaneceram estáveis em nitrogênio líquido por 6 meses (Palace et al., 1990).

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

3.5-EQUIPAMENTOS:

As pesagens foram realizadas em balança analítica marca Ohaus modelo AR2140. Os valores de pHs foram medidos com pH-metro marca Digimed, modelo DM20. A avaliação dos marcadores de estresse oxidativo foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível duplo feixe marca/modelo GBC 916 acoplado a um software apropriado e a um termostatizador elétrico (sistema Peltier).

3.6-REAGENTES:

A enzima GR, os reagentes 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), terc-butil hidroperóxido, 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato na forma reduzida (NADPH), GSH, GSSG e epinefrina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). O kit para PCR foi adquirido junto à Omega da Diagnostics-Avitex® (Scotland,UK). Todos os outros reagentes usados são de grau analítico.

3.7-ATIVIDADE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES E DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

3.7.1 DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

3.7.1.1 CATALASE (CAT)

A atividade da enzima catalase foi analisada segundo Aebi (1984), que se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparado no dia da análise, portanto 2 mL deste tampão em cubeta onde se adiciona 20 μ L da amostra, sob a leitura de 240 nm durante 20 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$.

3.7.1.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm, de acordo com o método de Misra & Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. Quando a amostra era colocada a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Numa cubeta contendo 1,95 ml de glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 μ l de adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação). A velocidade de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100s do início da reação (com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15s em torno de 0,013-0,015 unidades), para então adicionar a alíquota da amostra (geralmente em torno de 10 a 70 μ l, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota). O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (U SOD ml^{-1}) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é

definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo (Misra & Fridovich, 1972).

3.7.1.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GP_x)

A enzima glutationa peroxidase catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação, produzindo GSSG (Jones et al., 1981; Epp et al., 1983). Para a determinação desta enzima foi utilizado o método de Flohé & Gunzler (1984) usando 10 µl de amostra e 10 µl de ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 ml de um meio de reação. Este meio de reação é composto de 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 0,005 M pH 7,0, 15 ml de água destilada, 0,024 g de GSH, e 5 U de GR, colocada momentos antes do ensaio. O método baseia-se em dismutar o hidroperóxido (tBuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisado pela GP_x. Mas a medida consiste na oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH medido em 340 nm, já que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela enzima GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH catalisada pela enzima GP_x presente na amostra. Os valores foram expressos em µmol min⁻¹ ml⁻¹.

3.7.1.4 GLUTATIONA REDUTASE (GR)

O método utilizado foi o de Calberg & Mannervick (1985), que verifica em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de glutationa reduzida, a partir da GSSG pela glutationa redutase, enzima presente na amostra, em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutationa oxidada e DPTA 5mM. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em µmol min⁻¹ ml⁻¹.

3.7.1.5 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

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

3.7.2 ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

3.7.2.1 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

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

3.7.2.2 GLUTATIONA TOTAL (GT) E GLUTATIONA OXIDADA (GSSG)

Para esta análise utilizou-se o método enzimático de Tietze (1969), onde a taxa de oxidação do NADPH usada na redução da GSSG catalisada pela GR, permitiu avaliar indiretamente a concentração da glutationa total presente na amostra. Os valores da GSSG foram calculados em equivalentes ($2 \text{ GSH} \rightarrow \text{GSSG}$), a partir da concentração da GT. As concentrações obtidas neste ensaio, bem como do ensaio citado acima, foram expressas em $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

3.7.3 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

3.7.3.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) PELO NITRITO/NITRATO

As amostras de plasma foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Nos dias dos experimentos, o plasma foi descongelado em temperatura ambiente e desproteinizado, adicionando-lhe hidróxido de sódio (6 mM) e sulfato de zinco (0,6%). A seguir, 250 μL do plasma foram diluídos em solução contendo formato de amônia (30 μL), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (30 μL) e suspensão de *Escherichia coli* (EC ATCC 25922) (30 μL), diluída (1:10) em tampão PBS-pH 7,4. A solução foi incubada durante 2 h, em banho-maria à 37 °C, e a seguir, centrifugada (5000 g, 5 min). Cerca de 250 μL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, onde o mesmo volume de solução de Griess (fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado, 5% v/v), ácido sulfanílico (1%) e N-naftil-etilenodiamino (0,1%) foi adicionado e incubado durante 10 min, à temperatura ambiente (Saleh et al., 1999). A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que era quantificada através da medida das densidades óticas em leitor de Elisa (Organon-Teknica, Microwell System, Roseland, New Jersey, EUA) em 545nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- (0-150 μM) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no plasma, em μmol , com auxílio da equação da reta.

3.7.3.2 ANÁLISE DA PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR)

As amostras de plasma foram coletadas e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido. Nos dias dos experimentos, o plasma foi descongelado em temperatura ambiente e realizou-se um teste semiquantitativo de aglutinação do látex para proteína-C-reativa, com o kit Omega da Diagnostics-Avitex® (Scotland, UK), usando diluições do plasma. As amostras foram consideradas positivas pela aglutinação e quantificadas começando por 6 mg/L, segundo Singer & Plotz (1956).

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL DA IDADE DOS PACIENTES

Considerando que a idade é um parâmetro importante para avaliar as defesas antioxidantes (Mutlu-Türkglu et al., 2003; Junqueira et al., 2004), avaliou-se a diferença de idade entre os diversos pacientes utilizados no presente trabalho realizando a análise do gráfico de distribuição e, também, análise estatística não paramétrica Mann-Whitney, a qual não demonstrou nenhuma diferença estatística. Os grupos controle foram igualados pela idade e sexo aos grupos chagásicos, portanto, apresentaram o mesmo perfil (figura 05). O grupo I obteve mediana de 61,5 anos com 4M(masculino):6F(feminino), o grupo II obteve mediana de 55,5 anos com 4M:6F, o grupo III obteve mediana de 54 com 3M:7F e o grupo IV obteve mediana de 50 anos com 3M:7F. Pode-se observar que cada grupo possui um indivíduo mais jovem em relação aos demais, com aproximadamente 30 anos, mostrando uma distribuição uniforme dos pacientes em relação à idade.

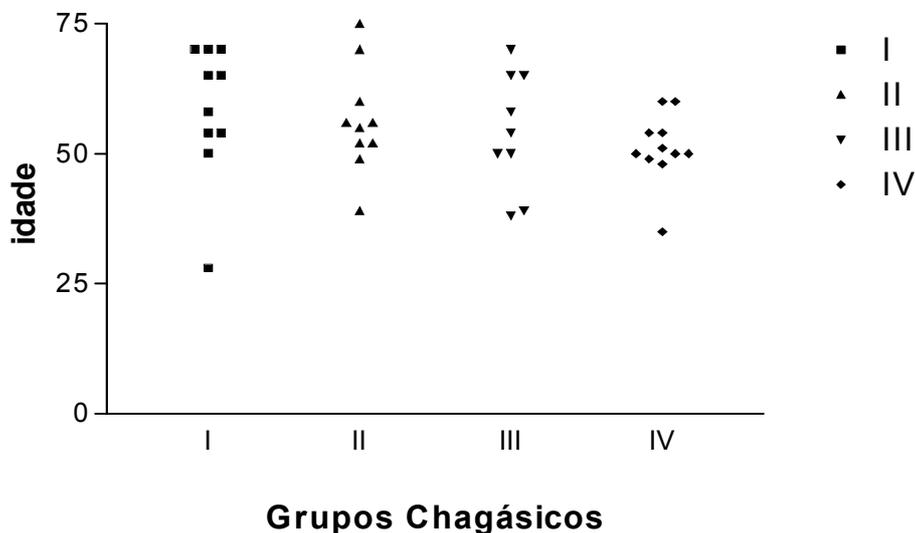


Figura 05 - Perfil da idade de todos os pacientes chagásicos distribuídos nos grupos de comprometimento cardíaco de I a IV.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

4.2.1 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD não apresentou alterações significativas, exceção à diferença estatística entre grupo II (disfunção sistólica ventricular esquerda moderada) e seu controle ($p < 0,05$). Os grupos chagásicos mantiveram o mesmo perfil, e o valor do ANOVA para os grupos chagásico foi de $p = 0,244$.

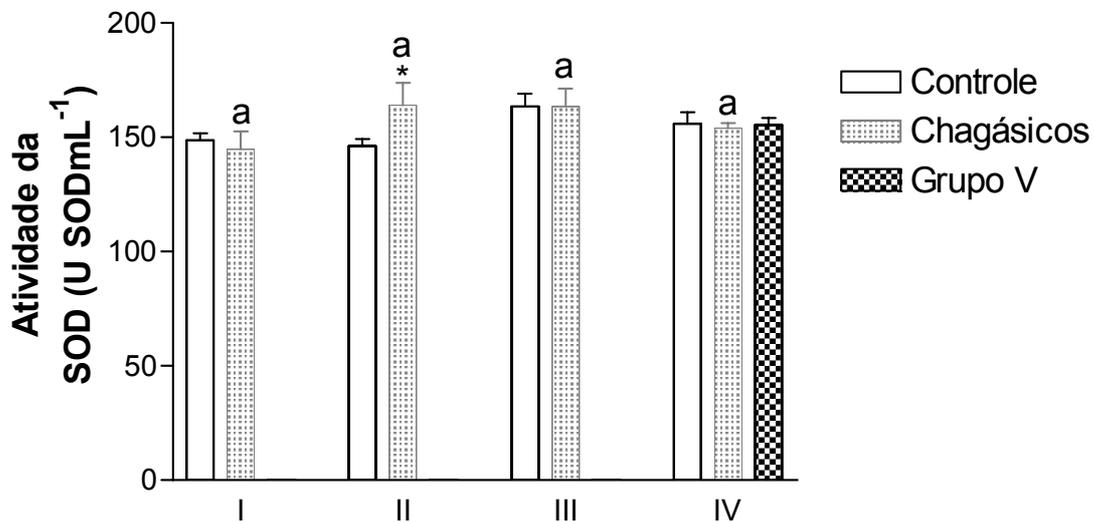


Figura 06 – Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificados segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pela letra (a) que significa semelhança estatística. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$.

4.2.2 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A CAT (Figura 07) mostrou um perfil muito semelhante ao da SOD, e não houve diferença significativa entre os grupos chagásicos, representado pela letra (a) que significa semelhança estatística. No entanto, o grupo I observou atividade da CAT maior que os demais grupos chagásicos e, à medida que o dano do miocárdio aumenta (grupo I para grupo IV), a CAT tendeu a diminuir, o que foi observado pela tendência estatística ($p=0,066$). O grupo I (função ventricular normal ou apenas discretamente deprimida) foi significativamente diferente em relação ao seu controle no teste t de Student ($p=0,033$), representado por um asterisco (*).

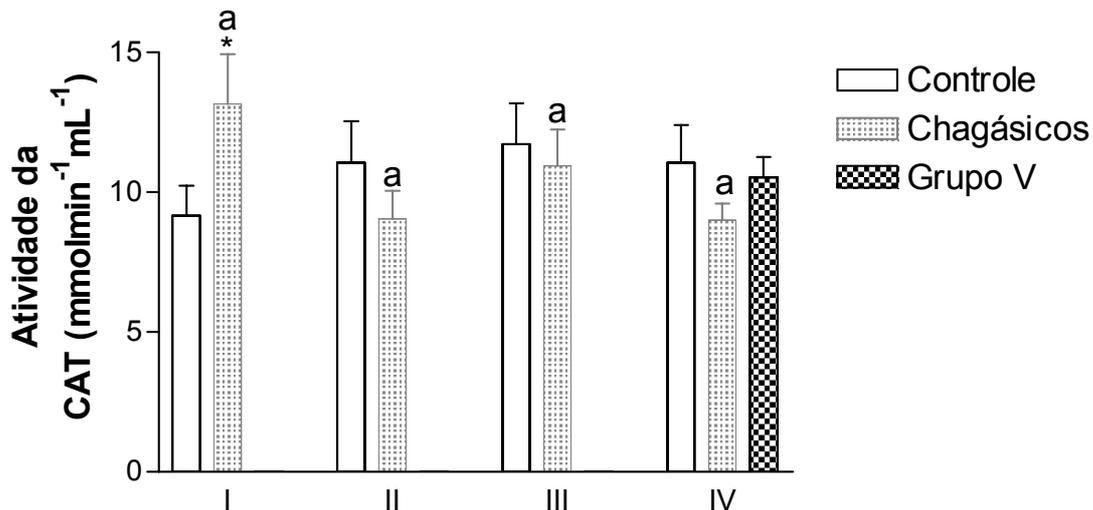


Figura 07 – Atividade da Catalase (CAT) nos eritrócitos de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificados segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pela letra (a) significa semelhança estatística. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

4.2.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A GPx (Figura 08) mostrou um perfil significativamente diferente entre os grupos chagásicos, onde o grupo III (disfunção sistólica ventricular esquerda grave) exibiu indução desta enzima. Este aumento dos níveis em relação aos outros grupos chagásicos está representado pela letra (b), os outros grupos representados pela letra (a). Na comparação do teste t de Student entre controle e chagásico observou-se a inibição da GPx no grupo II e grupo IV em relação aos seus controles. O grupo V (pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica) mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo IV (chagásico com insuficiência cardíaca). Observou-se uma inibição da GPx nos grupos chagásicos em relação aos controles, apenas no grupo III houve um aumento da atividade da enzima, sugerindo um efeito compensatório.

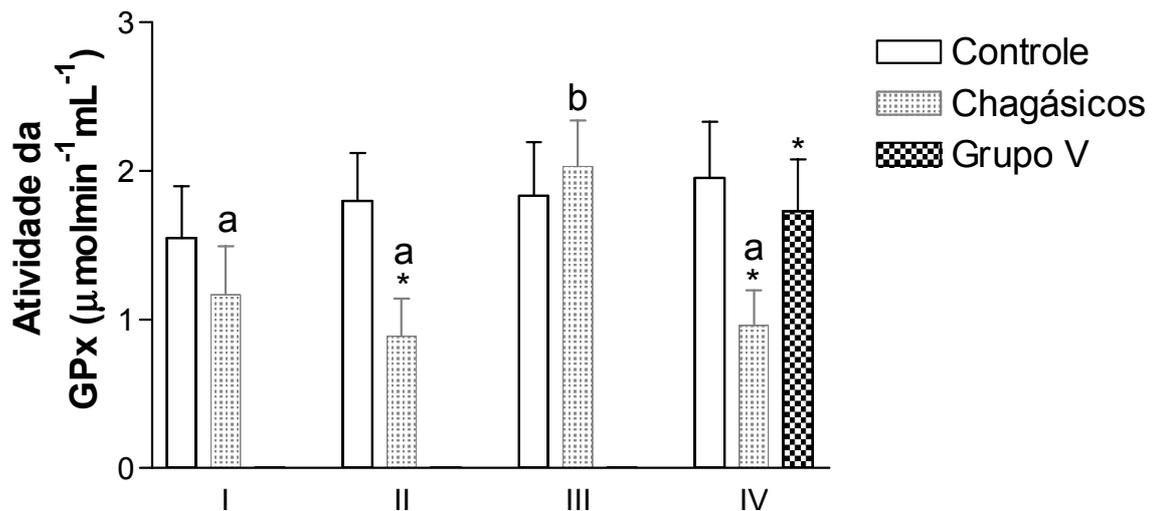


Figura 08 – Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) nos eritrócitos de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificados segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pelas letras (a) e (b) que significam diferença estatística, a diferença foi encontrada entre os grupos II e III onde $p < 0,05$. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$.

4.2.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A GST mostrou os grupos I e III aumentados em relação aos grupos II e IV ($p < 0,01$), representado por letras duplas (aa) e (bb). Os grupos chagásicos I e III, pelo teste t de Student, foram significativamente aumentados em relação aos seus controles, mostrando diferença significativa ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$), respectivamente. No grupo III o valor da atividade da GST foi praticamente o dobro de seu controle. O grupo V (insuficiência cardíaca de origem não chagásica) foi significativamente diferente ao grupo IV (chagásico com insuficiência cardíaca) pelo t de Student ($p = 0,0067$). Observou-se novamente atividade diminuída desta enzima no grupo IV.

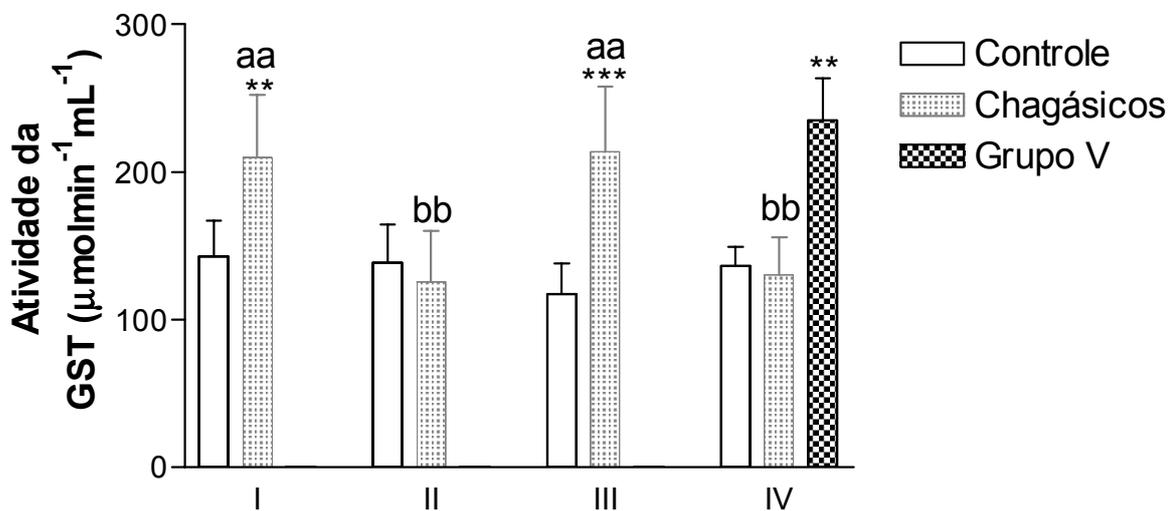


Figura 09 – Atividade da Glutaciona S-Transferase (GST) nos eritrócitos de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificadas segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pelas letras (a, b) que significam diferença estatística, (aa e bb), $p < 0,01$ entre os grupos I, III contra os grupos II, IV. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2.5 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

Na atividade da GR não ocorreram alterações significativas. Os grupos chagásicos mantiveram o mesmo perfil, o valor do ANOVA para os grupos chagásicos foi de $p=0,244$. Houve uma tendência estatística entre o grupo IV (insuficiência cardíaca chagásica) e seu controle ($p=0,077$), sugerindo a necessidade de mais GR para auxiliar o sistema de reciclo da GSH consumida neste grupo (ver figura 11 da GSH); houve também uma tendência do grupo V (insuficiência cardíaca de origem não chagásica) de ser diferente do grupo IV ($p=0,088$).

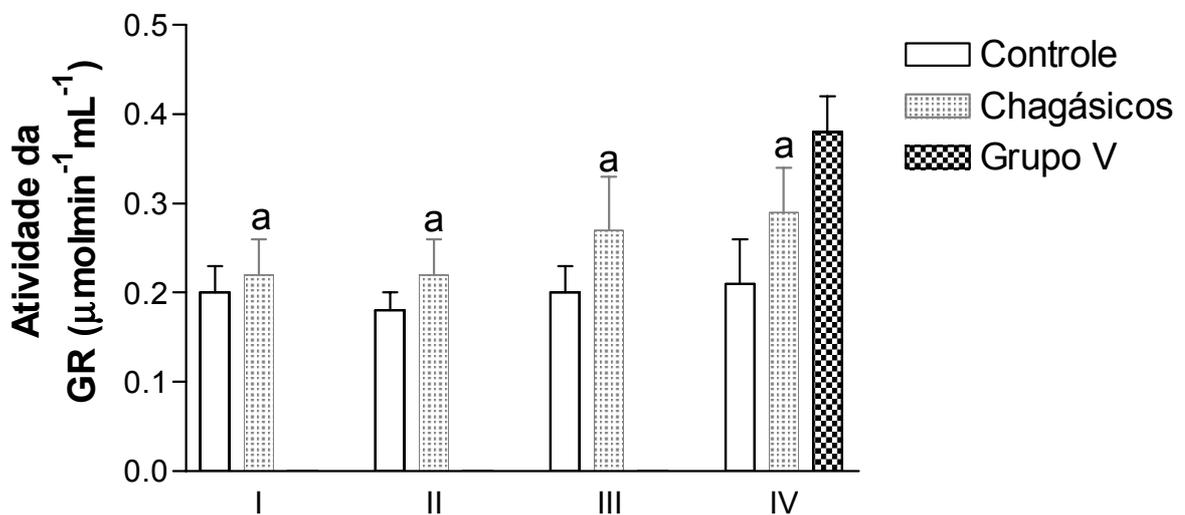


Figura 10 – Atividade da Glutaciona redutase (GR) nos eritrócitos de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificados segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pela letra (a) que significa semelhança estatística. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p<0,05$.

4.3 DETERMINAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICAS

4.3.1 CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), DA GLUTATIONA OXIDADA (GSSG) E DA GLUTATIONA TOTAL (GT)

Na figura 11 estão representados os resultados da GSH. À medida que progride a cardiopatia chagásica, ocorreu uma diminuição da quantidade de GSH intraeritrocitária, significativamente diferente, representada no grupo IV pela letra b. O teste ANOVA entre os grupos chagásicos foi significativamente diferente ($p = 0,016$). Em relação aos seus controles, ficou nítido o aumento da GSH, nos grupos I ($p < 0,001$), grupo II ($p < 0,01$) e grupo III ($p < 0,05$), indicando uma compensação da GSH devido à agressão oxidativa, porém no grupo IV já não ocorreu uma compensação adequada. O grupo V que representa os pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica, foi significativamente maior ($p < 0,05$), provavelmente para compensar o insulto oxidativo, de forma semelhante aos grupos chagásicos nos três primeiros estágios (grupo I, III, III).

A figura 12 mostra que a GSSG manteve-se em níveis semelhantes nos grupos chagásicos, o valor do ANOVA foi de $p = 0,554$. Porém, o nível de oxidação foi maior no grupo I em relação ao seu controle ($p < 0,05$). O grupo IV (insuficiência cardíaca chagásica) foi diferente significativamente do grupo V (insuficiência cardíaca não chagásica) ($p < 0,01$), com níveis de GSSG aumentados.

A GT manteve níveis semelhantes entre os grupos chagásicos (figura 13), o ANOVA foi de $p = 0,3404$. Como também encontrado na GSH, nos primeiros grupos (grupo I e II) houve um aumento significativo em relação aos controles, ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Isto sugere uma necessidade do sistema antioxidante de manter o tripeptídeo aumentado no começo da agressão. O grupo V (insuficiência cardíaca não chagásica) em relação ao grupo IV (insuficiência cardíaca chagásica) a GT mostrou o mesmo perfil da GSSG, com conteúdos aumentados ($p < 0,01$).

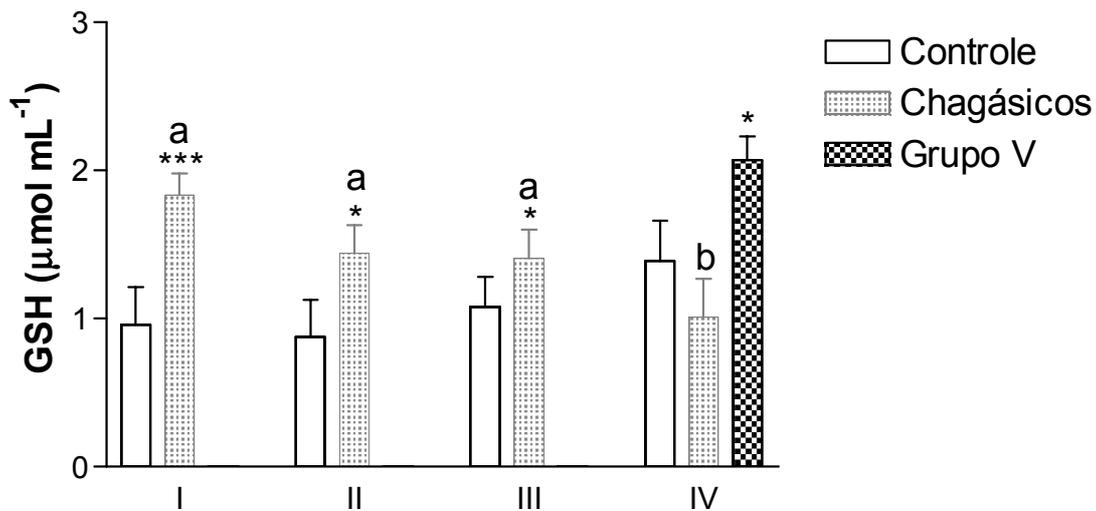


Figura 11 – Concentração da Glutaciona reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificados segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pelas letras (a) e (b) que significam diferença estatística, onde o grupo I é diferente do grupo IV, $p < 0,05$. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$.

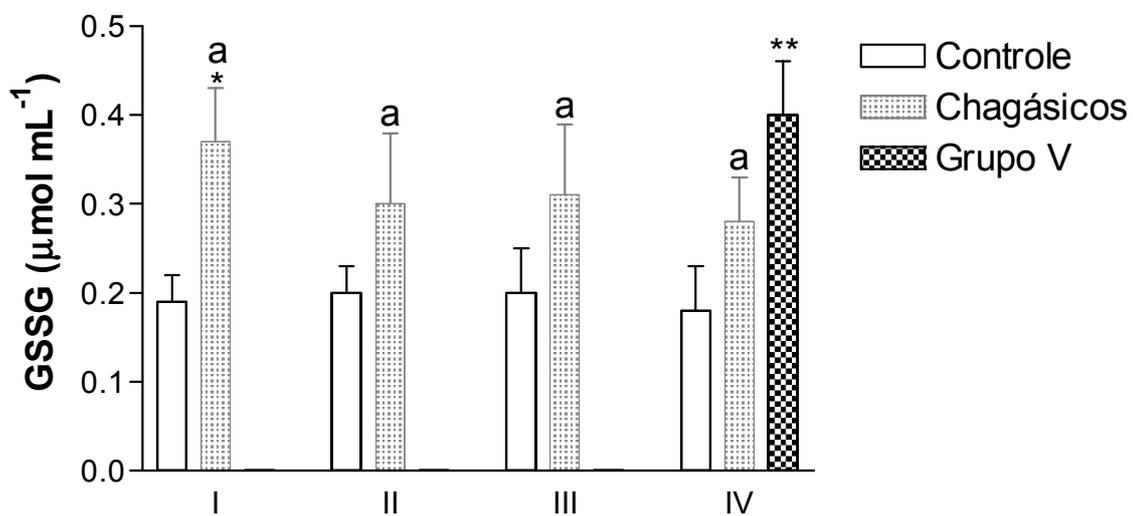


Figura 12 – Concentração da Glutaciona oxidada (GSSG) no extrato ácido do sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificados segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pela letra (a) que significa semelhança estatística. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

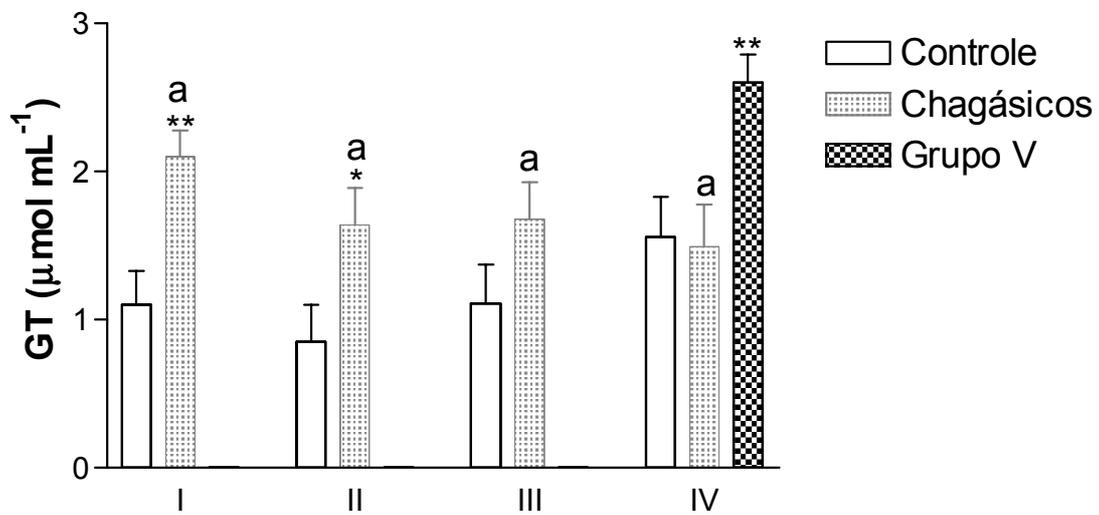


Figura 13 – Concentração da Glutathiona total (GT) no extrato ácido do sangue de pacientes chagásicos crônicos em quatro estágios de evolução do comprometimento cardíaco classificados segundo Los Andes modificada, mais respectivos indivíduos normais (controle). Grupo V pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica. Os resultados representam a média \pm erro padrão (n=10). A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos quatro grupos chagásicos representado pela letra (a) que significa semelhança estatística. O emprego do teste t de Student foi realizado entre o controle e seu grupo chagásico, a diferença estatística foi simbolizada pelo asterisco, quando *p<0,05 e **p<0,01.

4.4 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

4.4.1 CONCENTRAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)

No sentido de avaliar o processo inflamatório e atividade dos vasos na insuficiência cardíaca, analisou-se as concentrações de NO entre os indivíduos normais e grupo V (insuficiência cardíaca de origem orovalvar). A análise estatística empregada foi o teste t de Student, o qual demonstrou diferença estatística, onde o grupo V mostrou níveis aumentados em relação a indivíduos saudáveis ($p < 0,001$).

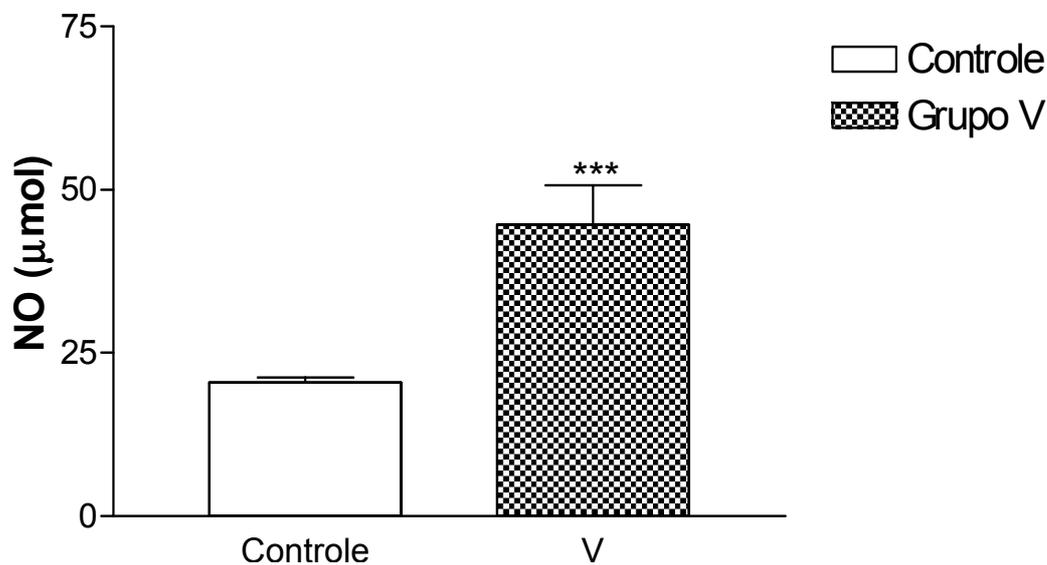


Figura 14 – Concentração do Óxido nítrico (NO) no plasma de pacientes do Grupo V (pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica) mais respectivos indivíduos normais (controle). Os resultados representam a média \pm erro padrão ($n=10$). A análise estatística empregada foi o teste t de Student entre controle e grupo V, a diferença estatística foi simbolizada pelos asteriscos, $***p < 0,001$.

4.4.2 CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA-C-REATIVA

No sentido de obter um marcador do processo inflamatório, utilizou-se a avaliação da proteína-C-reativa (PCR) entre os indivíduos. A análise estatística não paramétrica de Mann-Whitney foi empregada e não demonstrou diferença estatística entre o grupo V (pacientes com insuficiência cardíaca de origem orovalvar) e o grupo controle.

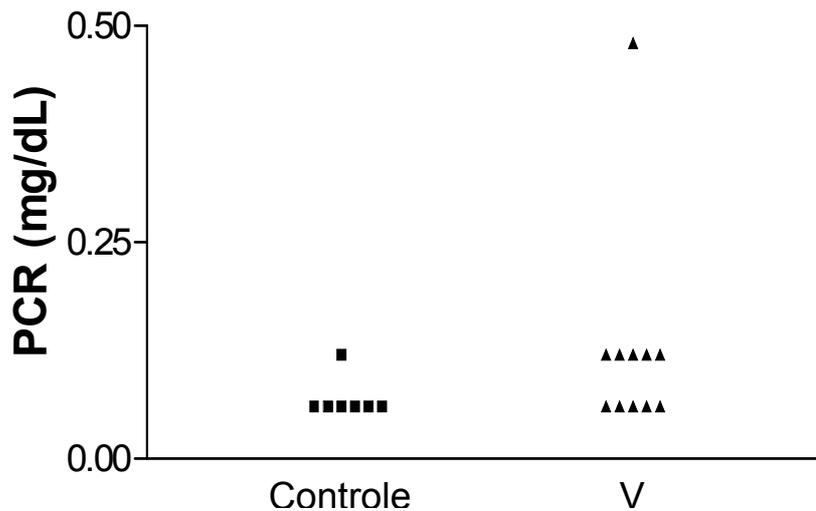


Figura 15 – Concentração da proteína-C-reativa (PCR) no plasma de pacientes do Grupo V (pacientes com insuficiência cardíaca de origem não chagásica) mais respectivos indivíduos normais (controle). Os resultados representam os valores em mg/dL (n=10). A análise estatística empregada foi o teste não paramétrico de Mann-Whitney entre controle e grupo V.

5 DISCUSSÃO

Apesar da titulada erradicação da doença de Chagas no Brasil em 2003, através da eliminação do vetor por inseticida (WHO, 2004), ainda aparecem focos da doença e até surgimento de casos agudos na Amazônia (Coura et al., 2002), enquanto que no interior do Ceará foi demonstrado recentemente alta presença do vetor (Sarquis et al., 2004). Como consequência, os estudos na fase crônica da doença são importantíssimos. Segundo Dias e cols. (1985), mesmo considerando a total erradicação da doença de Chagas, seriam necessários pelo menos mais 30 anos de tratamento e cuidados dos pacientes que já estão infectados e atravessam a fase crônica da doença.

A cardiopatia chagásica crônica é a forma da patologia de maior relevância devido à sua alta prevalência, alta mortalidade e morbidade (Prata, 2001). Nesta fase da doença, não existe nenhum tratamento consistente e direto (Brener, 1979; Brener, 2000). São vários motivos para que não se alcancem resultados eficazes no tratamento, entre eles estão o desinteresse comercial (baixo poder aquisitivo dos portadores), reduzido recurso nesta área de pesquisa, doença de caráter lento e progressivo (Dias, 1999). Além do mais, os mecanismos da cardiopatia chagásica crônica ainda são obscuros e fonte de muita discussão na literatura, o que aumenta a dificuldade de obter um quimioterápico eficaz (Tarleton & Zhang, 1999; Simões et al., 2000; Prata, 2001).

A classificação de Los Andes foi utilizada por Carrasco e colaboradores (1987) para mostrar diferenças entre as lesões intracelulares em biópsias cardíacas. No grupo II aparecem marcadamente maiores lesões intracelulares e processo inflamatório do que no grupo I. No grupo III já aparecem intensa fibrose e intenso processo inflamatório, o qual é maior ainda no grupo IV (Carrasco et al., 1987), mostrando uma relação de linearidade entre o processo inflamatório e a intensidade do grau de remodelamento ventricular. A classificação de Los Andes modificada (Xavier, 1999) estratifica os pacientes com cardiopatia chagásica em 4 estágios evolutivos baseados no grau de intensidade do remodelamento ventricular. Ela mostra que, quanto maior o grau de remodelamento, maior é a mortalidade. Alguns trabalhos têm usado esta classificação para avaliações clínicas (Pedrosa et al., 1996; Pedrosa et al., 1997; Oliveira et al., 2000). O presente trabalho utilizou a classificação de Los Andes modificada por constituir uma metodologia

que melhor discrimina os pacientes no que tange os aspectos clínicos evolutivos da cardiopatia chagásica em relação ao remodelamento ventricular e conseqüente intensidade do processo inflamatório.

A cardiopatia chagásica crônica é uma doença inflamatória em constante atividade e progressão. Outras patologias de característica inflamatória crônica citadas na literatura associadas com o estresse oxidativo são o lúpus eritematoso (Sukkar & Rossi, 2004), a artrite reumatóide (Deaney et al., 2001; Vuolteenaho et al., 2002; Jaswal et al., 2003; Bacher & Schmitz, 2004; Kamanli et al., 2004), periodontite (Borges Júnior, 2004), doença de Crohn e a colite ulcerativa (Bacher & Schmitz, 2004).

A idade apresenta papel importante no estresse oxidativo quando se compara adultos jovens (20 à 40 anos) e adultos sexagenários ou septagenários. Estudos mostram que o dano oxidativo é maior em idosos (Mutlu-Türkglu et al., 2003; Junqueira et al., 2004) e a GPx também pode estar alterada (Junqueira et al., 2004). No sentido de minimizar este viés, procurou-se igualar a idade e o sexo dos pacientes chagásicos aos seus controles, e a semelhança estatística obtida entre os quatro grupos chagásicos (I, II, III, IV) quanto ao fator idade, veio consolidar a ausência deste fator neste estudo.

No presente trabalho as atividades da CAT e da SOD permaneceram praticamente inalteradas quando comparadas à progressão da cardiopatia chagásica. Apesar disto, alguns resultados mostraram-se relevantes como o aumento da atividade da CAT no grupo I (função ventricular normal ou levemente deprimida) em relação ao seu controle, e a tendência de queda desta atividade quando da progressão da patologia chagásica. Esta diminuição poderia determinar um aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio intracelular, elevando o risco de um estresse oxidativo e desencadeando processos apoptóticos (Boveris & Cadenas, 1997; Nebert et al., 2000). Se ao nível sistêmico houve uma tendência de diminuição da CAT eritrocitária, esta enzima mostrou-se induzida ao nível cardíaco em pacientes com insuficiência cardíaca (grupo IV) (Dieterich et al., 2000). A pouca associação de indução da SOD e CAT com a progressão do comprometimento cardíaco, poderia ser explicada através da maior dependência do paciente ao metabolismo anaeróbico com grau de remodelamento ventricular (grupo I em direção ao grupo IV), (Pedrosa, 1997; Oliveira et al., 2000). Uma vez que o estresse oxidativo está estreitamente relacionado ao metabolismo aeróbico, e este encontra-se reduzido nos pacientes de maior grau de remodelação ventricular, seria de se esperar uma queda do

mesmo neste grupo de pacientes. Oliveira e colaboradores (2000) também mostraram que há uma melhor capacidade de absorção de O₂ por unidade de massa corpórea em pacientes saudáveis em relação aos pacientes com estágios mais avançados da cardiopatia chagásica. A produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio é proporcional ao volume de oxigênio consumido ao nível mitocondrial (Boveris & Chance, 1973; Jones, 1985), conseqüentemente o aumento do consumo de oxigênio aumenta a concentração de SOD (Wilhelm Filho et al., 2000). Também indivíduos saudáveis e cobaias sob treinamento físico aumentam as atividades da CAT e SOD (Kanter et al., 1985; Singal et al., 1993; Halliwell, 2000). Em contrapartida, a hipóxia é bem conhecida como produtora de estresse oxidativo, aumentando a produção de EROs, ratos submetidos à hipóxia mostraram a diminuição da GSH e GPx, como também o aumento do nível do TBARS plasmático e tecidual (Sarada et al., 2002).

A GPx, pela sua importante função e por sua ubíqua distribuição, constitui papel determinante na proteção contra o dano oxidativo (Nordberger & Arnèr, 2001). A GPx também pode estar associada às membranas (fosfolípide hidroperóxido glutathione peroxidase) onde atua contra os hidroperóxidos (LOOH) originados pela lipoperoxidação (Gaté et al., 1999). Péres-Fuentes e colaboradores (2004) encontraram depleção nos níveis séricos de GPx em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos, corroborando os resultados do presente trabalho. A depleção de elementos-traços tais como Zn, Se ou vitaminas pode levar à inativação das enzimas antioxidantes e originar um estado de estresse oxidativo associado (Sipowicz et al., 1997). A deficiência de selênio está relacionada com a miocardiopatia, principalmente com a doença de Keshan (Xu et al., 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999). Rivera e colaboradores (2002) associaram a deficiência de selênio na miocardiopatia chagásica à depleção de GPx, porém seus resultados não apresentaram diminuição nos valores de GPx com a progressão da patologia. Importante ressaltar que estes trabalhos (Rivera et al. 2002; Péres-Fuentes et al., 2003) utilizaram o soro para dosar a GPx, enquanto no presente estudo utilizou-se os eritrócitos, onde a GPx está presente em concentrações muito mais elevadas (Halliwell & Gutteridge, 1999) e, fisiologicamente, teria maior importância uma depleção de GPx nos eritrócitos do que no plasma.

Vários organismos têm a capacidade de responder ao aumento dos níveis de EROs com um aumento intracelular de GSH e ou com um aumento da expressão de

proteínas/enzimas com capacidade “scavenger” (Dröge, 2002). A GSH é o principal tiol não protéico encontrado em todos organismos aeróbicos (Wilhelm Filho et al., 2000) e constitui importante primeira linha de defesa contra as EROs, e sua concentração é muito elevada (aproximadamente mM) em tecidos animais ou vegetais. A maior fonte de GSH plasmática é de origem hepática. A depleção plasmática e hepática de GSH tem sido associada com patologias como a hepatite viral, hepatite crônica e cirrose hepática (Kaplowitz & Ookhtens, 1985; Shigesawa et al., 1992). A depleção de glutathiona também já foi associada a patologias pulmonares como a síndrome respiratória aguda (ARDS) e dano pulmonar neonatal (Gaté et al., 1999). As lesões que afetam outros órgãos na forma cardíaca crônica da doença de Chagas são causadas pela congestão crônica passiva, principalmente do fígado. A congestão hepática pode ser muito intensa, com necrose centrolobular, podendo dar lugar ao aparecimento de icterícia (Andrade, 2000). Isto poderia contribuir decisivamente com a queda gradativa da quantidade de GSH intraeritrocitária nos pacientes chagásicos, notadamente naqueles com insuficiência cardíaca (grupo IV). Desta forma, o estresse oxidativo em pacientes chagásicos crônicos estaria ocorrendo ao nível de órgãos importantes como o fígado, além do próprio miocárdio, sendo possível de ser detectado no sangue (nível sistêmico) destes pacientes. Nesta condição aparentemente o tecido sangüíneo, apesar de detentor de grande capacidade antioxidante, já não apresentaria um adequado poder redutor (Giulivi et al., 1993), com o comprometimento de todo o sistema antioxidante do organismo, notadamente o do grupo IV.

A diminuição de GSH no plasma de pacientes com cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca de etiologia idiopática e isquêmica, também já foi demonstrada em outros trabalhos (Belch et al., 1991; McMurray et al., 1993). Igualmente, Yücel e colaboradores (1998) mostraram a diminuição da GSH no sangue total de pacientes com cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca. A depleção da concentração da GSH poderia estar envolvida com o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , relação já encontrada também em cultura de células (Ishii et al., 1992; Phelps et al., 1995). De modo coerente, os níveis de TNF- α plasmáticos mostraram-se elevados em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos (Péres-Fuentes et al., 2003), sugerindo uma forte correlação entre morte celular e este importante antioxidante em cardiopatas, incluindo os da doença de Chagas. Portanto, mudanças intracelulares no balanço tiol/dissulfeto em

muitos casos pode causar modificações químicas na sinalização celular parecidas com as modificações causadas pelas EROs (Dröge, 2002).

Como o processo enzimático e não enzimático de detoxificação de EROs por GSH produz glutathiona oxidada (GSSG), pequenos aumentos nas concentrações de GSSG podem ser muito deletério para as células, principalmente após um insulto tóxico por xenobiontes ou pelo próprio estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1999). A GSSG é transportada para o compartimento extracelular quando uma concentração crítica de GSSG é atingida no citoplasma, causando uma depleção no nível intracelular de GSH (Meister, 1983), o que poderia se refletir em aumento dos níveis de GSSG sanguíneos.

A expressão de GST protege as células contra vários agentes carcinogênicos e toxinas eletrofílicas (Halliwell & Gutteridge, 1999). A concentração de GSH é também um importante fator associado à expressão de GST (Kumaraguruparan et al., 2002; Ouaiissi et al., 2002), ou seja, os níveis de GSH influenciam a expressão da GST, o que poderia explicar, neste trabalho, a depleção de GSH e inibição de GST à medida que o grau de remodelamento ventricular avança.

A GR é uma flavoproteína que permite a conversão de GSSG para GSH via oxidação do NADPH para NADP. Esta reação é importante na biodisponibilidade *in vivo* da GSH (Halliwell & Gutteridge, 1999). Mesmo sem ocorrer significância estatística, pode-se observar uma tendência de elevação nos níveis de GR provavelmente no sentido de tentar repor o consumo de GSH dos pacientes com insuficiência cardíaca (grupo IV).

O estresse oxidativo produz muitas mudanças e pode eventualmente levar a célula à morte pelo aumento dos elementos oxidativos e ou uma diminuição da proteção antioxidante (Fiers et al., 1999). A doença de Chagas é uma complexa relação entre a persistência do parasita e a má adaptação do mecanismo de defesa do hospedeiro, formando a severidade da patologia, de uma certa forma, o estresse oxidativo pode ser um dos fatores deste tipo de má adaptação (Péres-Fuentes et al., 2003). O aumento do processo inflamatório em patologias crônicas pode ser ativado pela EROs via modulação de fatores transcricionais NF- κ B e AP-1 (Sukkar & Rossi, 2004). Não obstante, o estado de estresse oxidativo na patologia chagásica pode ser importante via de indução inflamatória. Em modelos animais, mostrou-se a ativação de fatores transcricionais NF- κ B e AP-1 na fase aguda da cardiopatia chagásica e sua persistência por longos períodos (30 e 60 dias após indução) (Huang et al., 2003). Estudos recentes demonstraram a

importância da inflamação no desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva de etiologia chagásica. Amostras humanas do miocárdio com insuficiência cardíaca congestiva apresentaram ativação de NF-kB (Valen et al., 2001). O fator transcricional AP-1 contribui para o desenvolvimento de fibrose, deposição de colágeno e hipertrofia cardíaca, como observado em miocárdio de camundongos infectados por *T. cruzi* (Huang et al., 2003). Neste sentido, o presente trabalho procurou contribuir para o melhor entendimento da suscetibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento da severidade da patologia crônica, analisando as suas defesas antioxidantes.

Para comparar os níveis de estresse oxidativo dos pacientes chagásicos com insuficiência cardíaca (grupo IV) resolveu-se utilizar um grupo V que foram pacientes com insuficiência cardíaca de origem orovalvar, provocados provavelmente por febre reumática que, após descompensação cardíaca, retornaram à situação compensatória, no ponto de vista clínico semelhante ao grupo IV, porém de etiologia diferente. O objetivo deste grupo V foi comparar o comportamento das defesas antioxidantes na doença de Chagas e na insuficiência cardíaca. Escolheu-se o grupo V de etiologia única com o menor processo inflamatório possível, ou apenas local, porém é sabido que estes pacientes (grupo V) têm um processo inflamatório e aumento dos níveis de TNF- α e IL-6 associados com sobrecarga de pressão e volume, atividade reumática e insuficiência cardíaca resultante da disfunção ventricular sistólica esquerda (Bachetti et al., 1996; Kapadia et al., 2000; Chang et al., 2003), ou seja, mesmas características clínicas do grupo IV chagásico. Também cabe ressaltar que Péres-Fuentes e colaboradores (2003) encontraram níveis elevados de TNF- α em cardiopatas chagásicos crônicos. Entretanto, o grupo V tem significância clínica ao estresse oxidativo pouco relacionada, visto que, pacientes com insuficiência cardíaca de origem isquêmica, de origem diabética estão presentes na literatura com alterações das defesas antioxidantes (Chandra et al., 1994; Dieterich et al., 2000).

No intuito de analisar o processo inflamatório nestes pacientes, foi utilizada a quantificação da proteína-C-reativa (PCR) e do óxido nítrico (NO). A proteína-C-reativa é um marcador bastante inespecífico de inflamação e pode alterar-se facilmente, sendo um forte biomarcador inflamatório e uma proteína de resposta imune inata, membro da família das pentraxinas (Yeh & Willerson, 2003). Já a avaliação do NO foi alterada pelo envolvimento com a fisiologia vascular, pois é sabido que a insuficiência cardíaca altera

os seus níveis (Heymes et al., 1999; Vanderheyden et al., 2003). O óxido nítrico tem importância fundamental nas funções do sistema cardiovascular, bem como a regulação do tônus vascular (Palmer et al., 1987; Lowenstein et al., 1994) e a manutenção da integridade endotelial (Mellion et al., 1981). Além disso, o óxido nítrico pode reagir com o ânion superóxido e formar peroxinitrito, molécula altamente reativa que está envolvida na modificação oxidativa de LDL e proteínas (Beckman et al., 1990; Hogg et al., 1993). Os resultados obtidos no presente trabalho para os pacientes chagásicos do grupo IV, como a depleção de GSH, inibição de GPx e GST poderiam estar relacionados com a ação deletéria do peroxinitrito e formação de hidroperóxidos, pois a concentração de NO aumenta com a progressão da cardiopatia chagásica (Péres-Fuentes et al., 2003).

A insuficiência cardíaca provoca estresse oxidativo (Belch et al., 1991; Yücel et al., 1998), aumenta a expressão de CAT (Dieterich et al., 2000), nestes pacientes ocorre depleção de tióis plasmáticos, diminuição de GPx, inibição SOD eritrocitária, e aumento dos níveis de TBARS e 4-hidroxinonenal no plasma (McMurray et al., 1993; Yücel et al., 1998; Keith et al., 1998; Mak et al., 2000). Apesar disso, não há uma prova direta de que o estresse oxidativo está fortemente associado à progressão da insuficiência cardíaca congestiva (Mak & Newton, 2001). Portanto, seria esperada a presença de estresse oxidativo nos pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia orovalvar (grupo V) com problemas de sobrecarga de pressão e/ou volume. Os possíveis mecanismos para esta situação consistem no aumento da atividade e expressão da NADPH oxidase do miocárdio com o aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ (Heymes et al., 2003) e indução de NO sintase induzida (iNOS) (Vanderheyden et al., 2003), via ativação pelo TNF- α (Vuolteenaho et al., 2002; Péres-Fuentes et al., 2003). O estresse oxidativo poderia estar provocando um efeito no coração, como a ativação de vias de sinalização e expressão de genes que resultam no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, fibrose e remodelamento (Wenzel et al., 2001; Prabhu, 2004). A resposta do grupo V nas enzimas antioxidantes foi diferente do grupo IV (insuficiência cardíaca chagásica), já que ocorreu indução das enzimas GPx e GST, e aumento das concentrações de GSH e GT. O aumento destas enzimas poderia, ao menos em parte, ser explicado pelo uso da medicação dos inibidores da ECA, já que camundongos tratados com captopril e enalapril aumentam as enzimas antioxidantes (Cu,Zn-SOD, GPx, GR) e da concentração de GSH em vários tecidos (De Cavanagh et al., 1995, 1997, 2000, 2004). Apesar de que estudos em culturas de células

mostrarem o contrário (Mailloux et al., 2003); pacientes com disfunção renal crônica em hemodiálise tratados por 6 meses com enalapril aumentaram os níveis intraeritrocitários de GSH, GPx e β -caroteno plasmático (De Cavanagh et al., 1999). O grupo V (insuficiência cardíaca de origem orovalvar) estava sob esta medicação, apresentando um estado de estresse oxidativo “compensado”, enquanto que o comportamento destas enzimas nos pacientes chagásicos com insuficiência cardíaca foi uma resposta oposta, acompanhada da diminuição das atividades de GPx, GST e depleção dos conteúdos de GSH sem o aumento concomitante de GT, o que pressupõe um estado de estresse oxidativo crônico, com declínio das defesas e sem uma indução adequada das enzimas antioxidantes.

Observando os resultados do grupo III (infecção chagásica com disfunção ventricular sistólica grave) com o grupo IV (infecção chagásica com disfunção ventricular sistólica grave e insuficiência cardíaca), é possível inferir que ocorreu uma tentativa de compensação das defesas antioxidantes no grupo III, porém aparentemente insuficiente. Entretanto, com a progressão da doença, o organismo parece não conseguir mais responder satisfatoriamente a este insulto oxidativo, havendo uma diminuição na concentração de GSH e nas atividades da GPx e GST intraeritrocitárias no grupo IV comparativamente ao grupo III. Pode-se conjecturar, nesta fase evolutiva da doença (grupo IV), que o organismo não apresenta mais uma resposta adequada aos insultos oxidativos, evoluindo para um grau de remodelamento ventricular maior, manifestado clinicamente por insuficiência cardíaca.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o quadro de estresse oxidativo constatado nos eritrócitos de pacientes chagásicos crônicos aparentemente acentua-se com a progressão da doença. Este quadro de estresse oxidativo no sangue provavelmente é resultante de um conjunto de fatores relacionados intimamente com um processo inflamatório crônico vinculado à crescente incapacidade de órgãos importantes para o sistema antioxidante do organismo como o miocárdio (Belch et al., 1991; Dieterich et al., 2000) e o fígado (Andrade, 2000) de manter um poder antioxidante ao nível destes órgãos e ao nível sangüíneo compatível com a persistência do insulto oxidativo.

6 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos sugerem um estado de estresse oxidativo no grupo de insuficiência cardíaca chagásica pela depleção da GSH, GST e GPx (grupo IV). A depleção destes marcadores leva a um estado de estresse oxidativo com redução das defesas antioxidantes, sugerindo uma progressiva exaustão enzimática.
- Os grupos chagásicos I e II estão com algumas defesas antioxidantes aumentadas em relação aos seus controles e em relação ao outros grupos chagásicos, provavelmente refletindo uma necessidade inicial das defesas antioxidantes manterem-se elevadas devido à agressão da doença de Chagas. Com o aumento da severidade da doença de Chagas ocorre redução (grupo IV) de algumas defesas antioxidantes em relação ao controle.
- Dessa forma, o comprometimento maior da doença de Chagas, (grupo IV insuficiência cardíaca chagásica) coincide com uma menor compensação antioxidante, sugerindo uma deficiência do organismo em manter estas defesas face ao estresse oxidativo decorrente da agressão inflamatória crônica.
- O grupo V (insuficiência cardíaca de origem orovalvar) mostrou comportamento das defesas antioxidantes oposto ao grupo IV (insuficiência cardíaca de origem chagásica), ou seja, enquanto na insuficiência cardíaca chagásica ocorre uma aparente depleção dos níveis antioxidantes, os pacientes com insuficiência cardíaca de origem orovalvar possuem uma capacidade melhor de adaptação das defesas antioxidantes sangüíneas.
- Os resultados obtidos no presente trabalho têm grande importância quanto aos mecanismos de agressão do parasita nesta patologia crônica e na possibilidade de uso de terapia antioxidante para compensar os danos decorrentes do estresse oxidativo associado à doença.

7 PERSPECTIVAS

- Quantificar os marcadores de dano utilizando técnicas como a oxidação de proteínas (proteína carbonilada), oxidação aos lipídios por hidroperóxidos lipídicos ou, ainda, MDA e FOX no soro. Avaliar o dano ao DNA (teste cometa ou aductos de DNA como 8-oxoguanina).
- Para dados comparativos realizar dosagem de todas as enzimas antioxidantes realizadas neste trabalho em outra amostra biológica dos cardiopatas chagásicos, ou seja, ao invés de usar os eritrócitos utilizar o plasma, como certos trabalhos na literatura (Bednarek et al., 2004).
- Identificar o perfil inflamatório destes pacientes que estão sob classificação de Los Andes modificada para correlacionar com as enzimas antioxidantes, utilizando o óxido nítrico (NO), citocinas pré-inflamatórias (IL-1), citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, INF- γ e TNF- α), citocinas antiinflamatórias (IL-10). Dosar ainda a proteína C-reativa (PCR), o VHS (velocidade de hemossedimentação), β 2-microglobulina, C3 e C4 (fator complemento), IgM e IgG (imunoglobulinas).
- Estudar o efeito de suplementação antioxidante (vitaminas E e C) em pacientes chagásicos crônicos, no sentido de atenuar o quadro de estresse oxidativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clin. Exp. Immunol.** v.131, p. 398-404, 2003.

ANDRADE, Z. Pathogenesis of Chagas' disease. **Res. Immunol.** v. 142, p. 126-129, 1991.

ANDRADE, Z.A. Patologia da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2 ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.201-230, 2000.

BACHER, S.; SCHMITZ, M.L. The NF-kappaB pathway as a potential target for autoimmune disease therapy. **Curr. Pharm. Des.** v. 10, p. 2827-2837, 2004.

BACHETTI, T.; COMINI, L.; AGNOLETTI, L.; GAIA, G.; MILANESI, B.; CURELLO, S.; CORTI, A.; FERRARI, R.; VISIOLI, O. Activation and role of the tumor necrosis factor-alpha in congestive heart failure. **Cardiol.** v. 41, p. 343-347, 1996.

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

BEDNAREK, J.; WYSOCKI, H.; SOWINSKI, J. Oxidation products and antioxidant makers in plasma of patients with Graves' disease and toxic Multinodular Goiter: effect of Methimazole treatment. **Free Radic. Res.** v. 38, p. 659-644, 2004.

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

BESTETTI, R.B. Disfunção autonômica na cardiopatia chagásica crônica: fator importante na patogênese e na história natural da moléstia. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral**, 1ª ed., Rio de Janeiro:Fiocruz, p. 267-280, 1997.

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

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

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

BORGES JÚNIOR, I. Avaliação do estresse oxidativo em humanos com doença periodontal. Florianópolis:UFSC, 2004. 70pp. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Programa de pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

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

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.** v.227, p.534-41, 1983.

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

BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. **Pharmacol. Ther.** v. 7, p.71-90, 1979.

BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2ª ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 266-296, 2000.

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

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.** v. 64, p. 128-134, 1996.

CARDONI, R.L.; ROTTENBERG, M.E.; SEGURA, E.L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Invest.** v. 28, p. 257-268, 1990.

CARRASCO, H.A.; BARBOZA, J.S.; INGLESSIS, G.; FUENMAYOR, A.; MOLINA, C. Left ventricular cineangiography in Chagas' disease: detection of early myocardial damage. **Am. Heart J.** v.104, p. 595-602, 1982.

CARRASCO, H.A. Diagnóstico de daño miocárdico en la enfermedad de Chagas. Textos de la Universidad de Los Andes: Cosenjo de Publicaciones de la Universidad de Los Andes, Merida, 1983.

CARRASCO, H.A.; PALACIOS-PRÜ, E.; SCORZA C.D., MOLINA C., INGLESSIS G., MENDONZA, R.V. Clinical, histochemical and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. **Am. Heart J.** v. 113, p. 716-724, 1987.

CLARK, I.A.; CHAUDHRI, G.; COWDEN, W.B. Some roles of free radicals in malaria. **Free Radic. Biol. Med.** v. 6, p. 315-321, 1989.

COHEN, J.E.; GÜRTLER, R.E. Modeling household transmission of American Trypanosomiasis. **Science**, v. 293, p. 694-697, 2001.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.A.S.; MILES, M.A. Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol.** v. 18 (4), p. 171-176, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. N. gen., n. sp. Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 1, p. 159-218, 1909.

CHANDRA, M.; CHANDRA, N.; AGARWAL, R.; KUMAR, A.; GHATAK, A.; PANDEY, V.C.; The free radical system in ischemic heart disease. **Int. J. Cardiol.** v. 43, p. 121-125, 1994.

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P.C.; TROYER, A.; FREEMAN, G.L. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Clin. Exp. Immunol.** v. 121, p. 112-119, 2000.

CHANG, C.J.; HSU, L.A.; CHIANG, C.W.; KO, Y.S.; SEE, L.C.; SHEN, Y.C.; KO, Y.L.; KOU, C.T.; LEE, Y.S.; PANG, J.H.S. Percutaneous transvenous mitral valvulotomy normalizes elevated circulating levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in mitral stenosis with heart failure. **Am. J. Cardiol.** v. 91, p. 1018-1020, 2003.

D'ÁVILA, D.F.; ROSSEL, O.; BELLABARBA, G.A.; Pathogenesis of chronic chagas heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation. **Int. J. Parasitol.** 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. Florianópolis:UFSC, 2001. 66pp. Dissertação. (Mestrado em Farmácia). Programa de pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina.

DE CAVANAGH, E.M.V.; INSERRA, F.; FERDER, L.; ROMANO, L.; FRAGA, C.G. Superoxide-dismutase and glutathione-peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. **FEBS Lett.** v. 361, p. 22-24, 1995.

DE CAVANAGH, E.M.V.; FRAGA, C.G.; FERDER, L.; INSERRA, F. Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. **Am. J. Physiol.** v. 272, p. R514-R518, 1997.

- DE CAVANAGH, E.M.V.; FERDER, L.; CARRASQUEDO, F.A.; SCRIVO, D.; WASSERMAN, A.; FRAGA, C.G. Higher levels of antioxidant defenses in enalapril-treated versus non-enalapril treated hemodialysis patients. **Am. J. Kidney. Dis.** v. 34, p. 445-455, 1999.
- DE CAVANAGH, E.M.V.; INSERRA, F.; FERDER, L.; FRAGA, C.G. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defences in mouse tissue. **Am. J. Physiol.** v. 278, p. R572-R577, 2000.
- DE CAVANAGH, E.M.V.; PIOTRKWOSKI, B.; FRAGA, C.G. Concerted action of rennin-angiotensin system, mitochondria and antioxidant defenses in aging. **Mol. Asp. Med.** v. 25, p. 27-36, 2004.
- DEANEY, C.L.; FEYI, K.; FORREST, C.M.; FREEMAN, A.; HARMAN, G.; MCDONALD, M. S.; PETRIE, A.; SHAW, S. J.; STONE, T. W.; STOY, N.; DARLINGTON, L. G. Levels of lipid peroxidation products in a chronic inflammatory disorder. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** v. 110, p. 87-95, 2001.
- DIAS, J.C.P. História natural In: CANÇADO, J.R. **Cardiopatia chagásica.** São Paulo:Editora Chuster, p. 99-113, 1985.
- DIAS, J.C.P. Doença de Chagas In: CIMERMAN, B. CIMERMANN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais.** São Paulo:Editora Atheneu, p. 81-110, 1999.
- DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circ.** v. 101, p. 33-39, 2000.
- DOCAMPO, R.; STOPPANI, A.O.M. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nirfurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis.** v. 197, p. 317-321, 1979.
- DOLLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim. Act.** v. 329, p. 23-38, 2003.
- DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog. Lip. Res.** v. 43, p. 200-227, 2004.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** v. 82, p. 47-95, 2002.
- EPP, O.; LANDENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0,2 nm resolution. **Eur. J. Biochem.** v.133, p.51-69, 1983.
- FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncon.** v. 18, 7719-7730, 1999.

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

FLESCHIN, S.; FLESCHIN, M.; NITA, S.; PAVEL, E.; MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roum. Biotechnol. Lett.** v. 5 (6), p. 479-495, 2000.

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

FRAGA, C.G; MARTINO, V.S.; FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.D.; BOVERIS, A. Flavonoids as antioxidants evaluated by *in vitro* and *in situ* liver chemiluminescence. **Biochem. Pharmacol.** v. 36 (5), p. 717-720. 1987.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** v. 201, p. 1203-1209, 1997.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN Ba, G.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed. Pharmacother.** v. 53, p. 169-180, 1999.

GILBERT, D.L. **Oxygen and living processes: an inter-disciplinary approach**, 1^a ed., New York:Springer, 1981.

GIULIVI, C.; HOCHSTEIN, P.; DAVIES, K.J.A. Hydrogen peroxide production by red blood cells. **Free Rad. Biol. Med.** v. 16, p. 123-127, 1993.

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

GERSHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE, S.W.; DWYER, P.; FENN, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p. 623-666, 1954.

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

GUIMARÃES, A.C. Cardiopatia crônica: insuficiência cardíaca. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral**, 1^a ed., Rio de Janeiro:Fiocruz, p. 223-236, 1997.

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

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

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

HEYMES, C. BENDALL, J.K.; RATAJCZACK, P.; CAVE, A.C.; SAMUEL, J.; HASENFUSS, G.; SHAH, A.M. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 41, p. 2164-2171, 2003.

HIGUCHI, M.L. Doença de Chagas: importância do parasita na patogenia da forma crônica cardíaca. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 64, p. 251-254, 1995.

HIGUCHI, M.L. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 94, p. 263-267, 1999.

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

HUANG, H.; PETKOVA, S.B.; COHEN, A.W.; BOUZAHZAH, B.; CHAN, J.; ZHOU, J.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; KRISHNAMACHARY, M.; MUKHERJEE, S.; WITTNER, M.; KISTSIS, R.N.; PESTELL, R.G.; LISANTI, M.P.; ALBANESE, C.; TANOWITZ, H.B. Activation of transcription factors AP-1 and NF- κ B in murine chagasic myocarditis. **Infect. Immun.** v. 71, p. 2859-2867, 2003.

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

JASWAL, S.; MEHTA, H.C.; SOOD, A.K.; KAUR, J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. **Clin. Chim. Acta** v. 338, p. 123-129, 2003.

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

JONES, D.P. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: SIES, H. **Oxidative stress** 1^a ed., London:Academic, p. 151-195, 1985

JUNQUEIRA, V.B.C.; BARROS, S.B.M.; CHAN, S.S.; RODRIGUES, L.; GIAVAROTTI, L.; ABUD, R.L.; DEUCHER, G.P. Aging and oxidative stress. **Mol. Aspects Med.** v. 25, p. 5-16, 2004.

KAMANLI, A.; NAZIROGLU, M.; AYDILEK, N.; HACIEVLIYAGIL, C. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochem. Func.** v. 22, p. 53-57, 2004.

KANTER, M.M.; HAMLIM, R.L.; UNVERFERTH, D.V.; DAVIS, H.W.; MEROLA, A.J. Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. **J. Appl. Physiol.** v. 59, p. 1298-1303, 1985.

KAPADIA, S.R.; YAKOUB, K.; NADER, S.; THOMAS, J.D.; MANN, D.L.; GRIFFIN, B. Elevated circulating levels of serum tumor necrosis factor-alpha in patients with hemodynamically significant pressure and volume overload. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 36, p. 208-212, 2000.

KAPLOWITZ, N.; AW, T.Y.; OOKHTENS, M. The regulation of hepatic glutathione. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 25, p. 715-744, 1985.

KEHER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.** v. 23, p. 21-48, 1993.

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

KIRCHOFF, L.V.; GAM, A.A.; NEVA, F.A. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in Central American immigrants. **Am. J. Med.** v. 82, p. 915-920, 1987.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Edição 2000-2001, Rio de Janeiro:Guanabara Kogan, 2000.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; VISWANATHAN, P.; NAGINI, S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clin. Chim. Act.** v. 325, 165-170, 2002.

LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**, 10^a ed., São Paulo:Atheneu, p. 73-96, 2003.

LOWENSTEIN, C.J.; DINNERMAN, J.L.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: physiological messenger. **Ann. Int. Med.**, v. 120, p. 227-237, 1994.

LUCESOLI, F.; FRAGA, C.G. Oxidative damage to lipids and DNA concurrent with decrease of antioxidants in rat testes after acute iron intoxication. **Arch. Biochem. and Biophys.** v. 316, p. 567-571, 1995.

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

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

MAILLOUX, A.; DESLANDES, B.; VAUBOURDOLLE, M.; BAUDIN, B. Captopril and enalaprilat decrease antioxidant defences in human endothelial cells and are unable to protect against apoptosis. **Cell Biol. Inter.** v. 27, p. 825-830, 2003.

MAK, S.; LEHOTAY, D.C.; YAZDANPANA, M.; AZEVEDO, E.R.; LIU, P.P.; NEWTON, G.E. Unsaturated aldehydes including 4-OH-nonenal are elevated in patients with congestive heart failure. **J. Cardiol. Fail.** v. 6, p. 108-114, 2000.

MAK, S.; NEWTON, G.E. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. Radical thoughts. **Chest** v. 120, p. 2035-2046, 2001.

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

MARCONDES, J.; RASSI, A. A doença de Chagas. In: CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; **Protozooses humanas**. São Paulo: Editora Fundo Editorial, p. 38-72, 1994.

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

MAYA, J.D.; REPETTO, Y.; AGOSÍN, M.; OJEDA, J.M.; TÉLLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypanomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biol. Parasitol.** v. 86, p. 101-106, 1997.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocyanin (hemocyanin). **J. Biol. Chem.** v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MEDINA, M.; CARRASCO-GUERRA, H.A. Diagnóstico por métodos no invasivos de daño ventricular izquierdo incipiente en pacientes chagásicos. Utilidad de la ecocardiografía y la fonomecanocardiografía. **Arch. del Inst. de Cardiol. Mexico** v. 50, p. 663-669, 1980.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science** v. 220, p. 445-447, 1983.

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

MILZANI, A.; ROSSI, R.; DI SIMPLICIO, P.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; DALLE-DONNE, L. The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. **Protein Sci.** v. 9, p. 1774-1782, 2000.

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

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

- MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. In: LINDOSO, A.A.B.P.; YASUDA, M.A.S.; **Rev. Bras. Saúde Pública**, v. 37 (1), p.107-115, 2003.
- MUTLU-TÜRKOGLU; İYLHAN, E.; ÖZTEZCAN, S.; KURU, A.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. Age-related increased in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. **Clin. Biochem.** v. 36, p. 397-400, 2003.
- NEBERT, D.W.; AMY, R.L.; MATTEW, D.Z.; SOLIS, W.A.; YANG, Y.; DALTON, T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis. **Biochem. Pharmacol.** v. 59, p. 65-85, 2000.
- NIJVELDT, R.J.; PRINS, H.A.; VAN KEMENADE, F.J.; TEERLINK, T.; VAN LAMBALGEN, A.A.; BOELEN, P.G.; RAUWERDA, J.A.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Low arginine plasma levels do not aggravate renal blood flow after experimental renal ischaemia/reperfusion. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.** v. 22 (31), p. 232-239, 2001.
- NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A.C.; D'SOUZA-AULT, M.R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.J.; TEIXEIRA, A.R.L. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas' disease. **Cell** v. 118, p. 175-186, 2004.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.** v.31, p.1287-1312, 2001.
- OLIVEIRA, F.P.; PEDROSA, C.R.; GIANNELA-NETO, A. Gas exchange during exercise in different evolutionary stages of Chronic Chagas' heart disease. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 75, p.490-498, 2000.
- OUAISSI, A.; OUAISSI, M.; SERENO, D. Glutathione S-transferase and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. **Imm. Lett.** v. 81, p. 159-164, 2002.
- ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicol. Lett.** v. 149, p. 19-23, 2004.
- PALACE, V.P.; MATEHWSKI, H.S.; KLAVERKAMP, J.F. Effects of sampling and storage conditions on the stability of biochemical parameters measured in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. **Comp. Biochem. Physiol.** V. 95, p. 51-55, 1990.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** v. 327, p. 524-526, 1987.
- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-Arginine is the physiological precursor for formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 153, p. 1251-1256, 1988.

- PEDROSA, R.C.; SAAD, E.A.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A.M. Resposta proliferativa das células T contra a cruzipaina na cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 29 (4), p. 331-339, 1996.
- PEDROSA, R.C.; MELO, M.F.V.; SAAD, E.A. Limiar anaeróbio detectado pela "análise da curva-V" na cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 30 (2), p. 129-138, 1997.
- PEDROSA, R.C. Contribuição ao estudo da etiopatogenia do distúrbio de condução e da eletrogênese na cardiopatia chagásica crônica: efeitos de anticorpos IgG de pacientes chagásicos crônicos na eletrogênese e no sistema de condução do coração isolado de mamíferos. Rio de Janeiro:UFRJ, 1998. 145pp. Tese (Doutorado em cardiologia). Programa de pós-graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- PEDROSA, R.C.; DE BEM, A.F.; LOCATELLI, C.; PEDROSA, R.C.; GEREMIAS, R.; WILHELM FILHO, D. Time-dependent oxidative stress caused by benzimidazole. **Redox Report** v. 6, p. 265-270, 2001.
- PENG, S.L. Scleroderma: a disease related to damage proteins? **Nature** v. 3, p. 276-301, 1997.
- PÉRES-FUENTES, R.; JUEGAN, J.F.; BARNABÉ, C.; COLOMBO, A.L.; ROSAS, H.S.; RASGADO-TORRES, E.; BRIONES, B.; ROMERO-DÍAZ, M.; RAMOS-JIMÉNEZ, J.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, M.C. Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **Inter. Jour. Parasitol.** v. 33, p. 293-299, 2003.
- PETRAY, P.; CASTANHOS-VELEZ, E.; GRINSTEIN, S.; ORN, A.; ROTTENBERG, M.E. Role of nitric oxide in resistance and histopathological during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.** v. 47, p. 121-126, 1995.
- PHELPS, D.T.; FERRO, T.J.; HIGGINS, P.J.; SHANKAR, R.; PARKER, D.M.; JOHNSON, A. TNF- α induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. **Am. J. Physiol.** v. 269, p. L551-L559, 1995.
- POLLA, A.S.; POLLA, L.L.; POLLA, B.S. Iron as the malignant spirit in successful ageing. **Ageing Res. Rev.** v. 2, p. 25-37, 2003.
- PRABHU, S.D. Nitric Oxide protects against pathological ventricular remodeling. Reconsideration of the role of NO in the failing heart. **Circ. Res.** v. 94, p. 1155-1157, 2004.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. **The Lancet Infect. Dis.** v. 1, p. 92-100, 2001.
- PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annu. Rev. Physiol.** v. 48, p. 657-667, 1986.

- RABINOVICH, J.E.; WISNIVESKY-COLLI, C.; SOLARZ, N.D.; GURTNER, R.E. Probability of transmission of Chagas' disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. **Bull. World Health Org.** v. 68, p. 737-746, 1990.
- REAGAN, P.; MAGARINOS, A.M.; MICEWEN, B.S. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. **Ann. New York Acad. Sci.** v. 75, p. 126-137, 2001.
- RIBEIRO, A.L.P.; ROCHA, M.O.C. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2 ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 246-265, 2000.
- RIVERA, M.T.; DE SOUSA, A.P.; MORENO, A.H.M.; XAVIER, S.S.; GOMES, J.A.A.; ROCHA, M.O.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; NÈVE, J.; VANDERPAS, J.; ARAÚJO-JORGE, T.C. Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 66 (6), p. 706-712, 2002.
- ROMERO, N.; DENICOLA, A.; RADI, R. Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 368, p. 23-30, 1999.
- ROSE, G.; BLACKBURN, H.; GILLIUM, R.F.; PRINEAS, R.J. Cardiovascular survey methods. World Health Organization, Monograph Series n° 56, 1982.
- ROSSI, M.; BESTETTI, R.B. The challenge of chagasic cardiomyopathy. **Cardiol.** V. 86, p. 1-7, 1995.
- ROSSI, M.A. Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis. **São Paulo Med. J.** v. 113, 750-756, 1995.
- SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of Nitric Oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infec. And Imm.** v. 69, p.2252-2259, 2001.
- SAGARA, Y.; DARGUSCH, R.; CHAMBERS, D.; DAVIS, J.; SCHUBERT, D.; AHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** v. 24, p. 1375-1389, 1998.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B. MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides** v. 20, p. 949-956, 1999.
- SARADA, S.K.S.; SAIRAM, M.; ANJU, D.B.; PAULINE, T.; KAIN, A.K.; SHARMA, S.K.; BAGAWAT, S.; HAVAZHAGAN, G.; KUMAR, D. Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: an *in vivo* study. **Biomed. Pharm.** v. 56, p. 173-178, 2002.
- SARQUIS, O.; BORGES-PEREIRA, J.; MAc CORD, J.R.; GOMES, T.F.; CABELLO, P. H.; LIMA, M.M. Epidemiology of Chagas' disease in Jaguaruna, Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 99, p. 263-270, 2004.

SCHMUÑIS, G.A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin América. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p. 93-101, 1999.

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

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

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

SHIGESAWA, T.; SATO, C.; MARUMO, F. Significance of plasma glutathione determination in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease. **J. Gastroent. Hepatol.** v. 7, p. 7-11, 1992.

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

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** v. 215, p. 213-19, 1993.

SIMÕES, M.V.; ALMEIDA FILHO, O.C.; PAZIN FILHO, A.; PEREIRA DE CASTRO, R.B.; SCHMIDT, A.; MACIEL, B.C.; MARIN-NETO, J.A. Insuficiência cardíaca na Doença de Chagas. **Rev. Soc. Est. São Paulo** v. 10, p. 50-64, 2000.

SIMÕES-BARBOSA, A.; BARROS, A.M.; NITZ, N.; ARGANARAZ, E.R.; TEIXEIRA, A.R. Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas' disease patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 94, p. 249-252, 1999.

SINGAL, P.K.; DHALA, A.K.; HILL, M.; THOMAS, T.P. Endogenous antioxidant changes in the myocardium in response to acute and chronic stress condition. **Mol. Cell Biochem.** v. 129, p. 179-186, 1993.

SINGER, J.M.; PLOTZ, C.M. The latex fixation test. II. Results in rheumatoid arthritis. **Am. J. Med.** v. 21, p. 893-896, 1956.

SIPOWICZ, M.A.; CHOMARAT, P.; DIWAN, B.A. ANVER, M.A.; AWASTHY, Y.C.; WARD, J.M. Increased oxidative DNA damage and hepatocyte overexpression of specific cytochrome P450 isoforms in hepatitis of mice infected with *Helicobacter hepaticus*. **Am. J. Pathol.** v. 4, p. 933-941, 1997.

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

STORINO, R.A. Chagas crônico. In: STORINO, R.A.; MILEI, J. **Enfermedad de Chagas**, 1ª ed., Buenos Aires:Doyma Argentina, p. 247-266, 1994.

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

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

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

TEIXEIRA, P.A.T.; MARTINS, E.; ALMEIDA, H.A.; SOARES, H.R.; MORAIS, C.A. Sistema ABO e forma clínica da doença de Chagas crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 20, p. 163-168, 1987.

TEIXEIRA, V.D.; ALMEIDA, H.D.; DOS REIS, M.A.; SILVEIRA, S.A.; ARAÚJO, M.B. Parasitism of the vena cava and adrenal veins in chronic chagasic patients. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 52, p. 31-33, 1989.

TEXEIRA, M.G.; BORGES-PEREIRA, J.; NETIZERT, E.; SOUZA, M.L.; PERALTA, J.M. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. **Trop. Med. Parasitol.** v. 45, p. 308-312, 1994.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. **Anal. Biochem.** v. 27, p.502-522, 1969.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of disease caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspec. Med.** v. 25, p. 211-220, 2004.

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

VANDERHEYDEN, M.; BARTUNEK, J.; KNAAPEN, M.; KOCKX, M.; DE BRUYNE, B.; GOETHALS, M. Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine generation in heart failure. **J. Heart Lung Transpl.** v. 23, p. 723-728, 2003.

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

- VUOLTEENAHO, K.; MOILANEN, T.; HAMALAINEN, M.; MOILANEN, E. Effects of TNF- α antagonists on nitric oxide production in human cartilage. **Osteoar. Cart.** v. 10, p. 327-332, 2002.
- WENZEL, S.; TAIMOR, G.; PIPER, H.M.; SCHLUTER, K.D. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF- β expression in adult ventricular cardiomyocytes. **FASEB J.** v. 15, p. 2291-2293, 2001.
- WILHELM FILHO, D.; MARCON, J.L.; TORRES, M.A.; FRAGA, C.G.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in vertebrates: emphasis on fish and mammals. **Trends Comp. Biochem. Physiol.** v. 7, p. 33-45, 2000.
- WILHELM FILHO, D.; GONZÁLEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 27, p.2879-2882, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas' disease**, WHO Tech. Rep. Ser. No. 811, WHO:Genova, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Chagas' disease, Chili. **Weekly Epidemiological Record**, Genova; WHO, v. 75, p.10-11, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, site: www.who.int/health-topics/chagas.htm acessado em: 15/09/2004.
- XAVIER, S.S. Estudo longitudinal da morbi-mortalidade cardiaca da doença de Chagas em uma coorte de um grande centro urbano: análise clínica eletrocardiográfica, radiológica e ecocardiográfica de 604 casos. Rio de Janeiro : UFRJ, 1999. 181pp. Tese. (Doutorado em Cardiologia). Programa de pós-graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- XU, G.L.; WANG, S.C.; GU, B.Q.; YANG, X.Y.; SONG, H.B.; XUE, W.L. LIANG, W.S.; ZHANG, P.Y. Further investigation on the role of selenium deficiency in the aetiology and pathogenesis of Keshan disease. **Biomed. Environ. Sci.** v. 10, p. 316-326, 1997.
- YEH, E.; WILLERSON, J. Coming of age of c-reactive protein: using inflammation parameters in cardiology. **Circ.** v. 107, p. 370-377, 2003.
- YOSHIDA, W.B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Cir. Vasc. Angiol.** v. 12, p. 82-95, 1996.
- YÜCEL, D.; AYDOĞDU, S.; ÇEHRELI, S.; SAYDAM, G. CANATAN, H.; SENES, M.; TOPKAYA, Ç. B.; NEBİOĞLU, S. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. **Clin. Chem.** v. 44, p. 44-51, 1998.

9 ANEXO

PROGRAMA CARDIO/CHAGAS /HU-UFRJ

* IDENTIFICAÇÃO

01- Nome

.....

02- N° Prontuário

03- Data de Nascimento

04-Raça

(1) Negra

(2) Outra

05- Sexo

(1) Masculino

(2)Feminino

06-Naturalidade

07-Data da Avaliação Inicial

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

* SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

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

(1)-Sim

(2)-Não

Dispnéia / dificuldade de respirar

-caminhando depressa no plano ou em active 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

Frequência cardíaca 91 a 110 bpm

1

mais de 111 bm

2

Estertores nas bases pulmonares

1

Estertores nas bases e ápices pulmonares

2

Pressão venosa jugular aumentada isolada

1

Pressão venosa jugular aumentada associada a edema

2

Pressão venosa jugular aumentada associada a hepatomegalia

2

Distensão dos vasos dos lobos superiores no Rx de Torax

1

Edema intersticial pulmonar

2

Edema intersticial pulmonar + derrame pleural

2

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

1-Pressão venosa jugular aumentada isolada

2-Pressão venosa jugular aumentada associada a edema ou ascite

3-Pressão venosa jugular aumentada associada a hepatomegalia

11-Diag. de IC Biventricular (fadiga + PVC ↑ e/ou 1 e/ou 2 e/ou 3)
 Presença de fadigabilidade e aumento da pressão venosa jugular associada a:
 1-edema e/ou ascite
 2-hepatomegalia
 3-dispnéia e/ou estertores crepitantes

12-Diagnóstico de Insuficiência Cardíaca Biventricular predominio a Direita

13-Diag. de Insuficiência Cardíaca Biventricular predominio a Esquerda

14-Diag. de Hipoatividade simpática
 -ausência de ansiedade, ausência de transpiração, bradicardia, hipotensão

15-Diag. de Hiperatividade simpática
 -taquicardia, sudorese, palidez cutâneo-mucosa, pele fria, não-hipotensão

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

-*Palpitação*

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

-*Pré-síncope*

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

-*Síncope*

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

-*Morte Súbita Ressuscitada*

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

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

-*Bradicardia Sinusal persistente e inapropriada*

-*Pausas sinusais prolongadas*

-*Bloqueio sinoatrial*

-*Ritmo juncional de escape*

-*Síndrome taqui-bradicardia*

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

1-*Morte Súbita como primeira manifestação de cardiopatia*

2-*Portadores de Taquicardia Ventricular Sustentada Recorrente*

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

19-Diagnóstico de Embolia Sistêmica ou Pulmonar

20-Diagnóstico de AVC

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

21-Dor torácica

1-Angina Típica: Todas as respostas positivas

2-Angina Atípica : 2 das 3 respostas positivas

3-Dor Não Anginosa: 1 resposta só positiva

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

-sintomas são previsíveis ?

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

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

-Odinofagia / Disfagia / soluço

Você sente dor ou dificuldade para engolir alimentos ou soluços?

-Regurgitação

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

-Tosse

Você costuma tossir muito à noite?

-Constipação

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

-Sialose

Você costuma ter salivação excessiva principalmente durante alimentação?

-Meteorismo

Presença incômoda de gases/plenitude e/ou distensão abdominal

-Disquezia

Você tem dificuldade para evacuar (sensação de ânus estreitado)

-Dores no Abdome

* HÁBITOS

23-Diagnóstico de Tabagismo

1-Nunca Fumou

2-Fumante (1 ou mais maço/dia)

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

4-Eventualmente

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

(1)-Sim (2)-Não

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

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

-Se se sente culpado pela maneira com que costuma beber

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

25-Você atualmente pratica alguma atividade física regular

de duração de 20 min por 3 vezes na semana ?

26-Você está trabalhando atualmente ?
 (1)-Sim (2)-dona de casa (3)-estudante (4)-aposentado
 (5)-incapacitado (6)-afastado (em benefício) (7)-desempregado

27-Seu grau de atividade física no trabalho é
 (1) leve (2) moderado (3) pesado (4) Não se aplica

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

* HISTÓRIA DE RESIDÊNCIA

29- Número de Locais de residência
 Pergunte sobre os locais de residência desde o nascimento

30-Você já morou em casa com: telhado de palha ou palmeira, chão de terra batida e paredes de barro? (ou similar)
 (1) Sim no Rio; (2) Sim em outro estado; (3) Se (1)+(2); (4) Não

* ESCOLARIDADE

31-Que nível de escolaridade você chegou a completar?
 1-Analfabeto
 2-Nunca foi a escola mas sabe ler e escrever
 3-Primeiro grau incompleto
 4-Primeiro grau completo
 5-Segundo grau incompleto
 6-Segundo grau completo
 7-Terceiro grau (curso universitário) completo

* HISTÓRIA FAMILIAR

32-Familiares que você tem ou teve com :
 (1)-Doença do Coração (2)-Acidente Vascular Cerebral
 (3)-Dilatação do esôfago/ intestino (4)-Alcoolismo (5)-Se 1+2 (6)-Se 1+3
 (7)-Se 1+4 (8)-Se 2+3 (9)-Se 2+4 (10)-Se 3+4 (11)-Se 1+2+3 (12)-Se 1+2+4 (13)-
 Se Outra-especifique (14)

33-Na sua família alguém morreu de :
 (1)-Doença do Coração (2)-Morte súbita (3)-Derrame (4)-Doença mal definida (5)-
 Tem alguém na sua família com marcapasso ?

34-Quantas vezes você recebeu transfusão de sangue ?
 (1) Nunca (2) < de 5 (3) > de 5

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

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

* MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

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

37-Índice de massa corporal (peso/altura²)
(1)-Peso normal (2)-Sobrepeso (3)-Obeso

38-Relação cintura/quadril

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

40-Pressão de pulso

• EXAME FÍSICO

•

(1) Sim (2) Não

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

42-Sopros regurgitante Mitral e/ou Tricúspideo

* AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

(1) Sim (2) Não

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

1-Índice cardio-torácico $\geq 0,50$

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

ou

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

4-Índice do diâmetro do atrio esquerdo ≥ 25 mm

44-Normal

45-Compatível com ICC

*ALTERAÇÕES NO ECG DE REPOUSO CONVENCIONAL

(1)-Sim (2)-Não

46-Normal

47-BAV 1 grau+Alt de ST-T

48-BRE

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

* MONITORIZAÇÃO CONTÍNUA DO ECG DURANTE EXERCÍCIO

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

- 59-Ext Vent Polimórfica
- 60-Ext Vent Pareada
- 61-Taqui Vent Monomórfica Não Sustentada
- 62-Bigeminismo Ventricular

*ELETROCARDIOGRAFIA DINÂMICA (HOLTER)

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

* ECOCARDIOGRAMA Bi-Doppler
(1)-Sim (2)-Não

- 83-Normal
- 84-Déficit segmentar localizado

- 85-Déficit segmentar difuso
- 86-Disfunção sistólica de VE leve
- 87-Disfunção sistólica de VE moderada
- 88-Disfunção sistólica de VE grave
- 89-Regurgitação Mitral
- 90-Regurgitação Trícuspide
- 91-Aneurisma Apical
- 92-Hipertrofia concêntrica
- 93-Disfunção Diastólica
- (1)-Ausente (2)-Padrão de déficit de relaxamento
(3)-Padrão Restritivo (4)-Padrão Pseudo-normalização
- 94-Variabilidade R-R
- (1) Baixa (2) Alta
- 95-Índices Parassimpáticos
- (1) Normais (2) Alterados
- 96-Arco Reflexo Baroreceptores (Tilt)
- (1) Integros (2) Exarcebados (3) Paradoxal
- 97-Cintilografia Miocárdica marcada com leucócitos
- (1) Normal (2) Anormal (3) Não Fez
- 98-Cintilografia Miocárdica com MIBG
- (1) Normal (2) Anormal (3) Não Fez
- 99-Eletrocardiograma de Alta Resolução
- (1) Normal (2) Anormal (3) Não Fez
- 100-Estudo Eletrofisiológico
- (1) Normal (2) Anormal
- *MEDICAMENTOS
- (1)-Sim (2)-Não
- 101-Diurético 102-
- Digital
- 103-Vasodilatador
- 104-Espironactona
- 105-Anticoagulante Oral
- 106-Antiarrítmico
- 107-Beta bloqueador
- 108-Reabilitação Cardíaca
- *Doenças Associadas Cardíacas
- (1)-Sim (2)-Não
- 109-Cardiopatía Isquêmica

110-Cardiopatia Hipertensiva		<input type="checkbox"/>	
111-Marca-passo		<input type="checkbox"/>	
112-Cardio/desfibrilador		<input type="checkbox"/>	
113-Valvopatias		<input type="checkbox"/>	
114-Cardiopatia Dilatada Não Chagas		<input type="checkbox"/>	
115-Cardiopatia Congênita		<input type="checkbox"/>	
*Doenças Associadas Não Cardíacas			
116-Diabetes		<input type="checkbox"/>	
117-Disfunção Tireoidiana		<input type="checkbox"/>	
118-Disfunção Respiratória		<input type="checkbox"/>	
119-Doença péptica		<input type="checkbox"/>	120-
Nefropatia	<input type="checkbox"/>		
121-Neoplasias		<input type="checkbox"/>	
122-Dislipidemia		<input type="checkbox"/>	
* EXAMES LABORATORIAIS :			
123-Hematócrito (%)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
124-Sódio (mEq/l)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
125-Glicose(mEq/l)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
126-Creatinina (mEq/l)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
127-Colesterol Total (mEq/l)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
128-HDL-Colesterol		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
129-LDL-Colesterol		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
130-Triglicérideo		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
131-Albuminas		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
132-Globulinas		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
133- Via de infecção		<input type="checkbox"/>	
(1)-Natural (2)-Transfusão (3)-Congênita (4)-Laboratório (5)-Outros			
134-Diagnóstico laboratorial		<input type="checkbox"/>	
(1)-Imunofluorescência (2)-Hemaglutinação (3)-Elisa (4) Se 1+2 (5) Se 1+3 (6) Se 2+3			
* IMPRESSÃO FINAL			
(1)-Sim	(2)-Não		
135-Cardiopatia Chagásica Dilatada		<input type="checkbox"/>	
136-Cardiopatia Chagásica Não-Dilatada		<input type="checkbox"/>	
137-Esôfagopatia		<input type="checkbox"/>	
138-Colopatia		<input type="checkbox"/>	
139-Forma Clínica		<input type="checkbox"/>	
1-Crônica Indeterminada			
2-Cardiopatia Crônica sem ICC (Disfunção de VE)			

3-Cardiopatia Crônica com ICC

140-Classificação de Los Andes (estágio evolutivo)



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

Comentários:

Anexo

Paciente No |_|_|_|

Termo de Consentimento livre esclarecido

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

Instituição: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-UFRJ

Investigador: Dr. Roberto Coury Pedrosa

Telefone: 25622618

1. INTRODUÇÃO

Neste momento você está tendo a opção de participar de um estudo cujo objetivo é verificar a suas defesas naturais (antioxidantes e o estresse oxidativo) contra a doença de Chagas. Antes de você decidir participar deste estudo, é importante que você leia as informações a seguir, referente ao estudo para o qual você está sendo convidado a participar. O investigador do estudo discutirá com você as dúvidas que você tenha sobre este consentimento ou sobre o estudo.

2. PROPOSTA DO ESTUDO

A Doença de Chagas aflige entre 16 e 18 milhões de pessoas no continente americano infectadas com *Trypanossoma cruzi*, e aproximadamente 120 milhões estão sobre risco de contaminação (WHO, 2000). Dados do Ministério da Saúde indicam que aproximadamente 30% das pessoas infectadas desenvolvem cardiopatias, destas 10% na forma grave.

O presente estudo pretende avaliar o *status* antioxidante e o estresse oxidativo no sangue de pacientes com cardiopatia chagásica crônica nos vários estágios evolutivos, aspecto ainda não devidamente contemplado na literatura, e de grande relevância clínica. Dados preliminares de projeto piloto em execução indicam que os níveis intraeritrocitários de GSH dos pacientes em estágios iniciais da doença apresentam valores superiores àqueles de pacientes em estágios mais avançados. Desta forma, a progressão da doença implicaria em um maior estresse oxidativo vinculado à sua propensão. O uso de antioxidantes, tipo vitamina C ou E pode ter um papel importante de prevenção ou atenuação neste quadro de estresse oxidativo.

3. DURAÇÃO DO ESTUDO E NÚMERO DE INDIVÍDUOS

Você será um dos 90 indivíduos que irão participar deste estudo o qual estará sendo realizado em 2 centros universitários no Brasil. A duração esperada deste estudo é de aproximadamente 12 meses.

Mulheres com possibilidade de engravidar podem participar deste estudo, assim como as que estão utilizando métodos anticoncepcionais adequados, inclusive métodos de barreira. Mulheres que estiverem amamentando e mulheres grávidas não devem participar do estudo. Você não poderá doar sangue durante o estudo e nem durante um mês após sua finalização

4. PROCEDIMENTO A SEREM SEGUIDOS

O período deste estudo clínico é de aproximadamente 12 meses e você será solicitado a comparecer a este hospital para realizar apenas 1 visita no total. Nesta visita, você passará por um exame clínico que inclui um raio-X do tórax, um eletrocardiograma e um ecocardiograma. (caso já não os tenha feito previamente). Você deverá fornecer uma amostra de sangue. Este sangue coletado será enviado para os laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina onde será analisado. Caso ocorra alguma alteração em seus exames anteriores, o médico do estudo pode solicitar uma repetição destes exames. Para sua própria segurança, não tome nenhum medicamento (mesmos aqueles vendidos sem receita médica) que não tenha sido prescrito ou aprovado pelo médico responsável por este estudo. Você terá toda liberdade de vir ao ambulatório para resolver qualquer dúvida junto ao seu médico assistente. É importante também que você informe ao seu médico qualquer mudança ou problema que ocorra durante este estudo, incluindo qualquer sintoma desagradável ou diferente que se manifeste, bem como a melhora que for observada.

5. RISCOS E DESCONFORTOS

A coleta de sangue implica em uma dor leve durante a picada e eventualmente no surgimento de um pequeno hematoma no local, em raros casos, uma infecção no local da coleta poderá ocorrer. Em pessoas mais sensíveis, a coleta por si só pode causar desmaios.

6. EXCLUSÃO DO ESTUDO

Existem neste estudo critérios de inclusão e exclusão que serão discutidos pelo investigador com você. Você estará excluído deste estudo caso não os preencha. O investigador deste estudo pode, a qualquer momento, retirar você do mesmo, sem seu consentimento, se você

voluntariamente desobedecer as orientações do estudo, como faltar constantemente às consultas ou faltar constantemente ao exames

Você pode optar por não fazer parte deste estudo ou descontinuar a sua participação no mesmo a qualquer momento, sem que isto acarrete em prejuízos para seu tratamento atual ou futuro.

7. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO

O custo de todos os testes, exames e cuidados médicos necessários, como parte deste estudo, serão cobertos, sem nenhum custo para você. Outros pacientes podem vir a se beneficiar dos resultados deste estudo.

É possível, entretanto, que nenhum benefício à sua saúde ocorra durante ou após o estudo ser completado.

8. CONFIDENCIALIDADE

-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, 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.

9. 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.

10. RESPOSTAS ÀS PERGUNTAS SOBRE ESTE ESTUDO

Se durante o estudo clínico você tiver problemas ou gostaria de esclarecer alguma dúvida sobre a conduta deste estudo, entre em contato com o:

Dr Roberto Coury Pedrosa -pelo telefone:25622618

11. 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 orienta-lo sobre as possíveis opções.

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO

Eu recebi uma cópia deste acordo de consentimento livre e esclarecido, li e compreendi este documento, na qual foram me informados todos os dados importantes sobre a conduta deste estudo. Foi me oferecido ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram totalmente. Se eu não participar ou se eu decidir suspender minha participação neste estudo, não serei penalizado e não renunciarei de quaisquer direitos legais. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do paciente

Assinatura do investigador

Data: __/__/__

Data: __/__/__