

# Carvedilol Atenua o Estresse Oxidativo na Cardiopatia Chagásica Crônica

## Carvedilol Attenuates Oxidative Stress in Chronic Chagasic Cardiomyopathy

Patrícia Budni<sup>1</sup>, Roberto Coury Pedrosa<sup>2,3,4</sup>, Thais Regina Garlet<sup>1</sup>, Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>1</sup>, Juliana Bastos Dalmarco<sup>5</sup>, Manuel Rosa de Oliveira Lino<sup>1</sup>, Edésio Luiz Simionato<sup>5</sup>, Jorge Antônio Amara<sup>6</sup>, Tânia Sílvia Frode<sup>1</sup>, Danilo Wilhelm Filho<sup>1</sup>

Universidade Federal de Santa Catarina<sup>1</sup>; Instituto do Coração Edson Saad<sup>2</sup>; Universidade Federal do Rio de Janeiro<sup>3</sup>; Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, RJ<sup>4</sup>; Universidade Regional de Blumenau<sup>5</sup>; Hospital Universitário de Santa Catarina<sup>6</sup>, SC, Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Há cada vez mais evidências sugerindo que doença de Chagas envolve dano oxidativo e contribui para a progressão da doença cardíaca.

**Objetivo:** Avaliar o efeito do carvedilol sobre marcadores de estresse oxidativo na doença de Chagas crônica.

**Métodos:** A população de estudo incluiu 42 pacientes com cardiopatia chagásica e os biomarcadores de estresse oxidativo foram medidos antes e após um período de seis meses de tratamento com carvedilol (37,5 mg/dia). Os pacientes foram considerados de acordo com a classificação de Los Andes, e a atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, S-transferase e redutase, mieloperoxidase e adenosina deaminase; e os níveis de glutathione reduzida, de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, proteína carbonil, vitamina E e óxido nítrico foram medidos no sangue.

**Resultados:** Após o tratamento com carvedilol, todos os grupos apresentaram reduções significativas nos níveis de proteína carbonil e glutathione reduzida, enquanto os níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina aumentaram significativamente somente no grupo IA. Além disso, a maioria das enzimas antioxidantes apresentou diminuição de suas atividades, nos grupos IA e IB.

**Conclusão:** Os dados sugerem que o tratamento com carvedilol foi eficaz na atenuação do dano oxidativo, um efeito que pode ser particularmente importante em doença de Chagas crônica com cardiopatia. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):218-224)

**Palavras-chave:** Antagonistas de receptores adrenérgicos beta 1, estresse oxidativo, cardiomiopatia chagásica, doença de chagas.

### Abstract

**Background:** There is increasing evidence suggesting that Chagas' disease involves oxidative damage and contributes to heart disease progression.

**Objective:** To evaluate the effect of carvedilol on oxidative stress markers in chronic Chagas' disease.

**Methods:** The study population included 42 patients with Chagas cardiomyopathy and oxidative stress biomarkers were measured before and after a period of six months of treatment with carvedilol (37.5 mg/day). Patients were considered according to the Los Andes classification and the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, S-transferase and reductase, myeloperoxidase and adenosine deaminase; levels of reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive species, carbonyl protein, vitamin E and nitric oxide were measured in blood.

**Results:** After treatment with carvedilol, all groups showed significant reductions in levels of carbonyl protein and reduced glutathione, whereas the levels of nitric oxide and adenosine activity increased significantly only in group IA. Moreover, most of the antioxidant enzymes showed decrease in activity in groups IA and IB.

**Conclusion:** The data suggest that treatment with carvedilol was effective in attenuating oxidative damage, an effect that may be particularly important in patients with chronic Chagas' disease cardiomyopathy. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):218-224)

**Keywords:** Adrenergic beta-1 receptor antagonists; oxidative stress; chagas cardiomyopathy; Chagas' disease.

### Correspondência: Patricia Budni •

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Cidade Universitária – Trindade – 80040-900 – Florianópolis, SC – Brasil  
E-mail: budnip@gmail.com

Artigo recebido em 14/06/11, revisado recebido em 15/08/11; aceito em 20/09/11.

### Introdução

A Doença de Chagas (DC) é associada à infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) e tem uma ampla distribuição nas Américas Central e Latina. Estima-se que entre oito e 15 milhões de pessoas estão infectadas no continente, e que cerca de dois a três milhões sejam brasileiros<sup>1,2</sup>.

O período indeterminado representa a forma crônica mais comum da doença, com cerca de 70% dos casos, geralmente com duração de 10 a 30 anos, mas, em geral, pode persistir ao longo da vida<sup>3</sup>. No entanto, essa forma pode ser considerada como pertencente à categoria dos pacientes com potencial envolvimento cardíaco<sup>4</sup>. O acometimento cardíaco é a consequência mais frequente e grave do DC crônica, com mortalidade ambulatorial anual estimada em torno de 4%<sup>5</sup>.

O estresse oxidativo é comum em doenças inflamatórias, incluindo DC, que é caracterizada por inflamação crônica<sup>6</sup>. Recentemente, nosso grupo mostrou que um aumento do estresse oxidativo está associado à progressão da DC, e que o uso de intervenção antioxidante foi eficaz de atenuar a progressão da doença<sup>7,8</sup>. O carvedilol atua como um beta1-bloqueador adrenérgico, um vasodilatador e como um antioxidante, sendo considerado um potente agente cardioprotetor, como demonstrado em vários modelos experimentais de isquemia<sup>9</sup>. A ação protetora do carvedilol é superior à de outros betabloqueadores em doses equivalentes<sup>10</sup>. O efeito antioxidante tem sido atribuído largamente à sua estrutura carbazol, e metabólitos hidroxilados têm sua capacidade antioxidante maior quando comparados ao próprio carvedilol<sup>11</sup>.

O conceito de que o tratamento com carvedilol pode influenciar o curso da DC tem recebido mais apoio nos últimos tempos; contudo, suas propriedades antioxidantes têm sido muito pouco exploradas nessa doença, apesar das evidências de sua atividade antioxidante em modelos experimentais *in vitro*<sup>12</sup>. O carvedilol parece atuar como um antioxidante, através de doação de elétrons diretamente às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN)<sup>13</sup>.

### Métodos

#### Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de intervenção terapêutica, prospectivo, de uma amostra pertencente a uma coorte aberta, constituída de pacientes acompanhados no Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho HUCFF-UFRJ. Os biomarcadores de estresse oxidativo foram medidos antes e após seis meses de tratamento com carvedilol (divididos em três doses de 12,5 mg ao dia, compreendendo uma dose final diária de 37,5 mg).

#### Seleção dos pacientes

A amostra do estudo foi composta de pacientes que se encontravam na fase crônica da doença cardíaca, definida segundo exame eletrocardiográfico e ecocardiograma, que tivessem seguido o fluxograma de atendimento do ambulatório de doença de Chagas do HUCFF-UFRJ, de forma espontânea. Foram incluídos os pacientes com idade entre 21 e 70 anos

acompanhados ativa e regularmente no ambulatório de cardiopatia chagásica do Serviço de Cardiologia do HUCFF com diagnóstico de doença de Chagas, e que mantiveram os mesmos hábitos alimentares. Somente foram incluídos pacientes chagásicos crônicos sem outras doenças associadas, afastados da zona endêmica há mais de 20 anos. O projeto do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUCFF-UFRJ, atendendo às diretrizes nacionais e internacionais para pesquisa em seres humanos (Resolução n° 1996 do Conselho Nacional de Saúde), que regulamentam experimentos envolvendo pessoas (parecer CEP n° 053/07). Todos os pacientes receberam informações sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento informado, livre e esclarecido.

Os pacientes foram acompanhados pela mesma equipe de médicos. Visitas médicas foram agendadas no ambulatório regularmente, com intervalo médio de quatro meses, e, quando necessário, os pacientes eram submetidos a uma avaliação bioquímica, incluindo testes de função da tireoide. Pacientes com hipertensão arterial, doença pulmonar obstrutiva crônica, cardiomiopatia de qualquer outra origem que não chagásica, doença cardíaca valvar, disfunção da tireoide, consumo excessivo de tabaco/álcool, conhecidas disfunções imunológicas, anormalidades nos eletrólitos séricos (potássio e cálcio) ou doença sistêmica foram excluídos do estudo. Todos os pacientes encontravam-se clinicamente estáveis por pelo menos três meses no momento em que a amostra de sangue para este estudo foi coletada. A dieta dos pacientes foi pobre quanto a antioxidantes nutricionais mais importantes e, portanto, a ingestão de vitaminas C e E foi considerada negligenciável. Medicações que alteravam o equilíbrio hidroeletrólítico foram interrompidas por 48 horas antes das análises laboratoriais e clínicas, e não houve intercorrências clínicas durante esse período.

Os pacientes foram considerados de acordo com a classificação modificada de Los Andes<sup>14</sup> em quatro grupos: 10 pacientes no grupo IA (eletrocardiograma e ecocardiograma normais: sem envolvimento do coração); 20 pacientes do grupo IB (eletrocardiograma normal ou limítrofe e ecocardiograma anormal: ligeiro envolvimento cardíaco); oito pacientes no grupo II (eletrocardiograma e ecocardiograma anormal, sem insuficiência cardíaca: moderado envolvimento cardíaco); e quatro pacientes no grupo III (eletrocardiograma e ecocardiograma anormal com insuficiência cardíaca: grave envolvimento cardíaco).

#### Diagnóstico sorológico da doença de Chagas

O diagnóstico sorológico da doença de Chagas foi realizado em todos os pacientes, mediante pesquisa de anticorpos *anti-T. cruzi*, utilizando dois métodos. A diluição considerada reação sorológica positiva foi a estabelecida pelo laboratório do centro de referência de Manguinhos-Fiocruz (RJ).

O paciente soropositivo foi aquele com dois testes sorológicos positivos, em duas coletas diferentes. No caso de dúvidas entre os métodos, as amostras de soro foram retestadas pelo método de imunofluorescência e, persistindo a discrepância, foi considerado o resultado desse método. O sangue foi coletado sempre pela mesma pessoa, no mesmo dia da semana, na parte da manhã e em jejum.

### Fármacos e reagentes

O fármaco Carvedilol, (RS)-1-(9H-carbazol-4-iloxi)-3-[2-(2-etoxifenoxil) etilamino] propan-2-ol, foi gentilmente cedido pelo laboratório Farmacêutico do Estado de São Paulo (Brasil), grupo EMS Sigma Farma.

Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

### Preparação das amostras

Amostras de sangue foram obtidas em tubos previamente refrigerados à temperatura de 10 °C, contendo heparina como anticoagulante, ou sem heparina para obtenção de soro. Plasma, soro e extratos ácidos foram armazenados em nitrogênio líquido até a análise dos parâmetros. As avaliações enzimáticas foram realizadas em amostras hemolisadas, enquanto os níveis de GSH foram obtidos nos extratos ácidos no sangue total. Substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico e (TBARS) e conteúdo de proteína carbonilada (PC) foram analisados no plasma.

### Ensaio das enzimas antioxidantes

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada pela velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10 mM) em 240 nm<sup>14,15</sup>. Atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em 480 nm de acordo com o método de auto-oxidação da adrenalina<sup>16</sup>. Atividade da Glutathione Redutase (GR) foi determinada em 340 nm, pela medida da razão de oxidação de NADPH<sup>17</sup>. Glutathione Peroxidase (GPx) foi determinada em 340 nm, pela redução de tert-butilhidroperóxido pela oxidação de glutathione reduzida (GSH)<sup>18</sup>. Atividade da Glutathione S-transferase (GST) foi determinada em 340 nm usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como substrato de acordo com Habig e cols.<sup>19</sup>. Todas as atividades foram realizadas nos hemolisados e expressas em mililitro de sangue total.

### Ensaio da Glutathione reduzida (GSH)

GSH é um tripeptídeo endógeno com importante atividade antioxidante que previne o dano oxidativo a importantes componentes celulares causados por ERO, foi medido no extrato ácido a 412 nm, utilizando o método descrito por Beutler e cols.<sup>20</sup>.

### Proteína Carbonilada (PC)

PC é o marcador mais amplamente utilizado para verificar modificação oxidativa das proteínas e foi determinada no soro utilizando o método descrito por Levine e cols.<sup>21</sup>.

### Avaliação da lipoperoxidação (níveis de TBARS)

TBARS é um índice de peroxidação lipídica e estresse oxidativo. Foi determinado espectrofotometricamente a 535 nm no plasma por substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, segundo método descrito por Bird e Draper<sup>22</sup>.

### Determinação de Vitamina E

Determinação de vitamina E no plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV em 292 nm<sup>23</sup>.

### Ensaio dos marcadores Inflamatórios

Os níveis de Óxido Nítrico (NO) foram medidos indiretamente pelo método de Griess<sup>24</sup>. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi analisada de acordo com o método desenvolvido por Rao e cols.<sup>25,26</sup>, enquanto a atividade da Adenosina Desaminase (ADA) foi analisada de acordo com o método de Giusti e Galanti<sup>27</sup>. Todos esses parâmetros foram medidos no soro.

### Análise estatística

As comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo e dos marcadores de dano inflamatório dentro dos diferentes grupos foram realizadas segundo Análise de Variância – ANOVA, a um fator, complementada pelo teste de Tukey–Kramer. Os dados foram analisados pelo método dos modelos lineares generalizados para medidas repetidas. Para todas as análises foi utilizado o Software SPSS versão 11.5.0, adquirido sob licença pela Universidade Federal de Santa Catarina em 6/9/2002. O nível de significância mínimo adotado foi de 5%.

### Resultados

A tabela 1 contém as observações clínicas referentes aos grupos analisados. Dentre os 42 pacientes selecionados no início do estudo, a idade variou de 31 a 67 anos, com média de 58,8 anos, 17 masculinos e 25 pacientes do sexo feminino. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi de 24,3 kg/m<sup>2</sup>.

Os sintomas potencialmente relacionados com esofagopatia ocorreram com maior frequência nos grupos II e III, com significância estatística ( $p < 0,001$ ). Quanto a sintomas potencialmente relacionados à colopatia (constipação > 3 dias), houve apenas diferença significativa do grupo IA (em que 100% dos indivíduos não apresentavam tais sintomas) em relação aos grupos II e III (tab. 1).

A avaliação radiológica mostrou que o índice cardiotorácico aumentou com o grau de comprometimento cardíaco ( $p = 0,0001$ ). Não foram realizadas radiografias de esôfago e/ou enema opaco. O ecocardiograma mostrou fração de ejeção nos pacientes do grupo III significativamente menor do que nos demais grupos ( $p = 0,0001$ ). O diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo foi corrigido para a área da superfície corporal e valores acima de 32 mm/m<sup>2</sup> foram considerados anormais. Com base nesse critério, 12 pacientes apresentaram dilatação do ventrículo esquerdo. O comprometimento miocárdio à direita expresso pela hipertensão pulmonar esteve presente nos pacientes do grupo II e III (tab. 2).

A resposta dos diferentes grupos foi muito semelhante após terapia com o carvedilol. Em todos os grupos foram constatadas diminuições significativas nos níveis de GSH e PC, acompanhadas de uma diminuição não significativa dos níveis de TBARS. Também ocorreu a manutenção dos níveis de vitamina E, e nenhuma alteração nos marcadores inflamatórios, excetuando os níveis de NO e ADA que apresentaram um aumento significativo somente nos pacientes do grupo IA. Com relação ao perfil enzimático, ocorreu uma resposta generalizada de diminuição das atividades, essencialmente em todos

Tabela 1 - Características biométricas e demográficas dos 42 pacientes chagásicos

| Variável                              | IA<br>(n = 10)           | IB<br>(n = 20)           | II<br>(n = 8)            | III<br>(n = 4)           | ANOVA<br>p |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|
| Idade (média ± dp)                    | 58,9 ± 10,2              | 61,8 ± 11,2              | 58,8 ± 11,1              | 59 ± 10,6                | 0,10       |
| Sexo (m/total)                        | 6/10                     | 6/20                     | 4/8                      | 1/4                      | -          |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )              | 25,5 ± 4,2               | 24,1 ± 3,1               | 24,3 ± 4,3               | 23 ± 3,8                 | 0,25       |
| Atividade física regular (%)          | 78                       | 75                       | 60                       | 20                       | -          |
| Constipação > 3 dias (%)              | 0                        | 12,5                     | 35                       | 42                       | -          |
| Disfagia (%)                          | 47,8                     | 37                       | 88                       | 91                       | -          |
| Hemoglobina (g/dL)                    | 13,3 ± 1,2               | 13,8 ± 1,1               | 12,8 ± 1,6               | 10 ± 1,8                 | 0,11       |
| Creatinina (mg/dL)                    | 0,9 ± 0,6                | 1,1 ± 0,3                | 0,9 ± 0,4                | 1,0 ± 0,3                | 0,13       |
| TSH (µg/mL)                           | 2 ± 1,2                  | 2,8 ± 0,9                | 3,2 ± 0,7                | 3,1 ± 0,8                | 0,17       |
| Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> ) | 12x10 <sup>3</sup> ± 1,2 | 11x10 <sup>3</sup> ± 1,1 | 13x10 <sup>3</sup> ± 0,9 | 13x10 <sup>3</sup> ± 0,8 | 0,19       |
| Medicamentos                          |                          |                          |                          |                          |            |
| Amiodarona (n)                        | 0                        | 0                        | 2                        | 2                        |            |
| Captopril (n)                         | 0                        | 20                       | 8                        | 4                        |            |

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

Tabela 2 - Dados referentes à radiologia, eletrocardiografia e ecocardiograma dos pacientes chagásicos

| Variável                       | IA<br>(n = 10) | IB<br>(n = 20) | II<br>(n = 8) | III<br>(n = 4) | ANOVA<br>p |
|--------------------------------|----------------|----------------|---------------|----------------|------------|
| <b>Radiografia de Tórax</b>    |                |                |               |                |            |
| Índice cardiotorácico (m ± dp) | 0,45 ± 0,02    | 0,45 ± 0,02    | 0,48 ± 0,04   | 0,52 ± 0,02    | 0,0001*    |
| Compatível com ICC (%)         | 0              | 0              | 20            | 100            | 0,001♣     |
| <b>Eletrocardiograma</b>       |                |                |               |                |            |
| BCRD (%)                       | 0              | 55,7           | 62,3          | 97,8           | 0,001♥     |
| BCRD+HBAE (%)                  | 0              | 68,9           | 72,1          | 99,1           | 0,003♥     |
| Área inativa (%)               | 0              | 2              | 55            | 89,3           | 0,001♥     |
| <b>Ecocardiograma</b>          |                |                |               |                |            |
| FEVE (%)                       | 65,2           | 61,6           | 42,4          | 37,6           | 0,0001●    |
| IDdfVE (mm/m <sup>2</sup> )    | 28,3 ± 1,8     | 29,2 ± 1,2     | 32,3 ± 4,8    | 35,9 ± 1,9     | 0,001●     |
| Hipertensão Pulmonar (%)       | 0              | 0              | 25            | 44             | 0,001●     |

HBAE - hemibloqueio anterior esquerdo; FEVE - fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IDdfVE - índice diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; BCRD - bloqueio completo do ramo direito; ICC - Insuficiência cardíaca congestiva; Tukey (IA ' III)\*; (IA ' III)♣; (IB ' III)♥; (IA ' III)●.

os grupos. Mais especificamente, houve diminuição significativa da atividade da SOD em todos os grupos estudados, diminuições significativas nos grupos IA e IB das atividades da GPx e GST. Por sua vez, constatou-se a manutenção da atividade da GR e aumentos significativos da CAT somente nos grupos IA e IB. Os níveis de GSH foram significativamente diminuídos em pacientes do grupo IA tratados com carvedilol ( $0,18 \pm 0,12$  mmol mL<sup>-1</sup>) comparados aos pacientes não tratados ( $0,31 \pm 0,17$  mmol mL<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ), enquanto os níveis de TBARS e vitamina E permaneceram inalterados em ambos (tab. 3). No entanto, os níveis de PC mostraram uma diminuição significativa em pacientes tratados com carvedilol ( $0,04 \pm 0,01$  nmol mg<sup>-1</sup>) comparados aos não tratados ( $0,15 \pm 0,07$  nmol mg<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ). Quando comparados dentro do mesmo grupo IA, as atividades das enzimas antioxidantes como SOD, GST e GPx mostraram significativa diminuição comparadas às encontradas

em pacientes não tratados, enquanto a atividade da CAT foi aumentada e a atividade da GR permaneceu inalterada (tab. 4). Em relação aos marcadores inflamatórios, após tratamento com carvedilol houve um aumento significativo nos níveis de NO em comparação aos pacientes não tratados ( $10,93 \pm 3,19$  mM e  $17,96 \pm 3,2$  mM, respectivamente;  $p < 0,05$ ) e atividade da ADA ( $10,03 \pm 1,28$  UI<sup>-1</sup> e  $17,17 \pm 2,5$  UI<sup>-1</sup>, respectivamente;  $p < 0,05$ ), enquanto a atividade da MPO permaneceu inalterada (tab. 3).

Pacientes do grupo IB, tratados com carvedilol, mostraram uma resposta similar quando comparados aos pacientes do grupo IA. Níveis de GSH ( $0,16 \pm 0,13$  mmol mL<sup>-1</sup>) foram também significativamente diminuídos quando comparados aos pacientes não tratados ( $0,22 \pm 0,17$  mmol mL<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ), enquanto os níveis de TBARS e vitamina E permaneceram inalterados em ambos os grupos de pacientes (tab. 3). Da mesma forma como mostrado no

**Tabela 3 - Comparação dentro do mesmo grupo dos níveis de GSH, TBARS e PC, Vitamina E e níveis de •NO, MPO e ADA no sangue de pacientes chagásicos em dois tempos diferentes de tratamento**

|        | Grupo IA (n = 10)   |                            | Grupo IB (n = 20)   |                            | Grupo II (n = 8)    |                            | Grupo III (n = 4)   |                            |
|--------|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|
|        | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento |
| GSH    | 0,31 ± 0,17         | 0,18 ± 0,12*               | 0,22 ± 0,17         | 0,16 ± 0,13**              | 0,29 ± 0,10         | 0,18 ± 0,11*               | 0,38 ± 0,15         | 0,16 ± 0,09*               |
| TBARS  | 13,11 ± 9,98        | 9,5 ± 4,28                 | 10,02 ± 6,18        | 7,71 ± 1,17                | 11,34 ± 4,60        | 8,33 ± 1,55                | 15,19 ± 5,04        | 9,50 ± 2,22                |
| PC     | 0,15 ± 0,07         | 0,04 ± 0,01**              | 0,16 ± 0,19         | 0,05 ± 0,02*               | 0,17 ± 0,07         | 0,05 ± 0,01***             | 0,15 ± 0,06         | 0,05 ± 0,01*               |
| Vit. E | 17,36 ± 8,11        | 12,44 ± 2,85               | 17,12 ± 8,93        | 15,70 ± 4,68               | 19,64 ± 9,25        | 12,24 ± 2,18               | 11,72 ± 3,40        | 11,18 ± 3,83               |
| •NO    | 10,93 ± 3,19        | 17,96 ± 3,2 *              | 11,18 ± 1,38        | 16,07 ± 1,50               | 15,49 ± 3,42        | 18,86 ± 2,60               | 13,17 ± 4,62        | 12,10 ± 1,00               |
| MPO    | 417,3 ± 40,1        | 544,2 ± 70,1               | 430,97 ± 31,53      | 420,7 ± 27,9               | 409,54 ± 80,95      | 352,13 ± 50,36             | 440,92 ± 68,15      | 395,08 ± 60,10             |
| ADA    | 10,03 ± 1,28        | 17,17 ± 2,5 *              | 10,67 ± 1,08        | 15,36 ± 2,29               | 14,02 ± 2,27        | 12,90 ± 2,14               | 10,63 ± 3,52        | 9,05 ± 4,06                |

ADA - adenosina deaminase (U<sup>l</sup>); GSH - glutatona reduzida (μmol mL<sup>-1</sup>); MPO - mieloperoxidase (mU mL<sup>-1</sup>); •NO - óxido nítrico (mM); PC - proteína carbonil (nmol mg<sup>-1</sup>); TBARS - espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (nmol mL<sup>-1</sup>); Vit - Vitamina E (μmol mL<sup>-1</sup>); Valores representam média ± desvio padrão \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 representam diferenças significativas dentro do mesmo grupo chagásico.

**Tabela 4 - Comparação dentro do mesmo grupo da atividade das enzimas antioxidantes no sangue de pacientes chagásicos em dois tempos diferentes de tratamento**

|     | Group IA (n = 10)   |                            | Group IB (n = 20)   |                            | Group II (n = 8)    |                            | Group III (n = 4)   |                            |
|-----|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|
|     | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento | Antes do tratamento | Após 6 meses de tratamento |
| SOD | 144,99 ± 29,00      | 64,04 ± 6,05 ***           | 171,52 ± 41,16      | 66,37 ± 8,56 ***           | 141,26 ± 46,62      | 70,9 ± 11,2 **             | 145,4 ± 44,1        | 69,20 ± 6,54 *             |
| CAT | 8,87 ± 2,55         | 13,27 ± 3,88 *             | 9,21 ± 2,01         | 11,62 ± 4,10 *             | 8,43 ± 3,14         | 9,50 ± 4,06                | 7,54 ± 3,93         | 12,51 ± 6,43               |
| GR  | 5,02 ± 0,71         | 4,78 ± 1,26                | 4,94 ± 1,43         | 4,86 ± 1,70                | 4,76 ± 1,16         | 4,00 ± 1,09                | 4,69 ± 0,81         | 4,73 ± 1,52                |
| GST | 30,61 ± 2,58        | 24,07 ± 3,68*              | 35,41 ± 9,42        | 24,58 ± 9,64 ***           | 34,10 ± 5,64        | 20,81 ± 2,9 ***            | 26,66 ± 7,51        | 23,28 ± 5,33               |
| GPX | 2,35 ± 0,22         | 1,48 ± 0,54 ***            | 2,32 ± 0,35         | 1,49 ± 0,39 ***            | 2,75 ± 0,73         | 2,36 ± 0,35                | 2,48 ± 0,17         | 2,14 ± 0,40                |

CAT - catalase (mmol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>); GPx - glutatona peroxidase (μmol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>); GR - glutatona redutase (μmol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>); GST - glutatona S-transferase (μmol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>); SOD - superóxido dismutase (USOD mL<sup>-1</sup>); Valores representam média ± desvio padrão \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 representam diferenças significativas dentro do mesmo grupo chagásico.

grupo de pacientes IA, valores de PC foram também diminuídos significativamente em pacientes tratados com carvedilol (0,05 ± 0,02 nmol mg<sup>-1</sup>) quando comparados aos pacientes não tratados (0,16 ± 0,19 nmol mg<sup>-1</sup>; p < 0,05). O perfil das enzimas antioxidantes nesse grupo foi também similar ao encontrado no grupo IA, enquanto os marcadores inflamatórios, nesse grupo, permaneceram inalterados (tab. 3, 4).

Nos pacientes classificados como II, o comportamento dos parâmetros analisados foram também muito semelhantes aos dos grupos IA e IB (tab. 3). Níveis de GSH foram significativamente diminuídos nos pacientes tratados com carvedilol quando comparados aos não tratados (0,18 ± 0,11 e 0,29 ± 0,10 mmol mL<sup>-1</sup>, respectivamente; p < 0,05), enquanto não houve diferenças significativas dos níveis de TBARS e vitamina E. Valores de PC foram também diminuídos significativamente após tratamento com carvedilol (0,05 ± 0,01 nmol mg<sup>-1</sup>) comparados aos não tratados (0,17 ± 0,07 nmol mg<sup>-1</sup>; p < 0,001). Após tratamento com o carvedilol, os valores dos marcadores inflamatórios permaneceram inalterados

(tab. 3), as atividades das enzimas SOD e GST diminuíram significativamente, enquanto as atividades das enzimas CAT, GR e GPx não apresentaram diferenças significativas se comparadas aos pacientes não tratados (tab. 4).

Como encontrado em outros grupos, o grupo de pacientes classificados como III mostrou diminuição nos níveis de GSH nos pacientes tratados com carvedilol (0,16 ± 0,09 mmol mL<sup>-1</sup>; p < 0,05) em relação aos pacientes não tratados (0,38 ± 0,15 mmol mL<sup>-1</sup>) (tab. 3). Também de forma semelhante aos valores encontrados nos grupos IA, IB e II, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TBARS e vitamina E, enquanto o marcador de dano às proteínas mostrou novamente diminuição dos valores nos pacientes tratados com carvedilol (0,05 ± 0,01 nmol mg<sup>-1</sup>) comparados aos pacientes não-tratados (0,15 ± 0,06 nmol mg<sup>-1</sup>; p < 0,05) (tab. 3). As atividades da CAT, GR, GST e GPx não foram significativamente diferentes em relação ao tratamento aplicado com carvedilol, porém a atividade da SOD foi diminuída entre os pacientes tratados com carvedilol (69,20 ± 6,54 ml<sup>-1</sup>) em comparação

com não tratados ( $145,44 \pm 44,12$  mL USOD<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ). Similarmente aos resultados obtidos nos grupos IB e II, os marcadores inflamatórios permaneceram inalterados após o tratamento com carvedilol (tab. 3).

### Discussão

No presente estudo, pacientes sem tratamento apresentaram os maiores níveis de biomarcadores de dano a lipídeos (TBARS) e proteínas (PC), juntamente com atividades geralmente mais elevadas das enzimas antioxidantes, que parecem representar a manutenção do perfil de estresse oxidativo relacionado ao comprometimento cardíaco na doença de Chagas.

Aparentemente, o grupo III, considerado o estágio mais grave da insuficiência cardíaca e, portanto, no qual o número de indivíduos participantes foi menor em razão da alta taxa de mortalidade nessa fase, apresentou maior estresse oxidativo em relação aos grupos caracterizados por menor gravidade, especialmente considerando os grupos IA, IB e, em menor medida, também do grupo II. Em um estudo similar realizado por Keith e cols. envolvendo pacientes cardíacos com diferentes graus de comprometimento, os marcadores de dano oxidativo, tais como os peróxidos lipídicos e malondialdeído, além de defesas antioxidantes como os níveis de glutatona, vitaminas E e C, e a atividade da GPx também mostraram uma correlação direta entre esses marcadores e a gravidade da doença<sup>28</sup>. Essa relação já foi demonstrada por nosso laboratório em estudos anteriores, bem como em outros estudos relacionados<sup>29</sup>.

Conforme dados mostrados no presente trabalho, aparentemente os pacientes com menor comprometimento cardíaco e, conseqüentemente, portadores de uma capacidade antioxidante maior (grupos IA e IB) parecem possuir uma maior capacidade de neutralizar o dano oxidativo detectado em seu sangue, uma resposta que parece ser potencializada pelo tratamento com carvedilol. Uma resposta similar já foi detectada por nosso laboratório em pacientes chagásicos após seis meses de suplementação de vitaminas E e C. Em um trabalho com ratos infectados pelo *T. cruzi*, os resultados obtidos foram similares, onde as atividades das enzimas antioxidantes CAT, GPx e GR, bem como os níveis de GSH foram aumentados em resposta à infecção, enquanto ocorria o insulto oxidativo no miocárdio desses animais<sup>30</sup>.

De modo oposto ao verificado na maioria das demais enzimas antioxidantes, foi detectado um aumento da atividade da CAT no sangue dos pacientes pertencentes aos grupos IA e IB. Chow e cols. mostraram que ratos com deficiência de vitamina E diminuíram a atividade da CAT, enquanto as atividades da SOD e GPx não foram alteradas, que estão em conformidade com o presente estudo, sugerindo que a vitamina E na dieta fornece proteção contra a inativação da CAT em tais condições experimentais<sup>31</sup>. Considerando que a beta-oxidação dos lipídios no peroxissomos aumenta a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>32</sup>, e que a vitamina E protege contra a inativação da CAT<sup>33</sup>, o tratamento com carvedilol poderia ser responsável pelo aumento da atividade dessa enzima no sangue desses pacientes.

O carvedilol protege contra a superprodução de ERO nas concentrações de 0,1-100 mM, as quais estão de acordo com a dose (37,5 mg/dia) utilizadas no presente estudo<sup>34</sup>. Os primeiros estudos com esse composto indicaram que o carvedilol é muito mais potente em inibir a produção do radical hidroxila (\*OH) do que outros antagonistas beta-adrenérgicos<sup>35</sup>. Estudos têm mostrado que seus metabólitos hidroxilados também são potentes antioxidantes e podem contribuir para a ação antioxidante global dessa droga, podendo aumentar em 5-10 vezes a sua potência<sup>36,37</sup>. Diversos metabólitos do carvedilol encontrados no plasma humano mostraram uma atividade antioxidante ainda mais acentuada (50-80 vezes maior do que carvedilol) para inibir a oxidação do LDL pelos macrófagos<sup>38</sup>. Assim, é possível que a atividade antioxidante *in vivo* do carvedilol seja atribuída também a seus metabólitos<sup>39</sup>.

Seu potencial antioxidante também pode estar vinculado à sua capacidade de se ligar ao Fe (III) e Cu (II), impedindo a oxidação de lipídios e proteínas mediada por esses metais de transição, o que poderia explicar a diminuição dos biomarcadores de danos em lipídios (TBARS) e proteínas (PC) encontrados no presente estudo, após a terapia com carvedilol. Ao analisar o marcador de dano a proteínas, o carvedilol persistentemente diminuiu a formação de PC quando comparados a pacientes antes do tratamento. Exceto para o grupo classificado como IA, com menor comprometimento cardíaco, todos os marcadores inflamatórios permaneceram inalterados nos outros grupos. Sabe-se que o NO, em combinação com O<sub>2</sub><sup>-</sup> leva à formação de peroxinitrito, um potente oxidante biológico que elimina o *T. cruzi*, de maneira dose-dependente, e que a MPO é uma enzima que participa de reações de defesa imunológica, através da formação de ácido hipocloroso como um mecanismo de defesa contra patógenos<sup>40</sup>. Isso poderia explicar o aumento encontrado nos níveis de NO e da ADA no grupo que possui uma melhor resposta imunológica contra a infecção pelo parasita. Além disso, a cardioproteção do carvedilol poderia estar relacionada tanto à sua capacidade antioxidante, como também na prevenção da infiltração de células inflamatórias no miocárdio isquêmico, bem como na inibição do remodelamento do músculo liso vascular mediante a diminuição da migração e proliferação das células musculares lisas vasculares, como já mostrado em modelo animal.

### Conclusão

Os dados sugerem que o tratamento com carvedilol foi eficaz na atenuação do dano oxidativo causado pela própria doença de Chagas, um efeito que pode ser particularmente importante em doença de Chagas crônica com cardiopatia.

#### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

#### Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

#### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Patrícia Budni pela Universidade Federal de Santa Catarina.

## Referências

1. Dias JCP. Doença de Chagas, ambiente, participação e estado. *Cad Saúde Pública*. 2001;17(supl):S165-9.
2. Duarte JD, Magalhães LP, Santana OO, Silva LB, Simões M, Azevedo DO, et al. Prevalence and prognostic value of ventricular dyssynchrony in chagas cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(4):300-6.
3. Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1989;22(3):147-56.
4. Pinto Dias JC. The treatment of Chagas' disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med*. 2006;144(10):772-4.
5. Organización Panamericana de la Salud (OPAS). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo (Uruguay): PAHO Publishing; 2006. p. 1-28.
6. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Pinho-Filho JA, Mota AC, Almeida AJ, et al. Bone marrow cell transplantation in Chagas' disease heart failure: report of the first human experience. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(4):325-31.
7. de Oliveira TB, Pedrosa RC, Filho DW. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol*. 2007;116(3):357-63.
8. Maçao LB, Wilhelm-Filho D, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *Int J Cardiol*. 2007;123(1):43-9.
9. Feuerstein GZ, Ruffolo RR Jr. Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection. *Eur Heart J*. 1995;16(Suppl F):38-42.
10. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334(21):1349-55.
11. Yue TL, McKenna PJ, Lysko PG, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Carvedilol, a new antihypertensive, prevents oxidation of human low density lipoprotein by macrophages and copper. *Atherosclerosis*. 1992;97(2-3):209-16.
12. Donetti E, Soma MR, Barberi L, Paoletti R, Fumagalli R, Roma P, et al. Dual effects of the antioxidant agents probucol and carvedilol on proliferative and fatty lesions in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 1998;141(1):45-51.
13. Ferrari R, Agnoletti L, Ceconi C, Curello S, Nesta F, Manfredini R. Endothelial dysfunction in congestive heart failure: effects of carvedilol. *Arq Bras Cardiol*. 1999;4(1):53-63.
14. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 2007;298(18):2171-81.
15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
16. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-5.
17. Calberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113:484-90.
18. Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.
19. Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1976;249(22):7130-9.
20. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-8.
21. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.
22. Bird RP, Draper AH. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods Enzymol*. 1984;90:299-305.
23. Nicoletti G, Crescibene L, Scornaienchi M, Bastone L, Bagalà A, Napoli ID, et al. Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Arch Gerontol Geriatr*. 2001;33(1):7-12.
24. Fröde-Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides*. 1999;20(2):259-65.
25. Rao TS, Currie JL, Shaffer AL, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*. 1993;17(6):723-41.
26. Fröde TS, Medeiros YS. Myeloperoxidase and adenosine deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm*. 2001;10(4):223-7.
27. Giusti G, Galanti B. Colorimetric method: adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU. (ed.). *Methods enzymatic analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. Weinheim: Verlag Chemie; 1984. p. 315-23.
28. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(6):1352-6.
29. Péres-Fuentes R, Guegan JF, Barnabé C, López-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol*. 2003;33(3):293-9.
30. Wen JJ, Vyatkina G, Garg N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(11):1821-33.
31. Chow CK. Glucose and dietary vitamin E protection against catalase inactivation in 651 the red cells of rats. *Int J Vitam Nutr Res*. 1980;50(4):364-9.
32. Chow CK. Oxidative damage in the red cells of vitamin E-deficient rats. *Free Radic Res Commun*. 1992;16(4):247-58.
33. Tardif JC, Gregoire J, Schwartz L, Title L, Laramée L, Reeves F, et al. Effects of AGI-1067 and probucol after percutaneous coronary interventions. *Circulation*. 2003;107(4):552-8.
34. Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Pharmacology of carvedilol: rationale for use in hypertension, coronary artery disease, and congestive heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1997;11(Suppl 1):247-56.
35. Feuerstein GZ, Ruffolo RR Jr. Carvedilol, a novel vasodilating beta-blocker with the potential for cardiovascular organ protection. *Eur Heart J*. 1996;17(Suppl B):24-9.
36. Yue TL, McKenna PJ, Lysko PG, Gu JL, Lysko KA, Ruffolo RR Jr, et al. SB 211475, a metabolite of carvedilol, a novel antihypertensive agent, is a potent antioxidant. *Eur J Pharmacol*. 1994;251(2-3):237-43.
37. Yue TL, Wang X, Gu JL, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Carvedilol, a new vasodilating beta-adrenoceptor blocker, inhibits oxidation of low-density lipoproteins by vascular smooth muscle cells and prevents leukocyte adhesion to smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;273(3):1442-9.
38. Lopez BL, Christopher TA, Yue TL, Ruffolo R, Feuerstein GZ, Ma XL. Carvedilol, a new beta-adrenoreceptor blocker antihypertensive drug, protects against free-radical-induced endothelial dysfunction. *Pharmacology*. 1995;51(3):165-73.
39. Denicola A, Rubbo H, Rodriguez D, Radi R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys*. 1993;304(1):279-86.
40. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1102-11.