

Carvedilol Atenúa el Estrés Oxidativo en la Cardiopatía Chagásica Crónica

Patrícia Budni¹, Roberto Coury Pedrosa^{2,3,4}, Thais Regina Garlet¹, Eduardo Monguilhott Dalmarco¹, Juliana Bastos Dalmarco⁵, Manuel Rosa de Oliveira Lino¹, Edésio Luiz Simionato⁵, Jorge Antônio Amara⁶, Tânia Sílvia Frode¹, Danilo Wilhelm Filho¹

Universidade Federal de Santa Catarina¹; Instituto do Coração Edson Saad²; Universidade Federal do Rio de Janeiro³; Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, RJ⁴; Universidade Regional de Blumenau⁵; Hospital Universitário de Santa Catarina⁶, SC, Brasil

Resumen

Fundamento: Hay cada vez más evidencias sugiriendo que la enfermedad de Chagas envuelve daño oxidativo y contribuye a la progresión de la enfermedad cardíaca.

Objetivo: Evaluar el efecto del carvedilol sobre marcadores de estrés oxidativo en la enfermedad de Chagas crónica.

Métodos: La población de estudio incluyó 42 pacientes con cardiopatía chagásica y los biomarcadores de estrés oxidativo fueron medidos antes y después de un período de seis meses de tratamiento con carvedilol (37,5 mg/día). Los pacientes fueron considerados de acuerdo con la clasificación de Los Andes, y la actividad de la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, S-transferasa y reductasa, mieloperoxidasa y adenosina deaminasa; y los niveles de glutatión reducida, de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, proteína carbonil, vitamina E y óxido nítrico fueron medidos en la sangre.

Resultados: Después del tratamiento con carvedilol, todos los grupos presentaron reducciones significativas en los niveles de proteína carbonil y glutatión reducida, mientras que los niveles de óxido nítrico y actividad de la adenosina aumentaron significativamente solamente en el grupo IA. Además de eso, la mayoría de las enzimas antioxidantes presentó disminución de sus actividades, en los grupos IA e IB.

Conclusiones: Los datos sugieren que el tratamiento con carvedilol fue eficaz en la atenuación del daño oxidativo, un efecto que puede ser particularmente importante en enfermedad de Chagas crónica con cardiopatía. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):218-224)

Palabras clave: Antagonistas de receptores adrenérgicos beta 1, estrés oxidativo, cardiomiopatía chagásica, enfermedad de chagas.

Introducción

La Enfermedad de Chagas (EC) está asociada a la infección causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) y tiene una amplia distribución en las Américas Central y Latina. Se estima que entre ocho y 15 millones de personas están infectadas en el continente, y que cerca de dos a tres millones sean brasileños^{1,2}.

El período indeterminado representa la forma crónica más común de la enfermedad, con cerca de 70% de los casos, usualmente con duración de 10 a 30 años, pero, en general, puede persistir a lo largo de la vida³. Mientras tanto, esa forma puede ser considerada como perteneciente a la categoría de los pacientes con potencial compromiso cardíaco⁴. La afectación cardíaca es la consecuencia

más frecuente y grave de la EC crónica, con mortalidad ambulatoria anual estimada en torno de 4%⁵.

El estrés oxidativo es común en enfermedades inflamatorias, incluyendo EC, que es caracterizada por inflamación crónica⁶. Recientemente, nuestro grupo mostró que un aumento del estrés oxidativo está asociado a la progresión de la EC, y que el uso de intervención antioxidante fue eficaz para atenuar la progresión de la enfermedad^{7,8}. El carvedilol actúa como un beta1-bloqueante adrenérgico, un vasodilatador y como un antioxidante, siendo considerado un potente agente cardioprotector, como es demostrado en varios modelos experimentales de isquemia⁹. La acción protectora del carvedilol es superior a la de otros betabloqueantes en dosis equivalentes¹⁰. El efecto antioxidante ha sido atribuido ampliamente a su estructura carbazol, y metabolitos hidroxilados tienen su capacidad antioxidante mayor cuando son comparados al propio carvedilol¹¹.

El concepto de que el tratamiento con carvedilol puede influenciar el curso de la EC ha recibido más apoyo en los últimos tiempos; con todo, sus propiedades antioxidantes han sido muy poco exploradas en esa enfermedad, a pesar

Correspondencia: Patrícia Budni •

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

Artículo recibido el 14/06/11, revisado recibido el 15/08/11; aceptado el 20/09/11.

de las evidencias de su actividad antioxidante en modelos experimentales *in vitro*¹². El carvedilol parece actuar como un antioxidante, a través de la donación de electrones directamente a las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN)¹³.

Métodos

Delineamiento del estudio

Se trata de un estudio de intervención terapéutica, prospectivo, de una muestra perteneciente a una cohorte abierta, constituida por pacientes controlados en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Clementino Fraga Filho HUCFF-UFRJ. Los biomarcadores de estrés oxidativo fueron medidos antes y después de seis meses de tratamiento con carvedilol (divididos en tres dosis de 12,5 mg al día, comprendiendo una dosis final diaria de 37,5 mg).

Selección de los pacientes

La muestra del estudio fue compuesta de pacientes que se encontraban en la fase crónica de la enfermedad cardíaca, definida según examen electrocardiográfico y ecocardiograma, que hubiesen seguido el flujograma de atención del ambulatorio de enfermedad de Chagas del HUCFF-UFRJ, de forma espontánea. Fueron incluidos los pacientes con edad entre 21 y 70 años controlados activa y regularmente en el ambulatorio de cardiopatía chagásica del Servicio de Cardiología del HUCFF con diagnóstico de enfermedad de Chagas, y que mantuvieran los mismos hábitos alimentarios. Solamente fueron incluidos pacientes chagásicos crónicos sin otras enfermedades asociadas, alejados de la zona endémica hacía más de 20 años. El proyecto del estudio fue aprobado por la Comisión de Ética en Investigación del HUCFF-UFRJ, atendiendo las directrices nacionales e internacionales para investigación en seres humanos (Resolución n° 1996 del Conselho Nacional de Saúde), que reglamentan experimentos envolviendo personas (parecer CEP n° 053/07). Todos los pacientes recibieron informaciones sobre el estudio y firmaron el término de consentimiento informado, libre y esclarecido.

Los pacientes fueron controlados por el mismo equipo de médicos. Visitas médicas fueron marcadas en el ambulatorio regularmente, con intervalo medio de cuatro meses, y, cuando era necesario, los pacientes eran sometidos a una evaluación bioquímica, incluyendo tests de función de la tiroides. Pacientes con hipertensión arterial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cardiomiopatía de cualquier otro origen que no fuese chagásico, enfermedad cardíaca valvular, disfunción de la tiroides, consumo excesivo de tabaco/alcohol, conocidas disfunciones inmunológicas, anomalías en los electrolitos séricos (potasio y calcio) o enfermedad sistémica fueron excluidos del estudio. Todos los pacientes se encontraban clínicamente estables por al menos tres meses en el momento en que la muestra de sangre para este estudio fue colectada. La dieta de los pacientes fue pobre en cuanto a antioxidantes nutricionales más importantes y, por tanto, la ingestión de vitaminas C y E fue considerada descartable. Medicaciones que alteraban

el equilibrio hidroelectrolítico fueron interrumpidas por 48 horas antes de los análisis de laboratorio y clínicos, y no hubo interurrencias clínicas durante ese período.

Los pacientes fueron considerados de acuerdo con la clasificación modificada de Los Andes¹⁴ en cuatro grupos: 10 pacientes en el grupo IA (electrocardiograma y ecocardiograma normales: sin compromiso del corazón); 20 pacientes del grupo IB (electrocardiograma normal o limítrofe y ecocardiograma anormal: ligero compromiso cardíaco); ocho pacientes en el grupo II (electrocardiograma y ecocardiograma anormal, sin insuficiencia cardíaca: moderado compromiso cardíaco); y cuatro pacientes en el grupo III (electrocardiograma y ecocardiograma anormal con insuficiencia cardíaca: grave compromiso cardíaco).

Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas fue realizado en todos los pacientes, mediante investigación de anticuerpos *anti-T. cruzi*, utilizando dos métodos. La dilución considerada reacción serológica positiva fue la establecida por el laboratorio del centro de referencia de Manguinhos-Fiocruz (RJ).

El paciente seropositivo fue aquel con dos tests serológicos positivos, en dos colectas diferentes. En el caso de dudas entre los métodos, las muestras de suero fueron testeadas de nuevo por el método de inmunofluorescencia y, persistiendo la discrepancia, fue considerado el resultado de ese método. La sangre fue colectada siempre por la misma persona, el mismo día de la semana, de mañana y en ayunas.

Fármacos y reactivos

El fármaco Carvedilol, (RS)-1-(9H-carbazol-4-iloxi)-3-[2-(2-etoxifenoxil) etilamino] propan-2-ol, fue gentilmente cedido por el laboratorio Farmacéutico del Estado de São Paulo (Brasil), grupo EMS Sigma Farma.

Los reactivos referentes a los análisis de biomarcadores de estrés oxidativo fueron adquiridos en la Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

Preparación de las muestras

Muestras de sangre fueron obtenidas en tubos previamente refrigerados a la temperatura de 10 °C, conteniendo heparina como anticoagulante, o sin heparina para obtención de suero. Plasma, suero y extractos ácidos fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta el análisis de los parámetros. Las evaluaciones enzimáticas fueron realizadas en muestras hemolisadas, mientras que los niveles de GSH fueron obtenidos en los extractos ácidos en la sangre total. Sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico y (TBARS) y contenido de proteína carbonilada (PC) fueron analizados en el plasma.

Ensayos de las enzimas antioxidantes

La actividad de la enzima catalasa (CAT) fue determinada por la velocidad de degradación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (10 mM) en 240 nm^{14,15}. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) fue determinada en 480 nm de acuerdo

con el método de autooxidación de la adrenalina¹⁶. Actividad de la Glutación Reductasa (GR) fue determinada en 340 nm, por la medida de la razón de oxidación de NADPH¹⁷. Glutación Peroxidasa (GPx) fue determinada en 340 nm, por la reducción de tert-butilhidroperóxido por la oxidación de glutación reducida (GSH)¹⁸. Actividad de la Glutación S-transferasa (GST) fue determinada en 340 nm usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como sustrato de acuerdo con Habig et al¹⁹. Todas las actividades fueron realizadas en los hemolisados y expresadas en mililitro de sangre total.

Ensayo de la Glutación reducida (GSH)

GSH es un tripéptido endógeno con importante actividad antioxidante que previene el daño oxidativo a importantes componentes celulares causados por ERO, fue medido en el extracto ácido a 412 nm, utilizando el método descrito por Beutler et al²⁰.

Proteína Carbonilada (PC)

PC es el marcador más ampliamente utilizado para verificar modificación oxidativa de las proteínas y fue determinada en el suero utilizando el método descrito por Levine et al²¹.

Evaluación de la lipoperoxidación (niveles de TBARS)

TBARS es un índice de peroxidación lipídica y estrés oxidativo. Fue determinado espectrofotométricamente a 535 nm en el plasma por sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, según método descrito por Bird y Draper²².

Determinación de Vitamina E

Determinación de vitamina E en el plasma fue realizada por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección UV en 292 nm²³.

Ensayo de los marcadores Inflamatorios

Los niveles de Óxido Nítrico (ON) fueron medidos indirectamente por el método de Griess²⁴. La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) fue analizada de acuerdo con el método desarrollado por Rao et al^{25,26}, mientras que la actividad de la Adenosina Desaminasa (ADA) fue analizada de acuerdo con el método de Giusti y Galanti²⁷. Todos esos parámetros fueron medidos en el suero.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas de los marcadores de estrés oxidativo y de los marcadores de dano inflamatorio dentro de los diferentes grupos fueron realizadas según Análisis de Varianza – ANOVA, a un factor, complementada por el test de Tukey–Kramer. Los datos fueron analizados por el método de los modelos lineales generalizados para medidas repetidas. Para todos los análisis fue utilizado el Software SPSS versión 11.5.0, adquirido bajo licencia por la Universidad Federal de Santa Catarina el 6/9/2002. El nivel de significación mínimo adoptado fue de 5%.

Resultados

La tabla 1 contiene las observaciones clínicas referentes a los grupos analizados. Entre los 42 pacientes seleccionados en el inicio del estudio, la edad varió de 31 a 67 años, con media de 58,8 años, 17 masculinos y 25 pacientes del sexo femenino. El Índice de Masa Corporal (IMC) fue de 24,3 kg/m².

Los síntomas potencialmente relacionados con esofagopatía ocurrieron con mayor frecuencia en los grupos II y III, con significación estadística ($p < 0,001$). En cuanto a síntomas potencialmente relacionados a la colopatía (constipación > 3 días), hubo apenas diferencia significativa del grupo IA (en que 100% de los individuos no presentaban tales síntomas) en relación a los grupos II y III (tab. 1).

Tabla 1 - Características biométricas y demográficas de los 42 pacientes chagásicos

Variable	IA (n = 10)	IB (n = 20)	II (n = 8)	III (n = 4)	ANOVA P
Edad (media±de)	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 ²)	25,5 ± 4,2	24,1 ± 3,1	24,3 ± 4,3	23 ± 3,8	0,25
Actividad física regular (%)	78	75	60	20	-
Constipación > 3 días (%)	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
Leucocitos (células/mm ³)	12x10 ³ ± 1,2	11x10 ³ ± 1,1	13x10 ³ ± 0,9	13x10 ³ ± 0,8	0,19
Medicamentos					
Amiodarona (n)	0	0	2	2	
Captopril (n)	0	20	8	4	

Valores representan media ± desvío estándar; IMC – índice de masa corporal; TSH – hormona estimulante de la tiroides.

Tabla 2 - Datos referentes a la radiología, electrocardiografía y ecocardiograma de los pacientes chagásicos

Variable	IA (n = 10)	IB (n = 20)	II (n = 8)	III (n = 4)	ANOVA P
Radiografía de Tórax					
Índice cardiotorácico(m±de)	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,48 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,0001*
Compatible con ICC (%)	0	0	20	100	0,001♣
Electrocardiograma					
BCRD+HBAl (%)	0	55,7	62,3	97,8	0,001♥
BCRD+HBAl+HBAl (%)	0	68,9	72,1	99,1	0,003♥
Área inactiva (%)	0	2	55	89,3	0,001♥
Ecocardiograma					
FEVI (%)	65,2	61,6	42,4	37,6	0,0001 ●
IDdVI (mm/m ²)	28,3 ± 1,8	29,2 ± 1,2	32,3 ± 4,8	35,9 ± 1,9	0,001 ●
Hipertensión Pulmonar (%)	0	0	25	44	0,001 ●

HBAl - hemibloqueo anterior izquierdo; FEVI - fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IDdVI - índice diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo; ICC - Insuficiencia cardíaca congestiva; BCRD - bloqueo completo de rama derecha; Tukey (IA ' III)*; (IA ' III)♣; (IB ' III)♥; (IA ' III)●.

La evaluación radiológica mostró que el índice cardiotorácico aumentó con el grado de compromiso cardíaco ($p = 0,0001$). No fueron realizadas radiografías de esófago y/o enema opaco. El ecocardiograma mostró fracción de eyección en los pacientes del grupo III significativamente menor que en los demás grupos ($p = 0,0001$). El diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo fue corregido para el área de la superficie corporal y valores encima de 32 mm/m² fueron considerados anormales. Con base en ese criterio, 12 pacientes presentaron dilatación del ventrículo izquierdo. El compromiso miocárdico a la derecha expresado por la hipertensión pulmonar estuvo presente en los pacientes del grupo II y III (tab. 2).

La respuesta de los diferentes grupos fue muy semejante después de terapia con el carvedilol. En todos los grupos fueron constatadas disminuciones significativas en los niveles de GSH y PC, acompañadas de una disminución no significativa de los niveles de TBARS. También

ocurrió la mantención de los niveles de vitamina E, y ninguna alteración en los marcadores inflamatorios, exceptuando los niveles de ON y ADA que presentaron un aumento significativo solamente en los pacientes del grupo IA. Con relación al perfil enzimático, ocurrió una respuesta generalizada de disminución de las actividades esencialmente en todos los grupos. Más específicamente, hubo disminución significativa de la actividad de la SOD en todos los grupos estudiados, disminuciones significativas en los grupos IA e IB de las actividades de la GPx y GST. Por su vez, se constató la mantención de la actividad de la GR y aumentos significativos de la CAT solamente en los grupos IA e IB. Los niveles de GSH fueron significativamente disminuidos en pacientes del grupo IA tratados con carvedilol ($0,18 \pm 0,12$ mmol mL⁻¹) comparados a los pacientes no tratados ($0,31 \pm 0,17$ mmol mL⁻¹; $p < 0,05$), en cuanto los niveles de TBARS y vitamina E permanecieron inalterados en ambos (tab. 3). Mientras tanto, los niveles de PC mostraron

Tabla 3 - Comparación dentro del mismo grupo de los niveles de GSH, TBARS y PC, Vitamina E y niveles de •ON, MPO y ADA en la sangre de pacientes chagásicos en dos tiempos diferentes de tratamiento

	Grupo IA (n = 10)		Grupo IB (n = 20)		Grupo II (n = 8)		Grupo III (n = 4)	
	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento
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
•ON	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 deaminasa (U^l); GSH - glutatión reducida (μmol mL⁻¹); MPO - mieloperoxidasa (mU mL⁻¹); •ON - óxido nítrico (mM); PC - proteína carbonil (nmol mg⁻¹); TBARS - especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (nmol mL⁻¹); Vit - Vitamina E (μmol mL⁻¹); Valores representan media ± desvío estándar * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representan diferencias significativas dentro del mismo grupo chagásico.

una disminución significativa en pacientes tratados con carvedilol ($0,04 \pm 0,01 \text{ nmol mg}^{-1}$) comparados a los no tratados ($0,15 \pm 0,07 \text{ nmol mg}^{-1}$; $p < 0,01$). Cuando fueron comparados dentro del mismo grupo IA, las actividades de las enzimas antioxidantes como SOD, GST y GPx mostraron significativa disminución comparadas a las encontradas en pacientes no tratados, en cuanto la actividad de la CAT fue aumentada y la actividad de la GR permaneció inalterada (tab. 4). En relación a los marcadores inflamatorios, después de tratamiento con carvedilol hubo un aumento significativo en los niveles de ON en comparación a los pacientes no tratados ($10,93 \pm 3,19 \text{ mM}$ y $17,96 \pm 3,2 \text{ mM}$, respectivamente; $p < 0,05$) y actividad de la ADA ($10,03 \pm 1,28 \text{ UI}^{-1}$ y $17,17 \pm 2,5 \text{ UI}^{-1}$, respectivamente; $p < 0,05$), en cuanto la actividad de la MPO permaneció inalterada (tab. 3).

Pacientes del grupo IB, tratados con carvedilol, mostraron una respuesta similar cuando fueron comparados a los pacientes del grupo IA. Niveles de GSH ($0,16 \pm 0,13 \text{ mmol mL}^{-1}$) fueron también significativamente disminuidos cuando fueron comparados a los pacientes no tratados ($0,22 \pm 0,17 \text{ mmol mL}^{-1}$; $p < 0,01$), en cuanto los niveles de TBARS y vitamina E permanecieron inalterados en ambos grupos de pacientes (tab. 3). De la misma forma como fue mostrado en el grupo de pacientes IA, valores de PC fueron también disminuidos significativamente en pacientes tratados con carvedilol ($0,05 \pm 0,02 \text{ nmol mg}^{-1}$) cuando fueron comparados a los pacientes no tratados ($0,16 \pm 0,19 \text{ nmol mg}^{-1}$; $p < 0,05$). El perfil de las enzimas antioxidantes en ese grupo fue también similar al encontrado en el grupo IA, en cuanto los marcadores inflamatorios, en ese grupo, permanecieron inalterados (tab. 3, 4).

En los pacientes clasificados como II, el comportamiento de los parámetros analizados fue también muy semejante al de los grupos IA y IB (tab. 3). Niveles de GSH fueron significativamente disminuidos en los pacientes tratados con carvedilol cuando fueron comparados a los no tratados ($0,18 \pm 0,11$ y $0,29 \pm 0,10 \text{ mmol mL}^{-1}$, respectivamente; $p < 0,05$), en cuanto no hubo diferencias significativas

de los niveles de TBARS y vitamina E. Valores de PC fueron también disminuidos significativamente después de tratamiento con carvedilol ($0,05 \pm 0,01 \text{ nmol mg}^{-1}$) comparados a los no tratados ($0,17 \pm 0,07 \text{ nmol mg}^{-1}$; $p < 0,001$). Después de tratamiento con el carvedilol, los valores de los marcadores inflamatorios permanecieron inalterados (tab. 3), las actividades de las enzimas SOD y GST disminuyeron significativamente, en cuanto las actividades de las enzimas CAT, GR y GPx no presentaron diferencias significativas si eran comparadas a los pacientes no tratados (tab. 4).

Como fue encontrado en otros grupos, el grupo de pacientes clasificados como III mostró disminución en los niveles de GSH en los pacientes tratados con carvedilol ($0,16 \pm 0,095 \text{ mmol mL}^{-1}$; $p < 0,05$) en relación a los pacientes no tratados ($0,38 \pm 0,15 \text{ mmol mL}^{-1}$) (tab. 3). También de forma semejante a los valores encontrados en los grupos IA, IB y II, no fueron observadas diferencias significativas en los niveles de TBARS y vitamina E, en cuanto el marcador de daño a las proteínas mostró nuevamente disminución de los valores en los pacientes tratados con carvedilol ($0,05 \pm 0,01 \text{ nmol mg}^{-1}$) comparados a los pacientes no-tratados ($0,15 \pm 0,06 \text{ nmol mg}^{-1}$; $p < 0,05$) (tab. 3). Las actividades de la CAT, GR, GST y GPx no fueron significativamente diferentes en relación al tratamiento aplicado con carvedilol, sin embargo la actividad de la SOD fue disminuida entre los pacientes tratados con carvedilol ($69,20 \pm 6,54 \text{ mL}^{-1}$) en comparación con no tratados ($145,44 \pm 44,12 \text{ mL USOD}^{-1}$; $p < 0,05$). Similarmente a los resultados obtenidos en los grupos IB y II, los marcadores inflamatorios permanecieron inalterados después del tratamiento con carvedilol (tab. 3).

Discusión

En el presente estudio, pacientes sin tratamiento presentaron los mayores niveles de biomarcadores de daño a lípidos (TBARS) y proteínas (PC), juntamente con actividades generalmente más elevadas de las enzimas antioxidantes, que parecen representar la manutención

Tabla 4 - Comparación dentro del mismo grupo de la actividad de las enzimas antioxidantes en la sangre de pacientes chagásicos en dos tempos diferentes de tratamiento

	Group IA (n = 10)		Group IB (n = 20)		Group II (n = 8)		Group III (n = 4)	
	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento	Antes del tratamiento	Después de 6 meses de tratamiento
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 - catalasa ($\text{mmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$); GPx - glutatión peroxidasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$); GR - glutatión reductasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$); GST - glutatión S-transferasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$); SOD - superóxido dismutasa (USOD mL^{-1}); Valores representan media ± desvío estándar * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representan diferencias significativas dentro del mismo grupo chagásico.

del perfil de estrés oxidativo relacionado al compromiso cardíaco en la enfermedad de Chagas.

Aparentemente, el grupo III, considerado el nivel más grave de la insuficiencia cardíaca y, por lo tanto, en el cual el número de individuos participantes fue menor en razón de la alta tasa de mortalidad en esa fase, presentó mayor estrés oxidativo en relación a los grupos caracterizados por menor gravedad, especialmente considerando los grupos IA, IB y, en menor medida, también del grupo II. En un estudio similar realizado por Keith et al. involucrando pacientes cardíacos con diferentes grados de compromiso, los marcadores de daño oxidativo, tales como los peróxidos lipídicos y malondialdehído, además de defensas antioxidantes como los niveles de glutatión, vitaminas E y C, y la actividad de la GPx también mostraron una correlación directa entre esos marcadores y a gravedades de la enfermedad²⁸. Esa relación ya fue demostrada por nuestro laboratorio en estudios anteriores, así como en otros estudios relacionados²⁹.

Según datos mostrados en el presente trabajo, aparentemente los pacientes con menor compromiso cardíaco y, consecuentemente, portadores de una capacidad antioxidante mayor (grupos IA y IB) parecen poseer una mayor capacidad de neutralizar el daño oxidativo detectado en su sangre, una respuesta que parece ser potenciada por el tratamiento con carvedilol. Una respuesta similar ya fue detectada por nuestro laboratorio en pacientes chagásicos después de seis meses de suplementación de vitaminas E y C. En un trabajo con ratones infectados por el *T. cruzi*, los resultados obtenidos fueron similares, donde las actividades de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y GR, así como los niveles de GSH fueron aumentados en respuesta a la infección, en cuanto ocurría el insulto oxidativo en el miocardio de esos animales³⁰.

De modo opuesto al verificado en la mayoría de las demás enzimas antioxidantes, fue detectado un aumento de la actividad de la CAT en el sangre de los pacientes pertenecientes a los grupos IA y IB. Chow et al. mostraron que ratones con deficiencia de vitamina E disminuyeron la actividad de la CAT, mientras que las actividades de la SOD y GPX no fueron alteradas, y están en conformidad con el presente estudio, sugiriendo que la vitamina E en la dieta provee protección contra la inactivación CAT en tales condiciones experimentales³¹. Considerando que la betaoxidación de los lípidos en el peroxisoma aumenta la producción de H_2O_2 ³², y que la vitamina E protege contra la inactivación de la CAT³³, el tratamiento con carvedilol podría ser responsable por el aumento de la actividad de esa enzima en la sangre de esos pacientes.

El carvedilol protege contra la superproducción de ERO en las concentraciones de 0,1-100 mM, las cuales están de acuerdo con la dosis (37,5 mg/día) utilizadas en el presente estudio³⁴. Los primeros estudios con ese compuesto indicaron que el carvedilol es mucho más potente para inhibir la producción del radical oxhidrilo ($\cdot OH$) que otros antagonistas beta-adrenérgicos³⁵. Estudios han mostrado que sus metabolitos hidroxilados también son potentes antioxidantes y pueden contribuir a la acción

antioxidante global de esa droga, pudiendo aumentar en 5-10 veces su potencia^{36,37}. Diversos metabolitos del carvedilol encontrados en el plasma humano mostraron una actividad antioxidante aun más acentuada (50-80 veces mayor que el carvedilol) para inhibir la oxidación del LDL por los macrófagos³⁸. Así, es posible que la actividad antioxidante *in vivo* del carvedilol sea atribuida también a sus metabolitos³⁹.

Su potencial antioxidante también puede estar vinculado a su capacidad de ligarse al Fe (III) y Cu (II), impidiendo la oxidación de lípidos y proteínas mediada por esos metales de transición, lo que podría explicar la disminución de los biomarcadores de daños en lípidos (TBARS) y proteínas (PC) encontrados en el presente estudio, después de la terapia con carvedilol. Al analizar el marcador de daño a proteínas, el carvedilol persistentemente disminuyó la formación de PC cuando fue comparado a pacientes antes del tratamiento. Excepto para el grupo clasificado como IA, con menor compromiso cardíaco, todos los marcadores inflamatorios permanecieron inalterados en los otros grupos. Se sabe que el ON, en combinación con $O\cdot_2$ lleva a la formación de peroxinitrito, un potente oxidante biológico que elimina el *T. cruzi*, de manera dosis-dependiente, y que la MPO es una enzima que participa de reacciones de defensa inmunológica, a través de la formación de ácido hipocloroso como un mecanismo de defensa contra patógenos⁴⁰. Eso podría explicar el aumento encontrado en los niveles de ON y de la ADA en el grupo que posee una mejor respuesta inmunológica contra la infección por el parásito. Además de eso, la cardioprotección del carvedilol podría estar relacionada tanto a su capacidad antioxidante, como también a la prevención de la infiltración de células inflamatorias en el miocardio isquémico, así como en la inhibición del remodelado del músculo liso vascular mediante la disminución de la migración y proliferación de las células musculares lisas vasculares, como ya fue mostrado en modelo animal.

Conclusión

Los datos sugieren que el tratamiento con carvedilol fue eficaz en la atenuación del daño oxidativo causado por la propia enfermedad de Chagas, un efecto que puede ser particularmente importante en enfermedad de Chagas crónica con cardiopatía.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio no tuvo fuentes de financiación externas.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Doctorado de Patrícia Budni, por la Universidade Federal de Santa Catarina.

Referencias

- Dias JCP. Doença de Chagas, ambiente, participação e estado. *Cad Saúde Pública*. 2001;17(supl):S165-9.
- 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.
- Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1989;22(3):147-56.
- Pinto Dias JC. The treatment of Chagas' disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med*. 2006;144(10):772-4.
- Organización Panamericana de la Salud (OPAS). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo (Uruguay): PAHO Publishing; 2006. p. 1-28.
- 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.
- de Oliveira TB, Pedrosa RC, Wilhelm-Filho D. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol*. 2007;116(3):357-63.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- 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.
- Calberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113:484-90.
- Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.
- 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.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-8.
- 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.
- Bird RP, Draper AH. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol*. 1984;90:299-305.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Giusti G, Galanti B. Colorimetric method: adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU. (ed.). *Methods enzymatic analysis*. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie; 1984. p. 315-23.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chow CK. Oxidative damage in the red cells of vitamin E-deficient rats. *Free Radic Res Commun*. 1992;16(4):247-58.
- Tardif JC, Gregoire J, Schwartz L, Tittle L, Laramée L, Reeves F, et al. Effects of AGL-1067 and probucol after percutaneous coronary interventions. *Circulation*. 2003;107(4):552-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Denicola A, Rubbo H, Rodriguez D, Radi R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys*. 1993;304(1):279-86.
- Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1102-11.