

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



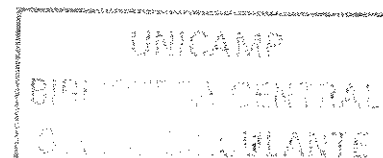
Maria Fernanda Castioni Gomes

Estudo da Interação parasita-hospedeiro na doença de Chagas: análise da glicemia, produção de insulina, peptídeo C e enzimas antioxidantes (catalase e glutathione redutase)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Maria Fernanda Castioni Gomes
Fernanda R. Gadelha
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, área de Bioquímica.

Orientador: a Prof. Dra. Fernanda Ramos Gadelha
Co-orientadora Prof. Dra Sarah Monte Alegre



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	G585e
V	EX
TOMBO BC	63798
PROC.	16.P00086.05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	13/05/05
Nº CFD	

Bibid 350299

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G585e

Gomes, Maria Fernanda Castioni

Estudo da Interação parasita-hospedeiro na doença de Chagas: análise da glicemia, produção de insulina, peptídeo C e enzimas antioxidantes (catalase e glutatona redutase) / Maria Fernanda Castioni Gomes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Fernanda Ramos Gadelha

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Doença de Chagas. 2. Insulina. 3. Glutaciona. 4. Catalase.
5. Peptídeos. I. Gadelha, Fernanda Ramos. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Agradecimentos...

A minha filha e meu marido por toda compreensão e companheirismo nos meus momentos de ausência.

À Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha, pela orientação, amizade, paciência, aprendizado e ajuda na orientação desse trabalho.

À Profa. Dra. Sarah Monte Alegre, pela amizade e orientações que nortearam meus objetivos futuros.

Aos profissionais do Labex pela ajuda nos experimentos iniciais e ajuda prática.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e torceram pelo meu crescimento profissional e principalmente pessoal.

A minha grande amiga, madrinha, irmã e “guru” Thais, que dispensa comentários sobre a ajuda nessa empreitada.

A Albanin, outra grande amiga que esteve sempre ao meu lado, na bancada do laboratório assim como nos momentos difíceis.

Um agradecimento especial a todos os doadores voluntários que participaram desse trabalho acreditando na sua importância.

Ao Kiko que além de amigo, torcedor e parceiro ajudou nos experimentos e na resolução de muitos problemas, mesmo aqueles mais tolos.

A Conceição, Breno, Aglécio e Daniela, pela amizade, presteza, competência, responsabilidade, paciência e grande ajuda durante todo o desenrolar desse trabalho.

As secretárias do departamento Andréia e Marina, pela simpatia e ajuda nos serviços burocráticos.

A amigos próximos que compartilharam todos os sucessos e desesperos tão de perto, obrigado Vera, Leonia, Márcia e outros tantos que participaram efetivamente dando ajuda emocional e afetiva.

Ao CNPq e FAEP pelo auxílio financeiro.

Data da Defesa: 26/08/2004

Banca Examinadora

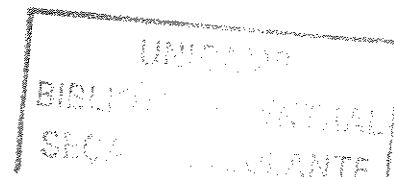
Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha (Orientadora) Fernanda R Gadelha

Profa. Dra. Maria Elena Guariento M. E. Guariento

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse D. M. Grassi-Kassisse

Prof. Dr. José Camillo Novello _____

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira _____



Resumo

Estima-se que existam de 18 a 24 milhões de portadores de doença de Chagas (DCH) no continente americano, entre os quais 5 a 6 milhões encontram-se no Brasil. Até o momento não foi descoberta a cura para a doença e no Brasil são registrados seis mil óbitos por ano relacionados à doença. Na evolução da DCH são descritas duas fases distintas: aguda e crônica. A denervação autonômica é fato bastante estudado e acredita-se que essa denervação esteja relacionada com as alterações no metabolismo dos hidratos de carbono, que são caracterizadas por recuperação deficiente dos níveis glicêmicos após a administração oral e intravenosa de glicose. Com base nesses dados, o presente estudo teve por objetivo avaliar os níveis glicêmicos e insulinêmicos em pacientes chagásicos crônicos, submetidos aos testes de tolerância à glicose oral (TTGO) e intravenosa (TTGIV), comparando-se os resultados a um grupo controle. O aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) apresenta um papel importante nas reações inflamatórias. Considerando a resposta do hospedeiro à infecção do *T. cruzi*, os níveis de duas enzimas antioxidantes catalase e glutathione redutase também foram determinados nos dois grupos. Não foram detectadas diferenças significativas entre os dois grupos tanto nos testes de tolerância a glicose com relação aos níveis plasmáticos de glicose, insulina e peptídeo C, assim como nas áreas sob as curvas desses parâmetros, quanto nas dosagens de catalase e glutathione redutase. Pode-se especular que os níveis de insulina e peptídeo C poderiam apresentar significância se esses parâmetros fossem avaliados nas diferentes formas da doença, já que na fase aguda o processo inflamatório é intenso.

Summary

It has been estimated that 18-24 million people in the American continent have Chagas' disease (DCH) and that 5-6 million live in Brazil. Up to now the cure for this disease has not been discovered and in Brazil occurs 6 thousand deaths / year related to this disease. In the evolution of DCH two phases are described: acute and chronic. The autonomic denervation is well studied. It is believed that this denervation is related to alterations in carbohydrate metabolism that is characterized by a deficient recovery in the glycemie levels after oral and intravenous administration of glucose. Based on these facts, the aim of this study was to evaluate the glycemie and insulinemic levels in chronic Chagas' disease patients, submitted to an oral (TTGO) and intravenous (TTGIV) glucose tolerance test, compared to a control group. The increase in the reactive oxygen species (ROS) has an important role in inflammatory reactions. Regarding the behavior of the host when infected with *T. cruzi*, the levels of two antioxidants enzymes (catalase and glutathione reductase) were determined in both groups. No significant differences were observed in the two groups considering the glucose testes regarding the plasmatic levels of glucose, insulin and peptid C, and the area above the curve in all parameters assayed and also in the catalase and glutathione reductase determinations. One hypothesis to explain these observations is that the insulin and peptid C levels may be significant if these parameters were evaluated in the different forms of the disease, since in the acute form the inflammatory process is intense.

I. Introdução:

1.1 *Trypanosoma cruzi*:

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas (DCH), também chamada de tripanossomíase americana. É um protozoário da família Tripanosomatidae, classe Kinetoplastidea, do grupo Stercoraria o que indica que há desenvolvimento dos parasitos no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectivas pelas fezes (Lana & Tafuri, 2000; Souza, 2000).

A população do *T. cruzi* não é homogênea, sendo constituída por diferentes cepas que circulam na natureza, entre o homem, vetores, animais domésticos e reservatórios silvestres. Essas populações possuem comportamento diverso no que se refere às curvas de parasitemia, interação com células hospedeiras, resposta imune, e também resposta aos medicamentos utilizados no tratamento (Lana & Tafuri, 2000). Essas diferenças indicam haver um tropismo diferente das distintas cepas de *T. cruzi*, o que explicaria, por exemplo, o fato de ser mais comum o diagnóstico de formas digestivas na região central do Brasil ou de ser baixa a prevalência de cardiopatias no norte do Equador em relação à região sul (Silveira, 2000).

1.2 Ciclo Evolutivo

Os transmissores do *T. cruzi* são insetos estritamente hematófagos; da família Reduviidae, subfamília Triatominae. Os triatomíneos são insetos de hábitos noturnos, mais conhecidos como “barbeiros”, pois a picada se dá principalmente na face onde depositam as fezes infectadas (Linhares, 2000; Pessoa & Martins, 1982). Das 114 espécies existentes de triatomídeos, aproximadamente 104 ocorrem nas Américas e Caribe, mas somente duas

espécies têm importância em saúde pública em nosso país, o *Triatoma infestans* (*T. infestans*) e o *Triatoma brasiliensis* (*T. brasiliensis*) (Shmunis, 1997; Linhares, 2000).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado tem início quando o sangue de animais infectados é ingerido durante o repasto sanguíneo (Lana & Tafuri, 2000; Souza, 2000). Ao ser ingerido pelo vetor, o *T. cruzi* passa por uma sequência irreversível de transformações ao longo do tubo digestivo do inseto. Desse modo, as formas sanguíneas ingeridas transformam-se em epimastigotas; que no intestino médio, se multiplica atingindo o reto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados com as dejeções do inseto (Lana & Tafuri, 2000; Souza, 2000).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando formas tripomastigotas e epimastigotas eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor, são inoculadas na pele ou mucosas do vertebrado (Brener, 1997). A forma tripomastigota penetra nas células do hospedeiro para aí se transformar em amastigotas. Tal multiplicação prossegue até a distensão e rotura da célula parasitada, com liberação de novos parasitas, que penetram em novas células, exceto em neutrófilos e eosinófilos ou caem na corrente sanguínea (Andrade, 2000; Brener, 1997). Como parasitas, estão expostos as espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas durante a reação de defesa do organismo, possuindo entretanto uma capacidade limitada em lidar com o estresse oxidativo, quando comparado com ao hospedeiro vertebrado (Docampo, 1976)

Os sistemas de defesa dos tripanossomatídeos contra as EROs diferem substancialmente do metabolismo análogo do hospedeiro, tendo sido apontado como um alvo em potencial para o desenvolvimento de drogas tripanossomicidas mais específicas (Fairlamb & Cerami, 1992).

Esses parasitas apresentam duas superóxidos dismutases (SOD) dependente de ferro (Fe-SODA e Fe-SODB) (Ismail *et al*, 1997). Não apresentam catalase (Docampo *et al*, 1976) e, não existem relatos da presença de vitamina E, ácido ascórbico, β -caroteno ou xantina oxidase nesses parasitas (Docampo, 1986).

Recentemente foi identificada nesses parasitas uma cascata de detoxificação de hidroperóxidos restrita a essa família de parasitas apresentando novas opções para o desenvolvimento de uma quimioterapia mais específica (Wilkinson *et al*, 2000).

1.3 Doença de Chagas (DCH):

Estima-se que os portadores de infecção chagásica no continente americano sejam de 18 a 24 milhões, sendo que cerca de 10% das infecções evoluem para as formas crônicas com graus variáveis de comprometimento orgânico, totalizando cerca de 1,8 a 2,5 milhões de portadores de doença clínica. A população exposta ao risco é aproximadamente de 90 milhões (Ianni, 1998; Urbina, 1999; Silveira, 2000). No Brasil, os dados revelam de 5 a 6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, havendo seis mil óbitos por ano relacionados à doença (Ianni & Madi, 1997; Ianni *et al*, 1998; Neves, 2000, Silva, 2000). Diante do exposto a DCH é considerada um problema de Saúde Pública, uma vez que os dados epidemiológicos de prevalência e gravidade de evolução são expressivos (Pessoa & Martins, 1982; Schmunis, 1997).

Os mecanismos de transmissão da DCH ao homem podem ser considerados, em ordem de frequência em primários ou secundários. Nos primários encontram-se a transmissão por insetos hematófagos, por transfusão de sangue e hemoderivados, por via oral, inclusive pelo leite materno, por via transplacentária e no canal do parto pelo contato

das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada. Como mecanismos secundários e menos frequentes ou acidentais encontram acidentes de laboratório, manejo de animais infectados e transplante de órgãos (Rezende, 1988; Coura *et al*, 2000).

A contaminação por transfusão de sangue e hemoderivados é atualmente mais rara apesar de seu aparecimento em áreas não endêmicas. A transmissão vetorial é a que assume maior importância epidemiológica sendo fundamental na manutenção da endemia chagásica (Linhares 2000, Dias & Coura, 1997).

O ambiente onde se dá a transmissão domiciliar da DCH é aquele em que as populações sob o risco sobrevivem em estado precário, como em casas de pau a pique, expressão da baixa condição econômica e social desses estratos populacionais (Tellería, 2000; Silveira, 2000; Shmunis, 2000).

As ferramentas para o controle da principal forma de transmissão estão disponíveis desde a década de quarenta, quando se comprovou a efetividade do tratamento da vivenda rural com inseticida para eliminar o vetor, porém uma solução mais permanente consiste no melhoramento ou substituição desta vivenda (Schmunis, 1997)

Indubitavelmente, o programa de controle da DCH no Brasil foi até o presente um grande sucesso, particularmente quanto ao controle do *T. infestans*. Essa espécie de triatomíneo, embora em menores densidades, ainda está presente em mais de 100 municípios brasileiros, sendo conhecidos muitos exemplos de sua capacidade de repovoamento quando da interrupção de ações regulares de controle e vigilância (Schmunis, 1997; Urbina, 1999).

O tratamento para essa doença continua insatisfatório, sendo baseado em nitroheterocíclicos: Nifurtimox (Lampit ®) e Benznidazole (Rochagan ®). O Nifurtimox foi recentemente retirado de comercialização devido a sua alta toxicidade (Ianni & Madi,

1997). Esses compostos têm atividades na fase aguda e no período inicial da fase crônica, mas sua eficiência varia de acordo com a área geográfica, provavelmente devido às diferenças na susceptibilidade à droga de diferentes cepas de *T.cruzi*. Na fase crônica possuem baixa ou nenhuma atividade (Ianni, 1998; Urbina, 1999; Maya *et al*, 2003). Apresentam efeitos colaterais frequentes incluindo anorexia, vômitos, neuropatia periférica e alergias. O Benznidazole em especial, apresenta efeitos colaterais significativos, sendo o comprometimento renal o mais importante (Filardi & Brener, 1987). Esses efeitos colaterais podem ser consequência do mecanismo de ação de ambos os medicamentos que agem promovendo a produção de EROs (WHO, 1984; Masana, 1984; Docampo & Moreno, 1986).

Outra alteração muito prevalente em doentes chagásicos é a morte súbita, afetando indivíduos na fase mais produtiva de suas vidas. A morte súbita é responsável por 2/3 dos óbitos por DCH (Ribeiro, 2000; Rassi, 2001).

Na evolução da doença são descritas duas fases distintas: uma aguda que é mais raramente diagnosticada, pois, na maioria dos casos esse período inicial pode ser assintomático ou oligossintomático passando assim despercebido. E, uma segunda fase, chamada crônica, subdividida em formas indeterminada, cardíaca e digestiva (Rezende, 1988; Ribeiro, 2000).

1.3.1 Forma Aguda da doença de Chagas

A forma aguda da DCH que representa, na realidade, uma infecção generalizada pelo *T.cruzi*, caracteriza-se pela relativa facilidade com que se evidencia o parasita no sangue periférico e tecidos nas formas tripomastigotas e amastigotas. Essa última forma é encontrada no interior das células de quase todos os órgãos e no interior de vários tipos

celulares, normalmente acompanhadas de um infiltrado mononuclear, congestão aguda e edema (Andrade, 2000; Neto *et al* 1997, Rassi *et al* 2000).

A destruição neuronal é predominantemente autonômica, podendo ocorrer de forma intensa nessa fase da doença (Dias, 2000a). Essas lesões aparecem em 50 % dos casos agudos dentro de quatro a dez dias após a picada do barbeiro (Lana & Tafuri, 2000), sendo necessário levar em conta os sinais da porta de entrada, os sintomas e as anormalidades sistêmicas (Neto *et al*, 1997; Rassi *et al*, 2000).

O parasitismo ocorre mais frequentemente em tecidos como músculo liso, estriado esquelético e cardíaco e o componente parassimpático, do sistema nervoso central ou mais raramente nos ovários, testículos, tireóide, pâncreas, entre outros (Santos, 1999).

As manifestações gerais são representadas por febre, edema localizado ou generalizado, poliadenomegalia, hepato-esplenomegalia e, às vezes, insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas. Mais de 90% dos pacientes com manifestações clínicas da fase aguda sobrevivem à infecção inicial. Pouco a pouco os parasitas escasseiam-se no sangue periférico, a sintomatologia se atenua e após algum tempo, em média dois a quatro meses, a doença entra em período de latência clínica e torna-se crônica (Prata, 1990).

Simultaneamente, ocorre a progressiva elevação dos anticorpos da classe IgG, a partir da terceira semana, começam a declinar esses sintomas agudos, até sua remissão completa, entre 60 e 90 dias. Para a maioria dos pacientes, em paralelo com a melhora clínica e a redução dos níveis de parasitemia, decrescem também os níveis de imunoglobulinas da classe M e sobem os níveis de IgG. Estes elementos praticamente definem a transição para a DCH crônica (Cançado, 1999; Dias, 2000).

1.3.2 Forma Crônica

A forma crônica da DCH divide-se em: indeterminada, cardíaca, digestiva, nervosa e forma com exacerbações agudas (Prata, 1990). Em certas circunstâncias, especialmente quando o quadro cardíaco é muito intenso, na fase aguda, ocorre uma evolução direta para uma forma crônica determinada. Uma característica marcante da forma crônica da doença de Chagas, observada em humanos e em modelos experimentais, é o nível extremamente baixo de parasitemia (Ianni, 1998).

Nessa fase da doença existe uma denervação, tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso autônomo, que em um indivíduo normal é o responsável pelo controle da secreção das glândulas mucosas. A estimulação parassimpática aumenta a secreção e a simpática diminui (Davilla, 1998). Além disso, estudos morfológicos e funcionais sugerem que anormalidades simpáticas e parassimpáticas são precedidas de dano ao miocárdio e disfunção ventricular esquerda. Na fase crônica da DCH, existe uma alteração na composição relativa dos vários tipos de mucopolissacarídeos secretados pelas glândulas mucosas do trato digestivo e dos brônquios (Davilla, 1998; Britto-Costa, 1973).

Entende-se por forma indeterminada da DCH a presença comprovada da infecção chagásica (revelada por sorologia e ou métodos parasitológicos indiretos) associada à ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo. A classificação do paciente nessa forma depende apenas da sorologia, de um exame clínico minucioso, do eletrocardiograma e da radiografia de tórax, esôfago e cólon (Ribeiro *et al*, 2000; Dias, 1989; Dias, 2000; Macedo, 1997). Essa é forma mais freqüente da doença de Chagas detectada na população geral das áreas endêmicas, com bom prognóstico a médio-longo prazo (Ianni, 1998; Dias, 2000). Embora reconhecendo esse bom prognóstico, sabe-se que 2 a 5% desses indivíduos podem evoluir,

a cada ano, para as outras formas da doença. A maioria permanece na forma indeterminada por 10 a 20 anos após a infecção pelo *T.cruzi* ou nela ficam indefinidamente (Dias, 1989).

A evolução da forma crônica indeterminada para as outras formas, como a cardíaca e a digestiva, é uma possibilidade que ocorre em geral de maneira insidiosa, em uma proporção de 2 a 3% dos casos ao ano, em especial entre 10 e 28 anos após a fase aguda e principalmente para uma forma cardíaca inicial (Dias, 1989; Dias, 1997). Não estão ainda bem estabelecidos os fatores envolvidos nessa evolução, podendo ser, a cor, raça, idade do hospedeiro, além da cepa, parasitemia e reinfecções (Dias, 2000).

A cardiopatia chagásica crônica constitui forma clínica tardia da infecção pelo *T. cruzi*, resultando em dano miocárdico progressivo conseqüente a incessante miocardite fibrosante (Ianni, 1998; Marin-Neto *et al*, 2000). A forma digestiva da DCH pode ser subdividida em esofagopatia, colopatia, e outras, para indicar o comprometimento do aparelho digestivo (Prata, 1990). Nessa forma da doença, a principal característica histopatológica é a destruição dos neurônios dos plexos nervosos entéricos. A alteração motora mais significativa no trato digestivo, na doença de Chagas, resulta do comprometimento do esôfago, ocasionando dificuldade na deglutição (disfagia), e também podem ocorrer nos colons resultando em constipação (Meneghelli, 1985).

O envolvimento pancreático causado pelo *T.cruzi* tem sido longamente demonstrado na DCH crônica. Em chagásicos crônicos necropsiados, também foram descritas hiperplasia das ilhotas e inflamação com destruição de gânglios parassimpáticos intrapancreáticos, podendo ter conseqüências nas secreções dos hormônios pancreáticos, em especial a insulina (Guariento *et al*, 1994; Santos, 1999; Santos, 1999a, Saldanha, 2001).

1.3.4 Metabolismo de carboidratos:

Muitos estudos para avaliar o metabolismo de carboidratos e concentrações plasmáticas de insulina foram realizados utilizando-se o teste de tolerância à glicose oral na forma indeterminada da DCH, onde foi observado um comportamento hipoinsulinêmico em alguns indivíduos chagásicos, e um comportamento normoinsulinêmico em outro grupo de indivíduos portadores da mesma doença (Guariento *et al*, 1993).

O metabolismo dos carboidratos em pacientes chagásicos parece ser anormal, como demonstrado pelas concentrações plasmáticas de glicose sanguínea mais elevada que em grupos controle após uma carga oral de glicose (Vieira *et al*, 1970). Esse padrão de curva de glicose tem sido associado a um aumento da absorção intestinal de glicose e, mais recentemente com mudanças na taxa de esvaziamento gástrico (Guariento *et al*, 1994). As alterações da glicose sanguínea e resposta insulínica após teste de sobrecarga oral de glicose descritos na doença de Chagas crônica podem ser devidos à ação parasitária e inflamatória na célula β ou denervação parcial das ilhotas pancreáticas (Saldanha, 2001). Podem ocorrer também alterações na absorção de carboidratos, como consequência da denervação parassimpática no intestino delgado (Saldanha, 2001).

Em estudos experimentais com gatos observou-se que a estimulação da inervação simpática ou parassimpática do pâncreas, promovia mudanças no número de células α ou β nas ilhotas pancreáticas, demonstrando possíveis transformações nas ilhotas. Possivelmente, as ilhotas pancreáticas de indivíduos com DCH perdem parcialmente o controle modulatório do crescimento, devido a possível desconexão do pâncreas com o sistema nervoso autônomo resultando em despopulação ganglionar (Sergeyva, 1940).

Saldanha, em 2001, não encontrou infiltrado inflamatório significativo nas ilhotas dos pacientes chagásicos, sendo o tecido conjuntivo fibrótico o principal achado. O infiltrado desse tecido conjuntivo era constituído de linfócitos e plasmócitos, sugerindo uma inflamação causada por fibrose.

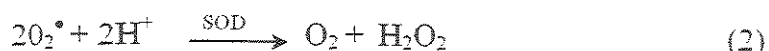
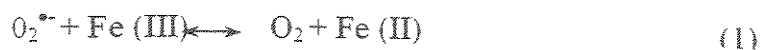
Danos teciduais, trauma, e outras causas como processos inflamatórios, promovem a formação de grande quantidade de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, interferons, fatores de necrose tumoral e espécies reativas de oxigênio (EROs). Na maioria das doenças humanas, o estresse oxidativo é um fenômeno secundário à injúria tissular. O aumento da geração de EROs, acaba assim por aumentar a geração de enzimas antioxidantes (Halliwell & Cross, 1994).

1.4 Defesas antioxidantes em mamíferos:

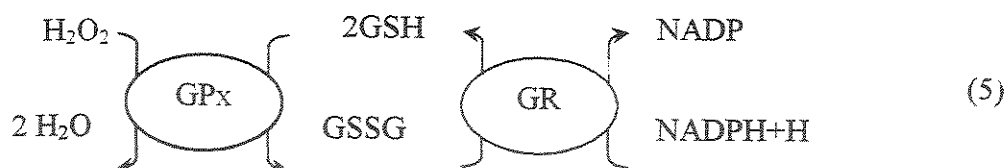
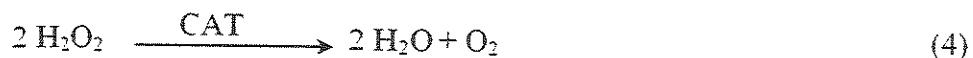
Desde 1956, Denham Harman sugeriu que radicais livres produzidos durante a respiração aeróbica causavam dano oxidativo. Esse estresse oxidativo pode ser devido a vários processos, tais como; produção excessiva de EROs causada tanto por uma situação metabólica ou pela presença de xenobióticos ou quando as defesas celulares estão baixas pela depleção de antioxidantes fisiológicos (Lenaz, 1998). A importância desse dano celular em diferentes alvos moleculares na promoção do dano ou morte celular depende do grau oxidativo pelo qual o mecanismo é imposto, assim como seu tempo de permanência e a natureza do sistema estressado (Halliwell & Cross, 1994). Cerca de 4 a 5% do oxigênio inspirado formam EROs, principalmente pelo vazamento de elétrons da cadeia respiratória na mitocôndria (Meneghini, 1987; Lenaz, 1998).

Entre as EROs podemos citar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) que pode formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (reação 2) e gerar também a partir da equação de Haber-Weiss o ânion hidroxil ($^{\bullet}OH$) (reação 3), o mais reativo de todos (Halliwell & Gutteridge, 1991).

Reação de Haber-Weiss



As principais enzimas celulares em mamíferos que participam das defesas antioxidantes são: a superóxido dismutase (SOD) que está localizada na matriz mitocondrial e citosol e age dismutando o ânion superóxido para a H_2O_2 ; a catalase (CAT), localizada em peroxissomas e que catalisa a dismutação do H_2O_2 (reação 4), e a glutathione peroxidase (GPx), dependente de selênio que catalisa a redução de peróxidos para água usando o peptídeo glutathione reduzido (GSH) como seu co-substrato, localizada tanto no citosol como na mitocôndria (reação 5). Esse ciclo redox da glutathione também detoxifica outros peróxidos além do H_2O_2 . E por fim a glutathione redutase (GR) que catalisa a redução às custas de NADPH, do GSSG formado na reação anterior (Sies, 1991). Cada uma dessas enzimas é capaz de produzir outras espécies menos reativas ou neutralizar metabólitos reativos (Halliwell & Cross, 1994).



Existem outras defesas antioxidantes, porém não enzimáticas que incluem substâncias como o ascorbato, carotenóides, vitamina E, ácido úrico entre outros (Kenneth, 1998).

Os danos oxidativos provenientes de EROs ocorrem por serem essas espécies muito instáveis, buscando sua estabilidade em diferentes macromoléculas, como por exemplo: fosfolípidos de membrana celulares, DNA e proteínas (Freeman & Crapo, 1982; Zwart *et al*, 1999).

Estudos recentes relacionam alguns danos causados às células β pancreáticas ao aumento na produção de EROs. A causa mais evidente parece ser uma baixa concentração de substâncias protetoras, embora as principais enzimas antioxidantes estejam presente na célula β pancreática em quantidades razoáveis (Oberley, 1988).

Enzimas como a superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (Cu-ZnSOD), superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GR) estão presentes em quantidades razoáveis na células β das ilhotas pancreáticas. Porém a atividade total dessas enzimas antioxidantes parece ser baixa, e o “status” das enzimas antioxidantes pode ser mais susceptível a algumas formas de estresse oxidativo. Estudos que evidenciaram mudanças nesse “status” de enzimas antioxidantes observaram uma diminuição da função das ilhotas e consequentemente na secreção de insulina (Oberley, 1988).

Devido ao exposto, seria possível inferir que o dano pancreático seja devido a um aumento da produção de EROs gerado no período inflamatório da doença, lembrando que alguns estudos sugerem a relação entre os marcadores de inflamação sistêmica subclínica principalmente a IL-6 e a proteína C reativa com situações de hiperglicemia e resistência à

insulina podendo chegar ao desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 2 (Pradhan *et al*, 2001; Hak *et al*, 2001).

1.5 Insulina

A molécula de insulina foi descoberta em 1922 por Banting e Best, sendo formada por duas cadeias polipeptídicas chamadas de A e B que são mantidas juntas por pontes de dissulfeto. Seu peso molecular é 6000 kDa. A cadeia A contém 21 aminoácidos e a cadeia B 30 aminoácidos (Berne, *et al*, 1998), como mostrado na figura abaixo.

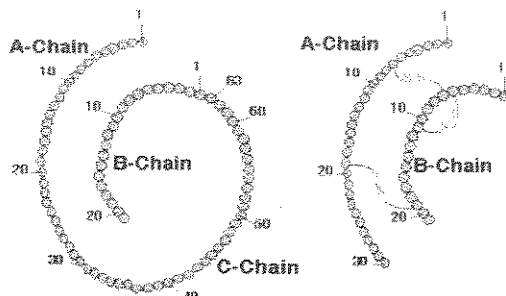


Figura 1 – Estrutura da molécula da insulina -

<http://www.blc.Arizona.Edu/courses/181gh/rick/expression2/translation.html>

A insulina é membro da família de proteínas regulatórias sendo o hormônio anabólico de maior importância no estado alimentado pelo seu papel como regulador do metabolismo glicídico, coordenando a distribuição do influxo de nutrientes (Berne *et al*, 1998). Seus efeitos são diversos, envolvendo muitos órgãos e vias intracelulares. Além de seu papel no metabolismo periférico, a insulina pode influenciar na regulação central do balanço energético como o único hormônio que diminui significativamente as concentrações plasmáticas de glicose sanguínea (Hoekstra *et al*, 1982; Berne *et al*, 1998).

1.5.1 Biossíntese da insulina

Esse hormônio é sintetizado pelas células β das ilhotas de Langerhans que perfazem um total de 1% de toda a massa pancreática (Berne *et al*, 1998). A biossíntese da molécula envolve dois precursores inativos, a pré-pró-insulina e a pró-insulina, que são posteriormente clivados para formar o hormônio ativo e o peptídeo C (Hoekstra *et al*, 1982; Berne *et al*, 1998)

A pré-pró-insulina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e transportada para o aparelho de Golgi onde são estabelecidas ligações dissulfeto (Hoekstra *et al*, 1982). Contêm quatro peptídeos: um peptídeo sinalizador N-terminal, a cadeia B da insulina, um peptídeo de conexão e a cadeia A da insulina. O primeiro a ser clivado é o peptídeo sinalizador logo no local da síntese, enquanto a cadeia pró-insulina esta sendo completada (Berne *et al*, 1998).

As cadeias A e B da insulina, conectadas por pontes de dissulfeto, estão ligadas pelo peptídeo C que é uma molécula de conexão. Essa molécula é clivada dando origem ao hormônio ativo. Essa clivagem é feita dentro dos grânulos de secreção. A molécula de insulina resultante, juntamente com o peptídeo C, é retida nos grânulos secretórios e liberadas por exocitose, em quantidades equimolares (Berne *et al*, 1998).

O peptídeo C é um polipeptídeo contendo 31 aminoácidos remanescentes da clivagem da molécula de pró-insulina sendo uma molécula biologicamente inativa. A função biológica primária do peptídeo C é de assegurar a estrutura correta da molécula de insulina durante seu armazenamento dentro dos grânulos de secreção antes de sua exocitose (Hoekstra *et al*, 1982).

A dosagem de peptídeo C tem sido aplicada extensivamente no estudo da função da célula β devido a sua alta sensibilidade. Na sua passagem pelo fígado esse peptídeo não é metabolizado, ao contrário da insulina que tem uma extração de 50 a 70% na sua primeira passagem pelo tecido hepático. Sendo assim, a dosagem do peptídeo C permite uma avaliação da quantidade real de insulina secretada pelos grânulos secretórios e liberada para a circulação portal (Hoekstra *et al*, 1982; Rendell *et al*, 1981).

1.5.2 Secreção de insulina

A secreção de insulina é controlada por uma relação de retroalimentação com o suprimento de nutrientes exógenos. Esse ajuste é feito de acordo com a flutuação das concentrações plasmáticas de glicose, ou seja, quando esse suprimento é abundante, ocorre a secreção de insulina. Sua liberação na corrente sanguínea permite que o uso desses nutrientes inibam simultaneamente a mobilização de substratos endógenos. Quando o suprimento de nutrientes é baixo, o inverso ocorre, acelerando esta mobilização (Bosquero, 1996; Berne *et al*, 1998).

O principal estimulante para a secreção de insulina é a glicose, porém essa secreção pode ainda ser modulada por hormônios e neurotransmissores. Com isso, um controle multifatorial para a secreção de insulina permite que o controle secretório seja bastante adequado em diferentes situações metabólicas como jejum, trauma, refeição, exercício físico, etc. (Bosquero, 1996; Berne *et al*, 1998; Haber *et al*, 2001).

A glicose é transportada para o interior da célula β por uma proteína de membrana, chamada GLUT 2 (Figura 2 - 1). Essa proteína tem um elevado K_m permitindo um equilíbrio rápido e eficiente entre as concentrações internas e externas desse carboidrato

quando essa se eleva no meio extracelular. Após sua secreção a insulina liga-se a receptores específicos na superfície celular e através de mecanismos moleculares facilita a entrada de glicose e o metabolismo celular (Bosquero, 1996; Haber *et al*, 1996).

O passo seguinte para a secreção insulínica na célula β é a fosforilação da molécula de glicose, o que, por sua vez, assegura que esse combustível seja metabolizado no interior da célula. A enzima glicoquinase, responsável por essa fosforilação, parece funcionar como o sensor fundamental da glicose que controla a resposta subsequente das células β . Um sinal para a liberação de insulina é gerado pela glicose 6- fosfato (G6P) (Bosquero, 1996; Haber *et al*, 1996).

No interior da célula β , o fluxo metabólico é sempre direcionado para eventos mitocondriais, onde o destino preferencial da G6P é a glicólise, que leva a produção de ATP. Outros substratos metabolizáveis pelas células β e que geram ATP, como alguns aminoácidos de cadeia ramificada, também são capazes de estimular a produção de insulina (Boschero, 1996). Menos de 10% da G6P entra na via das pentoses fosfato, além disso, as enzimas responsáveis pela síntese de glicogênio, têm atividade baixa na célula β (Haber *et al*, 1996). Com isso a fração ATP/ADP aumenta (Figura 2 – 2) no citoplasma levando ao fechamento dos canais de potássio que gera a despolarização da membrana (Figura 2 – 3) que por sua vez abre os canais de cálcio, sensíveis à voltagem.

O aumento do cálcio intracelular (Figura 2 – 4) resulta em despolarização suplementar da membrana plasmática, o que por fim desencadeia o processo excitatório (Figura 2 – 5) (Haber *et al*, 1996).

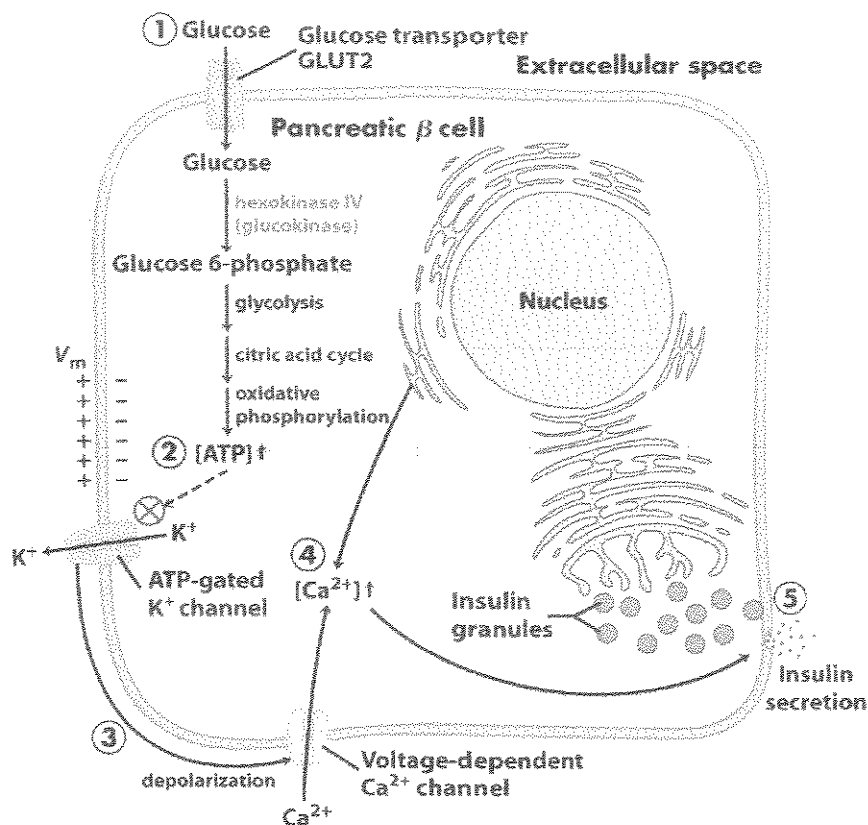


Figura 2 - Esquema da secreção de insulina (Lehninger *et al*, 2004)

A secreção de insulina, induzida por glicose ou por qualquer outro estímulo, somente ocorre quando as concentrações citoplasmáticas de cálcio se elevam. Esse cálcio pode ser proveniente tanto do compartimento intracelular (retículo endoplasmático) ou do compartimento extracelular, sendo este o mais importante (Boschero, 1996; Berne *et al*, 1998).

A secreção de insulina pode ser potencializada por agentes colinérgicos, em especial pela acetilcolina liberada por terminais vagais, na intimidade das ilhotas. Existem vários mecanismos pelo qual o sinal da superfície do receptor é passado para o interior da célula, sendo que o mais conhecido envolve a proteína G agindo em várias proteínas efetoras. A

interação do neurotransmissor com seu receptor específico estimula a fosfolipase C de membrana que resulta na hidrólise do fosfatidilinositol com a formação de dois segundos mensageiros: o inositol tri fosfato (IP3) e o diacil glicerol (DAG), ambos atuam aumentando a concentração de cálcio dentro da célula β . A potencialização da secreção de insulina pela acetilcolina ocorre na fase cefálica da alimentação, que corresponde aos primeiros 10 min (Boschero, 1996).

Estudos que não determinaram a glicemia e as taxas de insulina na fase rápida da secreção nos testes de tolerância intravenosa a glicose, encontraram diferenças nas concentrações plasmáticas nos tempos posteriores a 10 min, o que não corresponde a fase rápida da secreção insulínica (Reis, 1960; Oliveira, 1993).

Como já discutido anteriormente, a agressão ao sistema nervoso autônomo na fase aguda da DCH, resulta não somente em alterações viscerais, mas também em distúrbios metabólicos funcionais no organismo, alterando em graus variáveis a homeostase do metabolismo glicídico, provocada pela disautonomia causada pelo *T.cruzi* (Andrade, 2000). Esse fato ainda não está totalmente esclarecido com relação à secreção de insulina.

2. Objetivos:

Objetivo Geral:

Baseado no exposto, o presente estudo, teve como finalidade investigar as concentrações séricas de glicose sanguínea e secreção de insulina em pacientes chagásicos comparando-os com indivíduos normais. Além disso, as concentrações de duas enzimas antioxidantes foram avaliadas.

Objetivos Específicos:

- Avaliar as concentrações plasmáticas de glicose e insulina durante os testes de tolerância à glicose oral e intravenosa.
- Analisar a secreção de insulina através dos níveis plasmáticos de insulina e peptídeo C nos mesmos testes de sobrecarga de glicose.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes, catalase e glutathione redutase.

3. Materiais e Métodos:

3.1 Casuística:

O estudo consistiu da avaliação de dois grupos de indivíduos; um grupo controle composto por 15 indivíduos não chagásicos e um segundo formado por 15 portadores da forma crônica de DCH.

Os pacientes chagásicos desse estudo foram selecionados no ambulatório do Grupo de Estudos de Doença de Chagas (GEDOCH) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (FCM/UNICAMP). Os critérios para inclusão no estudo foram os seguintes:

- Duas reações sorológicas positivas para Doença de Chagas (fixação do complemento $\geq 1/40$ e reação de imunofluorescência $\geq 1/4$ ou ELISA reagente).
- Ausência de Hipertensão Arterial
- Idade entre 20 e 45 anos.
- Peso corpóreo em torno de 20% do peso ideal.
- Antecedentes pessoais e/ou familiares negativos para Diabetes Mellitus, hipertensão arterial, obesidade e outras doenças metabólicas.

O grupo composto de indivíduos normais também seguiu os mesmos critérios para inclusão no estudo, exceto as sorologias positivas.

Todos os procedimentos foram realizados após a concordância esclarecida e assinatura de todos os participantes de um termo de consentimento, aprovado pelo Comitê de Ética da (FCM/UNICAMP) (Anexo I).

Os participantes foram orientados a ingerir uma dieta adequada para as suas necessidades calóricas diárias, contendo no mínimo 200 g de carboidratos, pelo menos três dias antes da realização do teste. Recomendou-se também ao paciente que não ingerisse bebida alcoólica e/ou fumasse, por um período mínimo de sete dias antes da realização dos testes.

Os testes de tolerância à glicose intravenosa tiveram início pela manhã (entre 07:30h e 08:30h), em sala apropriada na Unidade de Estudos Metabólicos do HC-UNICAMP, após um período de 10 a 14 horas de jejum, com uma média de 12 horas.

Os participantes foram acomodados confortavelmente em leito e posicionados de forma adequada sendo a veia da fossa cubital puncionada para coleta de amostras de sangue durante o teste.

3.2 Teste de Tolerância à Glicose

3.2.1 Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

Os indivíduos ingeriram uma solução contendo 75 g de glicose dissolvida em 400 ml de água. Amostras de sangue (5 ml) foram colhidas nos tempos zero (jejum), 30, 60, 90 e 120 min, tendo o final da ingestão como referência e conforme descrito no anexo 1. As alíquotas coletadas foram submetidas à centrifugação a 700 x g por 10 min, e o sobrenadante utilizado para a quantificação da glicemia e insulinemia. A dosagem da glicemia foi feita pelo método da glicose-oxidase (Lott & Turner, 1975). A insulinemia foi dosada por radioimunoensaio, empregando-se o método do duplo anticorpo para insulina humana (Vieira, 1970; Feldman & Rodbard, 1971). Todas as amostras de um experimento foram dosadas em duplicata no mesmo ensaio.

3.2.2 Teste de Tolerância à Glicose Intravenosa (TTGIV)

O estudo com glicose intravenosa foi realizado uma semana após o primeiro teste e consistiu na administração intravenosa de glicose a 25% (0,5 g/Kg de peso). Após coleta de sangue no tempo zero seguido da infusão intravenosa de glicose, foram feitas coletas de sangue (5 ml) nos tempos 1,3,5,7,10,20,30,40,50 e 60 min, tendo o final da infusão como referência. A coleta foi realizada conforme descrito no TTOG. A glicemia e a insulinemia foram avaliadas conforme exposto anteriormente. Também foi dosado o nível de peptídeo-C em cada uma dessas amostras e os resultados expressos em ng/ml (Westgard *et al*, 1981).

3.3 Defesas Antioxidantes :

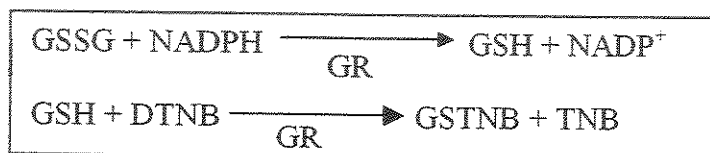
No segundo dia dos testes, durante a coleta do tempo zero, 8 ml de sangue foram coletados em tubos contendo heparina e centrifugado à 700 x g por 10 min sendo o plasma descartado .

As hemácias foram lavadas com solução gelada de tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e centrifugadas à 700 x g, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido três vezes. Aliquotas de 500 µL foram retiradas e hemolisadas com água destilada na proporção 1:1 (v/v), com posterior armazenamento a -80°C para as análises da atividade das enzimas antioxidantes. (Anexo II).

O hemolisado foi descongelado somente no momento do experimento e este sofreu nova diluição em tampão fosfato 0,2 M/ EDTA 2 mM (pH 7,0) na concentração final de 1/20.

3.3.1 Glutathione Redutase (GR)

Os ensaios foram conduzidos de acordo com Smith *et al* (1988). Amostras de hemolisado (5 μ L) foram adicionadas a um meio de incubação contendo KH₂PO₄ 0,2M e EDTA 2mM em pH 7,0, 50 μ L de NADPH 2mM, 250 μ L de 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) 3mM e 50 μ L de GSSG 20mM. A formação de TNB foi acompanhada em um espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 à 412 nm. O princípio do método é baseado na redução do DTNB, com conseqüente aumento de TNB, conforme mostrado na figura abaixo (Smith *et al*, 1988):



Para calcular a atividade da enzima no sangue, utilizou-se a seguinte equação:

$$E = 100 \times A / [\text{Hb}]$$

onde: E = atividade da enzima em unidades internacionais (UI)/grama de hemoglobina;

[Hb] = concentração de hemoglobina do hemolisado em g/dL

A = número de unidades de enzima da amostra, calculada pela equação:

$$\Delta A / 13.600 \times V_h / V_c$$

onde: ΔA = variação da absorbância à 412 nm em 1 minuto,

13.600 M⁻¹cm⁻¹ coeficiente de extinção do TNB à 412 nm,

V_h = volume de hemolisado na cubeta, V_c = volume total da cubeta

3.3.2 Catalase:

O meio de reação continha tampão fosfato 50mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 mM. A determinação da atividade da Catalase ocorre através da velocidade com que o H_2O_2 é reduzido pela enzima, levando a uma diminuição da absorbância à 240nm. A diferença na leitura das absorbâncias à 240nm, em um determinado intervalo de tempo, permite a determinação da velocidade de redução do H_2O_2 , que é proporcional a velocidade da reação enzimática catalisada pela Catalase (Aebi, 1984):

O cálculo da atividade da Catalase sanguínea foi feito pela seguinte equação (Aebi, 1984):

$$(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$$

onde: a = volume de hemolisado na cubeta

b = volume total da cubeta;

A1 = valor da absorbância em $t = 0$

A2 = valor da absorbância em 15 segundos

3.4 Determinação da Concentração de Hemoglobina no Hemolisado

Os valores de concentração de hemoglobina no hemolisado foram obtidos através do método de Drabkin (Beatler, 1975), onde a Hb (100 μL da amostra preparada a partir do hemolisado) em presença de reagente de Drabkin (2 mL) formam um composto, a cianometahemoglobina, que absorve em 540 nm e cujo coeficiente de extinção Milimolar é $11,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.5 Análise Estatística

Para comparar as AUCs, glutathione redutase e catalase, por grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

As variáveis peptide C, glicemia e insulina foram submetidas à análise estatística utilizando –se a ANOVA (Análise de Variância) por Ranks.

Em todas as análises foi utilizado um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Os resultados obtidos para os dois grupos foram confrontados através de tratamento estatístico por análise de variância para amostras do mesmo tamanho (Costa Netto, 1977).

Nos gráficos referentes às tabelas foram colocadas as médias e o erro padrão da média (EPM).

4. Resultados:

4.1 Características gerais dos indivíduos participantes do estudo:

As características gerais dos indivíduos normais e pacientes chagásicos demonstram equivalência entre os grupos de estudo quanto a faixa etária, índice de massa corpórea e sexo. (Tabela 1 e 2)

Tabela 1 - Características gerais dos indivíduos normais (grupo controle)

Controles	Cor	Sexo	Idade	IMC (kg/m ²)	PA (mmHg)
A.S.S.	Branca	Masculino	27	20.0	120x80
A.S	Branca	Masculino	22	21.0	120x80
A.A.M.	Branca	Feminino	23	22.3	110x70
C.F.	Negra	Feminino	24	23.5	120x80
D.M.M	Branca	Feminino	27	18.9	110x70
J.K.F	Branca	Feminino	27	19.0	120x80
J.M.F	Pardo	Masculino	32	23.7	120x80
L.M	Branca	Feminino	25	18.5	110x70
M.A.S.	Branca	Masculino	33	24.0	120x70
S.N.S	Negra	Feminino	41	20.4	110x80
T.G.F	Branca	Feminino	40	22.0	110x60
V.P.	Branca	Masculino	24	21.2	120x80
A.G.R.	Branca	Masculino	43	24.1	120x80
W.A.R.	Branca	Masculino	42	23.8	120x80
C.S.	Branca	Feminino	33	20.9	110x70
média			30.87	21.55	
DP			7.47	1.97	

Tabela 2 - Características gerais dos pacientes chagásicos

Paciente	Cor	Sexo	Idade	IMC (kg/m ²)	PA (mmHg)	Forma da DCH
A.O.S.	Branca	Feminino	35	22.6	125x80	I
A.C.R.	Branca	Feminino	40	23.8	120x70	C + D
C.S.B.	Pardo	Masculino	29	20.3	110x80	I
E.F.	Branca	Feminino	35	22.5	110x70	I
H.B.R.	Negra	Feminino	31	18.5	110x70	C+D
J.O.P.S.	Branca	Feminino	30	23.0	120x85	D
J.R.C.O.	Branca	Masculino	39	24.7	130x80	I
J.S.O.	Negra	Feminino	41	24.0	120x80	I
M.A.B	Parda	Feminino	28	22.9	120x80	C
M.A.S.	Branca	Feminino	23	19.5	110x70	C
M.F.L.A.	Parda	Feminino	35	23.1	130x70	C + D
M.R.S.	Parda	Feminino	41	20.1	120x80	D
R.G.M.	Branca	Masculino	35	24.0	120x80	C
V.G.M.	Branca	Feminino	35	22.0	130x80	C
Z.L.M.B.	Branca	Feminino	25	22.6	120x80	I
média			33.47	22.24		
DP			5.66	1.83		

onde: I – Doença de Chagas Forma Crônica Indeterminada
C – Doença de Chagas Forma Cardíaca
D – Doença de Chagas Forma Digestiva (Megacólon ou Megaesôfago)
DP – desvio padrão

4.2 Teste de tolerância à glicose oral (TTGO):

4.2.1 Determinação da concentração plasmática da Insulina:

As concentrações plasmáticas de insulina no TTGO dos dois grupos de estudos encontram-se representadas nas Tabelas 3 e 4 e na Figura 3.

As concentrações séricas de insulina dos indivíduos normais se elevaram rapidamente em resposta à carga oral de glicose atingindo valores máximos aos 30 min ($123,14 \pm 73,98 \mu\text{U/ml}$), declinando a seguir, mas mantendo-se mais elevado que o basal aos 120 min.

No grupo dos pacientes a resposta foi semelhante, sendo os níveis máximos de insulina também aos 30 min ($160,36 \pm 126,06 \mu\text{U/ml}$).

Não foram observadas diferenças significativas pelos testes estatísticos utilizados entre os dois grupos.

Tabela 3 – Concentrações Plasmáticas de Insulina ($\mu\text{U/ml}$) em indivíduos normais antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose.

Controles	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
A.S.S.	11,67	81,00	80,37	64,05	55,05
A.S.	8,00	108,00	93,00	42,00	22,00
A.A.M.	16,00	141,00	224,00	188,00	224,00
C.F.	31,00	300,00	360,00	234,00	240,00
D.M.M.	10,24	40,50	64,29	34,47	44,40
J.K.F.	12,00	57,00	48,00	42,00	42,00
J.M.F.	10,00	51,00	84,00	63,00	31,00
L.M.	13,00	234,00	135,00	42,00	42,00
M.A.S.	14,00	180,00	135,00	117,00	112,00
S.N.S.	13,66	68,91	75,90	46,47	46,23
T.G.F.	14,00	192,00	141,00	120,00	62,00
V.P.	8,14	100,50	69,39	52,77	49,05
A.G.R.	12,88	103,71	102,21	62,00	93,00
W.A.R.	8,98	73,47	67,86	71,07	49,65
C.S.	11,00	116,00	128,00	104,00	60,00
média	12,97	123,14	120,53	85,52	78,16
DP	5,50	73,98	79,64	58,36	66,42
EPM	1,42	19,10	20,56	15,07	17,15

Tabela 4 - Concentrações Plasmáticas de Insulina ($\mu\text{U/ml}$) em indivíduos chagásicos antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose.

Pacientes	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
A.O.S.	15,00	192,00	174,00	87,00	105,00
A.C.R.	15,00	63,00	102,00	90,00	92,00
C.S.B.	7,60	36,00	63,00	21,00	28,00
E.F.	9,00	71,00	81,00	63,00	62,00
H.B.R.	9,50	64,05	42,15	50,79	36,27
J.O.P.S.	11,00	150,00	63,00	30,00	40,00
J.R.C.O.	27,00	270,00	102,00	129,00	132,00
J.S.O.	11,94	33,00	45,09	53,40	68,70
M.A.B.	9,70	186,51	201,27	21,90	8,00
M.A.S.	9,60	117,00	129,00	168,00	92,00
M.F.L.A.	12,00	282,00	112,00	36,00	46,00
M.R.S.	12,71	502,83	220,80	40,00	28,38
R.G.M.	6,00	114,00	36,00	33,00	21,00
V.G.M.	14,00	246,00	168,00	120,00	58,00
Z.L.M.B.	15,00	78,00	141,00	174,00	129,00
média	12,34	160,36	112,02	74,47	63,09
DP	4,91	126,06	59,17	51,56	39,07
EPM	1,27	32,55	15,28	13,31	10,09

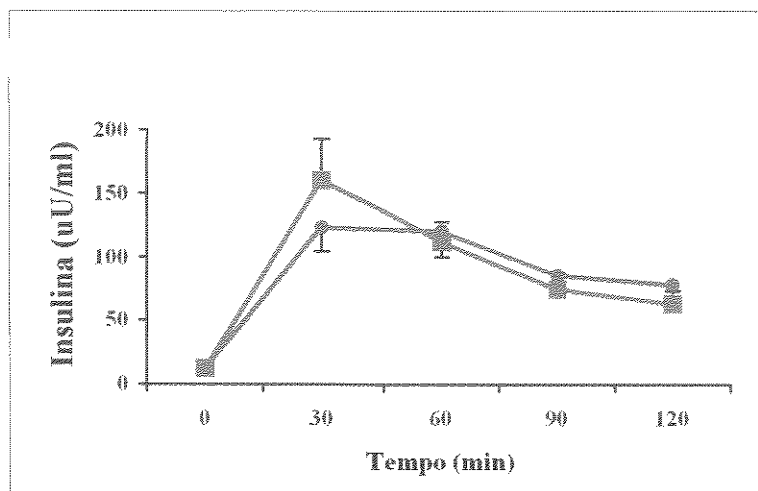


Figura 3 – Determinação das concentrações plasmáticas de insulina (µU/ml) em indivíduos normais (●) e chagásicos (■) antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose (TTGO).

4.2.2 Determinação da Glicemia:

As concentrações plasmáticas venosas de glicose no teste oral de tolerância à glicose dos dois grupos de estudos encontram-se nas Tabelas 5 e 6 e Figura 4. Houve uma resposta normal de tolerância à glicose no grupo controle, atingindo um valor máximo aos 30 min ($139,67 \pm 27,85$ mg/dl). O retorno aos valores próximos dos basais se deu ao final de 2 horas após a sobrecarga. No grupo de pacientes chagásicos o valor máximo ocorreu também aos 30 min após a sobrecarga ($128,13 \pm 24,83$ mg/dl), assim como o retorno aos valores basais aos 120 min.

Nenhum paciente chagásico apresentou valores de intolerância a carboidratos e todos após 90 min começavam a retornar aos níveis basais de glicose. Apenas o paciente J.S.O. apresentou ao final dos 120 min após a sobrecarga uma glicemia de 145 mg/dl. A análise comparativa entre os grupos demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 5 – Concentração plasmática de glicose (mg/dl) em indivíduos normais (grupo controle) antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose.

Controles	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
A.S.S.	82,0	181,0	184,0	139,0	129,0
A.S.	76,0	121,0	123,0	96,0	81,0
A.A.M.	78,0	140,0	138,0	121,0	115,0
C.F.	86,0	107,0	114,0	108,0	113,0
D.M.M.	69,0	83,0	65,0	57,0	78,0
J.K.F.	79,0	104,0	81,0	97,0	96,0
J.M.F.	82,0	159,0	169,0	145,0	108,0
L.M.	85,0	156,0	105,0	107,0	92,0
M.A.S.	86,0	172,0	154,0	157,0	132,0
S.N.S.	79,0	140,0	132,0	111,0	120,0
T.G.F.	97,0	176,0	163,0	136,0	122,0
V.P.	74,0	140,0	130,0	108,0	114,0
A.G.R.	85,0	146,0	122,0	98,0	115,0
W.A.R.	84,0	137,0	128,0	118,0	108,0
C.S.	93,0	133,0	113,0	101,0	96,0
média	82,33	139,67	128,07	113,27	107,93
DP	7,08	27,85	31,65	24,48	16,23
EPM	1,83	7,14	8,17	6,32	4,19

Tabela 6 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl) em indivíduos chagásicos antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose.

Pacientes	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
A.O.S.	88,0	130,0	102,0	92,0	104,0
A.C.R.	95,0	133,0	137,0	115,0	106,0
C.S.B.	86,0	128,0	137,0	83,0	73,0
E.F.	79,0	81,0	79,0	77,0	93,0
H.B.R.	82,0	134,0	89,0	94,0	109,0
J.O.P.S.	93,0	148,0	100,0	107,0	121,0
J.R.C.O.	92,0	148,0	110,0	125,0	116,0
J.S.O.	87,3	126,4	162,0	155,6	145,0
M.A.B.	82,3	131,5	120,0	54,0	57,0
M.A.S.	81,0	122,0	115,0	105,0	120,0
M.F.L.A.	83,0	115,0	108,0	63,0	86,0
M.R.S.	72,0	82,0	89,0	65,0	64,0
R.G.M.	86,0	178,0	127,0	126,0	122,0
V.G.M.	81,0	114,0	119,0	120,0	107,0
Z.L.M.B.	87,0	151,0	188,0	176,0	130,0
média	84,97	128,13	118,8	103,84	103,53
DP	5,92	24,83	28,77	34,09	24,81
EPM	1,53	6,41	7,43	8,8	6,41

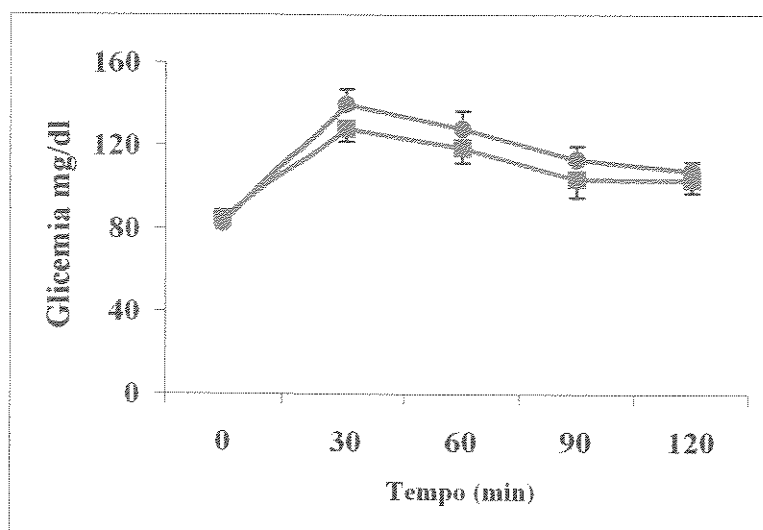


Figura 4 – Determinação da glicemia (mg/dl) em indivíduos normais (●) e chagásicos (■) antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose (TTGO).

4.2.3 Dosagem dos níveis de Peptídeo C:

A quantificação de peptídeo C, índice preciso para avaliação da secreção de insulina, no teste oral de tolerância à glicose dos dois grupos de estudos encontram-se nas Tabelas 7 e 8 e na Figura 5.

Da mesma forma que os parâmetros avaliados anteriormente, os valores basais de peptídeo C não diferiram entre as amostras obtidas dos voluntários e dos pacientes chagásicos nos diferentes tempos de coleta.

Tabela 7: Concentrações plasmáticas de peptídeo C (ng/dl) em indivíduos normais (grupo controle) antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose.

Controles	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
A.S.S.	1,2	6,6	8,0	8,0	9,2
A.S.	1,14	12,95	12,0	8,0	5,6
A.A.M.	2,4	5,0	8,8	12,0	11,0
C.F.	3,5	13,5	15,5	14,0	13,4
D.M.M.	0,88	3,21	11,76	6,31	6,6
J.K.F.	2,0	5,0	4,8	7,4	5,4
J.M.F.	1,8	3,3	8,8	11,0	6,8
L.M.	2,0	10,0	10,0	7,0	5,2
M.A.S.	1,2	2,87	5,03	2,17	3,56
S.N.S.	1,18	8,87	6,8	7,6	6,8
T.G.F.	2,4	8,4	7,4	8,4	8,4
V.P.	1,6	9,2	9,2	7,2	9,2
AGR	2,5	9,0	11,0	10,0	14,0
W.AR	2,3	8,6	10,8	10,8	9,6
C.S.	2,8	13,0	13,2	12,4	14,0
média	1,93	7,97	9,54	8,82	8,58
DP	0,74	3,57	2,96	2,94	3,33
EPM	0,19	0,92	0,76	0,76	0,86

Tabela 8: Concentrações plasmáticas de peptídeo C (ng/dl) em indivíduos chagásicos antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose.

Pacientes	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
A.O.S.	2,0	14,0	14,0	8,0	8,8
A.C.R.	3,2	6,0	7,4	10,92	11,0
C.S.B.	1,2	4,3	8,6	6,0	4,70
E.F.	1,6	10,6	10,44	15,7	9,6
H.B.R.	1,4	7,4	9,2	8,6	8,0
J.O.P.S.	1,6	7,4	8,6	5,4	6,0
J.R.C.O.	4,10	12,0	12,0	11,0	13,0
J.S.O.	3,2	3,8	5,2	7,0	9,0
M.A.B.	2,0	13,2	13,2	5,2	3,40
M.A.S.	2,47	13,4	16,0	12,4	16,0
M.F.L.A.	1,7	9,4	8,4	6,6	6,0
M.R.S.	1,12	8,0	8,0	6,97	4,46
R.G.M.	0,94	7,0	6,2	6,2	4,2
V.G.M.	1,7	14,0	17,04	10,2	6,6
Z.L.M.B.	2,0	6,6	8,4	11,0	8,4
média	2,02	9,14	10,18	8,75	7,94
DP	0,88	3,51	3,52	3,02	3,5
EPM	0,23	0,91	0,91	0,78	0,9

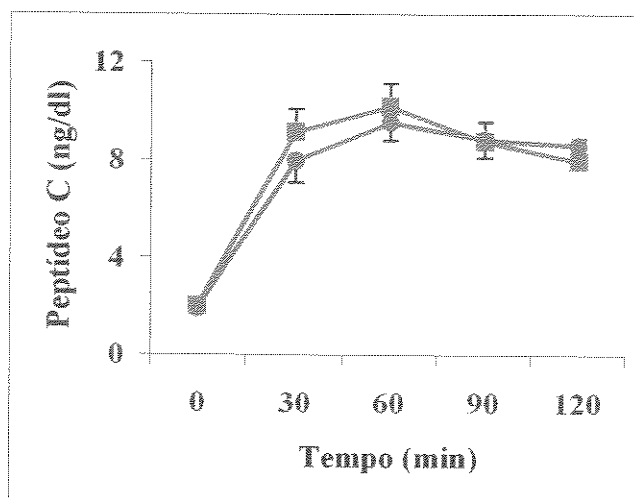


Figura 5 – Determinação das concentrações plasmáticas de peptídeo C (ng/dl) em indivíduos normais (●) e chagásicos (■) antes (tempo 0) e após a ingestão de 75g de glicose (TTOG).

4.3 Teste de tolerância intravenosa à glicose (TTGIV):

4.3.1 Determinação da concentração plasmática de Insulina

Quanto ao teste de avaliação com sobrecarga intravenosa de glicose, as médias das concentrações plasmáticas de insulina também não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos (Tabela 9 e 10 e Figura 6). Não houve diferença nos valores séricos de insulina entre os grupos, após o estímulo com glicose intravenosa.

Nos indivíduos normais, ocorreu uma resposta insulinêmica máxima nos tempos de 1 e/ou 3 min após o término da infusão de glicose, ocorrendo uma diminuição progressiva após esse tempo, mas com valores séricos superiores aos basais, após 60 min. O grupo de chagásicos mostrou comportamento similar.

Tabela 9 – Concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/ml}$) em indivíduos normais (grupo controle) antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de 0,5g/kg de peso de glicose.

Controles	Tempo (min)							
	0	1	3	5	7	10	30	60
A.S.S.	10.0	200.0	144.0	112.0	100.0	86.0	43.0	22.0
A.S.	12.0	148.0	228.0	148.0	140.0	112.0	46.0	22.0
A.A.M.	10.0	62.0	62.0	52.0	56.0	46.0	36.0	24.0
C.F.	15.0	300.0	380.0	400.0	240.0	260.0	58.0	15.0
D.M.M.	9.88	80.94	114.96	101.58	88.94	84.32	42.67	20.66
J.K.F.	11.0	54.0	60.0	56.0	46.0	46.0	29.0	12.0
J.M.F.	12.0	104.0	56.0	52.0	38.0	38.0	35.0	35.0
L.M.	11.0	132.0	116.0	96.0	96.0	92.0	66.0	21.0
M.A.S.	15.0	180.0	198.0	135.0	90.0	126.0	78.0	25.99
S.N.S.	10.5	136.0	124.0	100.0	83.0	70.0	35.0	13.0
T.G.F.	9.0	70.0	50.0	46.0	52.0	50.0	41.0	30.0
V.P.	14.0	141.0	111.0	81.0	81.0	90.0	50.0	24.0
A.G.R.	18.0	136.0	104.0	86.0	68.0	62.0	72.0	84.0
W.A.R.	12.0	80.0	88.0	56.0	60.0	44.0	47.0	40.0
C.S.	10.0	60.0	64.0	60.0	68.0	60.0	61.0	21.0
média	11.96	125.6	126.6	105.44	87.13	84.42	49.31	27.31
DP	2.5	66.02	86.92	87.34	49.46	55.19	14.63	17.39
EPM	0.50	12.20	15.69	13.29	8.26	9.19	3.01	2.88

Tabela 10 – Concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/ml}$) em indivíduos chagásicos antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de 0,5g/kg de peso de glicose.

Pacientes	Tempo (min)							
	0	1	3	5	7	10	30	60
A.O.S.	12.0	104.0	100.0	90.0	98.0	98.0	47.0	19.0
A.C.R.	15.0	70.0	64.0	66.0	56.0	56.0	41.0	38.0
C.S.B.	11.0	30.0	42.0	36.0	34.0	32.0	30.0	16.0
E.F.	9.0	104.0	104.0	92.0	86.0	88.0	58.0	24.0
H.B.R.	11.0	54.0	141.0	135.0	99.0	84.0	63.0	23.0
J.O.P.S.	9.8	54.0	68.0	64.0	66.0	66.0	43.0	14.0
J.R.C.O.	7.6	86.0	14.2	112.0	200.0	220.0	130.0	49.0
J.S.O.	14.0	42.0	36.0	29.0	30.0	30.0	26.0	34.0
M.A.B.	13.57	112.14	101.1	72.36	62.68	53.16	44.30	42.82
M.A.S.	7.0	116.0	144.0	104.0	120.0	144.0	80.0	37.0
M.F.L.A.	9.2	108.0	140.0	124.0	100.0	96.0	60.0	21.0
M.R.S.	11.23	311.94	365.56	344.6	330.68	450.0	107.34	21.22
R.G.M.	5.8	66.0	72.0	56.0	38.0	34.0	22.0	15.0
V.G.M.	15.0	300.0	300.0	250.0	330.0	250.0	120.0	32.0
Z.L.M.B.	17.0	86.0	80.0	64.0	58.0	62.0	53.0	41.0
média	11.21	109.61	118.12	109.26	113.89	117.54	61.64	28.47
D.P.	3.24	84.08	96.05	83.99	97.53	112.68	33.52	11.29
E.P.M.	0.84	21.71	24.8	21.69	25.18	29.09	8.65	2.92

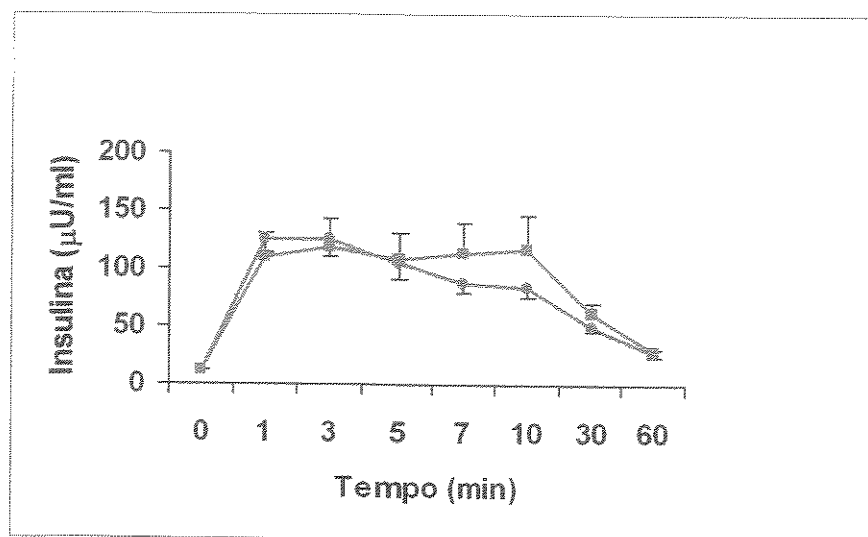


Figura 6 – Determinação das concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/ml}$) em indivíduos normais (●) e chagásicos (■) antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de glicose (TTGIV).

4.3.2 Determinação da Glicemia:

As concentrações plasmáticas de glicose também foram determinados nos diferentes tempos no TTGIV, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 11 e 12 e na Figura 7.

No teste de tolerância à glicose intravenosa, as concentrações plasmáticas venosas de glicose não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, ocorrendo maior valor após o primeiro minuto no grupo controle ($352,97 \pm 106,17 \text{ mg/dl}$), e no terceiro minuto no grupo de chagásicos ($315,67 \pm 36,24 \text{ mg/dl}$), com volta aos valores próximos do basal ao término da primeira hora após a infusão.

Tabela 11 – Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl) em indivíduos normais (grupo controle) antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de 0,5g/kg de peso de glicose.

Controles	Tempo (min)										
	0	1	3	5	7	10	20	30	40	50	60
A.S.S.	83,5	411,6	349,0	314,0	307,0	271,7	213,0	174,0	142,0	115,0	100,0
A.S.	77,0	360,0	318,0	304,0	282,0	260,0	186,0	136,0	110,0	85,0	74,0
A.A.M.	77,0	313,0	348,0	255,0	307,0	266,0	249,0	176,0	167,0	150,0	130,0
C.F.	95,0	424,0	409,0	323,0	314,0	285,0	215,0	119,0	75,0	64,0	62,0
D.M.M.	65,0	94,0	321,0	324,0	303,0	243,0	176,0	132,0	120,0	105,0	92,0
J.K.F.	94,0	254,0	314,0	333,0	331,0	304,0	182,0	107,0	71,0	65,0	69,0
J.M.F.	90,0	516,0	446,0	407,0	385,0	362,0	301,0	267,0	232,0	215,0	193,0
L.M.	98,0	501,0	416,0	366,0	366,0	341,0	255,0	175,0	138,0	105,0	78,0
M.A.S.	83,0	336,0	354,0	294,0	306,0	276,0	208,0	166,0	136,0	105,0	95,0
S.N.S.	94,0	418,0	313,0	322,0	292,0	241,0	175,0	124,0	90,0	76,0	72,0
T.G.F.	99,0	416,0	398,0	396,0	369,0	340,0	272,0	238,0	237,0	174,0	161,0
V.P.	81,0	365,0	327,0	337,0	298,0	280,0	230,0	197,0	159,0	133,0	111,0
A.G.R.	81,0	342,0	321,0	305,0	279,0	264,0	225,0	193,0	175,0	155,0	124,0
W.A.R.	74,0	287,0	279,0	271,0	263,0	258,0	216,0	198,0	167,0	146,0	126,0
C.S.	89,0	257,0	288,0	302,0	290,0	289,0	231,0	184,0	155,0	135,0	111,0
média	85,37	352,97	346,73	323,53	312,8	285,38	222,27	172,4	144,93	121,87	106,53
DP	9,83	106,17	49,28	41,32	35,34	36,45	36,15	44,37	48,98	42,35	36,41
E.P.M.	2,54	27,41	12,72	10,67	9,13	9,41	9,33	11,46	12,65	10,93	9,40

Tabela 12 – Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl) em indivíduos chagásicos antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de 0,5g/kg de peso de glicose.

Pacientes	Tempo (min)										
	0	1	3	5	7	10	20	30	40	50	60
A.O.S.	89,0	367,0	364,0	359,0	317,0	295,0	205,0	152,0	101,0	94,0	80,0
A.C.R.	97,0	261,0	279,0	288,0	273,0	273,0	261,0	242,0	223,0	202,0	183,0
C.S.B.	97,0	197,0	232,0	231,0	252,0	268,0	228,0	181,0	124,0	101,0	86,0
E.F.	85,0	332,0	334,0	327,0	329,0	290,0	224,0	164,0	136,0	113,0	91,0
H.B.R.	81,0	188,0	334,0	310,0	285,0	252,0	183,0	150,0	133,0	118,0	103,0
J.O.P.S.	81,0	301,0	288,0	307,0	324,0	299,0	204,0	144,0	117,0	97,0	81,0
J.R.C.O.	96,0	334,0	339,0	317,0	303,0	293,0	218,0	167,0	138,0	121,0	106,0
J.S.O.	83,0	376,0	341,0	328,0	319,0	308,0	276,0	244,0	223,0	205,0	192,0
M.A.B.	88,0	272,0	274,0	270,0	274,0	285,5	242,4	203,0	178,0	152,6	133,0
M.A.S.	85,0	244,0	306,0	306,0	279,0	278,0	201,0	178,0	157,0	140,0	110,0
M.F.L.A.	90,0	255,0	286,0	290,0	302,0	286,0	191,0	142,0	112,0	95,0	75,0
M.R.S.	79,0	373,0	339,0	306,0	293,0	264,0	185,0	120,0	84,0	62,0	54,0
R.G.M.	88,0	397,0	335,0	324,0	300,0	313,0	224,0	188,0	146,0	146,0	121,0
V.G.M.	83,0	329,0	336,0	322,0	318,0	307,0	219,0	159,0	111,0	105,0	87,0
Z.L.M.B.	98,0	337,0	348,0	337,0	336,0	300,0	256,0	193,0	163,0	140,0	118,0
Média	88,0	304,2	315,67	308,13	300,27	287,43	221,16	175,13	143,07	126,11	108,0
DP	6,43	65,33	36,24	30,29	24,09	17,59	28,0	35,09	40,59	39,43	38,12
E.P.M.	1,66	16,87	9,36	7,82	6,22	4,54	7,23	9,06	10,48	10,18	9,84

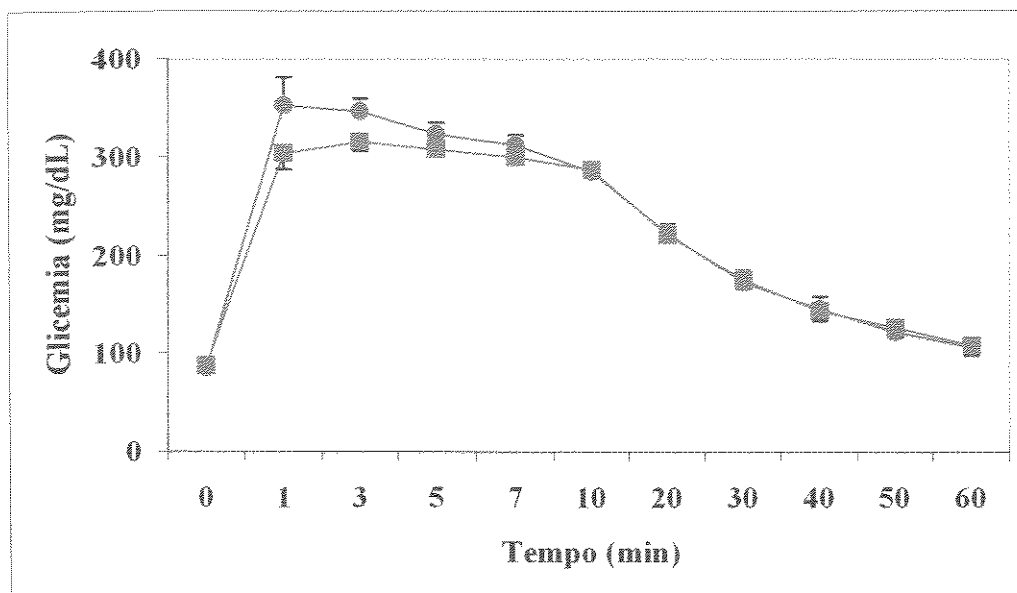


Figura 7 – Determinação da glicemia (mg/dl) em indivíduos normais (●) e chagásicos (■) antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de glicose (TTGIV).

4.3.2 Dosagem da concentração plasmática de Peptídeo C

Os valores séricos de peptídeo C encontram-se nas Tabelas 13 e 14 e Figura 8.

O mesmo comportamento observado no teste de tolerância oral à glicose, os valores basais de peptídeo C não diferiram entre as amostras obtidas dos voluntários e dos pacientes chagásicos nos diferentes tempos de coleta.

Tabela 13 – Concentrações plasmáticas de peptídeo C (ng/ml) em indivíduos normais (grupo controle) antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de 0,5g/kg de peso de glicose.

Controles	Tempo (min)							
	0	1	3	5	7	10	30	60
A.S.S.	1.2	6.6	6.0	5.6	5.2	5.2	4.4	3.0
A.S.	1.52	7.0	6.8	8.6	9.0	7.0	7.2	6.0
A.A.M.	1.8	4.0	4.9	4.2	4.5	5.0	6.4	6.4
C.F.	2.45	11.6	13.6	11.6	11.6	10.4	7.0	4.0
D.M.M.	1.2	4.4	5.4	7.1	-	3.1	3.8	2.6
J.K.F.	2.0	4.9	5.0	4.5	4.9	4.4	5.8	3.1
J.M.F.	2.5	8.0	6.8	6.4	5.6	6.4	7.4	7.4
L.M.	2.45	6.4	7.0	7.4	7.0	9.6	8.0	4.9
M.A.S.	2.59	7.2	8.4	8.0	9.0	10.0	8.0	6.8
S.N.S.	2.3	9.5	8.3	7.3	7.98	8.2	8.4	4.1
T.G.F.	2.4	6.4	6.0	5.6	6.4	6.8	4.9	6.2
V.P.	2.0	8.6	8.6	8.0	7.4	8.0	7.2	6.6
A.G.R.	2.5	6.6	6.0	5.4	5.4	5.8	9.0	13.0
W.A.R.	1.9	5.2	6.6	5.8	5.8	5.4	7.6	7.6
C.S.	2.3	4.6	5.4	6.0	5.4	6.0	6.0	4.8
média	2.07	6.73	6.99	6.77	8.41	6.75	6.74	5.77
DP	0.47	2.07	2.18	1.86	6.52	2.13	1.51	2.58
E.P.M.	0.10	0.39	0.39	0.38	0.96	0.46	0.32	0.49

Tabela 14 – Concentrações plasmáticas de peptídeo C (ng/ml) em indivíduos chagásicos antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de 0,5 g/kg de peso de glicose.

Pacientes	Tempo (min)							
	0	1	3	5	7	10	30	60
A.O.S.	1.95	6.0	6.0	5.6	6.0	6.8	6.4	4.9
A.C.R.	3.1	5.6	5.6	5.2	6.4	6.0	6.4	6.8
C.S.B.	2.0	3.1	3.05	3.3	3.3	4.9	5.6	4.0
E.F.	1.39	5.16	6.2	6.46	5.48	4.94	6.8	5.78
H.B.R.	1.5	2.9	5.4	5.8	4.8	5.2	6.0	4.5
J.O.P.S.	2.4	4.0	6.4	4.6	5.7	5.4	6.6	5.4
J.R.C.O.	3.7	7.4	11.0	9.6	9.6	7.4	10.0	10.0
J.S.O.	2.0	4.0	4.0	4.2	4.2	4.8	5.2	7.2
M.A.B.	2.2	5.2	5.6	5.6	5.4	5.0	6.6	6.6
M.A.S.	3.0	6.0	11.0	8.0	8.0	10.4	12.0	12.0
M.F.L.A.	2.2	8.0	7.4	7.4	6.8	6.8	5.2	4.9
M.R.S.	1.5	6.8	6.0	6.0	8.0	10.0	9.0	5.4
R.G.M.	1.1	5.0	5.6	5.4	4.5	4.4	4.2	4.0
V.G.M.	1.8	1.0	11.0	10.0	9.0	10.0	10.0	5.6
Z.L.M.B.	2.6	4.5	5.0	4.9	5.0	4.5	4.2	4.2
média	2.17	5.76	6.81	6.28	6.28	6.55	7.07	6.01
DP	0.73	2.10	2.46	1.88	1.80	2.14	2.32	2.31
E.P.M.	0.18	0.54	0.64	0.49	0.47	0.54	0.59	0.58

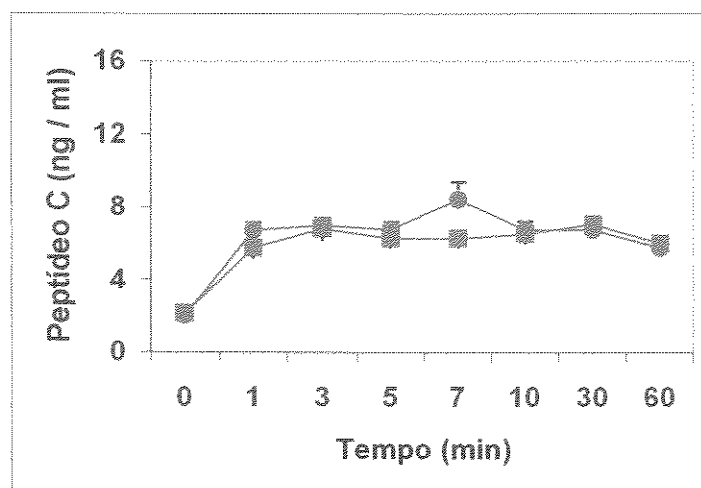


Figura 8 – Determinação das concentrações plasmáticas de peptídeo C (ng/ml) em indivíduos normais (●) e chagásicos (■) antes (tempo 0) e após a administração intravenosa de glicose (TTGIV).

O mesmo comportamento observado no TTOG foi observado no TTGIV.

A análise das áreas sob as curvas de glicose, insulina e peptídeo C tanto no teste de tolerância oral à glicose como no intravenoso, não mostraram diferenças significativas para os dois grupos estudados (Tabela 15 e 16).

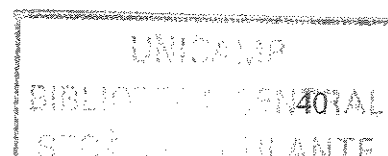
Tabela 15 – Área sob a curva dos parâmetros estudados no teste de tolerância oral a glicose (TTGO):

Parâmetro estudado	Área sob a curva				
	Controles		Pacientes		<i>p</i>
	Média	DP	Média	DP	
Insulina	9839,82	4442,04	11575,80	5515,02	0,4233
Glicose	14284,0	2653,69	13103,89	2494,84	0,2136
Peptídeo C	947,40	289,08	1014,78	280,58	0,6157

Parâmetro estudado	Área sob a curva				
	Controles		Pacientes		
	Média	DP	Média	DP	<i>p</i>
Insulina	3489,68	1363,81	4404,39	2741,09	0,5268
Glicose	11696,98	2206,21	11302,64	1331,71	0,8103
Peptídeo C	392,32	80,04	393,94	121,48	0.7434

Quando analisamos algumas ferramentas do sistema antioxidante dos grupos, a mesma tendência de similaridade se mantêm, pois entre os grupos o perfil das enzimas catalase e glutathione redutase não foram observadas diferenças significativas conforme mostrado na Tabela 17.

Enzima dosada	Grupo chagásico	Grupo controle	<i>p</i>
Catalase	0,39 ± 0,22	0,39 ± 0,17	0,9652
Glutationa Redutase	4,68 ± 1,76	4,84 ± 1,33	0,8786



5. Discussão

Na evolução da DCH são descritas duas fases distintas: uma aguda e outra crônica, onde o quadro clínico caracteriza-se principalmente pelo acometimento cardíaco e/ou digestivo. As alterações do sistema nervoso autônomo, presentes na DCH, ou seja, uma denervação autonômica, fato bastante estudado com importantes referências na literatura. Acredita-se que essa denervação relacione-se com as alterações no metabolismo dos carboidratos que são caracterizadas por uma recuperação deficiente dos níveis glicêmicos após a administração oral e intravenosa de glicose. É possível que esse tipo de alteração também ocorra no pâncreas, com conseqüentes anormalidades da denervação pancreática, particularmente no sistema parassimpático ou lesões nos gânglios intrapancreáticos que sofrem grande dano com a DCH, ou então pela própria lesão da célula β por processos isquêmicos ou inflamatórios, causados pela infecção parasitária, culminando com a redução na secreção de insulina (Oliveira, 1993; Guariento, 1994; Santos, 1999). Com relação ao metabolismo de carboidratos embora muitas alterações tenham sido encontradas, a literatura relata apenas alterações nas concentrações séricas de glicose e insulina, não havendo uma avaliação nesses trabalhos com relação à secreção de insulina ou peptídeo C, em diferentes tempos após a sobrecarga de glicose, tanto oral quanto intravenosa.

Nesse estudo foram avaliados 15 pacientes crônicos portadores de diferentes formas da DCH (divididas em indeterminada (6), digestiva (2), cardíaca (4) e cardíaca e digestiva (3)) e 15 indivíduos normais, com relação as concentrações plasmáticas de glicose, insulina e peptídeo C durante os testes de tolerância oral e intravenosa a glicose. Nos dois grupos estudados havia uma homogeneidade quanto a faixa etária (média de aproximadamente 30 anos), índice de massa corpórea (por volta de 22) e sexo (Tabelas 1 e 2).

Considerando-se o TTGO, alguns trabalhos observaram uma curva glicêmica anormalmente elevada quando os pacientes eram submetidos a um teste de tolerância oral a glicose, chegando a valores de 280 mg/dl nos primeiros 30 min e 245 mg/dl aos 60 min (Vieira, 1970; Vieira & Meneguelli, 1970). Entretanto, nesses trabalhos não havia um controle rigoroso da idade dos sujeitos da pesquisa, que variava de 17 até 60 anos. Os valores glicêmicos mais altos observados compreendiam os pacientes com idades acima de 45 anos, período onde se encontram diferenças significativas na secreção de insulina (Vieira, 1970; Vieira & Meneguelli, 1970; Oliveira, 1993; Santos, 1999). No presente estudo os valores máximos de glicemia observados ocorreram aos 30 min com retorno a valores próximos do basal ao final de 2hs (Figura 4). Nesse caso, porém, os valores máximos determinados foram de $139,67 \pm 7,41$ e $128,13 \pm 6,41$ mg/dl aos 30 minutos para o grupo controle e dos pacientes, respectivamente. As curvas de glicemia foram similares ao controle sem tendência à dispersão. Esses resultados, aliados ao fato das curvas de glicose no TTGIV também serem semelhantes ao grupo controle (Figura 7), como também observado por Guariento e colaboradores (Guariento *et al*, 1994), dão suporte à idéia de que o grupo de pacientes não apresentava anormalidades nos mecanismos de absorção de glicose. Nessas mesmas condições, os valores de insulina também atingiram níveis máximos aos 30 min nos dois grupos (Figura 3). Porém não foi observada nenhuma diferença estatística entre os mesmos.

Em nosso estudo, além dos níveis de insulina estarem similares ao do grupo controle observou-se que a secreção de insulina, avaliada pela quantificação do peptídeo C, também estava (Figura 5), descartando a possibilidade de uma alteração na secreção de insulina. Esse tipo de alteração foi sugerido por Guariento e colaboradores (Guariento *et al*, 1993) em um grupo de pacientes portadores da forma indeterminada da DCH, quando

foi observada uma resposta hipoinsulinêmica após sobrecarga oral de glicose que poderia estar relacionada, segundo os autores, à diminuição da secreção e /ou aumento da sensibilidade à insulina. Esses resultados sugerem que a hipoinsulinemia pode ser secundária a uma redução na secreção insulínica, provavelmente relacionada a uma disfunção autonômica e que a resposta normoinsulinêmica observada em alguns indivíduos seja resultado de um aumento da área da ilhota pancreática, indicando um mecanismo compensatório do pâncreas endócrino em resposta a denervação autonômica (Guariento *et al* 1993).

Considerando-se que seja possível que muitos chagásicos crônicos apresentem denervação parassimpática e alteração das células β pancreáticas, processos que explicariam as anormalidades ocasionalmente observadas nas curvas insulínicas e glicêmicas (Santos *et al*, 1999), os mesmos grupos foram submetidos ao TTGIV. Esses testes são de grande importância na detecção da disfunção discreta ou inicial da célula pancreática. Os mesmos parâmetros, ou seja, concentrações plasmáticas de insulina (Figura 6), glicose (Figura 7) e peptídeo C (Figura 8) também foram determinados não tendo sido detectada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos.

Um dos índices para avaliação da secreção rápida de insulina é a soma dos valores nos tempos 1 e 3 minutos do teste de GTTIV. Nesse estudo, observou-se uma leve tendência à significância estatística no grupo dos pacientes ($612,93 \pm 93,59$) em relação ao controle ($699,71 \pm 145,21$, $p=0,08$), o que não foi observado com os níveis de peptídeo C (pacientes – $12,57 \pm 4,25$ e controles – $13,72 \pm 4,14$, $p= 0,3947$).

Nesse estudo entre os 15 pacientes avaliados apenas 5 deles apresentavam a forma digestiva da doença, sugerindo que possivelmente uma avaliação com um número maior de

pacientes portadores dessa forma da DCH mostre um resultado significativo nas variações de glicemia e secreção de insulina, uma vez que, a forma digestiva é a que apresenta uma alteração autonômica seguramente mais significativa (Guariento *et al*, 1994). Nesse sentido seria necessário um novo estudo onde fossem agrupadas as formas da DCH separadamente para que fosse avaliado de forma mais criteriosa as alterações metabólicas característica, de cada forma da doença.

Outro mecanismo que ocorre durante períodos de hiperglicemia, é o aumento da produção de EROs através da auto-oxidação da glicose. Esses radicais exercem seus efeitos citotóxicos nos fosfolipídeos de membrana, resultando na formação de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (Há & Lee, 2001). Sabe-se que a geração de radicais livres como resultado do processo metabólico está associado com o dano celular e metabólico. As alterações provocadas por processos inflamatórios, traumas e outras causas, ocasionam um aumento de mediadores como prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, interferons e fatores de necrose tumoral. Todos esses fatores têm importante papel em várias doenças humanas. Um aumento significativo do dano celular poderia levar a um aumento na formação de EROs e portanto ao estresse oxidativo. De fato, na maioria das doenças humanas o estresse oxidativo é consequência de dano tissular (Halliwell, 1994).

Com relação a dosagem da catalase e glutathione redutase, o perfil do grupo de pacientes chagásicos foi semelhante ao do grupo controle (Tabela 17) e ao descrito anteriormente na literatura (Gaetani *et al*, 1989; Jozwik, *et al*, 1997). No grupo de pacientes chagásicos não havia nenhum indivíduo na fase aguda da doença ou na forma

crônica agudizada onde se espera uma parasitemia significativa com reativação da inflamação.

6. Conclusão e perspectivas:

Nesse estudo envolvendo indivíduos portadores da forma crônica da DCH e indivíduos normais submetidos aos testes de TTOG e TTGIV não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de glicose, insulina e peptídeo C plasmáticos. Como o grupo amostral foi composto por pacientes que apresentavam diversas formas da doença, fica claro que as condições metabólicas e imunológicas eram bastante diversas o que não nos permite uma avaliação precisa nas dosagens séricas tanto entre os grupos quanto em indivíduos do mesmo grupo.

Com relação aos mecanismos antioxidantes, os resultados indicam que os mesmos parecem não estar ativados no intuito de detoxificar um aumento na produção de EROs que poderia estar ocorrendo em função da infecção parasitária. Isso se deve provavelmente ao perfil do grupo de chagásicos, onde não havia nenhum indivíduo na forma aguda da doença, fase onde ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*.

6. Referências Bibliográficas

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-125, (1984).
- American Diabetes Association. **Diabetes Care**, 23, Supplement 1. (2000)
- ANDRADE, Z. A. Patologia da doença de Chagas. *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. 2 ed. p 201-230 (2000).
- BERNE, R.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M. Hormônios das Ilhotas Pancreáticas. *In: Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 807-813 (1998).
- BOSQUERO, A. Acoplamento da estimulação –secreção de insulina pelas células β pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.40, n.3, p. 149-155, (1996).
- BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. *In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Ed. Fiocruz. p. 25-31 (1997).
- BRITTO-COSTA, R. *et al.* Estudo sobre a secreção glandular exócrina do aparelho digestivo e dos brônquios na moléstia de Chagas humana. **Rev. Inst. Med. Trop**, v.15, n.4, p.227-234 (1973).
- CANÇADO, J.R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, Suppl. I. p. 331-335 (1999).
- CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.949-962 (1999).
- COURA J.R *et al.* Situação epidemiológica atual da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.29, p.33-46, Jan/Jun. (2000).
- DÁVILA, D.F.; INGLESSIS, G.; DÁVILLA, C.A.M.. Chagas' heart disease and the autonomic nervous system. **International Journal of Cardiology**, v.66, p.123-127 (1998).
- DE ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p.202-226 (1999).
- DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, n.3, p.147-156. (1989).
- DIAS, J.C.P & COURA, J.R. Epidemiologia. *In: Clínica e Terapêutica da doença de Chagas*. Ed. Fiocruz p. 33-65 (1997).

DIAS, J.C.P. A história natural da doença de Chagas. **Revista de patologia tropical**, v.29, Jan/Jun, p. 47-67 (2000).

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. 2a. ed. p. 48-74 (2000a).

DOCAMPO, R. DE BOISO JF, BOVERIS A, STOPPANI AO Localization of peroxidase activity in *T.cruzi* microbodies. **Experientia**, v. 32, p. 972-975 (1976).

DOCAMPO, R ; MORENO, S.N.J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Free radicals metabolites of Toxic chemicals**, v.45, n. 10, p.2471-2476 (1986).

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI. A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastidea. **Annu. Rev. Microbiol**,v.46, p.695-729 (1992).

FELDMAN, H.; RODBARD, D. Mathematical theory of Radioimmunoassay. In: **W. D. Odell and Doughaday, W.H. (Ed), Principles of Competitive Protein- Binding Assays**. Philadelphia:j.B. Leppincott Company: p. 158-203 (1971).

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs, used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.81, p. 755-759 (1987).

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of Disease: Free radicals and Tissue Injury. **Laboratory Investigations**, v.47, N°5, p.412- 426 (1982).

GAETANI, G.F. GALIANO S, CANEPA L, FERRARIS AM, KIRKMAN HN Catalase and Glutathione Peroxidase are equally active in detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes. **Blood**, v.73, n1, p. 334-339, (1989).

GUARIENTO, M.E.; SAAD, M. J.; MUSCELLI E. O.; GONTIJO J.A. Heterogenous insulin response to an oral glucose load by patients with the indeterminate clinical form of Chagas' disease. **Brazilian J Med Biol Res**, v.26, p.491-495 (1993).

GUARIENTO, M.E.; MUSCELLI, E. O.; GONTIJO J.A. Chronotopic and blood pressure response to oral glucose load in Chagas'disease. **São Paulo Medical Journal**, v.112, n.3, p.602-606 (1994).

HA, H. & LEE, H.B. Oxidative stress in diabetic nephropathy: basic and clinical information. **Curr. Diab. Rep.**, v. 1, n. 3, p. 282-7 (2001).

HABER, E.; CURT, R.; CARVALHO, C.R.O., CARPINELLI, A.R. Secreção de Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros Endocrinol. Metab**, v. 45, n.3, junho, p.219 –227 (2001).

HAK, A. E., POLS HA, STEHOUWER CD, MEIJER J, KILIAAN AJ, HOFMAN A, BRETELIER MM, WITTEMAN JC Markers of Inflammation and Cellular Adhesion

Molecules in Relation To Insulin Resistance in Nondiabetic Elderly: The Rotterdam Study. **The Journal of clinical Endocrinology & Metabolism**. 86(9) p.4398-4405 (2001).

HALLIWELL, B & CROSS, C.E. Oxygen- derived Species: Their relation to human disease and the environmental stress. **Oxygen Radicals, Disease, and The Environment**, 102, supl. 10, p. 5-12 (1994).

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic Metal Ions in Human Disease : an Overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85 (1991).

HOEKSTRA, J.B.L.; VAN RIJN, H.J.; THIJSEN, J.H.; ERKELENS, D.W. C-peptide reactivity as a measure of insulin dependency in obese diabetic patients treated with insulin. **Diabetes Care**, v. 5, n. 4, July-August, p. 438- 446 (1982).

IANNI, B.M.; MADY, C. Forma indeterminada da doença de Chagas. Mitos vs fatos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.68, n. 3 (1997).

IANNI, B.M. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. É eficaz ou tratamento etiológico? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, p.59-61 (1998).

IANNI, B. M., MADY, C., ARTEAGA, E. *et al.* Doenças cardiovasculares observadas durante o seguimento de um grupo de pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.71, no.1, p.21-24 (1998).

ISMAIL, S. O.; PARAMCHUK, W.; SKEIKY, Y.A.; REED, S.G.; BHATIA, A.; GEDAMU, L. Molecular cloning and characterization of two ion superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol**, v.86, p. 187-197. (1997).

JOZWIK, M.; SZCZYPKA, M.; GAJEWSKA, J.; LASKOWSKA-KLITA, T. Antioxidant defense of red blood cells and plasma in stored human blood. **Clinica Chimica Acta**, v.267, p. 129-142 (1997).

KENNETH, B.; AMES, B.N. The free radical Theory of Aging Matures. **Physiological Reviews**, v.78, n. 2, p.547-581 (1998).

LANA, M.; TAFURI, W.L *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. *In: Parasitologia Humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, p. 73-96. (2000).

LENAZ, G.. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1366, p.53-67 (1998).

LINHARES, A.X. Vetores do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, v.29, Jan/Jun , p. 83-89 (2000).

LOTT, J.A.; TURNER, K. Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clin. Chem.**, v.21, p.1754-1760 (1975).

MACEDO, V.O. Forma indeterminada da doença de Chagas. *In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Ed. Fiocruz. p. 135-152 (1997).

MARIN-NETO, J.A. Forma crônica cardíaca. *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Ed. Guanabara Koogan 2ª. ed. p. 266- 296 (2000).

MASANA, M.. Reductive metabolism and activation of benznidazole. *Biochem. Pharmacol.*, v.33, p. 1941-1045 (1984).

MAYA, J.D.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L.J.; SQUELLA, J.A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIERE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. *Biochem Pharmacol.*, v. 65 (6), p. 999-1006 (2003).

MENEGHINI, R. A toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*, v.5, n. 28, p.57-62 (1987).

MENEGHELLI, U.G. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 18, p.255-264 (1985).

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 10ª edição. Editora Atheneu (2000).

NETO, V. A.; YASUDA, M.A.S.; AMATO, V.S. Doença de Chagas aguda. *In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Ed. Fiocruz. p. 135-152 (1997).

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 5, p. 113-124 (1988).

OLIVEIRA, L.C.M.; JULIANO, Y.; NOVO, N.F.; NEVES, M.M. Blood glucose and insulin response to intravenous glucose by patients with chronic Chagas' disease and alcoholism. *Brazilian J. Med. Res.*, v.26, p.1187-1190 (1993).

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A. V. Doença de Chagas. *In: Parasitologia médica*. 11ª. ed. Ed. Guanabara Koogan. p. 143-163 (1982).

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; RIFAI, N.; BURING, J.E.; RIDKER, P.M. C-Reactive Protein, Interleukin6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*, 286(3), p. 327-334 (2001.)

PRATA, A. Classificação da Infecção chagásica no homem. *Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.23, n.2, p.109-113 (1990).

RASSI, A. Fase Aguda. *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. 2ª. ed. p. 231-245 (2000).

RASSI, A.J. Sudden death in Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol*, v.76, n.1, p.86-96, (2001).

RASSI, A. *et al.* Tratamento específico da doença de Chagas. Uma visão de 1962 a 1999. **Revista de Patologia Tropical**, v. 29, jan/jun, p.157-163 (2000).

REIS, L.C.F. *et al.* Curvas glicêmicas anormais observadas em pacientes com a forma crônica da moléstia de Chagas. **Revista Goiana de Medicina**, v.6, n. 2, abril- junho, 155 – 165 (1960).

RENDELL, M.; ZARRIELLO, J.; DREW, H.M.; DRANBAUER, B.; WILSON, G.; WAUD, J.; ROSS, D. Recovery from decompensated non-insulin-dependent Diabetes Mellitus: Studies of C-Peptide Secretion. **Diabetes Care**, v.4, n.3, may- june, p. 354 –359 (1981).

REZENDE, J. M. Manifestações digestivas da doença de Chagas. *In: Gastroenterologia Clínica*. Ed. Guanabara Koogan. 2^a. ed. 1988. p.1387-1411 (1988).

RIBEIRO, A.L.P.; ROCHA, M.O.C. Forma indeterminada da doença de Chagas. *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. 2^a.ed. p. 246-265 (2000).

SALDANHA, J.C.; SANTOS, V.M.; REIS, M.A; CUNHA,D.F.; TEIXEIRA,V.P.A. Morphologic and morphometric evaluation of Pancreatic islets in chronic Chagas' disease. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Méd. S. Paulo**, v.56 (5) p.131-138 (2001).

SANTOS, V.M.; CUNHA,S.F.C.; TEIXEIRA, V.P.A.; MONTEIRO,J.P.; SANTOS, J.A.M; SANTOS, T.A.M.; SANTOS, L.A.M.;CUNHA, D.F. Frequência de diabetes mellitus e hiperglicemia em mulheres chagásicas e não chagásicas. **Rev. da Soc. Med. Trop**, v. 32,n.5, p. 489-496, (1999).

SANTOS, V.M.; TEIXEIRA, V.D.E.P.; CUNHA, D.F.; CUNHA, S.F.; MONTEIRO, J.P.; SANTOS, J.A.; SANTOS, T.A. Alterações anatomo-patológicas do pâncreas em Chagásicas crônicas. **Arq. Gastroenterol.** v.36, n.3, p.127 –132, (1999a).

SCHMUNIS, G.A. Tripanossomíase americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. *In: Clínica e Terapêutica da doença de Chagas*. Ed. Fiocruz.p. 11-24. (1997).

SCHMUNIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. 2^o ed. p.01-15 (2000).

SERGEYVA, M. A. Microscopic changes in the islands of Langerhans produced by sympahetic and parassymphathetic stimulation in the cat. **Anat Rec**, v.77, p.297 – 317. (1940).

SIES, H. Oxidative stress:oxidant and antioxidants.London, Academic Press, 1991.

SILVA, L.J. Doença de Chagas no Brasil: Sua expansão e fatores de risco. Perspectivas para um futuro próximo. **Revista de Patologia Tropical**, v.29, jan/jun, p. 67-74, (2000).

SILVEIRA, A.C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cad Saúde Pública**, v. 16, n.2, p.35-42, (2000).

SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates Using 5,5 ` Dithiobis (2 nitrobenzoic acid). **Analytical Biochemistry**, v. 175, p.408- 413, (1988).

SOUZA, W. O Parasito e sua interação com os hospedeiros. *In: Trypanosoma Cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. 2ª. ed. p. 88-126 (2000).

TELLERÍA, A.V. Situação atual da doença de Chagas no continente sul-americano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 29, jan/jun, p.75-82, (2000).

URBINA, J.A. Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v.10, n.3, p.107-110,(1994).

URBINA, J.A. Parasitological cure of Chagas disease: Is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, suppl.I, p.349-355, (1999).

VIEIRA, C.B.; MENEGHELLI, U.G. Peculiaridades da hipoglicemia insulínica na forma crônica da moléstia de Chagas. **Rev. Inst. Méd. Trop**, v.12, n. 3, p.175-178, (1970).

WHO Special programme for research and training in tropical disease. Meeting on the development of trypanocidal compounds for the sterilization of blood. Geneva, 13-14 dezembro (1984).

WILKINSON, S. R.; TEMPERTON, N.J.; MONDRAGON, A.; KELLY, J.M. Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol.Chem.**, v.275, n.11, p. 8220-8225 (2000).

WESTGARD, J.O.; BARRY, P.L.; HUNT, M.R.; GROTH, T. A. Multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. **Clin. Chem.** v. 27, p. 493-501, (1981).

Anexo I

Projeto: Estudo da Interação parasita-hospedeiro na doença de Chagas: análise da glicemia, produção de insulina e mecanismos antioxidantes

Equipe de Pesquisa: Dra Sarah Monte Alegre
Dra Fernanda Ramos Gadelha
Maria Fernanda C. Gomes de Souza

Termo de Consentimento Pós Informação

Justificativa/ Objetivo:

Estudar as alterações na secreção de insulina do paciente portador de doença de Chagas na forma crônica através da realização de curva glicêmica, por estímulos oral e endovenoso, além de verificar seus mecanismos antioxidantes.

Procedimentos:

Se você concordar em participar, será submetido a um teste de tolerância à glicose que será realizado em duas etapas:

Na primeira, você receberá 400 ml de um líquido adocicado correspondendo a 75 gramas de glicose. Essa ingestão será precedida de um período de jejum de 10-12 horas, onde será feita a primeira coleta de sangue com um volume de 10 ml. Nas coletas subsequentes serão coletados 5 ml de sangue a cada 30 min até o término da segunda hora, totalizando 5 coletas.

Na segunda etapa, você em um segundo encontro, aproximadamente 1 semana após, será submetido a um segundo teste, onde, a glicose, na concentração de 25% será administrada por via intravenosa, na dose de 0,5g/kg de peso, após um período de jejum de 10-12 horas. Antes dessa infusão será coletado 5 ml de sangue, seguidas de coletas posteriores do mesmo volume, nos tempos 1,3,5,7,10,20,30,40,50 e 60 min, totalizando 11 coletas.

Vale lembrar que esses testes são utilizados para diagnóstico de *diabetes mellitus*, não apresentando nenhum risco para o paciente.

Transtornos e Riscos:

Para participação no estudo você será esclarecido a realizar uma dieta equilibrada por três dias, de acordo com seus hábitos diários. Nos dias a serem realizados os testes, previamente acordados, você deverá comparecer, à Unidade Metabólica no 6^o andar do Hospital das Clínicas em jejum de 10-12 horas aproximadamente. A duração dos testes é de cerca de 4 horas.

Os riscos para você são mínimos, pois as coletas de sangue serão realizadas por pessoal capacitado e com o uso de material descartável, além disso, para evitar repetidas punções (serão realizadas 3) utilizaremos escalpe n^o 19 que será mantido pérvio com solução heparinizada na proporção de 19,9 ml de soro fisiológico 0,9% e 0,1 ml de heparina.

Benefícios:

Você estará sendo avaliado metabolicamente e será informado sobre todos os resultados dos exames realizados. Além disso, estará nos ajudando a entender melhor esta doença

Garante-se ao participante voluntário:

- a) Respostas a quaisquer perguntas e esclarecimentos a quaisquer dúvidas acerca do assunto relacionado à pesquisa.
- b) Liberdade para deixar de participar da pesquisa ou cancelar este termo de consentimento em qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízos no seu tratamento.

c) É assegurado caráter absolutamente confidencial das informações recebidas, sendo o sigilo assegurado além da manutenção da privacidade e compromisso de que sua identidade não será revelada nas publicações do trabalho.

d) Acesso às informações quanto aos resultados atualizados decorrentes da pesquisa, mesmo que possa afetar a vontade do doador em continuar participando da pesquisa.

e) Receberá tratamento médico e indenização por parte do órgão financiador caso haja danos que os justifiquem, causados diretamente pela pesquisa.

f) Após a coleta de sangue, será fornecido um lanche e passagem de ônibus, caso não haja transporte gratuito de sua cidade.

Atenção:

A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP. Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz, S/N. Distrito de Barão Geraldo, Campinas- SP. CEP: 13083-970 Telefone: (0xx19) 37888936. Ou com a equipe de pesquisa:

• Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha no Instituto de Biologia no tel: 37887886 ramal 226 email: frgad@unicamp.br

• Profa. Dra Sarah Monte Alegre no Departamento de Clínica Médica no tel: 32894107 / 37887878 email: demfem@head.fcm.unicamp.br

• Maria Fernanda C. Gomes de Souza no Instituto de Biologia no tel: 37887886 ramal 226 email: cuda@dginet.com.br

Agradecemos desde já a sua colaboração que tornará possível a realização deste trabalho.

Consentimento:

Eu _____ data nasc. ____/____/____

RG nº _____ residente à _____

Estou suficientemente informado e concordo em participar dessa pesquisa.

Assinatura do Paciente

Data

Assinatura do responsável

Assinatura do Pesquisador

Anexo II

Esquema Ilustrativo do Preparo das Amostras para análise das enzimas antioxidantes

