



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA  
POR *Plasmodium vivax*, DURANTE O TRATAMENTO COM PRIMAQUINA E  
CLOROQUINA.

**AMANDA GABRYELLE NUNES CARDOSO MELLO**

**BELÉM – PARÁ**  
**2012**

**AMANDA GABRYELLE NUNES CARDOSO MELLO**

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA  
POR *Plasmodium vivax*, DURANTE O TRATAMENTO COM PRIMAQUINA E  
CLOROQUINA.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de  
Mestre em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo  
de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.  
Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.  
Co-orientador (a): Prof. Dra. Rosana Maria Feio  
Libonati.

**BELÉM – PARÁ**

**2012**

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –  
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

---

Mello, Amanda Gabryelle Nunes Cardoso.

Marcadores de estresse oxidativo em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*, durante o tratamento com primaquina e cloroquina / Amanda Gabryelle Nunes Cardoso Mello; orientador, José Luiz Fernandes Vieira, co-orientadora, Rosana Maria Feio Libonati. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Malária. 2. *Plasmodium vivax*. I. Vieira, José Luiz Fernandes, orient. II. Libonati, Rosana Maria Feio, co-orient. III. Título.

CDD: 22. ed. 614.532

**AMANDA GABRYELLE NUNES CARDOSO MELLO**

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA  
POR *Plasmodium vivax*, DURANTE A FASE DE TRATAMENTO COM  
PRIMAQUINA E CLOROQUINA.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de  
Mestre em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo  
de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.  
Orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira.  
Co-orientador (a): Prof. Dra. Rosana Maria Feio  
Libonati.

Data de aprovação: 02/07/2012

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosana Maria Feio Libonati

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lilian Lund Amado

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Revoredo da Silva Ventura

## DEDICATÓRIA

A Deus, sem ele nada seria possível e aos meus avós, Reynaldo Melo (*in memorium*) e Raimundo e Raimunda, que dedicaram parte de sua vida à minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Virgem Maria, fonte de fé e espiritualidade.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> José Luiz, além da função de orientar esta dissertação, hoje é um grande amigo.

Ao PECEM/IEC/PA, representado pela Dra. Ana e Rosana, sem o apoio deste órgão, a pesquisa não seria viável.

Aos meus pais e familiares (Irmão, Avós, Tios e Primos) que sempre torceram e incentivaram o meu sucesso.

Ao Luiz Carlos, hoje mais que um companheiro de pesquisa, um grande amigo.

Às MC's, que hoje são mais que simplesmente amigas, fazem parte da minha vida.

Ao Redyvan, meu amor, pela excelente companhia, incentivos e carinhos.

Aos amigos do LATOX, pelas inúmeras ajudas na bancada e, também, pelas alegrias e tristeza compartilhadas no dia-a-dia, especialmente, à Taysa, a qual dividiu muito “estresse” nos experimentos de estresse oxidativo.

Ao Danilo, por ter cedido um pouco de seu tempo para o desenvolvimento da técnica de GSH por ELISA.

Aos amigos da Schola Cantorum, que com a terapia do canto, acalmou meu espírito inúmeras vezes.

Aos amigos dos tempos da graduação, a qual a amizade ultrapassou os muros da UFPa.

À Universidade Federal do Pará, por ter a oportunidade de conviver com pessoas com ampla visão científica.

A CAPES, a qual incentivou e foi fomentadora desta pesquisa científica.

E por último, porém EXTREMAMENTE importante, aos pacientes que se dedicaram a esta pesquisa, oferecendo informações valiosas e quantidades de seu próprio sangue, os quais foram possíveis chegar a conclusões inéditas sobre a patogenia da malária. Sem a dedicação deles, nada poderia ser feito.

“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”

***Texto budista***

## RESUMO

No Brasil, o *P. vivax* representa a maioria dos casos de malária, totalizando quase 90% dos registros nos estados da Amazônia Legal. Vários estudos objetivaram compreender a relação do estresse oxidativo nos pacientes infectados pelo *Plasmodium spp* com as respostas clínica e parasitológica, pois o papel protetor ou deletério das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas por diferentes mecanismos no decurso da infecção é controverso na fisiopatogenia da malária humana. Entretanto, não há estudos que associem os danos oxidativos e as defesas antioxidantes do hospedeiro na malária vivax não complicada na Amazônia. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar marcadores de estresse oxidativo no decorrer da fase aguda da malária por *P. vivax*, caracterizando o envolvimento das vias redox, a resposta do hospedeiro humano e a influência da quimioterapia, a fim de testar as hipóteses que os biomarcadores de estresse oxidativo não são alterados no decurso da fase aguda da malária vivax não complicada e a introdução da quimioterapia não contribui para o estresse oxidativo nestes sujeitos. Foi realizado estudo quantitativo longitudinal de casos constituídos por 38 sujeitos com malária por *P. vivax* adultos, de ambos os gêneros, os quais foram analisados antes, durante e após a instituição da terapia (D0, D2 e D7), comparados a grupo controle de 15 voluntários saudáveis, pareados por gênero e idade. Foram determinados por técnicas espectrofotométricas os teores de metemoglobina, a peroxidação lipídica, a capacidade antioxidante não enzimática total, a atividade da superóxido dismutase, os níveis eritrocitários de glutathione reduzida e da glutathione total plasmática. Comparado ao grupo controle, de maneira significativa, os teores de glutathione reduzida ( $p=0,004$ ) foram inferiores e a peroxidação lipídica ( $p<0,001$ ) foi superior, respectivamente. Entretanto, alterações significativas não foram observadas nos teores de metemoglobina, na capacidade antioxidante não enzimática total e na atividade da superóxido dismutase comparados ao grupo controle. Entretanto, com o decorrer do tratamento foram notados aumento significativo dos teores de metemoglobina ( $p<0,001$ ) e da atividade da superóxido dismutase ( $p=0,038$ ); porém os níveis de glutathione reduzida eritrocitária estava reduzidos ( $p=0,007$ ). Além disso, não houve alterações significativas nos níveis da capacidade antioxidante não enzimática total e da glutathione total plasmática com a introdução dos antimaláricos. O nível de estresse oxidativo não foi obtido, uma vez que não foi significativa a correlação da peroxidação lipídica com a capacidade antioxidante não enzimática total durante o tratamento. Conclui-se que o aumento da peroxidação lipídica resultante do dano oxidativo foi contraposto pelo consumo de glutathione eritrocitária antes da introdução da terapia, sugerindo a participação das vias redox na malária vivax não complicada. A instituição da quimioterapia, provavelmente, interferiu no ciclo redox intraeritrocitário, o que foi caracterizado pelo contínuo aumento da metemoglobina e da atividade da superóxido dismutase, bem como pela redução dos teores de glutathione reduzida nos eritrócitos.

Palavras-chave: Malária, *P. vivax*, Estresse oxidativo, Biomarcadores, Metemoglobina, Peroxidação lipídica, Capacidade antioxidante não enzimática total, Superóxido dismutase, Glutathione reduzida, Glutathione total plasmática.

## ABSTRACT

In Brazil, *P. vivax* accounts for the majority of malaria cases, totaling almost 90% of the records in the Amazonian states. Several studies aimed to understand the relationship of oxidative stress in patients infected with *Plasmodium spp* clinical and parasitological responses because the plays role deleterious or protective of reactive oxygen species and nitrogen generated by different mechanisms during infection is controversial in the pathogenesis of human malaria . However, no studies involving oxidative damage and antioxidant defenses of the host uncomplicated vivax malaria in the Amazon. Therefore, the aim of this study was to evaluate oxidative stress markers during the acute phase of malaria by *P. vivax*, characterizing pathways involving redox response of the human host and the influence of chemotherapy in order to test the hypothesis that biomarkers of oxidative stress are not changed during the acute phase of vivax malaria and uncomplicated introduction of chemotherapy does not contribute for oxidative stress in these subjects. It was conducted quantitative study longitudinal case consisting of 38 subjects with malaria by *P. vivax* adults of both gender, which were analyzed before, during and after the introduction of therapy (D0, D7 and D2), compared to control group of 15 healthy volunteers, matched for gender and age. Were determined by spectrophotometric techniques levels of methemoglobin, lipid peroxidation, total non-enzimatic antioxidant capacity, the activity of superoxide dismutase, erythrocyte levels of reduced glutathione and total glutathione in bloodstone. Compared to the control group, significantly, the levels of reduced glutathione ( $p = 0.004$ ) was lower and lipid peroxidation ( $p < 0.001$ ) was higher, respectively. However, no significant changes were observed in the levels of methemoglobin, in total non-enzimatic antioxidant capacity and activity of superoxide dismutase compared to the control group. However, with the course of treatment were noted significant increase in the levels of methemoglobin ( $p < 0.001$ ) and superoxide dismutase activity ( $p = 0.038$ ), but erythrocyte levels of reduced glutathione was reduced ( $p = 0.007$ ). Furthermore, no significant changes in the levels of total non-enzimatic antioxidant capacity and glutathione in bloodstone with the introduction of antimalarials. The level of oxidative stress was not obtained, since there was no significant correlation between lipid peroxidation with the total non-enzimatic antioxidant capacity during all treatment. It was concluded that increased lipid peroxidation resulting from oxidative damage is opposed by the use of glutathione before the introduction of the therapy, suggesting the involvement of redox pathways in uncomplicated vivax malaria. The institution of chemotherapy, probably, interfered in intraerythrocyte redox cycle, which was characterized by a continuous increase in methemoglobin and the activity of superoxide dismutase, as well as by the reduction of the levels of reduced glutathione in erythrocytes.

Keywords: Malaria, *P. vivax*, Oxidative stress, Biomarkers, Methemoglobin, Lipid peroxidation, Total non-enzimatic antioxidant capacity, Superoxide dismutase, Reduced glutathione, Total glutathione in bloodstone.

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

5-HPQ	5-Hidroxiprimaquina
6-MAQ	6-metoxi-8-aminoquinolina
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ATC	Ácido Tricloroacético
CAT	Catalase Intraeritrocitária
CQ	Cloroquina
Cu/Zn	Cobre/Zinco
DNTB	Ácido-5,5-ditiobis-2-Nitrobenzóico
DCQ	Desetilcloroquina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERONs	Espécies Reativas Derivados do Oxigênio e Nitrogênio
Fe	Ferro
Fe [III]PPIX	Ferro [III] Protoporfirina IX
G6PD	Glucose-6-fosfato Desidrogenase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Dissulfeto
GSH-Px	Glutaciona Peroxidase
GST	Glutaciona S-transferase
GR	Glutaciona Redutase
HIV <sup>+</sup>	Soropositivo ao Vírus da Imunodeficiência Humana
IEC	Instituto Evandro Chagas
IL-10	Interleucina-10

LATOX	Laboratório de Toxicologia
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MetHb	Metemoglobina
Mn	Manganês
n	Número de amostras
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reduzido
NADHb5R	NADHcitocromo b5 Redutase
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PECEM	Programa de Ensaio Clínicos em Malária
PUFA	Membrana Plasmática Rica em Cadeias Ácidos Graxos Poliinsaturados de Hemácias
PQ	Primaquina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD	Superóxido Dismutase
SOD-Cu/Zn	Superóxido Dismutase dependente de Cobre e Zinco
SOD-Mn/Fe	Superóxido Dismutase dependente de Manganês e Ferro
SOD-Fe	Superóxido Dismutase dependente de Ferro
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
TAC	Capacidade antioxidante não enzimática total
TAH	Transferência de átomo de hidrogênio
TE	Transferência de elétrons
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox
TNB	Ácido Nitrobenzóico
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFPA	Universidade Federal do Pará
WHO	World Health Organization

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Fig.1</b> Distribuição de casos de malária confirmados (por 1000 habitantes) no Brasil	<b>20</b>
<b>Fig. 2</b> Representação do ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> nos dois hospedeiros	<b>23</b>
<b>Fig. 3</b> Esquema representativo do desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, levando ao estresse oxidativo	<b>29</b>
<b>Fig. 4</b> Reação de Fenton e Haber-Weiss	<b>30</b>
<b>Fig. 5</b> Representação esquemática do ciclo catalítico da glutatona	<b>37</b>
<b>Fig. 6</b> Procedimento para determinação do TBARS	<b>56</b>
<b>Fig. 7</b> Procedimento para determinação da capacidade antioxidante não enzimática total	<b>57</b>
<b>Fig. 8</b> Reação de derivação da GSH com o DTNB	<b>58</b>
<b>Fig. 9</b> Procedimento para determinação de metemoglobina	<b>60</b>
<b>Quadro 1</b> Tratamento das infecções pelo <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> com cloroquina em três dias e primaquina em sete dias (esquema curto)	<b>27</b>
<b>Quadro 2</b> Ajuste da dose e tempo de administração da primaquina para pacientes com peso igual ou superior a 70 kg	<b>28</b>
<b>Tabela 1</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 5</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 6</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 7</b>	<b>68</b>

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
2.1 MALÁRIA	19
<b>2.1.1 Epidemiologia</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Transmissão</b>	<b>20</b>
<b>2.1.3 Ciclo biológico</b>	<b>21</b>
<b>2.1.4 Manifestações clínicas</b>	<b>23</b>
<b>2.1.5 Tratamento</b>	<b>24</b>
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO	29
<b>2.2.1 Fontes de EROs</b>	<b>30</b>
2.3 ANTIOXIDANTES	32
<b>2.3.1 Antioxidantes enzimáticos</b>	<b>32</b>
2.3.1.1 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)	32
2.3.1.2 Glutationa S-transferase (GST)	33
2.3.1.3 Enzima superóxido dismutase (SOD)	33
2.3.1.4 Catalase intraeritrocitária	34
2.3.1.5 Coenzima Q <sub>10</sub>	35
<b>2.3.2 Antioxidantes Não Enzimáticos</b>	<b>36</b>
2.3.2.1 Glutationa reduzida (GSH)	36
2.3.2.2 Ácido úrico	37
2.3.2.3 Vitamina E	38
2.3.2.4 Vitamina C	38
2.3.2.5 $\beta$ -caroteno	38
2.3.2.6 Metais de transição ligados a proteínas	39

<b>2.3.3 Avaliação da capacidade antioxidante não enzimática total (TAC)</b>	<b>39</b>
<b>2.3.4 Peroxidação lipídica</b>	<b>40</b>
<b>2.4 ESTRESSE OXIDATIVO E SUAS MANIFESTAÇÕES NA MALÁRIA</b>	<b>43</b>
<b>2.5 METEMOGLOBINEMIA</b>	<b>49</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>51</b>
<b>4. OBJETIVO</b>	<b>52</b>
4.1 GERAL	52
4.2 ESPECÍFICOS	52
<b>5. MÉTODOS</b>	<b>53</b>
5.1 CASUÍSTICA	53
<b>5.1.1 Tipo e população de estudo</b>	<b>53</b>
<b>5.1.2 Local da pesquisa</b>	<b>53</b>
<b>5.1.3 Critérios de inclusão e exclusão</b>	<b>53</b>
5.2 AMOSTRAS	54
5.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	55
<b>5.3.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)</b>	<b>55</b>
<b>5.3.2 Determinação da capacidade antioxidante não enzimática total (TAC)</b>	<b>56</b>
<b>5.3.3 Índice de estresse oxidativo</b>	<b>57</b>
<b>5.3.4 Medição dos níveis de glutathiona</b>	<b>58</b>
5.3.4.1 Glutathiona reduzida	58
5.3.4.2 Glutathiona total	58
<b>5.3.5 Atividade enzimática da superóxido dismutase intraeritocitária</b>	<b>59</b>
<b>5.3.6 Determinação dos teores de metemoglobina</b>	<b>59</b>

5.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	60
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>62</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO</b>	<b>93</b>

## 1- INTRODUÇÃO:

A malária ainda é considerada uma das doenças mais devastadoras no mundo. Estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que mais de 40% (3,3 bilhões de pessoas) da população mundial distribuída em 106 países apresenta risco de contrair a doença, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, como África, Ásia e América Latina. Em 2010, foram registrados 216 milhões de casos nos diversos continentes. Além disso, seus efeitos econômicos e sociais são refletidos em quase um bilhão de pessoas (GREENWOOD, 2008; FRASSON et al., 2009; WHO, 2011).

Cinco espécies de parasitas infectam o homem, a saber: *Plasmodium falciparum*, o mais letal e predominante na África; *Plasmodium vivax*, responsável pela maioria do registro de casos; *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*, os quais são de baixa incidência (WHO, 2011). Os vetores da infecção são as fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, cujos representantes de importância no Brasil são *A. darlingi*, *A. aquasalis* e *A. albitarsis* (BRASIL, 2009).

De acordo com a sintomatologia no hospedeiro humano, a doença pode se apresentar clinicamente nas formas severa e não-complicada. A primeira se caracteriza pela presença das formas assexuadas de *P. falciparum* no esfregaço sanguíneo periférico, geralmente em contagem superior a  $100000/\text{cmm}^3$ , associada às manifestações do sistema nervoso central, renal e pulmonar. Tais achados são acrescidos de hematócrito inferior a 20%; icterícia; hipoglicemia; colapso circulatório; sangramento espontâneo e acidose metabólica nas primeiras 24 horas (ADHIKARI, 2002). Enquanto a forma

benigna, geralmente causada pelo *P. vivax*, é de fácil tratamento, de menor gravidade e raramente leva a óbito. (SATTABONGKOT et al., 2004).

Diversos estudos objetivaram compreender a relação entre o estresse oxidativo nos paciente infectados pelo *Plasmodium spp* e as respostas clínica e parasitológica (TILLEY et al., 2001; PABÓN et al., 2003; BECKER et al., 2004; YAZAR et al., 2004; JARAMILLO et al., 2005; WILMANSKI et al., 2005; KUMAR, 2006; DEY et al., 2009), uma vez que o equilíbrio entre os radicais livres gerados durante a infecção malárica, resultantes principalmente da ação do sistema imune e da degradação da hemoglobina, e as defesas antioxidantes do hospedeiro humano e do parasita influencia de forma significativa o prognóstico da doença (MÜLLER et al., 2001; KELLER et al., 2004a). Soma-se que este entendimento é promissor à descoberta ou melhoramento do tratamento antimalárico (BECKER et al., 2004). O objetivo deste estudo foi avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em sujeitos com malária por *P. vivax* não complicada, oriundos da região amazônica, no intuito de inferir o envolvimento do sistema de defesa antioxidante e danos oxidativos as respostas antioxidantes dos hospedeiros e a influência dos antimaláricos neste grupo populacional.

## **2 – REFERENCIAL TEÓRICO:**

### **2.1 - MALÁRIA**

#### **2.1.1 – Epidemiologia da malária:**

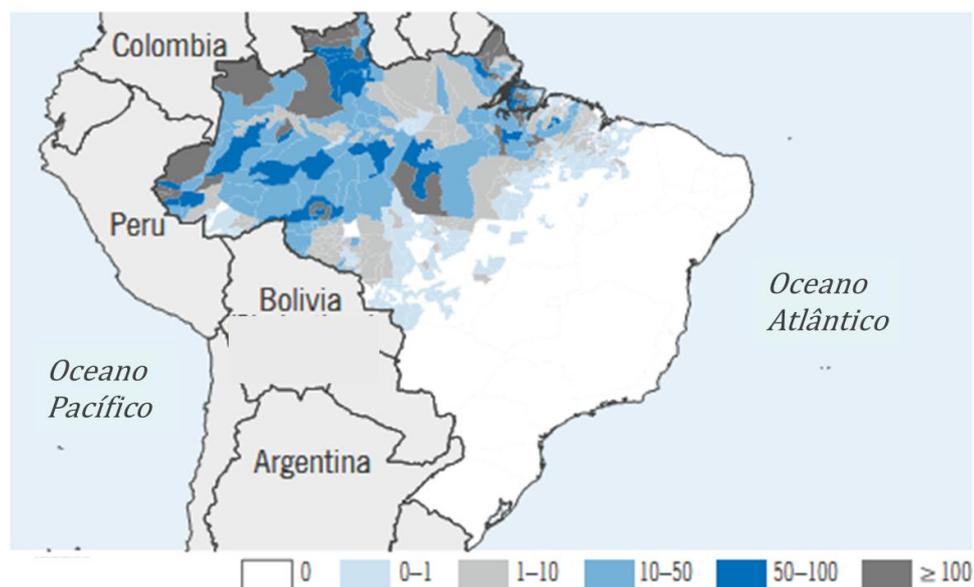
O *P. vivax* é responsável por cerca de 25 a 40% dos casos de malária em humanos, perfazendo aproximadamente 132 a 391 milhões de registros por ano no mundo (HAY et al., 2004; WHO, 2011). Quando se considera a densidade populacional das áreas endêmicas, o número de pessoas sob risco de infecção chega a 2,6 bilhões, o que é significativamente superior aquele pelo *P. falciparum* (PRICE et al., 2007).

Nos países não africanos, a infecção pelo *P. vivax* representa quase a metade dos casos da doença, com cerca de 390 milhões a cada ano (PRICE et al., 2007; GALINSKI e BARNWELL, 2008). No continente americano, aproximadamente 137 milhões de pessoas vivem nas áreas endêmicas, representando cerca de 4% da população mundial susceptível de contrair a doença. Em 2010, foram registrados 673.000 casos de malária nas Américas. Destes, 89% nos países pertencentes ao bioma amazônico, onde o *P. vivax* é a principal espécie infectante (WHO, 2011).

No Brasil, a doença é causada principalmente por três espécies de *Plasmodium*: *P. vivax* (83,7%), *P. falciparum* (16,3%) e, raramente, pelo *P. malariae*. *P. vivax* é responsável pela maioria dos casos e o *P. falciparum* pelo maior número de óbitos (FREITAS et al., 2007). Atualmente, a malária apresenta quadro epidemiológico ainda preocupante, pois embora em declínio, o número absoluto de casos no ano de 2009 foi de 306.000 no país (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Destes, 99,9% ocorreram nos estados da Amazônia Legal, sendo o *P. vivax* a espécie causadora de quase 90% dos

casos. No entanto, a malária por *P. falciparum*, sabidamente responsável pela forma severa e letal da doença, tem reduzido significativamente nos últimos anos. Além disso, a frequência de internações tem declinado, ficando em 1,3% no ano de 2008, enquanto em 2003 foi de 2,6% (BRASIL, 2010).

Na região amazônica, as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a proliferação do vetor e consequente exposição de grande contingente populacional (LADISLAU et al., 2006). A distribuição da doença não é uniforme nesta região, conforme apresentado na Figura 1 (WHO, 2011).



**Figura 1.** Distribuição de casos de malária confirmados (por 1000 habitantes) no Brasil. Fonte: WHO, 2011 (Modificada).

### 2.1.2 - Transmissão:

É uma doença infecciosa cujo agente etiológico é um parasita do gênero *Plasmodium*, pertencente ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae. Atualmente são conhecidas cerca de 172 espécies causadoras da malária em diferentes hospedeiros vertebrados, destas somente cinco parasitam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (WHO, 2011). No

Brasil, não há registros da transmissão autóctone do *P. ovale* (África e Ásia) e do *P. knowlesi* (sudeste da Ásia). A transmissão natural da doença ocorre pela picada das fêmeas infectadas dos mosquitos do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo, sendo o *A. darlingi* a espécie mais importante na Região Amazônica, uma vez que seus criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreadas e de baixo fluxo, frequentes na Amazônia brasileira (MELO et al., 2005; BRASIL, 2010). Já as fontes de infecção humana para os invertebrados são os doentes ou indivíduos assintomáticos, que albergam formas sexuadas do parasita (MELO et al., 2005).

### **2.1.3 - Ciclo Biológico:**

O *Plasmodium* possui um ciclo de vida complexo com várias fases em dois hospedeiros, o mosquito e um vertebrado; a fase sexuada ocorre na fêmea do mosquito Anófeles e a assexuada no homem (CORNEJO e ESCALANTE, 2006; CUNICO et al., 2008). As diferentes fases do ciclo estão apresentadas na Figura 2.

A infecção se inicia quando os esporozoítos são inoculados na corrente sanguínea durante o repasto do vetor; a seguir irão invadir os hepatócitos, se multiplicar e originar milhares de merozoítos, que romperão os hepatócitos e, ao alcançarem a circulação sanguínea (BRASIL, 2010).

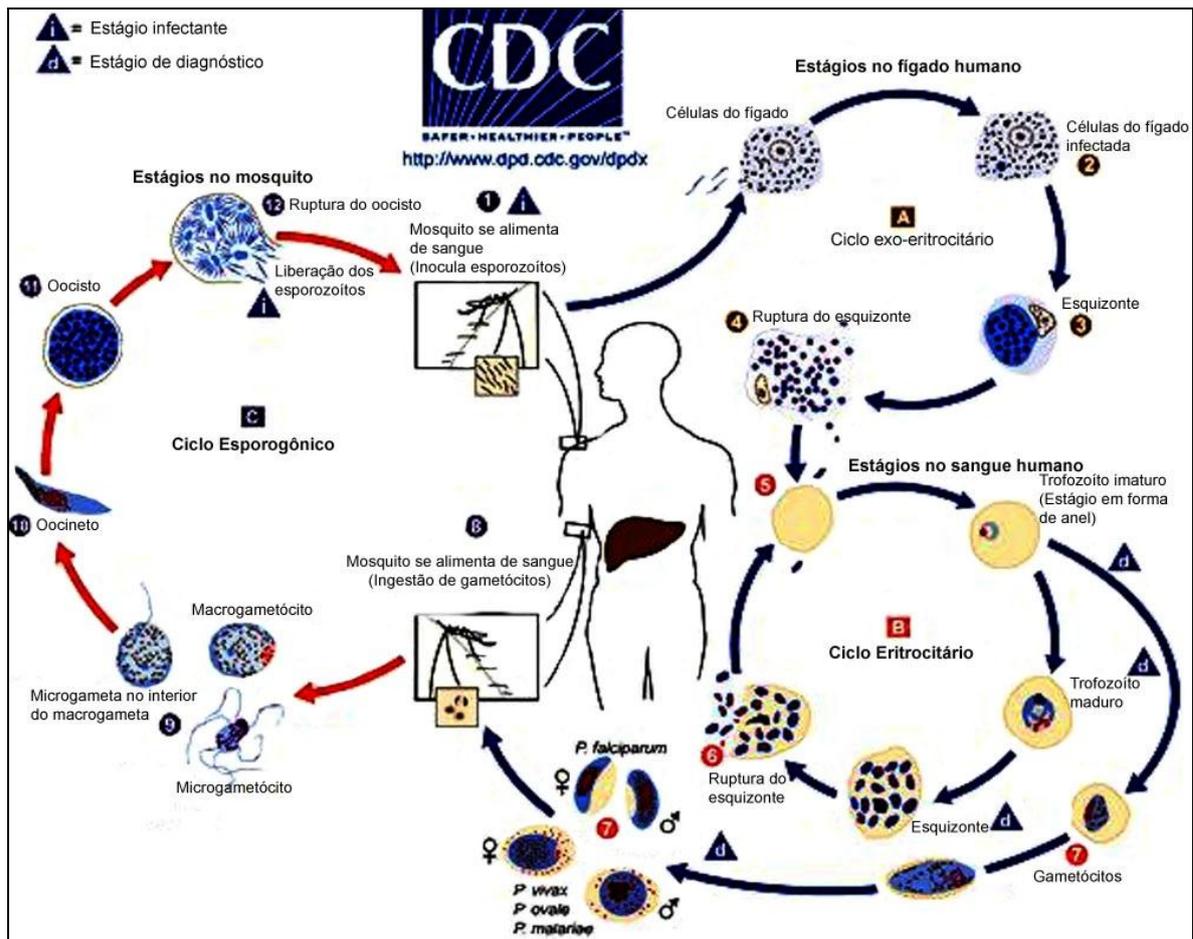
O desenvolvimento do parasita nos hepatócitos requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum*; já no *P. vivax* pode chegar a meses nas regiões de clima temperado e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos se desenvolvem rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito, sendo denominados hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono), os quais

são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após período variável de incubação, geralmente seis meses (BRASIL, 2010).

Ao final do ciclo tecidual, os merozoítos liberados iniciarão a esquizogonia sanguínea, na qual estes invadirão os eritrócitos, diferenciando-se em trofozoítos, que irão se multiplicar por divisão nuclear, formando esquizontes, que liberam os merozoítos na circulação sanguínea (acesso malárico), os quais invadirão novos eritrócitos (BRASIL, 2010).

Após algumas gerações, certos merozoítos eritrocitários se diferenciam nas formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino), os quais não se dividem no interior das hemácias e, quando ingeridos pelos insetos vetores, iniciarão o ciclo sexuado do parasita (BRASIL, 2010).

No hospedeiro invertebrado, as formas sexuadas (gametócitos) iniciam o ciclo esporogônico no aparelho digestivo. No estômago do anofelino, os microgametas fecundam os macrogametas gerando os zigotos, os quais se transformam em oocinetos (forma móvel), que migram até a parede do intestino médio, formando os oocistos, que crescem, rompem e liberam os esprozoítos na hemolinfa. Estes se dirigem às glândulas salivares e são inoculados no hospedeiro humano, durante o repasto sanguíneo, iniciando o novo ciclo de vida do *Plasmodium* (BRASIL, 2010).



**Figura 2.** Representação do ciclo evolutivo do *Plasmodium* nos dois hospedeiros. Fonte: CDC, 2008.

#### 2.1.4 - Manifestações Clínicas:

O quadro clínico pode ser leve, moderado ou grave, em função da espécie e quantidade de parasitas circulantes, do tempo de infecção e da imunidade do hospedeiro humano (BRASIL, 2010).

O período de incubação varia de sete a 14 dias, chegando a vários meses (nas regiões de clima temperado e nos casos de malária dos viajantes) nas infecções por *P. vivax* e *P. malariae* (BRASIL, 2010). Os sinais e sintomas iniciais são inespecíficos e semelhantes à doença viral, e incluem: cefaleia, cansaço, fadiga, desconforto abdominal, dores musculares e articulares.

Geralmente são acompanhados de febre, calafrios, sudorese, anorexia, vômitos e mal-estar. Nas áreas endêmicas, a doença é frequentemente diagnosticada considerando-se apenas os sinais e sintomas, apesar destes não serem específicos. Nesta fase inicial, sem evidência de disfunção de órgãos vitais, os pacientes podem ser facilmente tratados com recuperação rápida, eficaz e completa (WHO, 2010).

### **2.1.5 – Tratamento:**

O tratamento requer abordagem integrada, incluindo a prevenção (controle de vetores) e o emprego de antimaláricos eficazes. Os antimaláricos em uso atualmente incluem os de primeira escolha para os casos prováveis ou confirmados; bem como de segunda e terceira linhas, utilizados nas falhas de tratamento, na malária severa em grávidas e em grupos especiais de pacientes (WHO, 2009).

O tratamento visa à interrupção da esquizogonia sanguínea, através da clivagem oxidoreductiva dos peróxidos e interação com o grupo heme Fe (II), gerando ERONs contra o parasita. Também impede o desenvolvimento dos gametócitos, bem como a erradicação das formas latentes do parasita nos tecidos (hipnozoítos) do *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas (MELO et al., 2005; CUNICO et al., 2008; FREITAS et al., 2007).

A escolha do antimalárico deve ser adequada à espécie do parasita e à resistência destes aos fármacos, à gravidade do quadro clínico e às características imunológicas do paciente (GERMANO et al., 2005). Dentre estes se destacam as quinolinas (quinina, cloroquina, primaquina, mefloquina, amodiaquina, halofantrina) diclorobenzilidina (lumefantrina), biguanidas (proguanil, clorproguanil), diaminopiridinas (primetamina), sulfonas (dapsona),

hidroxinaftoquinonas (atovaquona) e as lactonas sesquiterpênicas (derivados da artemisinina, artesunato e artemeter; LOISEAU e LE BRAS, 2007).

Nos pacientes com malária vivax, o objetivo é a cura clínica e parasitológica, pela eliminação de todas as formas do parasita, prevenindo o aparecimento e a disseminação da resistência aos antimaláricos. Soma-se a eliminação dos gametócitos, reduzindo assim, a transmissão da doença (WHO, 2009). Os fármacos de primeira linha são a cloroquina (CQ) e a primaquina (PQ), os quais vêm sendo utilizados há mais de 60 anos, apesar do aumento das falhas terapêuticas, resultante principalmente da resistência do parasita a cloroquina (MUELLER et al., 2009).

O metabolismo da CQ vem sendo estudado desde 1966, e inicia-se com a perda de um grupo *N*-etilo, originando “desetil-cloroquina” (DCQ), que sofre transformações adicionais conducentes aos restantes metabólitos. Apesar dos vários metabólitos originados pela CQ, apenas uma pequena fração é excretada na forma de ácido carboxílico nos humanos, tendo a amina 17 uma importância bastante reduzida. O principal metabólito excretado é a DCQ, que apresenta atividade antimalárica semelhante à CQ. Já a PQ, após administração oral, perde o grupo *N*-alquilo, originando 6-metoxi-8-aminoquinolina (6-MAQ). Acredita-se que a 6-MAQ possa ser convertida no derivado *N*-hidroxilado (MAQ-NOH, 6-metoxi-8-hidroxi-aminoquinolina), sendo este o agente responsável pela metemoglobinemia (VALE et al., 2005).

Para facilitar a ação dos profissionais de saúde nas áreas endêmicas e garantir a padronização dos procedimentos para o tratamento da malária, são apresentadas a seguir as orientações relevantes sobre a indicação e uso dos antimaláricos, preconizadas pela Secretária de Vigilância em Saúde (SVS) do

Ministério da Saúde no Brasil. Embora as doses constantes no quadro 1 levem em consideração o grupo etário, é recomendável, sempre que possível, para assegurar a eficácia terapêutica e reduzir os riscos de toxicidade, que as doses sejam ajustadas ao peso do paciente (Quadro 2). Entretanto, quando uma balança para aferição do peso não estiver disponível, recomenda-se a utilização da estimativa da relação peso/idade apresentada no quadro 1 (BRASIL, 2009).

Quadro 1 - Tratamento das infecções pelo *P. vivax* ou *P. ovale* com cloroquina em três dias e primaquina em sete dias (esquema curto).

Idade/ Peso	Número de Comprimidos por medicamento por dia						
	1º Dia		2º Dia		3º Dia		4º ao 7º Dias
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses 5-9 kg	1/2	1	1/4	1	1/4	1	1/2
1-3 anos 10-14 kg	1	2	1/2	1	1/2	1	1
4-8 anos 15-24 kg	1	2	1	2	1	2	2
	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Primaquina ADULTO
9-11 anos 25-34 kg	2	1	2	1	2	1	1
12-14 anos 35-49 kg	3	2	2	2	2	2	1
≥ 15 anos ≥ 50 kg	4	2	3	2	3	2	2

Fonte: BRASIL, 2010.

- Cloroquina: comprimidos de 150mg, Primaquina infantil: comprimidos de 5 mg e Primaquina adulto: comprimidos de 15 mg.
- Sempre dar preferência ao peso para a escolha da dose.
- Todos os medicamentos devem ser administrados em dose única diária.
- Administrar os medicamentos preferencialmente às refeições.

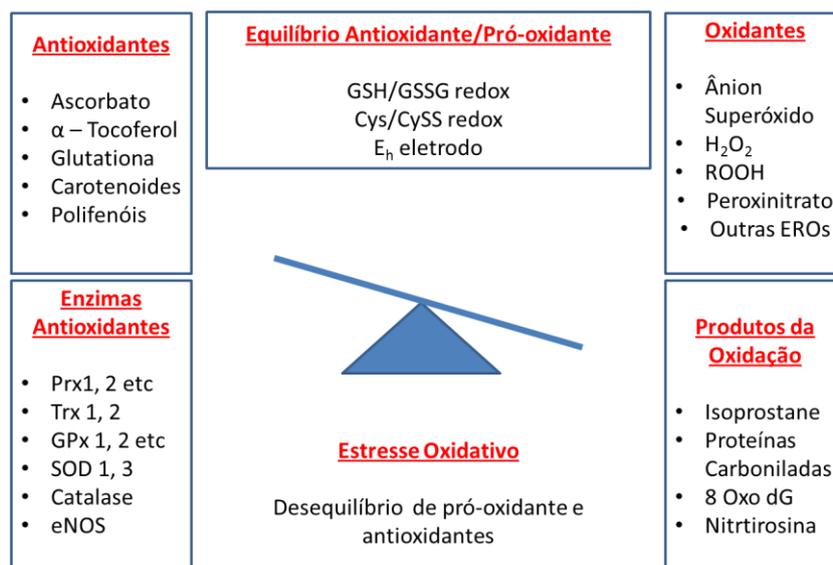
**Quadro 2 - Ajuste da dose e tempo de administração da primaquina para pacientes com peso igual ou superior a 70 kg.**

<b>Faixa de peso (kg)</b>	<b>Dose total de primaquina (mg)</b>	<b>Tempo de administração (30 mg/dia)</b>
<b>70 – 79</b>	240	8
<b>80 – 89</b>	272	9
<b>90 – 99</b>	304	10
<b>100 – 109</b>	336	11
<b>110 – 120</b>	368	12

Fonte: BRASIL, 2009 (modificado).

## 2.2 – ESTRESSE OXIDATIVO:

O estresse oxidativo corresponde ao desequilíbrio entre formação endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes, a favor das primeiras, promovendo danos nas macromoléculas biológicas como lipídios, DNA e proteínas (Figura 3; SIES, 1985)



**Figura 3.** Esquema representativo do desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, levando ao estresse oxidativo. Adaptado de JONES, 2006.

Adicionalmente, Jones (2006) sugeriu que os danos oxidativos as macromoléculas biológicas também poderiam ser resultantes do desequilíbrio nos mecanismos redox, como as relações entre os sistemas tiol/disulfetos (Tioredoxinas reduzida/Tioredoxina oxidada, Glutathiona/Glutathiona dissulfeto, Cisteína/Cistina), direcionando a célula, via sinalização celular, à divisão ou a apoptose, respectivamente, indicando que as ERONs (espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio, termo que engloba tanto as EROs quanto as espécies reativas de nitrogênio) não representam a única fonte de danos oxidativos. Deste modo, o reconhecimento dos papéis críticos da sinalização celular e das diversas vias que mantém o equilíbrio redox possibilitam

identificar alterações chaves nestes processos, favorecendo novas abordagens terapêuticas para as doenças nas quais o estresse oxidativo desempenha papel relevante na fisiopatologia.

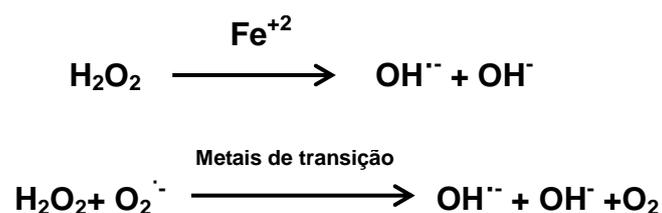
As EROs se distribuem em dois grupos, a saber:

- Os radicais livres de oxigênio: hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ );
- As espécies derivadas do oxigênio sem características de um radical (um elétron não pareado no último orbital): oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso (CIRCU e AW, 2010).

Dentre as ERNs (espécies reativas de nitrogênio) incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^\bullet$ ; CIRCU e AW, 2010).

### 2.2.1 – Fontes de ERONS:

Dentre as diversas reações de formação de ERONS se destaca a produção de radical  $\text{HO}^\bullet$ , considerado altamente reativo e tóxico, a partir da dismutação do ânion superóxido pela enzima superóxido dismutase com produção de peróxido de hidrogênio, que na presença de certos metais de transição (especialmente o cobre e o ferro) pode levar a produção deste radical via reações de Fenton e Haber Weiss (Figura 4; BARREIROS et al., 2006).



**Figura 4.** Reação de Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007)

Em condições fisiológicas normais, diversos processos metabólicos geram ERONs, como por exemplo, a produção de ATP mitocondrial é acompanhada pelo fluxo intermitente de elétrons pelos derivados reduzidos do ácido tricarboxílico, via oxidação do NADH e FADH<sub>2</sub>. Grande parte do oxigênio consumido é reduzido a água, entretanto, cerca de 1% é convertido ao ânion radical superóxido, a partir da redução de um elétron desta molécula (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004; BUETTNER, 2011).

Os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos contribuem para a formação de ERONs nos processos infecciosos através da explosão respiratória, na qual há aumento da conversão do oxigênio pela NADPH oxidase, NO sintase a ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, respectivamente. Existem duas formas de participação destas moléculas, quer sejam: diretamente contra os patógenos ou via regulação da resposta imune. Entretanto, somente o NO e as EROs possuem esta dupla função (BEDARD e KRAUSE, 2007; WINK et al., 2011). Também ocorre o recrutamento de citocinas pró-inflamatórias, que aumentam a produção do radical ânion superóxido e consequente dismutação a peróxido de hidrogênio, bem como o bloqueio do fluxo sanguíneo através da neutralização do NO e, consequente isquemia, seguida da reperfusão (NASSAR et al., 2011). Para combater a ação deletéria das ERONs sobre macromoléculas essenciais a homeostasia, o organismo dispõe de um complexo sistema de defesa antioxidante, composto por compostos enzimáticos e não enzimáticos.

## 2.3 – ANTIOXIDANTES:

Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), antioxidante é qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo em uma molécula alvo. Os antioxidantes atuam por diferentes mecanismos de ação, como por exemplo: inibindo ou retardando a formação de EROs, como cofatores de enzimas antioxidantes, dentre outros (MAGALHÃES et al., 2008).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos, como a Glutathione Peroxidase (GSH-Px), Glutathione S-transferase (GST), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase Intraeritrocitária (CAT), coenzima Q<sub>10</sub>; e não enzimáticos: a glutathione reduzida (GSH), ácido úrico, vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -caroteno e metais de transição ligados às proteínas (YOUNG e WOODSIDE, 2001; KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004).

### 2.3.1 – Antioxidantes enzimáticos:

#### 2.3.1.1 – Glutathione Peroxidase (GSH-Px):

Um importante sistema enzimático de defesa contra radicais livres envolve as glutathione peroxidases (GSH-Px) encontradas em muitos tecidos de origem animal. Estas enzimas são bastante particulares no que se refere à sua constituição, pois incorporam um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo. Também atuam inativando os derivados das ERO do metabolismo aeróbico, sendo responsável pela proteção da membrana das células que funcionam em presença de oxigênio (MILLER et al., 1993a).

O envolvimento de algumas GSH-Px no controle dos níveis de hidroperóxidos fosfolipídicos, formados a partir do ataque de espécies radiculares às membranas é bem estudado, assim como os parâmetros

cinéticos da GSH-Px e o mecanismo catalítico envolvendo glutathione e peróxido de hidrogênio (LEHMANN et al. 1998; HUBER et al. 2008).

#### 2.3.1.2 – Glutathione S-transferase (GST):

A GST é uma ubiquinona, proteína multifuncional com componentes essenciais para detoxificação celular e possui uma “caixa pandora” sobre os mecanismos de defesa antioxidante. É o antioxidante intracelular mais abundante com complexas funções biológicas e apresenta um sistema de reguladores metabólicos bem estabelecidos, assim pode fornecer um índice putativo de saúde (FAMIN et al. 1999).

O sistema da glutathione desempenha um papel chave na defesa do parasita da malária contra o estresse oxidativo e no desenvolvimento de resistência a drogas. Isto é apoiado pelo fato de que parasita resistente a cloroquina apresentam aumento das concentrações de glutathione (SOHAIL et al. 2007).

#### 2.3.1.3 - Superóxido dismutase (SOD):

A SOD é uma das mais eficientes enzimas antioxidantes, a qual catalisa a conversão do ânion superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio. Apresenta várias isoformas, que diferem de acordo com o metal (cofator), a localização, a cadeia de aminoácidos e outras características físico-químicas. Existem três formas de SOD: a citosólica SOD-dependente de Cu/Zn (SOD-Cu/Zn), a mitocondrial SOD-dependente de Mn e Fe (SOD-Mn/Fe) e a SOD-extracelular. Alguns protozoários, como aqueles pertencentes ao filo Apicomplexa, apresentam também a SOD-dependente de Fe (SOD-Fe; MÜLLER, 2004; KUPPUSAMY et al., 2005).

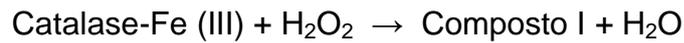
A SOD-Cu/Zn (SOD-1), presente no citosol dos eritrócitos, possui duas subunidades idênticas com peso molecular de 32 kDa, as quais possuem um sítio ativo. Catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (RAHMAN, 2007).

A SOD-Mn/Fe, presente nas mitocôndrias, possui atividade antioxidante resultante da doação de elétrons originários da mudança do estado de oxidação do Mn e Fe. A SOD-Mn em humanos difere da SOD-Fe dos eucariotos pelo acoplamento em um tetrâmero, da ligação de dois dímeros que gera duas ligações simétricas de quatro hélices. É uma enzima homotetrâmera com peso molecular de 96 kDa (PERRY et al., 2010).

Recentemente foi descrita a SOD-extracelular (SOD-3), a qual é sintetizada por alguns tipos de células, incluindo fibroblastos e células endoteliais, sendo expressa na superfície destas, ligada a heparina sulfato (YOUNG e WOODSIDE, 2001). A análise cristalográfica desta enzima demonstrou estrutura tetramérica composta de dímeros similares a SOD-1. Esta glicoproteína contém íons Cu e Zn e catalisa as mesmas reações da SOD-1, apresentando elevada afinidade por certas glicoproteínas, entretanto sua regulação nos tecidos de mamíferos ocorre, principalmente, através da liberação das citocinas nos processos inflamatórios (RAHMAN, 2007; PERRY et al., 2010).

#### 2.3.1.4 – Catalase intraeritrocitária (CAT):

A catalase foi a primeira enzima antioxidante caracterizada e sua função é catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio:



A CAT consiste de quatro subunidades de proteínas, na qual cada uma contém um grupamento heme e uma molécula de NADPH. Encontra-se amplamente distribuída nos peroxissomos, os quais possuem a maioria das enzimas capazes de gerar o peróxido de hidrogênio. Apresenta elevada atividade no fígado e eritrócitos, porém também possui atividade em outras células do organismo (YOUNG e WOODSIDE, 2001).

#### 2.3.1.5 - Coenzima Q<sub>10</sub>:

A Coenzima Q<sub>10</sub> é uma ubiquinona que participa da cadeia de transporte de elétrons e translocação de prótons H<sup>+</sup> na mitocôndria, juntamente com o citocromo e as desidrogenases mitocondriais, as quais oxidam NADH, NADPH e FADH<sub>2</sub>, transferindo prótons e elétrons para a ubiquinona, convertendo-a em ubiquinol. Este por sua vez transfere prótons para a matriz mitocondrial e elétrons ao citocromo. Desta forma, as isoformas de citocromo reduzem o O<sub>2</sub> à H<sub>2</sub>O, indispensável à produção de ATP (BARREIROS et al., 2006).

Na sua forma reduzida, esta coenzima também inibe a peroxidação dos lipídios, protegendo dos danos oxidativos o DNA e as proteínas intermembranas da mitocôndria. É amplamente utilizada como cofator nas alterações metabólicas da cadeia de transporte de elétrons, quando é capaz de transferir elétrons desemparelhados para receptores que não participam da cadeia respiratória, atuando também na regeneração do tocoferol na membrana mitocondrial, bem como na redução do ânion superóxido, além de

possuir em sua composição química insaturações que participam da redução do oxigênio singlet (TURUNEN et al., 2004; BARREIROS et al., 2006).

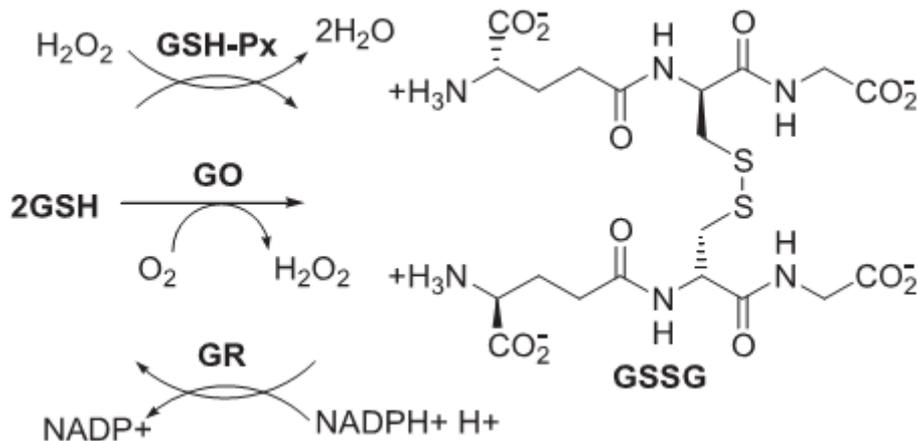
### **2.3.2 – Antioxidantes não enzimáticos:**

#### 2.3.2.1 – Glutationa reduzida (GSH):

A glutaciona reduzida (GSH) é um tripeptídeo (*L*-γ-glutamil-*L*-cisteinilglicina) considerado a primeira linha de defesa contra as ERONs nas hemácias. É uma molécula que apresenta diversas funções, dentre elas de cofator de diversas enzimas, como a glutaciona peroxidase, a glutaciona-S-transferase, glutaredoxinas e glioxalases. Desempenha ação protetora contra as ERONs, sendo oxidada a dissulfeto da glutaciona (GSSG) à custa da glutaciona peroxidase. É considerada um tampão redox sulfidrílico, pois mantém os resíduos cisteinil da hemoglobina e de outras proteínas no estado reduzido (PANDEY e RIZVI, 2011).

A GSH é o único tiol não protéico presente nas espécies aeróbicas, nas quais desempenha relevante papel antioxidante, sendo considerada o principal antioxidante nas hemácias. Quando seus teores estão reduzidos, como por exemplo, nos indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase, não há doação do NADPH, que atua como cofator da glutaciona redutase na redução da GSSG a GSH, com conseqüente aumento das ERONs e dano oxidativo no eritrócito, promovendo hemólise e a formação de metemoglobina, diminuindo desta forma, o transporte de oxigênio aos tecidos. Ocorrem também alterações na morfologia eritrocitária com perda da flexibilidade da membrana, impedindo sua passagem para órgãos vitais, formando corpúsculos de Heinz e favorecendo a fagocitose pelo sistema retículo-endotelial (ALVES et al., 2003).

No ciclo catalítico da GSH (Figura 5), podem ser identificadas três enzimas: a glutationa oxidase (GO), a GSH-Px e a glutationa redutase (GR). As duas primeiras catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última é responsável pela regeneração de GSSG a sua forma reduzida na presença de NADPH (HUBER et al., 2008).



**Figura 5:** Representação esquemática do ciclo catalítico da glutatona. Fonte: HUBER et al., 2008.

### 2.3.2.2 – Ácido úrico:

É a principal forma de excreção de compostos nitrogenados das aves e dos répteis. Nos mamíferos, é produto secundário da excreção, derivado das bases purínicas. Na maioria dos tecidos orgânicos encontra-se na forma de ânion urato ( $\text{pK}_{\text{a}1}=5,4$ ). Somente a partir dos anos 80 foi demonstrado que é um antioxidante efetivo nos sistemas biológicos, capaz de proteger o DNA e lipídios da ação deletéria das ERONs. Entretanto, a elevada polaridade restringe sua atividade ao meio aquoso e sua concentração nos compartimentos aquosos do organismo é próxima ao limite de solubilidade ( $300 \mu\text{M}$ ). Indivíduos com aterosclerose podem apresentar nível elevado de ácido úrico no sangue, o que pode representar um mecanismo para contrapor a ação

deletéria das ERONs, derivadas, principalmente, dos processos inflamatórios relacionados a aterogênese (NIETO et al., 2000).

A ação antioxidante do ânion urato deve-se a reação imediata com o radical hidroxila, no entanto, não reage com o superóxido e peróxidos (ROOH), bem como não é capaz de desativar o oxigênio singlet, porém, ao inibir outras espécies oxidadas no meio biológico, promove, indiretamente, a redução desta molécula. Sua principal ação é a inativação dos radicais hidroxilas, peroxilas ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e  $\text{NO}_2^\bullet$  (gerando nitrito), protegendo o DNA e os lipídios da ação deletéria destes compostos. Como está presente no meio aquoso, o urato reage com as ERONs antes da transposição da membrana celular e consequente início dos danos oxidativos (BARREIROS et al., 2006)

#### 2.3.2.3 - Vitamina E:

Esta vitamina existe em diferentes formas. Nos humanos, o  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais ativa, sendo considerado um potente antioxidante lipossolúvel, cuja principal função é proteger a membrana celular da peroxidação dos lipídios. O  $\alpha$ -tocoferol é convertido ao radical  $\alpha$ -tocoferil pela doação de hidrogênio ao radical peroxila dos lipídios, o qual é regenerado à forma original pelo ácido ascórbico (HENSLEY et al., 2004; KOJO, 2004).

#### 2.3.2.4 - Vitamina C:

É um importante antioxidante hidrossolúvel. Atua como cofator de várias enzimas que catalisam as reações de hidroxilação. Desempenha papel relevante na síntese do colágeno, como cofator na hidroxilação da prolina e lisina. Além disso, interrompe os processos em cascata da peroxidação dos lipídios em meio aquoso. Atua em conjunto com a vitamina E na regeneração do radical  $\alpha$ -tocoferil (YOUNG e WOODSIDE, 2001; KOJO, 2004).

#### 2.3.2.5 - $\beta$ -caroteno:

Os carotenóides constituem um grupo de antioxidantes lipossolúveis, dos quais, o  $\beta$ -caroteno é considerado o mais importante, embora pelo menos, outros 20 compostos estejam presentes nas membranas e lipoproteínas. Atuam *in vivo* como inibidores do oxigênio singlet ou como sequestradores dos radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídios em baixa pressão de oxigênio com eficiência superior ao  $\alpha$ -tocoferol, nestas condições. Entretanto, tornam-se pró-oxidantes em elevada pressão de oxigênio (RAHMAN, 2007).

#### 2.3.2.6 - Metais de transição ligados a proteínas:

Algumas enzimas antioxidantes dependem de metais de transição para atuarem nos mecanismos celulares de defesa contra os ERONs. Sua ação antioxidante ocorre através do sequestro de ferro e cobre, impedindo que eles atuem como cofatores das reações de Fenton e Haber-Weiss. Como exemplo, o cobre da ceruloplasmina catalisa a oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$ , impedindo sua ação como cofator na reação de Fenton exercendo desta forma ação antioxidante (BIANCHI e ANTUNES, 1999; YOUNG e WOODSIDE, 2001).

A avaliação dos antioxidantes, quer de forma isolada ou conjunta, através da determinação da capacidade antioxidante não enzimática total, é empregada como biomarcador do estresse oxidativo, e juntamente com a peroxidação lipídica, podem fornecer informações valiosas sobre o estresse oxidativo de determinado sistema biológico (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004).

### **2.3.3 - Avaliação da capacidade antioxidante não enzimática total (TAC):**

A mensuração da capacidade antioxidante não enzimática total fornece informações relevantes para estimar as defesas não enzimáticas à ação

deletéria das ERONs. Numerosos métodos foram propostos e aplicados em produtos naturais e fluídos biológicos, tais como plasma, urina e líquido seminal (PRIOR, 2004; SERAFINI e DEL RIO, 2004). Estes são classificados em dois grupos, dependendo do fundamento da técnica: métodos de transferência de átomo de hidrogênio (TAH) e aqueles de transferência de elétrons (TE). A maioria das análises de TAH se baseia na competição entre os antioxidantes e o substrato para gerar radical peroxila através da decomposição de compostos azo. Já as análises de TE avaliam a capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras de reduzir um composto oxidado, cuja coloração é alterada após redução de maneira proporcional à concentração dos antioxidantes (ZULUETA et al., 2009).

A conversão colorimétrica do 2,2'-azinobis, ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) ao radical ABTS (ABTS<sup>•</sup>) é uma das análises de TE mais empregadas atualmente. Originalmente, foi desenvolvida para determinar o conteúdo de hemoglobina em amostras de tecidos (MARKLUND, 1979). No entanto, após diversos aperfeiçoamentos, a técnica foi adaptada para usar o ânion radical ABTS<sup>•</sup> pré-formado, como biomarcador da capacidade antioxidante não enzimática total e os resultados expressos em valores relativos ao ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX), um análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E (RAUTIAINEN et al., 2008; NIKI, 2010).

#### **2.3.4 – Peroxidação lipídica:**

Os lipídios são indispensáveis para manutenção da forma, fluidez e funções da membrana eritrocitária, entretanto as ERONs promovem a

peroxidação dos lipídios da membrana (PANDEY e RIZVI, 2011), que por ser um processo em cascata origina diversos aldeídos eletrofilicos reativos capazes de se unir facilmente as proteínas, formando adutos com cisteína ou resíduos de histidina (KOPITZ et al., 2004). Dentre estes, o malondialdeído (MDA) é considerado o principal produto da peroxidação lipídica. Várias hipóteses referentes à formação do MDA *in vivo* foram propostas. Pryor e Stanley (1975) sugeriram que a oxidação dos lipídios objetivando a formação das prostaglandinas, que são endoperóxidos similares aqueles da membrana plasmática das hemácias, rica em cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) com duas ou mais ligações duplas, é capaz de produzir MDA. Em 1990, Esterbauer e Cheeseman sugeriram uma via alternativa para geração do MDA, baseado na formação de hidroperóxido e posterior  $\beta$ -clivagem de PUFA (ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico). Soma-se outras fontes geradoras de MDA, consideradas de menor importância, como a radiação ionizante (PANDEY e RIZVI, 2011).

Um método espectrofotométrico simples para avaliar a peroxidação lipídica (YAGI, 1976) tem sido frequentemente utilizado e se fundamenta na formação de adutos entre moléculas resultantes da peroxidação lipídica (dentre elas o MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), utilizando condição ácida extrema e elevada temperatura. Os produtos coloridos são mensurados por técnicas colorimétricas ou fluorimétricas. Ressalta-se que frequentemente é descrito que a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) destina-se a quantificar exclusivamente o MDA, contudo outros compostos presentes na amostra reagem com este ácido, contribuindo para o aumento da absorbância ou fluorescência total. Além disso, o MDA e

substâncias similares também podem ser formados como artefatos da técnica durante a análise (ANTUNES et al., 2008).

Há forte associação entre as ERONs e os processos de envelhecimento, transformação e morte celular com consequências diretas sob diversas doenças, dentre elas, a indução do câncer e a propagação da SIDA nos pacientes soropositivos (HIV<sup>+</sup>), parasitoses, bem como na fisiopatologia de diversas doenças crônicas, como as autoimunes, cardiovasculares, pulmonares, nas intoxicação por xenobióticos, dentre outras. Por outro lado, também é reconhecido que as ERONs desempenham papel fisiológico importante no controle da pressão arterial, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, na fertilização de ovos e no amadurecimento de frutos (VASCONCELOS et al., 2007).

Assim, buscando ampliar o conhecimento da fisiopatologia da malária, é indispensável o entendimento dos mecanismos envolvidos na geração das ERONs no decurso da infecção e a resposta do hospedeiro humano.

## 2.4 – ESTRESSE OXIDATIVO E SUAS MANIFESTAÇÕES NA MALÁRIA:

Discute-se o papel protetor ou deletério das ERONs na fisiopatogenia da malária humana, uma vez que como vive em meio aeróbico, o *Plasmodium* pode contribuir para a formação de ERONs, como o ânion radical hidroxila, via reação de Fenton, empregando como cofator o  $Fe^{+2}$  resultante da degradação da hemoglobina no vacúolo ácido digestivo, o que é favorecido pela sua elevada taxa metabólica e rápido crescimento durante a fase aguda da infecção (PABÓN et al., 2003; MÜLLER, 2004). Portanto, o passo chave para produção das ERONs no eritrócito infectado é a degradação da hemoglobina, a qual representa a principal fonte de aminoácidos para o *Plasmodium*, com liberação do grupamento heme (Ferro protoporfirina IX; BECKER et al., 2004).

Outro mecanismo envolvido na geração de ERONs na malária é a ativação da resposta imune do hospedeiro, aumentando a fagocitose pelos monócitos e macrófagos circulantes em resposta a ruptura dos eritrócitos e liberação da hemozoína na circulação sanguínea. Cultivo de células sanguíneas monucleadas demonstrou que a hemozoína promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tal como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10), aumentando a explosão respiratória dos fagócitos, e consequente produção de ERONs (KELLER et al., 2004b).

A infecção pode depletar cofatores essenciais à ação das enzimas antioxidantes, bem como reduzir os teores de antioxidantes circulantes como o ascorbato e o tocoferol. Também foi demonstrado que a infecção por *P. yoelii* em ratos MDR aumenta a atividade da xantina oxidase e a peroxidação dos lipídios armazenados no fígado, indicando a ocorrência de dano oxidativo ao hepatócito (PABÓN et al., 2003; GUHA et al., 2006).

A síndrome de isquemia e reperfusão também é responsável pela geração de ERONs nos pacientes com malária, especialmente nos casos graves, e representa a principal causa de danos neurológicos na malária cerebral, afetando a integridade e a função neuronal. O sequestro dos eritrócitos contendo o parasita no estágio maduro nos pequenos vasos bloqueia o fluxo sanguíneo para diversos órgãos, principalmente no sistema nervoso central, ocasionando hipóxia e recrutamento de citocinas pró-inflamatórias, as quais participam da citoaderência. Objetivando manter o tônus vascular, o óxido nítrico (NO) é gerado pelas células endoteliais, promovendo a homeostase vascular por regular a agregação plaquetária e a adesão ao endotélio, restringindo a extensão do processo inflamatório (SERIROM et al., 2003).

Por fim, o mecanismo de ação de grande parte dos antimaláricos envolve a geração de ERONs no eritrócito parasitado, uma vez que o *Plasmodium* é extremamente sensível ao meio oxidante. Por exemplo, o mecanismo de ação da primaquina (PQ), que é uma 8-aminoquinolina esquizonticida tecidual, gametocitocida ao *P. falciparum* e hipnozoiticida ao *P. vivax* e *P. ovale* é, provavelmente, mediado por metabólitos redox-ativos, como a 5-hidroxiprimaquina (5-HPQ), que é um produto de biotransformação em humanos e possível responsável pela ação antimalárica e pelos efeitos hemolíticos da PQ. Foi demonstrada hemólise em eritrócitos contendo teores normais de GSH, após aumento das concentrações de 5-HPQ, que forma um par redox com suas formas quinolinas, cujo ciclo contínuo de oxi-redução gera ERONs e aumenta o consumo de GSH (SHANKS et al., 2001).

Como resultado da depleção da GSH e NADPH, as células diminuem a capacidade de inativar as ERONs e alteram a via da hexose monofosfato. Nas hemácias com baixo nível de GSH, como nos indivíduos com deficiência de G6PD, doses moderadas de PQ aumentam os níveis de metemoglobina, levando a oxidação dos lipídios e proteínas, alterando desta maneira, a integridade da membrana dos eritrócitos infectados e normais. Nestes últimos há eriptose, evento com algumas características similares a apoptose, como ativação dos canais de  $\text{Ca}^+$  e exposição da fosfatidilserina, removendo-os da circulação através dos macrófagos. Ressalta-se que a ativação dos canais de  $\text{Ca}^+$  leva a peroxidação dos fosfolipídios e a exposição da fosfatidilserina, causando hemólise intravascular não imune, contribuindo também para o estresse oxidativo (BOWMAN et al., 2005; GANESAN et al., 2012).

A cloroquina é um esquizonticida sanguíneo pertencente à classe das 4-aminoquinolina, de baixa toxicidade aos humanos. É biotransformada no fígado à monodesetilcloroquina e se acumula nos vacúolos digestivos do *Plasmodium* em razão do pH lisossômico, interferindo na metabolização e utilização da hemoglobina pelo parasita. Uma hipótese amplamente aceita sobre seu mecanismo de ação sugere que a ligação da cloroquina a Ferro III protoporfirina IX (Fe [III] PPIX) impede a biocristalização da hemozoína, o que resultará na formação de um composto tóxico ao *Plasmodium* (DAILY, 2006). Soma-se o fato que a ferro III protoporfirina IX e/ou aductos de CQ-Fe [III] PPIX podem acarretar a formação de ERONs, levando a peroxidação dos lipídios da membrana do parasita e sua conseqüente destruição. O envolvimento de eventos oxidativos no mecanismo de ação da CQ foi confirmado por estudo de modulação de sua ação pelos níveis de GSH. Neste sentido, a expressão da  $\gamma$ -

glutamil-cisteína sintetase na malária por *P. berghei* em murinos tem sido relacionada a resistência à droga, como já descrito para o *P. falciparum* (MONTIA et al., 2002; BECKER et al., 2004; SOLOMON e LEE, 2009).

Com a finalidade de impedir os efeitos deletérios das ERONs em um meio altamente oxidante, os parasitas possuem antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathiona, que é o mais abundante, bem como enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e proteínas dependentes de tioredoxinas. Nos últimos anos, a estrutura e a função destas enzimas foram estudadas detalhadamente, objetivando o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos (BECKER et al., 2004).

Sabe-se que o *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. vivax* e outros protozoários, como o *Toxoplasma gondii*, possuem dois genes distintos que codificam diferentes SODs, dentre estas, a SOD-Fe, de localização citosólica que é transcrita e expressa durante o ciclo eritrocítico do parasita e realiza a dismutação do ânion superóxido produzido no vacúolo digestivo do parasita. Já a SOD-2 está localizada nas mitocôndrias e possui uma cauda N-terminal. Sua presença indica que o *Plasmodium* possui uma cadeia respiratória ativa, na qual o ânion superóxido é gerado e posteriormente dismutado por esta enzima, evitando desta forma, danos às suas funções metabólicas, ácidos nucleicos, proteínas e membranas das organelas intracelulares (MÜLLER, 2004).

O *Plasmodium* também possui via funcional para síntese da glutathiona, através da  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase ( $\gamma$ -GCS) e glutathiona sintase, as quais catalisam a ligação do glutamato a cisteína seguida pela adição de glicin. Os diferentes genes que codificam a  $\gamma$ -GCS do *P. falciparum* contêm várias regiões N-terminal repetidas, as quais não são notadas no *P. berghei*. Esta

variação pode estar associada à resistência aos antimaláricos ou a distribuição geográfica do parasita (MÜLLER, 2004).

Outro sistema antioxidante presente nos parasitas são as tioredoxinas, as quais são consideradas mensageiros redox que interagem com vários compostos redox ativos e seus metabólitos, como ribonucleotídeos redutase, fatores transcricionais, peroxidases e tiois de baixo peso molecular (MÜLLER, 2004).

A eriptose (apoptose em eritrócitos) também é um mecanismo que envolve a produção de ERONS durante a infecção malárica pelo parasita, a qual é caracterizada por modificação dos fosfolipídios e deformação da membrana eritrocitária. Esse processo é desencadeado pela ativação da atividade de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que pode resultar na abertura dos canais de cátions através da ativação da prostaglandina E-2. Isto ocorre devido ao aumento das taxas metabólicas e rápido crescimento do parasita, diminuindo a quantidade de nutrientes no interior do eritrócito e necessitando a busca de outras fontes (SYED e QADRI, 2012).

Embora a ativação destes canais seja necessário para reprodução, maturação e sobrevivência do patógeno, este limita o tempo de vida dos eritrócitos infectados e, portanto, do *Plasmodium*, visto que esta abertura estimula a eriptose. Assim, o patógeno enfrenta um dilema: por um lado, requer a absorção de nutrientes e a substituição de  $\text{K}^+$  pelo  $\text{Na}^+$  no citosol; por outro, desencadeia o suicídio do eritrócito, limitando o tempo de vida do parasita no hospedeiro. Tentando resolver, o parasita sequestra  $\text{Ca}^{2+}$  e, assim, mantém a pressão intraeritrocitária e a atividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  baixa. Além disso, evita a hemólise prematura dos eritrócitos, diminuindo a pressão osmótica no

citossol, a qual é obtida através da digestão do excesso de hemoglobina e exposição de seus aminoácidos. Eventualmente, a infecção pelo *Plasmodium* resulta na perda da assimetria dos fosfolipídios por toda a membrana e exposição da fosfatidilserina, o que ativará a captura dos eritrócitos infectados pelos macrófagos (KOKA et al., 2008; FÖLLER et al., 2009).

Também, a eritose pode aderir à parede vascular e fomentar a coagulação do sangue. Assim, eritrócitos expostos com fosfatidilserina podem comprometer a microcirculação, sugerindo a participação na lesão vascular da síndrome metabólica. O impacto da eritose induzida por hemina (indutor da lise celular) na microcirculação pode ser agravado pelo efeito da hemina sobre as células endoteliais. Se por um lado a hemina induzida por estresse oxidativo pode estimular a apoptose de células nucleadas, por outro regula a hemo-oxidase, que por sua vez, confere resistência a apoptose (GATIDIS et al., 2009). Assim, esse evento induzirá a síndrome de isquemia e reperfusão por hemólise.

## 2.5 – METEMOGLOBINEMIA:

A hemoglobina é a principal proteína presente nas hemácias, fortemente compactada no citoplasma, constituindo cerca de 90% do peso destas células. Apesar de um sistema antioxidante efetivo no seu interior, os íons ferroso da hemoglobina estão continuamente expostos a elevada concentração de oxigênio, sendo oxidados a íons férricos, formando metemoglobina (MetHb), a qual é mantida em valores inferiores a 2% (PANDEY e RIZVI, 2011).

Concentrações superiores caracterizam a metemoglobinemia que pode ser congênita ou adquirida. A primeira se manifesta sob duas formas distintas, a saber: tipo I, na qual há deficiência do gene responsável pela expressão da NADH citocromo b5 redutase (NADHb5R) apenas nos eritrócitos e tipo II, na qual a deficiência desta enzima se distribui por vários tecidos. Já a forma adquirida resulta da exposição aos agentes oxidantes como as quinolinas (primaquina), nitritos, cloratos, fenacetina, acetanilida, sulfanilamida, nitrobenzeno, anilina, nitratos, nitritos e óxido nítrico (FERREIRA et al., 2011).

A redução da metemoglobina é catalisada pela forma reduzida da NADHb5R. Os elétrons são transferidos do NADH, gerado pela gliceraldeído 3-fosfato na via glicolítica para a enzima NADHb5R, e então, para o citocromo b5 (NAOUM et al., 2004).

A hemoglobina é sensível aos danos causados pelas ERONs, o qual é agravado na deficiência de G6PD, uma vez que esta enzima participa das reações de redução pela doação de NADPH a glutatona redutase dos grupos cisteinil, previamente oxidados no transporte do oxigênio. Portanto, quando estes pacientes são tratados com fármacos oxidantes, como a primaquina, há

aumento da metemoglobina e da hemólise (CARMONA-FONSECA et al., 2009).

### 3 – JUSTIFICATIVA:

Ao se considerar o número elevado de casos de malária por *P. vivax* no estado do Pará, a repercussão socioeconômica e a possibilidade de agravamento de alguns casos, inclusive com registro de óbitos, torna-se necessário a compreensão de mecanismos fisiopatológicos adicionais, como o estresse oxidativo, resultante do aumento da geração de ERONs proveniente da resposta inflamatória, da oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  após degradação da hemoglobina e a isquemia e reperfusão na fase aguda da malária, os quais permitirão melhorar o prognóstico e propor novos alvos terapêuticos.

Justifica-se, portanto, a realização deste projeto, tanto pelo número reduzido de estudos nos casos de malária vivax não grave, quanto para caracterização do envolvimento das vias redox, da resposta do hospedeiro humano e a possível influência do tratamento sobre os biomarcadores de estresse oxidativo nos pacientes com malária vivax não complicada, a fim de testar as seguintes hipóteses: a) os biomarcadores de estresse oxidativo não são alterados no decorso da fase aguda da malária vivax não complicada; b) a introdução do tratamento não contribui para o estresse oxidativo nestes pacientes. Espera-se que os biomarcadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo se comportem de maneira semelhante no grupo controle e nos pacientes com malária vivax e independente da introdução dos fármacos antimaláricos.

#### 4 - OBJETIVO:

##### 4.1 - GERAL:

Avaliar marcadores de estresse oxidativo na malária por *P. vivax* e correlacioná-los com o período de tratamento, através do emprego de Primaquina e Cloroquina.

##### 4.2 - ESPECÍFICOS:

- Quantificar os danos oxidativos através da determinação dos teores de metemoglobina e dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico em sujeitos com malária por *P. vivax* não complicada em distintas fases de tratamento, comparando-os com indivíduos saudáveis;
- Determinar a capacidade antioxidante não enzimática total, a glutatona reduzida, a glutatona total e a atividade da enzima superóxido dismutase em sujeitos com malária por *P. vivax* não complicada em distintas fases de tratamento, comparando-os com indivíduos saudáveis;
- Correlacionar os biomarcadores de estresse oxidativo à intervenção terapêutica.

## **5 - MÉTODOS:**

### **5.1 – CASUÍSTICA:**

#### **5.1.1 – Tipo e população de estudo:**

Trata-se de um estudo quantitativo longitudinal de casos constituídos por 38 sujeitos adultos com malária por *P. vivax* (gênero masculino e feminino), dos quais foram coletadas amostras de sangue total antes e após a instituição da terapia. Foi constituído grupo controle composto por 15 voluntários saudáveis selecionados no Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pará, pareados em gênero e idade.

#### **5.1.2 - Local da pesquisa:**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará e no Ambulatório/Laboratório do Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas (PECEM/IEC), obedecendo aos Aspectos Éticos e Legais da Resolução 196/96.

#### **5.1.3 - Critérios de inclusão e exclusão:**

A inclusão dos sujeitos utilizou os seguintes critérios:

- diagnóstico positivo pelo exame da gota espessa para infecção por *P. vivax* e tratados com esquema terapêutico padrão preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010), constituído pela associação cloroquina (150mg/comprimido – 1,5g em três dias de tratamento) e primaquina (15mg/comprimido – 0,21g em sete dias de tratamento),
- adultos entre 15 anos a 50 anos de idade, ambos os gêneros.

Foram excluídos sujeitos e voluntários que apresentaram síndrome febril não oriunda da infecção malárica, aqueles que fizeram uso de antimaláricos ou antibióticos em período de uma semana anterior a coleta do material biológico, bem como os que apresentaram quadro de malária grave (intensa anemia e febre elevada e constante), agravamento do quadro no decorrer do tratamento ou com malária mista, grávidas ou suspeita de gravidez, apresentavam comorbidades e os que se recusaram a assinar o termo consentimento livre e esclarecido e/ou não responderam ao questionário.

Os sujeitos com malária vivax e os voluntários do grupo controle foram consultados a respeito da realização dos referidos exames, dando a autorização devida, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1), bem como responderam ao questionário padrão aplicado pelo PECEM (Anexo 1). Este estudo está vinculado ao projeto “Malária por *Plasmodium vivax*: análise da possível influência da composição corporal na resposta terapêutica à primaquina”, o qual foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas, sendo aprovado sob o número 0028/2010 (Anexo 2).

## 5.2 - AMOSTRAS:

Foram coletados de cada sujeito, antes da introdução dos antimaláricos (D0) e após dois (D2) e sete (D7) dias, cerca de 10 mL de sangue, por punção venosa periférica, separados em dois tubos de coleta a vácuo (5mL cada) contendo EDTA como anticoagulante, devidamente identificados. Em um dos tubos, o plasma e os eritrócitos foram separados por centrifugação a 2.000rpm/6min/28-30°C. Em seguida, as amostras foram transportadas a 4°C

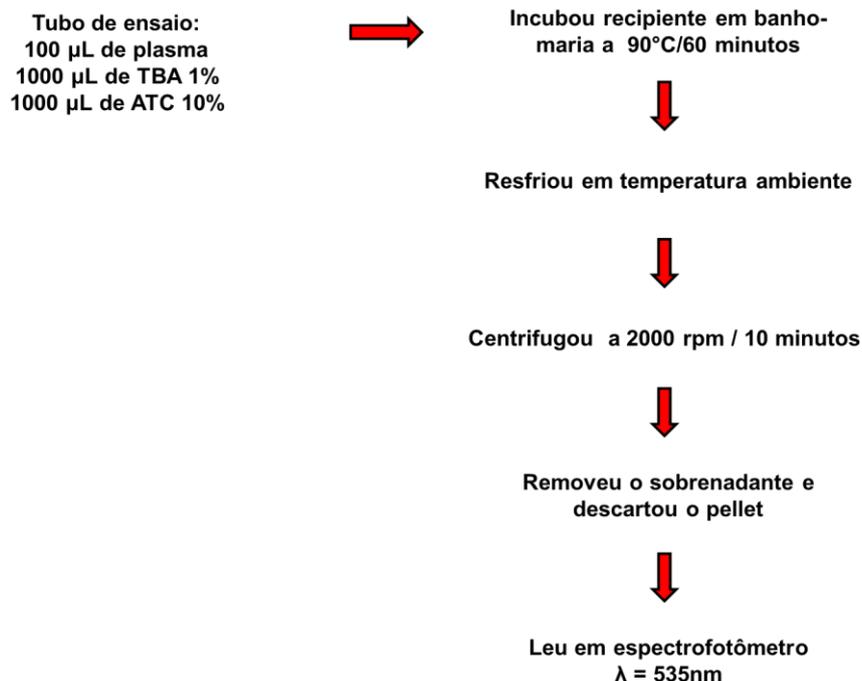
ao Laboratório de Toxicologia (LATOX - UFPA), onde foram analisadas. No grupo controle foi coletada apenas uma amostra de sangue e seguido os mesmos procedimentos dos sujeitos com malária vivax.

No sangue total foi determinado o teor de metemoglobina. O plasma foi separado para determinação da capacidade antioxidante não enzimática total, compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico e glutatona total. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina a 0,89%, centrifugados a 2.000rpm por 5min a 20<sup>o</sup>C para determinação da atividade da glutatona reduzida e superóxido dismutase.

### 5.3 - PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS:

#### 5.3.1 - Determinação da peroxidação lipídica – (TBARS):

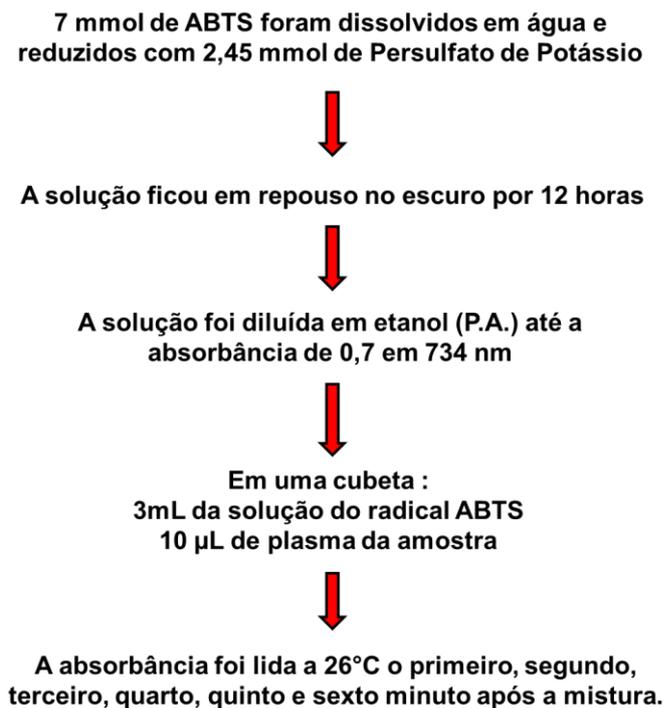
Realizada através da quantificação dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método é considerado de fácil reprodutibilidade e execução para avaliar danos oxidativos (DOTAN et al., 2004; ISAKSSON et al., 2009). De maneira resumida, as lipoproteínas foram precipitadas pela adição do ácido tricloroacético a 10% e a seguir adicionado ácido tiobarbitúrico a 0,67%. A formação do aducto entre o peróxido lipídico e o ácido tiobarbitúrico foi realizada pelo aquecimento em banho de água a 90<sup>o</sup>C por 60 minutos. O cromógeno formado foi lido a 535 nm (Figura 6). A seguir foi elaborada uma curva de calibração contendo diluições sucessivas de solução padrão de tetraetoxipropano (MDA), as quais foram processadas de maneira semelhante às amostras biológicas. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e a peroxidação lipídica foi expressa em nmols de MDA/L de plasma. As amostras foram analisadas em triplicata.



**Figura 6:** Procedimento para determinação do TBARS.

### **5.3.2 – Determinação da capacidade antioxidante não enzimática total (TAC):**

A TAC foi determinada através do método de Miller e colaboradores (1993b), com modificações, fundamentado na redução do ânion radical ABTS, pelos antioxidantes presentes na amostra. Os resultados do decaimento da absorvância foram plotados em uma curva de calibração previamente elaborada com diluições sucessivas de TROLOX, um análogo sintético da vitamina E, submetidas ao mesmo procedimento adotado para as amostras biológicas (Figura 7). A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e os resultados expressos mmol Trolox/L de plasma como capacidade antioxidante total em relação ao TROLOX. As amostras foram analisadas em triplicata.



**Figura 7:** Procedimento para determinação da capacidade antioxidante não enzimática total.

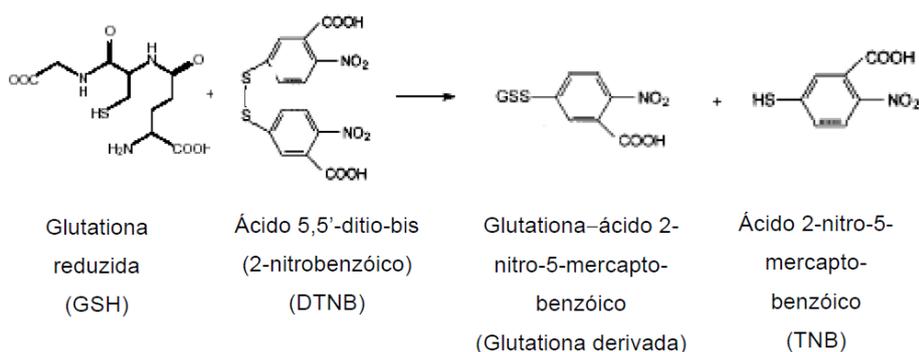
### 5.3.3 – Índice de estresse oxidativo:

O índice de estresse oxidativo é considerado como a razão entre o TBARS e TAC (YEUM et al., 2004; COHEN e MCGRAW, 2009) e reflete a resposta antioxidante do organismo aos seus efeitos deletérios das ERONs, no qual os maiores valores correspondem aos elevados níveis de estresse oxidativo. Entretanto, como a resposta do organismo aos agentes pró-oxidantes, via de regra, não é normotônica, o pré-requisito para determinação deste índice é a existência de correlação significativa entre as duas variáveis (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005; COSTANTINI e VERHULST, 2009).

### 5.3.4 – Determinação dos níveis de glutatona:

#### 5.3.4.1 – Glutatona reduzida (GSH):

A determinação de GSH baseou-se na sua capacidade de reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) a ácido nitrobenzóico (TNB), cujo cromógeno é quantificado por espectrofotometria em 412 nm (Figura 9). Foi elaborada curva de calibração contendo diluições sucessivas de solução padrão de GSH (0 a 5  $\mu\text{mol/mL}$ ). A seguir, foi obtida a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e os teores de GSH foram expressos em  $\mu\text{mol/mL}$  de eritrócito. As amostras foram analisadas em triplicata (ANDERSON, 1969).



**Figura 8:** Reação de derivação da GSH com o DTNB. Fonte: ROVER JUNIOR et al., 2001.

#### 5.3.4.2 – Glutaciona total:

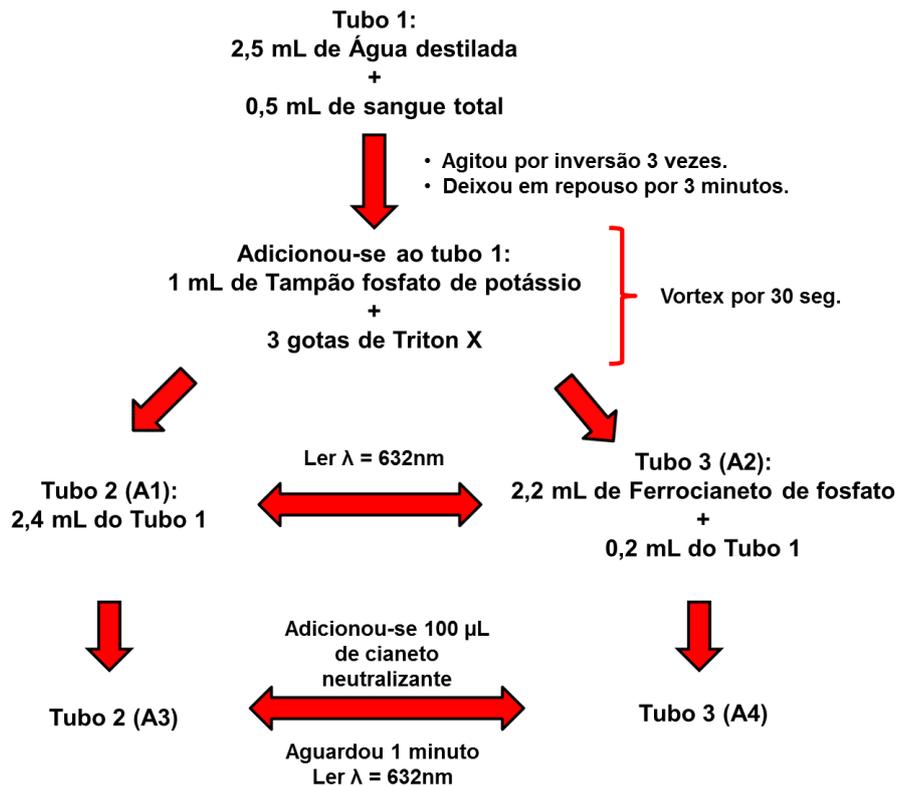
O teor de glutaciona total das amostras de plasma foi determinado usando kit comercial (Glutathione Colorimetric Detection Kit<sup>®</sup>, Arbor Assays<sup>™</sup>), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de GSH.

### **5.3.5 - Atividade da superóxido dismutase intraeritrocitária:**

A atividade enzimática da SOD foi determinada pela não redução do citocromo C, visto que para tal redução, é necessária a presença de  $O_2^-$ , o qual é dismutado a  $H_2O_2 + O_2$  pela SOD. Foram feitos dois controles, um negativo e outro positivo. O negativo contendo tampão, citocromo C e hipoxantina, no qual não houve formação de  $O_2^-$ , não reduzindo o citocromo C. Já o positivo, continha tampão, citocromo C, hipoxantina e xantina oxidase, apresentando redução do citocromo C. A atividade da SOD foi proporcional à inibição da redução do citocromo C, a qual foi avaliada pela medida da absorbância a 550 nm. Uma curva padrão contendo diluições sucessivas, de 50 a 200 U/mL da enzima, seguido de obtenção da equação da reta, através do método dos mínimos quadrados. As amostras foram analisadas em triplicata (MCCORD E FRIDOWICH, 1969).

### **5.3.6 - Determinação dos teores de metemoglobina:**

Foi utilizada a metodologia proposta por Hegesh e colaboradores (1970), fundamentada na leitura da absorvância diferencial a 632 nm, em que os resultados foram expressos em % de metemoglobina sobre a porcentagem total de hemoglobina presente na amostra. As amostras foram analisadas em triplicata (Figura 9).



**Figura 9:** Procedimento para determinação de metemoglobina.

Para o cálculo do percentual de metemoglobina nas amostras empregou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{MetHb} = \frac{(A1 - A3) \times 100}{12 \times (A2 - A4)}$$

Onde: 12 = Fator de Diluição

A1 – A3 = Porcentagem de metemoglobina na amostra;

A2 – A4 = 100% de metemoglobina

#### 5.4 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS:

Os resultados obtidos durante os experimentos foram armazenados em planilhas eletrônicas utilizando os programas *EXCEL*® e *INSTAT*® e analisados usando os software BioEstat 5.0, estabelecendo em 0,05 (5%) o nível alfa para rejeição da hipótese de nulidade. A normalidade das variáveis foi

avaliada pelo Kolmogorov-Smirnov. As hipóteses foram testadas pelos testes: qui quadrado, t de student, ANOVA e quando significativo foi empregado o teste a posteriori de Student-Newman-Keuls. A correlação entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a capacidade antioxidante não enzimática total foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

## 6 – RESULTADOS:

### 6.1 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS SUJEITOS QUE PARTICIPARAM DO ESTUDO.

Tabela 1 – Dados epidemiológicos dos sujeitos selecionados para o estudo.

Variável	Dados
<b>Número de Amostras (n)</b>	38
<b>Parasitemia no D0 mm<sup>3</sup> sangue (Xg)</b>	3755, 11 (±3.49)
<b>Tempo de Clareamento da Parasitemia</b>	48 hr
<b>Idade (anos)</b>	35, 0513 (±10,8869)
<b>Gênero masculino (%)</b>	71,05% (27)*
<b>Gênero Femenino</b>	28,95 (11)
<b>Primoinfectados (%)</b>	50% (19)
<b>Episódios anteriores de malária (%)</b>	50% (19)
<b>Recaídas (%)</b>	23,69% (9)**

Teste do qui-quadrado (\*X=16,81; p<0,0001 \*\*X=27,04; p<0,0001)

Nenhum dos pacientes desenvolveu quadro clínico grave durante o período do estudo.

## 6.2 – TEORES DE METEMOGLOBINA NOS DIFERENTES DIAS DE ESTUDO

Tabela 2 - Valores médios de percentagem de metemoglobina entre os pacientes com malária vivax e grupo controle durante o período de estudo (D0, D2 e D7).

Dias de tratamento	n	MetHb (% Hb/mg amostra) $\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo	Máximo
<b>D0</b>	34	1,2 $\pm$ 1.5	0,35	8,08
<b>D2</b>	34	2,1 $\pm$ 2.2	0,61	8,84
<b>D7</b>	34	5,2 $\pm$ 2.7	0,64	12,78
<b>Grupo controle</b>	15	1,02 $\pm$ 0.40	0,53	1,51

n= número de pacientes

A análise da variância dos teores de metemoglobina nos diferentes dias de estudo indicou diferença estatística significativa ( $F= 38,92$ ;  $p<0,001$ ). O emprego de teste a posteriori “Student-Newman-Keuls” indicou diferença significativa entre D0 e D2 ( $p<0,001$ ), D0 e D7 ( $p<0,001$ ) e D2 e D7 ( $p<0,001$ ). Por outro lado, o emprego do teste t de student não indicou diferença significativa entre o grupo controle e D0. Entretanto, um paciente foi excluído do estudo por apresentar teores de metemoglobina no D7 (11,26%) superior a média de todos os pacientes (5,2 $\pm$ 2.7).

### 6.3 – BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO:

#### 6.3.1 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

Tabela 3 - Comportamento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em pacientes com malária vivax e grupo controle durante o período de estudo (D0, D2 e D7).

Dias de tratamento	n	TBARS		
		nmol MDA/L de plasma $\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo	Máximo
<b>D0</b>	35	2,2±1,1	0,63	4,81
<b>D2</b>	35	1,8±1,14	0,55	4,25
<b>D7</b>	35	1,9±1,2	0,39	4,35
<b>Grupo controle</b>	15	0,8±1,3	0,23	1,12

n= número de pacientes

A análise de variância dos teores de TBARS nos diferentes dias de estudo não indicou diferença estatística significativa ( $F= 1,096$ ;  $p=0,34$ ). O emprego do teste t de student indicou diferença estatística significativa entre o D0 e o grupo controle ( $t=0,795$ ;  $p<0,001$ ).

### 6.3.2 – Capacidade antioxidante não enzimática total:

Tabela 4 – Teores da capacidade antioxidante não enzimática total do plasma nos pacientes com malária vivax e grupo controle durante o período de estudo (D0, D2 e D7).

Dias de tratamento	n	TEAC		
		(mmol/L de plasma)* $\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo	Máximo
<b>D0</b>	34	0,62±0,2	0,10	1,08
<b>D2</b>	34	0,677±0,2	0,32	1,21
<b>D7</b>	34	0,608±0,03	0,20	1,05
<b>Grupo controle</b>	15	0,792±0,21	0,41	1,02

n= número de pacientes

\*Resultados expressos como capacidade equivalente ao TROLOX em nmol/L.

A análise de variância dos teores de TEAC nos diferentes dias de estudo não demonstrou diferença estatística significativa ( $F= 2,140$ ;  $p=0,126$ ), bem como o emprego do teste t de student não indicou diferença significativa entre D0 e o grupo controle.

### 6.3.3 – Índice de estresse oxidativo:

Não foi possível estabelecer a relação entre os valores de TBARS e TEAC, pois não houve correlação estatística significativa entre estas variáveis nos diferentes dias de estudo (D0  $r=-0,916$ ;  $p=0,268$  / D2  $r= -0,306$ ;  $p=0,078$  / D7  $r=-0,04$ ,  $p=0,822$ ).

## 6.4 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH):

Tabela 5 - Teores médios de glutatona reduzida dos sujeitos com malária vivax e grupo controle durante o período de estudo (D0, D2 e D7).

Dias de Tratamento	n	GSH	
		( $\mu\text{mol/mL}$ de eritrócito)	Mínimo
		$\bar{X} \pm \sigma$	
<b>GSH D0</b>	31	2,03 $\pm$ 1,4	0,211
<b>GSH D2</b>	31	1,88 $\pm$ 1,6	0,06
<b>GSH D7</b>	31	1,21 $\pm$ 0,9	0,06
<b>Grupo Controle</b>	15	3,42 $\pm$ 1,36	1,33

n= número de determinações

A análise da variância dos teores de GSH nos diversos dias de experimento apresentou diferença estatística significativa ( $F=5,335$ ;  $p=0,007$ ). O emprego de teste a posteriori “Student – Newman-keuls” indicou diferença entre D0 e D7 ( $p= 0,025$ ) e D2 e D7 ( $p=0,006$ ). O emprego do teste t de student indicou diferença significativa entre D0 e o grupo controle ( $t=3,047$ ;  $p=0,004$ ).

Tabela 6 - Valores médios plasmáticos de glutathiona total dos sujeitos com malária vivax e grupo controle durante o período de estudo (D0, D2 e D7).

<b>Dias de tratamento</b>	<b>n</b>	<b>GSH Total (<math>\mu\text{M}</math> de GSH) <math>\bar{X} \pm \sigma</math></b>
<b>D0</b>	20	8,3 $\pm$ 3,3
<b>D2</b>	20	7,9 $\pm$ 2,7
<b>D7</b>	20	6,7 $\pm$ 2

n= número de determinações

A análise de variância não indicou diferença estatística significativa nos teores de glutathiona total nas amostras de plasma nos diferentes dias de estudo (F=2,273;  $p=0,118$ ).

## 6.5 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE INTRAERITROCITÁRIA:

Tabela 7 - Atividade média da enzima superóxido dismutase dos sujeitos com malária vivax e grupo controle durante o período de estudo (D0, D2 e D7).

Dias de tratamento	n	SOD (U/mL de eritrócito)		
		$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo	Máximo
<b>SOD D0</b>	31	134±50	27	178
<b>SOD D2</b>	31	138±55	11	176
<b>SOD D7</b>	31	150±41	43	187
<b>Grupo controle</b>	15	99±63	28	187

n= número de determinações

A análise da variância dos teores de superóxido dismutase nos diversos dias de experimento apresentou diferença estatística significativa ( $F=3,507$ ;  $p=0,036$ ). O emprego de teste a posteriori “Student – Newman-keuls” indicou diferença entre D0 e D7 ( $p=0,038$ ) e D2 e D7 ( $p=0,05$ ). O emprego do teste t de student não indicou diferença significativa entre D0 e o grupo controle ( $t=1,927$ ;  $p=0,061$ ).

## 7 – DISCUSSÃO:

Este estudo propôs determinar biomarcadores de estresse oxidativo no transcorrer da fase aguda da doença, associando-os a instituição do tratamento. Para tal, foram incluídos 38 sujeitos (27 homens e 11 mulheres) provenientes do Programa de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas, com diagnóstico positivo, pelo exame da gota espessa, para malária por *P. vivax*, nos quais foram avaliados os seguintes parâmetros: metemoglobinemia, compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico, capacidade antioxidante não enzimática total, glutatona reduzida, atividade da superóxido dismutase intraeritrocitária e níveis plasmáticos de glutatona total. Objetivando confirmar o envolvimento das ERONs na malária vivax não complicada, constituiu-se grupo controle de voluntários saudáveis, pareados pelo gênero e idade, nos quais foram determinados os parâmetros acima descritos, e posteriormente comparados aqueles dos sujeitos com malária vivax não complicada antes da introdução dos antimaláricos, a exceção da enzima superóxido dismutase e da glutatona total.

A região de estudo está localizada na Amazônia brasileira, que possui coleções de águas limpas, quente, sombreadas e de baixo fluxo, atributo preferencial para proliferação do vetor da doença (BRASIL, 2010), bem como, as diferentes formas de ocupação do solo e modalidades de exploração econômica dos recursos naturais no decorrer do tempo (CORDEIRO et al., 2002) justificam o elevado número de casos anuais da doença e sua repercussão social e perdas econômicas, uma vez que o perfil epidemiológico demonstrou maior proporção de casos no gênero masculino e na faixa etária de maior produtividade.

Em relação à ocorrência de episódios anteriores de malária, até o ano do corrente estudo, a proporção foi igual tanto para primeira infecção quanto para os relatos de episódios anteriores. Embora a cura clínica e parasitológica tenha sido significativa, o número de sujeitos que recaíram foi elevado, fato considerado preocupante, uma vez que os mesmos não retornaram a área endêmica no período compreendido entre o diagnóstico e o reaparecimento da parasitemia, bem como, foram acompanhados diariamente a fim de aumentar a adesão ao tratamento. Duarte e colaboradores (2001), em estudo realizado no Mato Grosso, relataram recaída de sete (14%) dos 50 pacientes, mesmo com supervisão da terapia.

A geração de ERONs na fase aguda da infecção parece ser um fator associado à ocorrência de anemia, uma vez que estes compostos modificam a membrana eritrocitária, aumentando sua rigidez, como resultado do aumento da peroxidação dos lipídios e da liberação de citocinas, bem como da ação direta dos subprodutos gerados pelo parasita. Como consequência, os eritrócitos são reconhecidos pelo sistema retículo endotelial como senescentes, sendo removidos da circulação; soma-se a hemólise daqueles infectados, resultante da liberação dos esquizontes ao término do ciclo eritrocítico do parasita (LAMIKANRA et al., 2007). Ressalta-se que a rigidez da membrana eritrocitária se associa a obstrução dos microvasos e consequente injúria tecidual (BECKER et al., 2004).

A degradação da hemoglobina e consequente liberação do  $\text{Fe}^{+2}$  é capaz de acelerar a peroxidação lipídica, pelo aumento da geração de ERONs, como o ânion radical  $\text{OH}^{\cdot}$  via reação de Fenton (BOWMAN et al., 2005). Além disso, o

estresse oxidativo leva à ativação dos canais de cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nos eritrócitos não infectados (KOKA et al., 2008; GANESAN et al., 2012).

Sabe-se que a cloroquina ao ligar-se a ferro III protoporfirina IX, a qual está livre após a degradação da hemoglobina, forma aductos de CQ-Fe [III] PPIX, que podem acarretar a formação de ERONs, levando a peroxidação dos lipídios da membrana do parasita e sua consequente destruição (MONTIA et al., 2002). Já a primaquina pode causar danos oxidativos aos eritrócitos aumentando os teores de metemoglobina e o risco de anemia hemolítica, os quais têm sido associados, principalmente, aos seus metabólitos redox-ativos, como a 5-HPQ (BOWMAN et al., 2005). Vasquez-Vivar e Augusto (1992) demonstraram que a 5-HPQ favorece a geração das ERONs, sugerindo que este metabólito contribua para hemotoxicidade da droga. Ressalte-se que o ferro oxidado pode participar da reação de Haber-Weiss, contribuindo também para formação das ERONs.

Neste estudo, os teores de metemoglobina dos sujeitos com malária por *P. vivax* antes da introdução do tratamento foram semelhantes ao grupo controle, indicando que a elevação da metemoglobina não se associa a presença do parasita nos eritrócitos. Entretanto, quando se introduziu a cloroquina e a primaquina nas doses recomendadas pelo Ministério da Saúde, ocorreu aumento significativo dos níveis de metemoglobina no D2, quando comparado a D0, o qual persistiu no decorrer do tratamento, de maneira que os teores de metemoglobinemia foram significativamente superiores em D7. Ressalte-se que não foram observadas manifestações clínicas de metemoglobinemia, como cianose ou insuficiência respiratória.

Carmona-Fonseca e colaboradores (2009) demonstraram aumento dos níveis de metemoglobina após a introdução da Primaquina, os quais foram inferiores a 20% na maioria dos sujeitos nas primeiras 24 horas. Também não foram notadas manifestações clínicas de cianose, a qual é geralmente observada em níveis superiores a 20% (HALL et al., 1986; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ e DEL POZO-HESSING, 2005). Baird e Hoffman (2004) relataram elevação dos níveis de metemoglobina de 5% a 12% após administração de doses terapêuticas de primaquina. Já Santana e colaboradores (2007), relataram manifestações clínicas em pacientes que apresentaram níveis de metemoglobina superiores a 10%.

Ressalta-se que apesar da possibilidade do mecanismo de ação da cloroquina envolver a geração de ERONs, os estudos experimentais e em humanos não indicaram a ocorrência de metemoglobina significativa após administração de doses terapêuticas deste fármaco (MONTIA et al., 2002; SOLOMON et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2010).

A peroxidação dos lipídios na fase aguda da doença aumenta a concentração de malondialdeído, conforme demonstrado em ratos MDR infectados pelo *P. yoelii*, que aliada à elevação da atividade da xantina oxidase em tecido hepático, sugere a ocorrência de estresse oxidativo hepático no decorrer da infecção (GUHA et al., 2006). Neste estudo, a peroxidação lipídica foi avaliada através dos níveis de TBARS no plasma dos sujeitos infectados por *P. vivax*, cujos valores foram significativamente elevados, quando comparados ao grupo controle, antes da introdução dos antimaláricos (D0), corroborando Pabón e colaboradores (2003), os quais notaram diferença significativa nos teores de MDA entre sujeitos com malária não-complicada e grupo controle.

Sohail e colaboradores (2007) relataram aumento significativo da peroxidação lipídica em sujeitos infectados por *P. vivax*. Além disso, Narsaria e colaboradores (2011) descreveram aumento dos níveis de MDA em crianças com malária severa quando comparadas ao grupo controle, e Nwagha e colaboradores (2011) observaram aumento dos níveis de MDA em grávidas do sudeste da Nigéria com malária assintomática.

Os teores de TBARS foram semelhantes antes e no decorrer do tratamento, inclusive houve diminuição não significativa dos níveis deste biomarcador, sugerindo que apesar do possível mecanismo de ação dos antimaláricos envolver a geração de ERONs, os danos a membrana eritrocitária se associaram a presença de parasitas, reduzindo com o clareamento da parasitemia. Pode-se inferir também que os possíveis danos oxidativos foram evitados pelos antioxidantes. A análise conjunta do aumento da metemoglobina no decorrer do tratamento, não acompanhada da peroxidação lipídica, remete a ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do hospedeiro e, provavelmente, do parasita, objetivando contrapor a ação deletéria das ERONs.

Neste sentido, avaliou-se a capacidade antioxidante não enzimática total através do ensaio do ânion radical ABTS, a qual foi semelhante entre o grupo controle e sujeitos com malária vivax antes da introdução do tratamento, assim permanecendo no decorrer do tratamento. Dados similares foram relatados por Pabón e colaboradores (2003), os quais não observaram diferença significativa nesta variável entre sujeitos infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* e o grupo controle. Entretanto Erel e colaboradores (1997) observaram diminuição

significativa ( $p>0.05$ ) da capacidade antioxidante não enzimática total em sujeitos com malária vivax, quando comparados ao grupo controle.

Tal achado justifica a ausência de correlação significativa entre os níveis de TBARS e a capacidade antioxidante não enzimática total nos sujeitos deste estudo, o que impossibilitou a determinação do índice de estresse oxidativo, corroborando estudos que demonstraram ausência de correlação entre os teores de antioxidantes endógenos e exógenos com os biomarcadores de dano oxidativo em algumas doenças (LI et al., 2010; POLIDORI et al., 2009), especialmente nos estudos conduzidos em humanos, o que pode resultar da dificuldade de controle das diversas variáveis ambientais e genéticas no decurso da doença, como sua gravidade. Neste sentido, alguns achados em animais de experimentação não se reproduzem em humanos, uma vez que naqueles são realizados controle rigoroso destas variáveis, desde a seleção dos animais em estudo até a inoculação das cepas (NIKI, 2010).

A seguir foram determinados os teores de GSH, cujo metabolismo nos eritrócitos infectados pelo *Plasmodium* é objeto de vários estudos, os quais demonstraram sua importância na defesa eritrocitária do hospedeiro e do *Plasmodium* (HARWALDT et al., 2002; BECKER et al., 2004). Também foi sugerido que a GSH estaria envolvida na resistência aos antimaláricos, como cofator de várias reações enzimáticas e na redução da Fe [III] PPIX, subproduto tóxico da degradação da hemoglobina (MÜLLER, 2004). Os níveis de GSH reduziram de forma significativa no decorrer do tratamento ( $p=0.007$ ), bem como foram significativamente inferiores quando comparados ao grupo controle, demonstrando, desta forma, o consumo da GSH com o decorrer da infecção malárica, provavelmente resultante do aumento da geração de

ERONs, corroborando achados de Erel e colaboradores (1997), os quais correlacionaram o aumento significativo da peroxidação lipídica à redução dos níveis de GSH nos pacientes infectados pelo *P. vivax* e *P. falciparum*. Vega-Rodríguez e colaboradores (2009) também relataram a redução dos níveis de GSH nos eritrócitos de ratos infectados pelo *P. berghei*. Resultados similares foram obtidos por Akanbi e colaboradores (2010), que observaram redução significativa dos níveis de GSH em pacientes grávidas, as quais estavam infectadas e fizeram uso de antimaláricos, comparando com não grávidas na Nigéria.

Os teores eritrocitários de GSH no decorrer do tratamento indicaram o aumento do consumo deste composto, a fim de contrapor as ações deletérias das EROs, o que pode justificar a semelhança entre os níveis de TBARS durante o tratamento. Por outro lado, os teores de glutatona total no plasma reduziram no decorrer do tratamento, contudo a ausência de significância estatística sugere que os níveis eritrocitários de GSH retrataram de forma fidedigna as defesas antioxidantes do hospedeiro. Sabe-se que a GSH desempenha funções importantes nos eritrócitos infectados por *P. falciparum*, tais como: proteção contra os danos oxidativos, modulação das alterações na membrana dos eritrócitos infectados, no catabolismo do heme e no crescimento do parasita. Nas condições pró-oxidantes, os níveis de GSH podem estar reduzidos pela invasão do eritrócito pelo parasita e pelos diversos mecanismos envolvidos na geração de EROs na fase aguda da infecção (SOHAIL et al., 2007).

O consumo eritrocitário de GSH em D0 e D2 justifica-se pela presença de parasitas. Entretanto, o resultado do tempo de clareamento da parasitemia

de todos os sujeitos observados em D7 permite inferir que a redução significativa dos teores de GSH, quando comparada a D0 e D2, pode estar associada a formação de ERONs oriundas dos produtos de biotransformação dos antimaláricos, especialmente a 5-HP, corroborando, desta forma, o aumento da metemoglobinemia no decorrer do tratamento. Outros fatores, como os produtos finais de degradação do parasita e consequente resposta inflamatória e o fato dos teores iniciais de GSH considerarem também aquela proveniente do sistema de defesa antioxidante do parasita, devem ser considerados na avaliação do consumo deste composto na malária.

Objetivando esclarecimentos adicionais acerca das defesas antioxidantes do hospedeiro e do parasita foi determinada a atividade da SOD, uma vez que no decorrer da infecção os radicais superóxidos são importantes fontes de ERONs altamente reativas e tóxicas, bem como, algumas espécies de *Plasmodium* possuem genes que codificam esta enzima, que auxilia na redução do estado pró-oxidante intraeritrocitário (SCHWARTZ et al., 1999; ANDRADE et al., 2010), por exemplo, o *P. falciparum* possui dois genes distintos que codificam diferentes formas de SOD (MÜLLER, 2004). Neste estudo, foi observado aumento significativo da atividade da SOD no decorrer do tratamento, o que pode ser devido à elevação da geração do ânion radical superóxido. Com o clareamento da parasitemia em D7, pode-se inferir que foi determinada apenas a atividade da enzima do hospedeiro e que a geração deste radical se deveu, provavelmente, aos produtos de biotransformação e ao mecanismo de ação dos antimaláricos, pois ao impedir a polimerização do heme, permitiu a participação do ferro nas reações para a formação das ERONs. Este achado corrobora o aumento da metemoglobinemia, do consumo

de GSH no curso do tratamento e a semelhança na atividade da enzima quando comparados os sujeitos com malária vivax e o grupo controle.

A atividade da SOD está aumentada nos sujeitos com malária (PÁBON et al, 2003; MÜLLER, 2004; ANDRADE et al., 2010), fato que pode ser prejudicial à manutenção do equilíbrio redox, uma vez que não é acompanhado de maneira proporcional ao aumento da atividade da catalase, em que esta não dismutará o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio e, conseqüentemente, elevando a geração de ânion radical hidroxila, pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio, ocasionando a morte do parasita. Amstad e colaboradores (1991) observaram que o aumento da atividade da SOD nas células da epiderme de camundongos acarretou um estado pró-oxidante crônico, agravado pelo não aumento da atividade da catalase. Meshnick e colaboradores (1990) notaram que a adição de cobre, que atuaria como cofator da SOD, potencializa a ação antimalárica do dietilditiocarbamato.

Os dados deste estudo permitem rejeitar a hipótese da nulidade, referente à participação das ERONS na fisiopatogenia da malária vivax não complicada, uma vez que a peroxidação lipídica, avaliada através dos TBARS, foi significativamente superior nos sujeitos com malária vivax quando comparados ao grupo controle, provavelmente pela diminuição da GSH, observados nestes indivíduos. A metemoglobinemia foi significativamente superior nos sujeitos com malária (D2 e D7). Nestes, os mecanismos compensatórios frente ao meio pró-oxidante foram representados pelo consumo aumentado de GSH e aumento da atividade da SOD, o que não permite aceitar a hipótese da nulidade para contribuição dos antimaláricos para geração de ERONS.

## 8 – CONCLUSÕES:

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- 1) Os teores de metemoglobina de sujeitos com malária por *P. vivax* antes da introdução dos antimaláricos foram semelhantes ao grupo controle, entretanto foram significativamente superiores após o início do tratamento, indicando que a elevação da metemoglobina se associa a instituição do tratamento;
- 2) Os teores de TBARS nos sujeitos com malária vivax antes da introdução do tratamento foram significativamente superiores ao grupo controle, indicando a ocorrência de danos oxidativos relacionados à presença dos parasitas nos eritrócitos. Contudo, foram semelhantes no decorrer do tratamento, sugerindo que o tratamento não acarretou o aumento do dano oxidativo à membrana celular ou que estes foram contrapostos pelos antioxidantes;
- 3) A capacidade antioxidante não enzimática total foi semelhante entre o grupo controle e sujeitos com malária antes e no decorrer do tratamento;
- 4) Os níveis de GSH nos sujeitos com malária vivax antes da introdução dos antimaláricos foram significativamente inferiores ao grupo controle, indicando o consumo deste composto para contrapor os efeitos deletérios das ERONs geradas no ciclo eritrocitário do parasita. Também houve redução significativa no decorrer do tratamento, o que pode estar associado à participação dos antimaláricos ou seus produtos de biotransformação nas reações de formação de ERONs;
- 5) A ausência de redução significativa dos teores plasmáticos de glutathiona total entre pacientes com malária vivax e o grupo controle, bem como

nos diversos dias de tratamento, recomenda a utilização da GSH eritrocitária como biomarcador apropriado da atividade antioxidante eritrocitária na malária vivax não complicada;

- 6) A atividade da SOD foi semelhante nos sujeitos com malária vivax antes da introdução do tratamento em comparação com o grupo controle. Entretanto, o aumento significativo no decorrer do tratamento, especialmente após o clareamento da parasitemia, se deveu, provavelmente, aos produtos de biotransformação e ao mecanismo de ação dos antimaláricos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ADHIKARI, M. R. Severe and complicated malaria. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 56, n. 9, p. 445 – 448, 2002.

AKANBI, O. M.; ODAIBO, A. B.; ADEMOWO, O. G. Effect of antimalarial drugs and malaria infection on oxidative stress in pregnant women. **African Journal of Reproductive Health**, v. 14, n. 3, p. 209-212, 2010.

ALVES, A. A.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. **Analytical Biochemistry**, v. 323, n.1, p. 33 – 38, 2003.

AMSTAD, P.; PESKIN, A.; SHAH, G.; MIRAULT, M. E.; MORET, R.; ZBINDEN, I.; CERUTTI, P. The balance between Cu, Zn-SOD and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. **Biochemistry**, v. 30, p. 9305–9313, 1991.

ANDERSON, M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological sample. **Methods Enzimology**, v. 113, p. 548 – 555, 1969.

ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M.; RAFFAELE-NETTO, I.; CAMARGO, L. M. A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, e650, p. 1-8, 2010.

ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G. D.; LINDEN, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 279 - 287, 2008.

BAIRD, J. K.; HOFFMAN, S. L. Primaquine therapy for malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.1336–1345, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BECKER, K.; TILLEY, L.; VENNERSTROM, J. L.; ROBERTS, D.; ROGERSONE, S.; GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 163 – 189, 2004.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12 n. 2, p. 123-130, 1999.

BOWMAN, Z. S.; MORROW, J. D.; JOLLOW, D. J.; MCMILLAN, D. C. Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 2, p. 838-845, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**– Brasília: MS. Caderno 10, 2009, p. 31 – 54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**– Brasília: MS. 1ª Ed., 2010, p. 7 – 19.

BUETTNER, G. R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 341–346, 2011.

CARMONA-FONSECA, J.; ÁLVAREZ, G.; MAESTRE, A. Methemoglobinemia and adverse events in *Plasmodium vivax* malaria patients associated with high doses of primaquine treatment. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n.2, p. 188–193, 2009.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Life Cycle**, 2008. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/malaria/biology/life\\_cycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm)>. Acesso em: 24 de Outubro de 2009.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 749– 762, 2010.

COHEN, A. A.; MCGRAW, K. J. No simple measures for antioxidant status in birds? Complexity in inter- and intraspecific correlations among circulating antioxidant types. **Functional Ecology**, v. 23, p. 310-320, 2009.

CORDEIRO, C. E. S.; FILOMENO, C. R. M.; COSTA, C. M. A. da.; COUTO, A. A. R. A. Perfil epidemiológico da malária no estado do Pará em 1999 com base numa série histórica de dez anos (1989-1999). **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 11, n. 2, 69 – 77, 2002.

CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, 2006.

COSTANTINI, D.; VERHULST, S. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? **Functional Ecology**, v. 23, p. 506-509, 2009.

CUNICO, W.; CARVALHO, S. A.; GOMES, C. R. B.; MARQUES, G. H. Fármacos antimalariais - história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 1, p.49 – 55, 2008.

DAILY, J. P. Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. **Journal Clin Pharmacology**, v. 46, p. 1487-1497, 2006.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.15, p.316-328, 2005.

DEY, S.; GUHA, M.; ALAM, A. GOYAL, M.; BINDU, S.; PAL, C.; MAITY, P.; MITRA, K.; BANDYOPADHYAY, U. Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 2, p. 271 – 281, 2009.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 200-227, 2004.

DUARTE, E. C.; PANG, L. W.; RIBEIRO, L. C.; FONTES, C. J. Association of sub-therapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in pre-venting relapses of vivax malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 471–476, 2001.

EREL, O.; KOCYIGIT, A.; AVCI, S.; AKTEPE, N.; BULU, V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 631– 639, 1997.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydiclipid peroxidation products: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 407-13, 1990.

FAMIN, O.; KRUGLIAK, M.; GINSBURG, H. Kinetics of inhibition of glutathionemediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 59–68, 1999.

FERREIRA, M.; GOMES, M. S. M.; VIEIRA, J. L. F. Methemoglobinemia in patients with *Plasmodium vivax* receiving oral therapy with primaquine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.1, p. 113-115, 2011.

FÖLLER, M.; BOBBALA, D.; KOKA, S.; HUBER, S. M.; GULBINS, E.; LANG, F. Suicide for survival - death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 24, p. 133-140, 2009.

FRASSON, A. P.; BARLETTE, A. G.; DALPIZOLO, C.; SAUTER, I. P.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 201 – 208, 2009.

FREITAS, L. F.; CHAVES, G. C.; WANNMACHER, L.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. Falciparum* no Brasil: evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos recomendados pelo protocolo terapêutico oficial. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 10, p. 2285 – 2294, 2007.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: Who cares? **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 1 – 8, 2008.

GANESAN, S.; CHAURASIYA, N. D.; SAHU, R.; WALKER, L. A.; TEKWANI, L. B. Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: Evaluation of eryptotic pathway. **Toxicology**, v. 294, p. 54–60, 2012.

GATIDIS, S.; MICHAEL FÖLLER, M.; FLORIAN, L. Hemin-induced suicidal erythrocyte death. **Annals of Hematology**, v. 88, p. 721–726, 2009.

GERMANO, N.; MENDONÇA, P. R.; MURINELLO, A. Adequação dos fármacos antimaláricos na quimioprofilaxia e tratamento da malária em países não endêmicos. **Medicina Interna**, v. 12, n. 3, p. 165 – 170, 2005.

GREENWOOD, B. M. Control to elimination: implications for malaria research. **Cell Press**, v. 24, n. 10, p. 449 – 454, 2008.

GUHA, M.; KUMAR, S.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; BANDYOPADHYAY, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, p. 1224 – 1226, 2006.

HALL, A. H.; KULIG, K. W.; RUMACK, B. H. Drug- and chemical-induced methaemoglobinaemia clinical features and management. **Journal of Medical Toxicology**, v. 1, p. 253–260, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HARWALDT, P.; RAHLFS, S.; BECKER, K. Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 383, p. 821 – 830, 2002.

HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; KABARIA, C. W.; MBITHI, P. M.; TAGO, C. C.; DBENZ, D.; GETHING, P. W.; HOWES, R. E.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; BANGS, M. J.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; ELYAZAR, I. R. F.; HARBACH, R. E.; HEMINGWAY, J.; MANGUIN, S.; MBOGO, C. M.; RUBIO-PALIS, Y.; GODFRAY, H. C. J. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 327–36, 2004.

HEGESH, E.; GRUENER, R. N.; COHEN S.; BOCHKOVSKF, R.; SHUVAL, H. I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 30, p. 679-682, 1970.

HENSLEY, K.; BENAKASS, E. J.; BOLLI, R.; COMP, P.; GRAMMAS, P.; HAMDHEYDARI, L.; MOU, S.; PYE, Q. N.; STODDARD, M. F.; WALLIS, G.; WILLIAMSON, K. S.; WEST, M.; WECHTER, W. J.; FLOYD, R. A. New perspectives on vitamin E:  $\gamma$ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman

metabolites in biology and medicine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 1–15, 2004.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n. 5, p. 1170 – 1179, 2008.

ISAKSSON, C.; STURVE, J.; ALMROTH, B. C.; ANDERSSON, S. The impact of urban environment on oxidative damage (TBARS) and antioxidant systems in lungs and liver of great tits, *Parus major*. **Environmental Research**, v. 109, p. 46-50, 2009.

JARAMILLO, M.; GODBOUT, M.; OLIVIER, M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and –independent mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 74, n. 1, p. 475 – 484, 2005.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9 e 10, p. 1865-1879, 2006.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239–267, 2004.

KELLER, C. C.; KREMSNER, P. G.; HITTNER, J. B.; MISUKONIS, M. A.; WEINBERG, J. B.; PERKINS, D. J. Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 8, p. 4868 – 4873, 2004a.

\_\_\_\_\_ ; HITTNER, J. B.; NTI, B. K.; WEINBERG, J. B.; KREMSNER, P. G.; PERKINS, D. J.. Reduced peripheral PGE2 biosynthesis in *Plasmodium falciparum* malaria occurs through hemozoin-induced suppression of blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 gene expression via an interleukin-10–independent mechanism. **Molecular Medicine**, v. 10, n. 1–6, p. 45- 54, 2004b.

KOKA, S.; LANG, C.; BOINI, K. M.; BOBBALA, D.; HUBER, S. M.; LANG, F. Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, p. 261-268, 2008.

KOJO, S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1041–1064, 2004.

KOPITZ, J.; HOLZ, F. G.; KAEMMERER, E.; SCHUTT, F. Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Biochimie**, v. 86, p. 825–831, 2004.

KUMAR, A. Trombocytopenia – an indicator of acute vivax malaria. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 31, p. 77 – 87, 2006.

KUPPUSAMY, U. R.; DHARMANI, M.; KANTHIMATHI, M. S.; INDRAN, M. Antioxidant enzyme activities of human peripheral blood mononuclear cells exposed to trace elements. **Biological Trace Element Research**, v. 106, p. 29–39, 2005.

LADISLAU, B. L. J.; LEAL, C. M.; TAUIL, L. P. Avaliação do plano de intensificação das ações de controle da malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.15, n. 2, p.9 – 20, 2006.

LAMIKANRA, A. A.; BROWN, D.; POTOENIK, A.; CASALS-PASCUAL, C.; LANGHORNE, J.; ROBERTS, D. J. Malarial anemia: of mice and men. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 18 - 28, 2007.

SYED, F L.; QADRI, M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. **Blood Purification**, v. 33, p. 125–130, 2012.

LEE, C. Y.; SEET, R. C.; HUANG, S. H.; LONG, L. H.; HALLIWELL, B. Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of dengue fever, stroke, and Parkinson's disease patients: cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 407–420, 2009.

LEHMANN, C.; WOLLENBERGER, U.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHELLER, F.W. Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme. *Journal Electroanalytical Chemistry*, v. 455, p. 259-263, 1998

LI, L.; CHEN, C. O.; ALDINI, G.; JOHNSON, E. J.; RASMUSSEN, H.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; BLUMBERG, J. B.; RUSSELL, R. M.; YEUM, K. J. Supplementation with lutein or lutein plus green tea extracts does not change oxidative stress in adequately nourished older adults. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v., 21; n.6, p. 544-549, 2010.

LOISEAU, P. M.; LE BRAS, J. New drugs against parasitic diseases. **Revista Praticiens**, v. 57, p.175 – 182, 2007.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1–19, 2008.

MARKLUND, S.A. Simple specific method for the determination of the hemoglobin content of tissue homogenates. **Clinic Chimica Acta**, v. 92, 229–234, 1979.

MCCORD, J. M.; FRIDOWICH, I. Superoxide dismutase: anenzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049 – 6055, 1969.

MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11ª Ed. São Paulo Atheneu, 2005, p. 143 – 159.

MESHNICK, S. R.; SCOTT, M. D.; LUBIN, B.; RANZ, A.; EATON, J. W. Antimalarial activity of diethyldithiocarbamate. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 213–216, 1990.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADESEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 2812-2823, 1993a.

\_\_\_\_\_, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**. v. 84, p. 407–412, 1993b.

MONTIA, D.; BASILICOB, N.; PARAPINIB, S. Does chloroquine really act through oxidative stress? **Federation of European Biochemical Societies**, v. 522, p. 3-5, 2002.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K. ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v.9, p. 555 – 566, 2009.

MÜLLER, S.; GILBERGER, T.W.; KRNAJSKI, Z.; LÜERSEN, K.; MEIERJOHANN, S.; WALTER, R. D. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Protoplasma**, v. 217, p. 43-49, 2001.

\_\_\_\_\_, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1291–1305, 2004.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrofotométrica de metemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n.1, p. 19 – 22, 2004.

NARSARIA, N.; MOHANTY, C.; DAS, B. K.; MISHRA, S. P.; PRASAD, R. Oxidative stress in children with severe malaria. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.1, p. 1-4, 2011.

NASSAR, N. N.; ABDELSALAM, R. N.; ABDEL-RAHMAN, A. A.; ABDALLAH, D. M. Possible involvement of oxidative stress and inflammatory mediators in the protective effects of the early preconditioning window against transient global ischemia in rats. **Neurochem Research**, v. 37, n. 3, p. 614-621, 2011.

NIETO F.J.; IRIBARREN, C.; GROSS, M. D.; COMSTOCK, G. W.; CUTLER, R. G. Uric acid and serum antioxidant capacity: A reaction to atherosclerosis? **Atherosclerosis**, p. 148-131, 2000.

NWAGHA, U. I.; OKEKE, C. T.; NWAGHA, T. U.; EJEZIE, F. E.; OGBODO, S. O.; DIM, C. C.; ANYAEHIE, B. U. Asymptomatic malaria parasitemia does not

induce additional oxidative stress in pregnant women of South East Nigeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 229-233, 2011.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503–515, 2010.

NOGUEIRA, F.; DIEZ, A.; RADFAR, A.; PÉREZ-BENAVENTE, S.; ROSARIO, V. E.; PUYET, A.; BAUTISTA, J. M. Early transcriptional response to chloroquine of the *Plasmodium falciparum* antioxidant defence in sensitive and resistant clones. **Acta Tropical**, v. 114, p. 109–115, 2010.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, (Suppl.115), p. 1 – 15, 2010.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 155, n. 2, p. 131–136, 2011.

PABÓN, A.; CARMONA, J.; BURGOS, L. C.; BLAIR, S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. **Clinical Biochemistry**, v.36, p. 71–78, 2003.

PERRY, J. J. P.; SHINA, D. S.; GETZOFFA, E. D.; TAINER, J. A. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 2, p. 245–262, 2010.

POLIDORI, M. C.; CARRILLO, J. C.; VERDE, P. E.; SIES, H.; SIEGRIST, J.; STAHL, W. Plasma micronutrient status is improved after a 3-month dietary intervention with 5 daily portions of fruits and vegetables: implications for optimal antioxidant levels. **Journal of Nutrition**, v. 8, n.10, 2009.

PRICE, R.N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A., YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. Vivax malaria: neglected and not benign. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 79–87, 2007.

PRIOR, R. L. Plasma antioxidant measurements. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3184S–3185S, 2004.

PRYOR, W. A.; STANLEY, J. P. A. Suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids: nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 40, p. 3615–17, 1975.

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v.2, n. 2, p. 219–236, 2007.

RAUTIAINEN, S.; SERAFINI, M.; MORGENSTERN, R.; PRIOR, R. L.; WOLK, A. The validity and reproducibility of food-frequency questionnaire-based total antioxidant capacity estimates in Swedish women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 247–253, 2008.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, A.; DEL POZO-HESSING, C. Intoxicación por cianuro. **Medisan**, v. 5, p. 103–107, 2005.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, F. N.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SANTANA, M. S.; DA ROCHA, M. A. F.; ARCANJO, A. R. L.; SARDINHA, J. F. J.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C. Associação de metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 533-536, 2007.

SATTABONGKOT, J.; TSUBOI, T.; ZOLLNER, G. E.; SIRICHAISINTHOP, J.; CU, L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 1471 – 4922, 2004.

SCHWARTZ, E.; SAMUNI, A.; FRIEDMAN, I.; EMPELMANN, E.; GOLENSER, J. The role of superoxide dismutation in malaria parasites. **Inflammation**, v. 23, n. 4, p. 361-370, 1999.

SERAFINI, M.; DEL RIO, D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? **Redox Report**, v. 9, p. 145–152, 2004.

SERIROM, S.; RAHARJO, W. H.; CHOTIVANICH, K.; LOAREESUWAN, S.; KUBES, P.; HO, M. Anti-Adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 5, p. 1651 –1659, 2003.

SHANKS, G. D.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. II. Drugs that may be available in the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 381–385, 2001.

SIES H. Oxidative stress: introductory remarks. In: **Oxidative Stress**, editado por Sies H. London, Academic Press: London. 1985, p. 1–8.

SOHAIL, M.; KAUL, A.; M. RAZIUDDIN, M.; ADAK, T. Decreased glutathione-S-transferase activity: diagnostic and protective role in vivax malaria. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p.377 – 382, 2007.

SOLOMON, V. R.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 220 – 233, 2009.

TILLEY, L., LORIA, P., FOLEY, M. Chloroquine and other quinolone antimalarials. **Antimalarial Chemotherapy, Humana Press**. In: Totowa, R.P.J., p, 87–122, 2001.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1660, p. 171–199, 2004.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, v. 099, p. 58-69, 2005.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. De F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.5, p. 1323 – 1338, 2007.

VASQUEZ-VIVAR, J.; AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine: oxidation and redox cycling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 6848 – 6854, 1992.

VEGA-RODRÍGUEZ, J.; FRANKE-FAYARD, B.; DINGLASAN, R. R.; JANSE, C. J.; PASTRANA-MENA, R.; WATERS, A. P.; COPPENS, I.; RODRÍGUEZ-ORENGO, J. F.; JACOBS-LORENA, M.; SERRANO, A. E. The glutathione biosynthetic pathway of *Plasmodium* is essential for mosquito transmission. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, 1-12, 2009.

WILMANSKI, J.; SIDDIQI, M.; DEITCH, E. A.; SPOLARICS, Z. Augmented IL-10 production and redox-dependent signaling pathways in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mouse peritoneal macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 1, p. 85 – 94, 2005.

WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y. S.; SWITZER, C. H.; FLORES-SANTANA, W.; VITEK, M. P.; RIDNOUR, L. A.; COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, p. 873 – 891, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Malaria Case Management**. 2009, p. 20 – 23.

WORLD HEALTH ORGANIZATION(WHO). **The World Malaria Report**. Geneva. Disponível em: <[http:// www.who.int/wmr2005/](http://www.who.int/wmr2005/)>Acesso em 20 de fevereiro de 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report: 2011**. Geneva, 2011.

YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemical medicine**, v.15, n. 2, p. 212-216, 1976.

YAZAR, S.; KILLIC, E.; SARAYMEN, R.; OZILGE, H. Serum malondialdehyde levels in patients infected with *Plasmodium vivax*. **West Indian Medical Journal**, v. 53, n. 3, p. 147 – 149, 2004.

YEUM, K. J.; RUSSELL, R. M.; KRINSKY, N. I.; ALDINI, G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 97-103, 2004.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p.176–186, 2001.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310–316, 2009.

## APÊNDICE

### 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Projeto: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*, DURANTE A FASE DE TRATAMENTO COM PRIMAQUINA E CLOROQUINA.

#### DESCRIÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO

Você tem um tipo de doença denominada malária que é causada por um protozoário chamado *Plasmodium vivax*. Este estudo tem por objetivo determinar, nas suas amostras de sangue: a atividade da enzima superóxido dismutase intraeritrocitária, da capacidade antioxidante total não enzimática, das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, bem como os teores de metemoglobinemia e os níveis de glutatona e glutatona dissulfeto, estabelecendo correlação com os índices de estresse oxidativo, por um período de dois anos.

Esta pesquisa irá ajudar a compreender melhor o envolvimento dos ERONs (Espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio) na fisiopatogenia da malária.

Você, ou a pessoa pela qual é responsável, será tratada para malária com o medicamento que está sendo usado pelo serviço de saúde de seu município.

Com a sua autorização, ou do responsável do paciente, será coletado 10 mL de sangue, através da punção da veia do braço, para a pesquisa e pelo método “fura-dedo” para o diagnóstico de rotina da malária. A coleta de sangue será realizada no 1º dia de diagnóstico e no 2º e 7º dia de controle da malária.

Nos exames serão utilizados materiais descartáveis e lhe causará o mínimo de risco, os quais são atribuídos à coleta da amostra para realização do exame de rotina, visto que utilizaremos todos os procedimentos adequados para minimizar ou eliminar os riscos possíveis.

Depois que os resultados dos exames estiverem prontos, a pessoa que participar da pesquisa poderá ver estes resultados.

O sangue coletado poderá futuramente ser utilizado para possíveis pesquisas relacionadas à malária.

Participando deste estudo você (ou o paciente) receberá cuidados médicos durante todo o seguimento do seu tratamento, e, no caso de qualquer complicação decorrente da malária e do uso dos medicamentos, estaremos disponíveis para atendê-los e indenizá-los pelos danos causados com o estudo. Também você estará contribuindo com essa pesquisa na obtenção do conhecimento científico da malária em nosso estado.

Sua participação é VOLUNTÁRIA, isto quer dizer, que o paciente tem todo direito de não participar ou se retirar do estudo, em qualquer fase da pesquisa. A amostra de sangue coletada será analisada no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), sediada no município de Belém, Pará. Desataca-se que a realização deste estudo não incorrerá em prejuízos físicos e morais aos pacientes que participarem, já que as informações serão de uso exclusivamente científico e as identificações pessoais serão mantidas em sigilo.

Os pesquisadores utilizarão os resultados desta pesquisa posteriormente em eventos de âmbito científico, tais como publicações e congressos.

Os principais pesquisadores são:

1. Amanda Gabryelle Nunes Cardoso Mello: aluna do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Topical da Universidade Federal do Pará;
2. Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira: orientador desta pesquisa.
3. Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosana Maria Feio Libonati: co-orientadora desta pesquisa

A pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado duas vezes, uma cópia fica com o pesquisador e outra com o paciente.

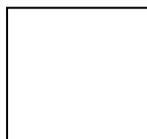
Pesquisador Responsável  
Amanda Gabryelle Nunes Cardoso Mello  
End: Rua Augusto Corrêa, s/n Guamá  
Fone: 3201-7733

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, compreendendo seus riscos e benefícios. Declaro ainda, que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando com a mesma.

Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_  
Testemunha (No caso de analfabetismo)



Impressão digital (No caso de analfabetismo).

## ANEXO



Parecer de Aprovação nº 0028/2010  
Protocolo CEP/IEC - Nº 0015/10  
CAAE: 0015.0.072.000-10

Ananindeua/PA, 13 de outubro de 2010.

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Malária por *Plasmodium vivax*: análise da possível influência da composição corporal na resposta terapêutica à primaquina”

Pesquisador Responsável: ROSANA MARIA FEIO LIBONATI

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epígrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,

MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES  
Coordenador do CEP/IEC

**MS/SVS/INSTITUTO EVANDRO CHAGAS  
VIGILÂNCIA DA RESPOSTA DOS PARASITAS DA MALÁRIA**



GUARDA/PN: \_\_\_\_\_ Lâmina nº \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Diagnóstico: \_\_\_\_\_  
 Paciente: \_\_\_\_\_  
 Registro: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ (Anos/Meses) Responsável: \_\_\_\_\_  
 Parentesco: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Perímetro: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_  
 Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Cor da Pele: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_  
 Ocupação Principal: \_\_\_\_\_ Ocupação Alternativa: \_\_\_\_\_  
 Localidade de Infecção: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_  
 Período de Permanência da Área: \_\_\_\_\_ Autoctonia? ( ) Sim ( ) Não  
 Passado Nosológico: vezes que teve malária: Nunca ( ) 1x ( ) 2x ( ) 3x ( ) 4x ( ) 5x ou + ( )  
 Última Vez: \_\_\_\_\_ Medicamento(s) utilizado(s) no último tratamento: \_\_\_\_\_  
 Por quantos dias: \_\_\_\_\_

Outras Doenças: (Hepatite, Leishmaniose, D. Chagas, Amebíase, Esquistossomose, Doenças crônico-degenerativas, etc): \_\_\_\_\_

Alergia? Sim ( ) Não ( ) A que?: \_\_\_\_\_

Quando adoece, usa remédio de farmácia ou caseiro? Ou ambos?: \_\_\_\_\_

Movimentação do Paciente: Nos últimos 12 meses viajou ou pernitoou fora da localidade onde reside?

Sim ( ) Não ( ) Período: \_\_\_\_\_ Localidade: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ Motivo da Viagem: \_\_\_\_\_ Teve febre

na localidade onde dormiu? Sim ( ) Não ( ) Quantos dias após regressar? \_\_\_\_\_

Onde pernoitou havia alguém com febre? \_\_\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

Sinal ou Sintoma clínico inicial: \_\_\_\_\_ Data início de sintomas: \_\_\_\_\_

Droga(s) utilizada(s) no tratamento atual e esquema: \_\_\_\_\_

Formulação da droga (VO/IM/EV) \_\_\_\_\_ Quantidade (Amp., Frasco, Comp.): \_\_\_\_\_

CONCLUSÃO DO CASO/RESPOSTA AO TRATAMENTO: CURA \_\_\_\_\_ RECRUDESCÊNCIA  
 RECAÍDA \_\_\_\_\_ INDEFINIDO \_\_\_\_\_ ÓBITO \_\_\_\_\_ INTERRUPÇÃO OU TROCA DE ESQUEMA \_\_\_\_\_

**SINAIS E SIMTOMAS REFERENTES AO QUADRO CLÍNICO E/OU DECORRENTES DE INTOLERÂNCIA OU TOXICIDADE DEVIDAS AO MEDICAMENTO (OU ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) EM ESTUDO.**

Sinal/Sintoma/DIA	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	DX	DX
Febre										
Calafrio										
Cefaléia										
Astralgia/Lombargia										
Astenia / Mialgias										
Tonteira										
Zumbidos / Surdez										
Insônia										
Náuseas / Vômitos										
Dor Abdominal										
Erução / Flatos										
Diarréia										
Colúria										
Oligúria / Anúria										
Palidez / Ictericia										
Prurido / Alergia										
Tosse / Dispneia										
Anorexia										
Esplenomegalia										
Hepatomegalia										
Pressão Arterial										
Freq. Respiratória										
Pulso										
Temperatura Axilar										

As informações deverão ser registradas segundo a convenção que se segue

Ausente/Normal = 0 / Alteração Discreta = 1 / Moderada = 2 / Severa = 3 / Severíssima = 4 / Indefinida = IND

