

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COMO BIOMARCADORES DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX SOB DIFERENTES
ESQUEMAS DE TRATAMENTO

BOLSISTA: MAIRA LAYLA MELO DE MATOS, CNPq

MANAUS

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0009/2009

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COMO BIOMARCADORES DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX SOB DIFERENTES
ESQUEMAS DE TRATAMENTO

BOLSISTA: MAIRA LAYLA MELO DE MATOS, CNPq

ORIENTADOR: PROF. DR. EMERSON SILVA LIMA

MANAUS

2010

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e aos seus autores.

Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica com manifestações de caráter agudo, crônico ou recorrente sendo a doença mais amplamente distribuída no mundo e uma das doenças parasitárias mais prevalentes da atualidade. Tanto a doença como os medicamentos utilizados (primaquina e cloroquina) para tratá-la causam estresse oxidativo, o qual ocorre quando há aumento na concentração de oxidantes ou diminuição na concentração dos antioxidantes, causando dano à estrutura das biomoléculas. Com o objetivo de estudar o perfil plasmático proteico no tratamento da malária *vivax*, foram selecionados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, 27 pacientes sob três diferentes esquemas terapêuticos. Em amostras de sangue, foram dosadas as proteínas albumina, ceruloplasmina e ferritina e, como biomarcadores do estresse oxidativo, o malondialdeído, as proteínas carboniladas, as bilirrubinas totais, indireta e direta nos dias 0, 3 e 7 do início do tratamento. As dosagens dos biomarcadores foram realizadas através de métodos colorimétricos ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Não foram observadas modificações significativas nos níveis plasmáticos das proteínas analisadas quando comparados os diferentes esquemas de tratamento. Quanto aos marcadores de estresse oxidativo MDA e proteínas carboniladas, também não se observou diferença significativa entre os tratamentos. Houve redução significativa dos níveis de bilirrubinas nos esquemas I e II, indicando melhor eficácia desses esquemas de tratamento neste parâmetro. Os resultados observados indicam não haver modificações significativas nos níveis de proteínas plasmáticas ou biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo durante o período de tratamento na malária *vivax*. Estes achados também sugerem que o estresse oxidativo relatado na malária pode estar sendo compensado por outros fatores não analisados no presente trabalho ou ocorrerem em outros sítios específicos como na membrana dos eritrócitos ou plaquetas também não avaliados no presente estudo.

Palavras Chave: Malária, Estresse Oxidativo, Proteínas Plasmáticas.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease, non-contagious, has a chronic course with acute, chronic or recurrent manifestations of character, being the disease more widely distributed in the world and one of the most prevalent parasitic diseases of today. Both the disease and the drugs used (primaquine and chloroquine) to treat it cause oxidative stress, which occurs when there is an increase in the concentration of oxidants or decrease in the concentration of antioxidants, causing damage to the structure of biomolecules. With the aim of studying the plasma protein profile in the treatment of *vivax* malaria, 27 patients under three different regimens were selected in the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. Albumin, ceruloplasmin and ferritin were dosed in the blood samples and as biomarkers of oxidative stress, malondialdehyde, carbonyls protein, the total, direct and indirect bilirubin on days 0, 3 and 7 of treatment. The dosages of biomarkers were performed using colorimetric methods or high performance liquid chromatography (HPLC). There were no significant changes in plasma levels of analyzed proteins when they were compared with the different treatment regimens. Regarding oxidative stress markers as MDA and carbonyls protein, there was also no significant difference between treatments. There was a significant reduction in levels of bilirubin in the diagrams I and II, indicating greater efficiency of these treatment regimens on this parameter. The results indicate no significant changes in levels of plasma proteins or biomarkers related to oxidative stress during the treatment period of *vivax* malaria. These results also suggest that oxidative stress reported in malaria, may be being offset by other factors not analyzed in this study or perhaps is happening at others specific sites, as the membrane of erythrocytes or platelets which was also not evaluated in this study.

Keywords: Malaria, Oxidative Stress, Plasma Proteins

LISTA DE SIGLAS

AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
BD	Bilirrubina direta
BHT	Butilhidroxitolueno
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	Acido dinitrobenzóico
EPS	Eletrofosere de Proteínas Séricas
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FMT-AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Aglutationa
G6PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MDA	Malondialdeído
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição da malária no mundo	13
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.	15
Figura 3 - Reação utilizada para detecção de malondialdeído (MDA) em plasma humano	20

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de pacientes do sexo masculino e feminino participantes do projeto	33
Gráfico 2 - Porcentagem de pacientes com diferentes tipos de parasitema para malária <i>vivax</i>	34
Gráfico 3 - Porcentagem de pacientes não fumantes e fumantes do projeto	34
Gráfico 4 - Níveis plasmáticos de proteínas totais em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	35
Gráfico 5 - Níveis plasmáticos de proteínas carboniladas em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	35
Gráfico 6 - Níveis plasmáticos de ceruloplasmina em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	36
Gráfico 7 - Níveis plasmáticos de ferritina em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	36
Gráfico 8 - Níveis séricos de albumina em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	37
Gráfico 9 - Níveis séricos de MDA em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	37
Gráfico 10 - Níveis séricos de BT em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	38
Gráfico 11 - Níveis séricos de BI em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	38
Gráfico 12 - Níveis séricos de BD em cada esquema de tratamento para malária <i>vivax</i> com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Os três esquemas de tratamento para malária *vivax* utilizados no projeto.

28

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Geral	12
2.2. Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Aspecto geral da malária	13
3.2. Estresse oxidativo	17
3.3. Estresse oxidativo relacionado à malária	18
3.4. Sistema antioxidante nos estados maláricos	21
3.5. Medicamentos utilizados para o tratamento da malária: Primaquina e Cloroquina	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Tipo de Estudo	26
4.2. População de Estudo	26
4.3. Critério de inclusão e exclusão	26
4.4. Delineamento Experimental	26
4.5. Amostragem	29
4.6. Considerações Éticas	29
4.7. Métodos	29
4.7.1. Dosagem de Proteínas Carboniladas	29
4.7.2. Dosagem de Proteínas Totais	30
4.7.3. Dosagem de Ceruloplasmina	30
4.7.4. Dosagem de Ferritina	31
4.7.5. Dosagem de Albumina	31
4.7.6. Eletroforese de proteína	31
4.7.7. Dosagem de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)	32
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9. CRONOGRAMA	49
10. ANEXOS	50

1. JUSTIFICATIVA

Em virtude de a região amazônica ser uma área endêmica para malária por *P. vivax* e o uso da primaquina e cloroquina serem indispensáveis ao tratamento da doença, o entendimento dos fatores associados ao estresse oxidativo e sua caracterização clínica são fundamentais como informação aos profissionais, para melhor definição de condutas terapêuticas e reconhecimento precoce dos eventos adversos destas drogas, o que certamente trará benefícios diretos ao paciente.

Classicamente, a cloroquina tem se mostrado uma droga praticamente desprovida de eventos adversos graves, entretanto, o uso da primaquina pode levar à metemoglobinemia e à hemólise, especialmente em pacientes deficientes de uma enzima antioxidante intra-eritrocitária, a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD).

Há poucos estudos na literatura avaliando o estresse oxidativo de pacientes sob tratamento antimalárico. Também é desconhecido o efeito oxidativo da associação da cloroquina à primaquina, em diferentes regimes posológicos. A Organização Mundial da Saúde recomenda a dose de primaquina para adultos de 15 mg/dia por 14 dias, dose comprovadamente eficaz contra a recaída da doença. No Brasil, a dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 30 mg/dia por 7 dias, iniciando-se a primaquina juntamente com a cloroquina. Na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), pela comodidade posológica, os pacientes são tratados inicialmente com cloroquina, seguida pela primaquina, dois dias após o término da cloroquina.

A avaliação do perfil oxidativo nos três esquemas de cura radical da malária *vivax* permitirá subsidiar a escolha de um ou outro esquema, com vistas a evitar complicações clínicas associadas ao estresse oxidativo, como metemoglobinemia, hemólise, anemia e até mesmo plaquetopenia.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar o perfil plasmático de proteínas como biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com malária *vivax* submetidos a diferentes esquemas de tratamento com cloroquina e primaquina.

2.2. Específicos

Avaliar a relação entre os níveis plasmáticos de MDA e de proteínas relacionadas à proteção antioxidante como a ceruloplasmina, ferritina e albumina.

Verificar possíveis alterações na eletroforese de proteínas plasmáticas e sua relação com marcadores do estresse oxidativo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspecto geral da malária

A malária é uma doença infecciosa evitável e tratável, transmitida por mosquitos, não contagiosa, de evolução crônica com manifestações de caráter agudo, crônico ou recorrente, sendo a doença mais amplamente distribuída no mundo e uma das doenças parasitárias mais prevalentes da atualidade (Figura 1). Quarenta por cento da população mundial tem risco de contrair a doença, 300 e 500 milhões de casos ocorrem anualmente e a cada ano, um a dois milhões de pessoas (na maioria crianças) morrem de malária (ROLL BACK MALARIA, 2010; FREVERT & NARDIN, 2005).

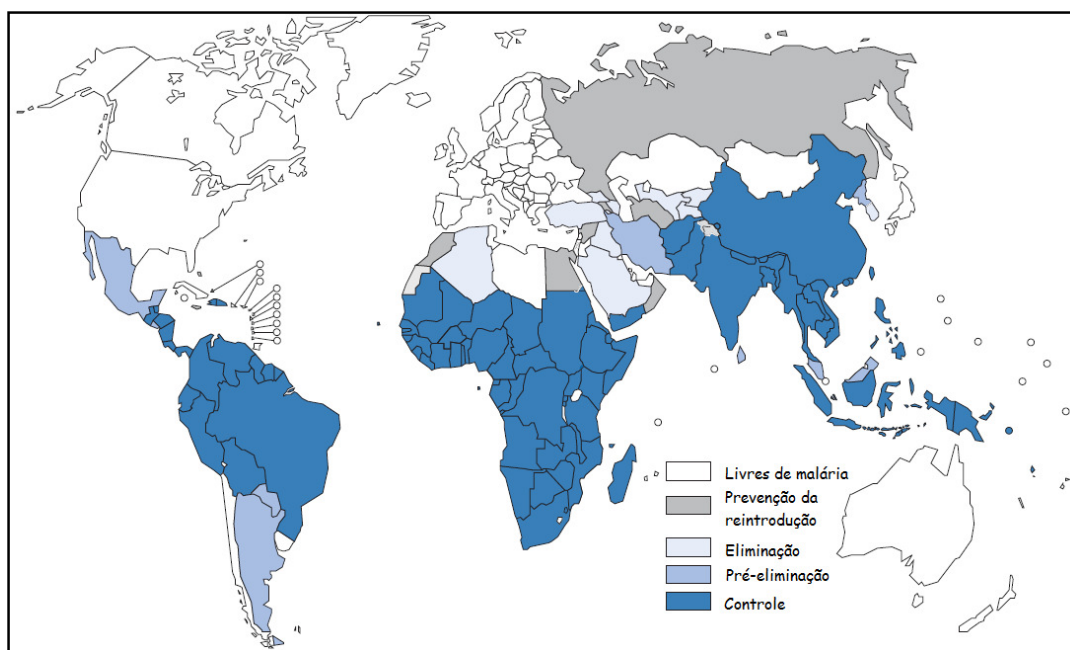


Figura 1 - Mapa da distribuição da malária no mundo

FONTE: Adaptado de WORLD MALARIA REPORT 2009

No estado do Amazonas, entre janeiro de 2007 a março de 2009, foram diagnosticados e notificados 22.081 casos de malária, com maior registro (14.249) em 2007. Comparando-se 2008 com 2007, houve uma redução de 51,6% dos casos e, ao se comparar o primeiro trimestre de 2009 com o mesmo período de 2008, tem-se uma redução de 55,4% dos casos, ou seja, de 2.096 para 934 casos (FMTAM, 2009).

Essa doença é transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles* contaminados por protozoários do gênero *Plasmodium*. Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium* conhecidas, destas, apenas quatro parasitam o homem preferencialmente: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale* (SUH, 2004).

Em 1898, Ronald Ross descobriu o desenvolvimento de oocistos na parede do estômago de mosquitos *Anopheles*, confirmando que a transmissão da doença ao homem se dá por esse vetor invertebrado. Dentre as diversas espécies encontradas na Amazônia, o *Anopheles darlingi* apresenta-se como o principal vetor com relevância epidemiológica (TADEI & THATCHER, 2000).

O ciclo biológico da malária (de todas as espécies de *Plasmodium*) possui duas fases: uma fase assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado, denominada de endógena ou esquizogônica, e outra fase sexuada de desenvolvimento no vetor mosquito do gênero *Anopheles* (espécie *A. darlingi* na Amazônia), denominado exógena ou esporogônica (Figura 2) (SHERMAN, 1998).

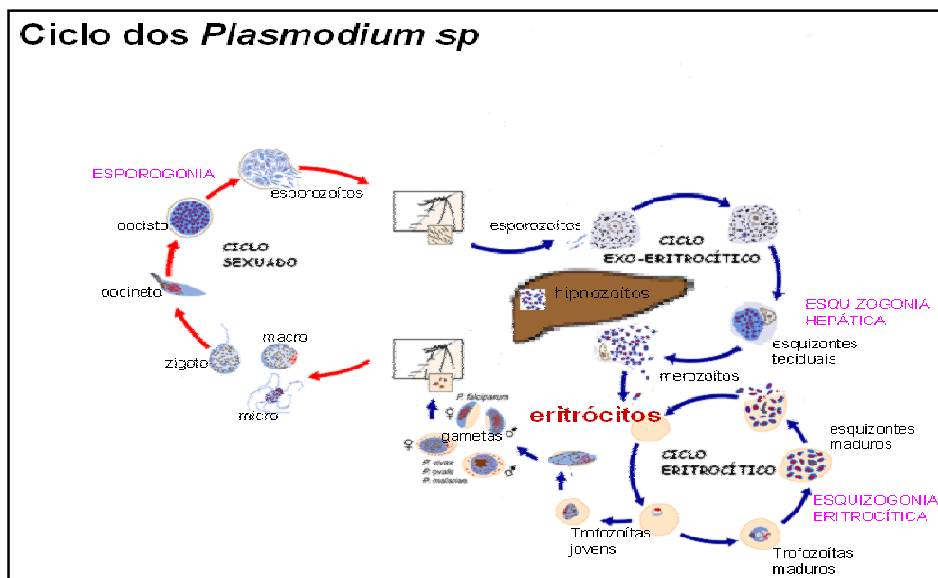


Figura 2 - Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.
 FONTE: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (2004).

O esporozoíta é introduzido no homem durante o repasto sangüíneo dos Anofelinos, que inoculam esta forma infectante e, os que não são fagocitados pelos macrófagos, atingem os capilares subcutâneos e chegam aos hepatócitos em 30 minutos. No fígado, estes se desenvolvem por esquizogonia (reprodução assexuada). Após alguns dias, o esquizonte formado se rompe e libera merozoítos nos capilares e estes invadem os eritrócitos e se transformam em trofozoítas jovens (forma em anel) que originam os esquizontes hemáticos. A ruptura do esquizonte libera novos merozoítos que parasitam outros glóbulos vermelhos repetindo o ciclo. Na malária causada por *P. vivax*, permanecem algumas formas latentes no fígado chamadas hipnozoítos, às quais são atribuídas as recaídas tardias de malária *vivax* (LIMA, *et al.*, 1992). Após sucessivas esquizogonias, alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuais chamadas de gametócitos femininos e masculinos que ao serem ingeridos pela fêmea do *Anopheles*, dão início ao ciclo sexual ou gametogênico e, após algumas etapas de desenvolvimento, liberam os esporozoítos, que migram para as glândulas salivares dos mosquitos, onde permanecem viáveis por cerca de dois meses, até serem inoculados no homem (REY, 1992; FAIRHURST & WELLEMS, 2000).

A doença se caracteriza por acessos de febre intermitente, sobrevivendo de dois em dois dias (febre terçã) ou de três em três dias (febre quartã), seguindo a evolução cíclica de cada espécie do parasito. Os acessos febris podem, entretanto, ocorrer diariamente, em virtude de eclosão diária da nova geração de parasitos ou por infecções em tempos distintos por populações diferentes de mosquitos. Durante o acesso malárico, o doente passa por três fases: calafrio, hipertermia e sudação. Em geral, ocorre esplenomegalia e anemia (LIMA *et al.*, 1992).

A sintomatologia malárica depende do estado imune do paciente. Na primeira infecção, em pacientes não imunes, a febre pode alcançar 40°C e os sinais e sintomas podem ser mais acentuados. Nas recidivas, os sintomas geralmente são mais brandos (ALECRIM, 2000).

Plasmodium vivax é o agente da febre terçã benigna, com ciclo febril que retorna a cada 48 horas. É o parasita humano mais extensamente distribuído no mundo que infecta o homem. Causa uma doença menos severa que o *P. falciparum*, sendo raramente fatal (LECLERC *et al.*, 2004).

Infecções por *P. vivax* são importantes principalmente pela morbidade prolongada e a possibilidade de recaídas quando a doença não é tratada de forma correta. Entretanto, poucos estudos são realizados com o *P. vivax* devido às dificuldades no cultivo celular, baixa fatalidade e complicações clínicas devido à infecção causada (ALEXANDRE, 2004; MENDIS *et al.*, 2001).

O diagnóstico de malária, na rotina clínica, utiliza como Padrão Ouro o esfregaço sanguíneo e a gota espessa corados pelo método de Giemsa (ou alternativamente pelo método de Wright) (PATEL *et al.*, 2004). A lâmina de malária permite tanto a identificação da espécie como a quantificação (expresso como percentagem dos eritrócitos infectados ou como parasitas por microlitro) de parasitas. A malária não deve ser excluída sem confirmar ao menos três lâminas negativas obtidas no período de 48 horas. Todavia, o processamento e a interpretação das lâminas requerem equipamento apropriado, bem como treinamento profissional (SUH *et al.*, 2004).

3.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há aumento na concentração de oxidantes ou diminuição na concentração dos antioxidantes (EREL *et al.*, 1997). O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) causa danos à estrutura das biomoléculas, gerando estresse oxidativo (GUTTERIDGE, 1995). Também pode ser definido como qualquer distúrbio celular no balanço entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes (EREL *et al.*, 1997).

Radical livre é qualquer molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados (orbital molecular incompleto). São espécies de moléculas extremamente reativas, e que podem causar dano ou morte celular. Os radicais livres são continuamente produzidos pelo organismo, sendo a maioria por reações bioquímicas envolvendo oxigênio, que ocorrem normalmente no metabolismo (fontes endógenas) como na cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, na hipóxia, na explosão respiratória pelos macrófagos sendo também formados por fagocitose, como parte do controle da reação inflamatória. Ocasionalmente

podem ocorrer em resposta a exposição (fontes exógenas) a radiação ionizante, luz ultravioleta, poluição ambiental, fumaça de cigarro, exercícios excessivos e isquemia (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).

Todos os organismos aeróbicos são expostos a espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânions superóxido (O_2^-), oxigênio singlet (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hipoclorito ($HOCl^-$) e radicais hidroxila (OH^\bullet) bem como espécies reativas de nitrogênio (ERN) como óxido nítrico (NO^\bullet) e peroxinitrito (NO_3^-) gerados pelo metabolismo (GUTTERIDGE, 1995; MÜLLER *et al.*, 2003; EREL, 2004). Cada radical livre formado pelo corpo pode iniciar uma série de reações, que continuam até que sejam removidos. Podem desaparecer reagindo com outros radicais livres ou devido a ações do sistema antioxidante.

3.3. Estresse oxidativo relacionado à malária

O parasitismo da malária sozinho gera grandes quantidades de H_2O_2 e O_2^- . Os mecanismos oxidativos são dominantes em relação aos antioxidantes na malária *vivax*. Por esse motivo, o estresse oxidativo produzido é mantido pelo hospedeiro como um mecanismo de defesa contra a infecção malarial (EREL *et al.*, 1997).

Algumas espécies reativas do oxigênio parecem contribuir para os sinais e sintomas apresentados na malária, tanto agravando como atenuando este quadro, e podem explicar algumas alterações encontradas nos pacientes com malária. Os eritrócitos são expostos ao estresse oxidativo endógeno e exógeno na malária *vivax*, que podem levar as várias alterações metabólicas no hospedeiro (EREL *et al.*, 1997; KOCHAR *et al.*, 2005).

Akaike & Maeda (2000) afirmam que entender as funções das ERO e do NO• iria contribuir muito para o entendimento das doenças infecciosas. Neste sentido, a avaliação do estresse oxidativo gerado pelo parasitismo malárico pode ajudar a esclarecer o mecanismo de atuação do Plasmodium e as conseqüências do parasitismo no organismo.

Na determinação do estresse oxidativo, a dosagem de peróxidos totais é de grande relevância para avaliar a exposição aos sistemas oxidantes. Os hidroperóxidos são produtos primários da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e isso dá importância à sua medida, uma vez que a maioria dos métodos avalia seus produtos de degradação (LIMA & ABDALLA, 2001).

Uma forma de avaliar o estresse oxidativo é através da dosagem do malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico. Atualmente, o MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em plasma. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 532 nm e fluorescência em 553 nm (figura 3) (VASCONCELOS *et al*, 2007).

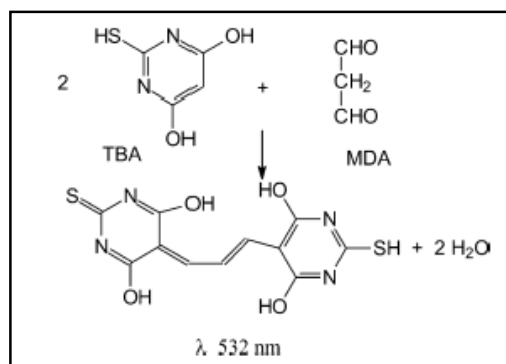


Figura 3 - Reação utilizada para detecção de malondialdeído (MDA) em plasma humano. Ao plasma é adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA), que reage com MDA e forma um cromógeno que absorve a 532 nm
 FONTE: VASCONCELOS *et al*, 2007.

Existem outros métodos de avaliação do estresse oxidativo por modificação de outros componentes celulares, como por exemplo, proteínas e enzimas. Em relação a proteínas podem-se citar os grupos carbonilas como marcadores da oxidação protéica. A modificação de proteínas pode ser induzida por ERO, por cátions metálicos (Fe^{2+} , Cu^+), por endobióticos (GSH), por HOCl e HOBr, no processo da fagocitose, por irradiação, por peróxidos lipídicos, por oxidoredutases, por fármacos etc. Todos os aminoácidos são susceptíveis à oxidação, principalmente os aromáticos, que são alvos preferidos de ataque. A oxidação direta de lisina, arginina, prolina e treonina fornecem derivados carbonílicos. É necessário, porém, identificar a natureza do grupo carbonila, ou seja, qual dos resíduos de aminoácido sofreu o dano, pois a ligação de certos aldeídos a proteínas (ex. MDA e HNE) pode gerar carbonilas por glicoxidação, de modo que a presença de grupo carbonila não é, necessariamente, indicativa de oxidação de aminoácidos. Há diversas técnicas para se medir a presença de grupo carbonila em proteínas, sendo imprescindível uma preparação adequada da amostra. O método mais conveniente é o espectrofotométrico, baseado na reação do ácido dinitrobenzóico (DTNB) com o grupo carbonila, que forma a hidrazona da proteína, cuja leitura de absorbância é feita a 370 nm. (VASCONCELOS *et al*, 2007).

3.4. Sistema antioxidante nos estados maláricos

A alimentação é a base para a constituição do corpo e estabilização do organismo contra infecções e também na suplementação do sistema antioxidante. Kiszewski & Teklehaimanot (2004) afirmam que a má nutrição pode contribuir para a maior severidade da epidemia malárica. Eles ainda sugerem que outros estudos devem ser conduzidos para se detectar a associação entre má nutrição e a susceptibilidade à malária.

O sistema antioxidante protege os tecidos dos efeitos dos radicais livres. Três grupos principais fazem parte deste sistema e são classificados como antioxidantes primários, secundários e terciários. O objetivo do antioxidante é estabilizar a molécula por um tempo mais longo e, neste sentido, ocorre extrema cooperação entre seus componentes. Como vários deles constituem o sistema redox, a atividade de um é adjuvada pela do outro (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).

Os antioxidantes primários trabalham prevenindo a formação de novas espécies radicalares. Estes antioxidantes atuam convertendo os radicais livres existentes em moléculas menos reativas antes que eles possam reagir. São enzimas solúveis, isto é, não aderidas em sistemas de membranas, o que lhes faculta atuar no citossol, na matriz mitocondrial, nos peroxissomos e outros compartimentos subcelulares em praticamente todos os tecidos. Está bem estabelecido que os principais antioxidantes intracelulares, sejam a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^\bullet) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutathione peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, atuam com utilização de glutathione como co-fator (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

Antioxidantes secundários atuam como armadilhas aos radicais, prevenindo reações em cadeia. Podem ser originários da dieta como, por exemplo, vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ascorbato), β -caroteno, selênio, zinco e magnésio, ou são sintetizados no organismo como o ácido úrico, a bilirrubina e a albumina. Antioxidantes terciários reparam biomoléculas que foram lesadas por radicais livres. Enzimas reparadoras de DNA e metionina sulfóxido redutase são exemplos (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).

Além da dosagem dos biomarcadores de peroxidação lipídica e dano oxidativo em proteínas, pode-se também dosear proteínas séricas, que são biomarcadores de processos antioxidantes, como a ceruloplasmina e ferritina, e também de processos inflamatórios agudos ou crônicos, como a dosagem de albumina e proteínas totais.

A ceruloplasmina ou ferroxidase I é uma α_2 -glicoproteína que transporta cerca de 90 a 95% do cobre total no plasma. O Cu^{2+} , obtido da dieta, é quelado pelo aminoácido histidina e absorvido no duodeno. É transportado ao fígado ligado à albumina e lá é incorporado na proteína ceruloplasmina. O Cu^{2+} ligado à ceruloplasmina é, então, distribuído para as células. Além do transporte de Cu^{2+} , a ceruloplasmina oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} para sua subsequente transferência para a transferrina (daí a sinonímia de ferroxidase) e catalisa a *S*-nitrosação de biomoléculas tiólicas. A determinação de ceruloplasmina humana baseia-se na reação entre essa enzima como antígeno e o anti-soro específico obtido em kits disponíveis no mercado (VASCONCELOS et al, 2007).

A ferritina é uma apoproteína com 24 subunidades de cadeias leves (L) e pesadas (H) ao redor de um centro, capaz de ligar até 4.500 átomos de ferro. Ao entrar nas células, o ferro excedente é estocado na forma de ferritina. A ferritina sequestra o ferro do meio intracelular,

fixando-o na forma oxidada (Fe^{3+}), quimicamente menos reativa, tanto para armazenamento quanto pra desintoxicação. A determinação de ferritina é feita por método espectrofotométrico na reação entre essa enzima com o antígeno e o anti-soro (MENDES, 2008).

As proteínas séricas possuem diversos métodos para serem doseadas e quantificadas. É possível quantificá-las através da Eletroforese de Proteínas Séricas (EPS). É um método laboratorial simples usado para separar as proteínas presentes no plasma humano em frações, de acordo com as suas respectivas cargas elétricas. Trata-se do teste de triagem mais utilizado para investigação de anormalidades protéicas no sangue. A análise das proporções das frações protéicas tem considerável valor na abordagem de doenças agudas e crônicas, como a malária, em processos inflamatórios, infecciosos e imunes, fornecendo informações clinicamente úteis (PAULA E SILVA *et al.*, 2008).

Existem várias substâncias que podem ser avaliadas para quantificar os antioxidantes no organismo (EREL, 2004). Estas substâncias podem ser medidas no soro (ou plasma) separadamente. Halliwell & Gutteridge (1990) compararam vários antioxidantes que estão dispersos no plasma e concluíram que a atividade depende da natureza do estresse pró-oxidante imposto, sendo difícil determinar qual é o mais importante.

3.5. Medicamentos utilizados para o tratamento da malária: Primaquina e Cloroquina

O tratamento da malária visa à interrupção da esquizogonia sangüínea, responsável pelas manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do ciclo biológico do *Plasmodium*, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes

do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítos) da espécie *P. vivax*, evitando assim as recaídas. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A primaquina é uma 8-aminoquinoleína, altamente ativa contra gametócitos de todas as espécies de malária humana, e contra hipnozoítos do *P. vivax*. Foi desenvolvida pelos Estados Unidos, durante a Guerra do Pacífico em 1941, para impedir as recaídas de malária. Atualmente, é a única droga usada para evitar recaídas, embora já esteja em fase de ensaios clínicos uma outra 8-aminoquinoleína, a tafenoquina (WR238605). A primaquina é uma droga bastante eficiente, no entanto, é muito tóxica (BAIRD, 2005; TEKWANI & WALKER, 2006).

A primaquina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, concentrando-se no fígado, cérebro, coração, pulmões e músculos esqueléticos. A média de volume de distribuição é de 3L/kg. Possui o pico de concentração plasmática de 1 a 3h para 70mg/mL. A primaquina elimina os hipnozoítos no fígado através da produção de radicais livres (WATKINS & MESHNICK, 2004; BAIRD & HOFFMAN, 2004).

Um dos poucos efeitos adversos deste fármaco é a sua atividade hemolítica em pacientes com deficiência congênita em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) nas hemácias. As células dos pacientes deficientes em G6PD não conseguem regenerar NaDPH, cuja concentração é reduzida pelos metabolitos oxidantes da primaquina e de outros fármacos. Em consequência disto, as funções metabólicas gerais das hemácias alteram-se e ocorre hemólise entre outros processos relacionados a ela (FERRAZ, 2002). Além dos efeitos hemolíticos, a primaquina pode causar distúrbios gastrintestinais como dor abdominal, diarréia, náuseas e vômitos (SHANKS, 2001).

A cloroquina é um fármaco pertencente à família das 4-aminoquinolinas. Ativa por via oral, exibe uma potente ação antimalárica. Essa ação é exercida sobre as formas eritrocíticas do *Plasmodium vivax*, do *P. malariae* e sobre a maior parte de cepas de *P. falciparum*. Não age sobre o gametócitos de *P. falciparum* (VADE-MÉCUM, 2008).

É útil no tratamento supressor e de ataque agudo de malária provocado por várias espécies de *Plasmodium*, no entanto, a cloroquina não previne as recaídas nos pacientes infectados com *P. vivax* ou *P. malariae*, porque as formas exoeritrocíticas não são afetadas pelo fármaco; também não previne a infecção pelos parasitos dessas espécies quando administrado como profilático. É eficaz no ataque agudo e prolonga os períodos entre recaídas para o *P. malariae* e *P. falciparum* (VADE-MÉCUM, 2008).

A cloroquina é rápida e quase completamente absorvida no trato gastrointestinal; 55% do fármaco circulante encontram-se ligados a constituintes plasmáticos não-difundíveis. A excreção é lenta e 50% do que é excretado na urina corresponde à cloroquina não metabolizada (VADE-MÉCUM, 2008).

A FMT-AM preconiza o uso da primaquina a partir do 5º dia de tratamento, quando o paciente já deve estar afebril e sem vômitos. Isso melhora a adesão terapêutica e permite observar a ação isolada da cloroquina (ALECRIM, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Tipo de Estudo

Estudo-piloto prospectivo, onde serão realizadas dosagens de biomarcadores do estresse oxidativo e do perfil de proteínas no plasma de pacientes com malária *vivax* sob diferentes esquemas de tratamento com cloroquina e primaquina.

4.2. População de Estudo

Pacientes diagnosticados com malária *vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM.

4.3. Critério de inclusão e exclusão

Serão selecionados pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos, com diagnóstico de malária *vivax* pela gota espessa (qualquer parasitemia) que puderem comparecer às consultas de retorno na FMT-AM. Serão excluídos os pacientes com história de alguma comorbidade, gestantes e deficientes de G6PD.

4.4. Delineamento Experimental

Os pacientes que preencherem os critérios acima foram convidados a participar da pesquisa e posteriormente a assinar um Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 01). Os pacientes foram alocados em três grupos de tratamento distintos (tabela 01). A

fim de identificar o perfil oxidativo relacionado ao uso das referidas drogas e a dosagem plasmática das mesmas, amostras de sangue venoso em tubos com EDTA (15 mL) e em todos sem anticoagulante (5 mL) foram coletadas nos dias D0, D3 e D7. Depois de coletadas as amostras eram centrifugadas e o plasma era armazenado com adição de butilhidroxitolueno (BHT) em freezer – com a finalidade de conservar plasma e soro, prevenindo oxidações – para posterior análise dos biomarcadores de estresse oxidativo. Um plasma sem adição de BHT era encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM para a realização de hemograma, o qual era passado para o médico que atendeu o paciente. O sangue coletado em tubos sem anticoagulantes também eram centrifugados e o soro era encaminhado para análise bioquímica (bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e albumina) no mesmo local citado anteriormente. Em todos os dias de análise, foram realizadas também gotas espessas com contagem da parasitemia em mm^3 . Os testes para análise dos biomarcadores de estresse oxidativo foram realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

Esquema	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13
I Cloroquina	X	X	X											
(150 mg/comp.)														
Primaquina					X	X	X	X	X	X	X			
(30mg/dia)														
II Cloroquina	X	X	X											
(150 mg/comp.)														
Primaquina	X	X	X	X	X	X	X							
(30 mg/dia)														
III Cloroquina	X	X	X											
(150 mg/comp.)														
Primaquina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(15 mg/dia)														
Coleta de amostra biológica	X			X				X						

Tabela 1 - Os três esquemas de tratamento para malária *vivax* utilizados no projeto. O Esquema I é o preconizado pela FMT-AM, o Esquema II pelo Ministério da Saúde e o Esquema III pela Organização Mundial de Saúde.

4.5. Amostragem

Como se trata de um estudo piloto, serão alocados 10 pacientes em cada esquema de tratamento, com os devidos cuidados (vide critérios de inclusão) para se manter a amostra o mais homogênea possível, em termos de idade, parasitemia e passado de infecção malárica.

4.6. Considerações Éticas

Esta pesquisa faz parte do projeto “Avaliação do Estresse Oxidativo em Pacientes com Malária vivax sob Diferentes Esquemas de Tratamento com Cloroquina e Primaquina” que obteve a liberação formal e aceitação por parte da instituição em questão, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em 2008 com cronograma de execução até 2010, sob o número do CAAE 004.0.114.114-08.

Os pacientes que participarem do projeto terão que assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 01), tendo em vista o atendimento às disposições da resolução CNS nº196/96, visando o bem estar dos participantes.

Todos os pacientes incluídos serão atendidos e acompanhados pelo Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, médico-pesquisador da FMT-AM.

4.7. Métodos

4.7.1. Dosagem de Proteínas Carboniladas

É um marcador da oxidação das proteínas. Pela ação das ERO alguns aminoácidos são modificados como a lisina e a arginina fornecendo derivados carbonílicos, os quais são

quantificados pelo método segundo Bradford, 1976. O procedimento mais conveniente para quantificar proteínas carboniladas em amostras de plasma envolve a reação entre 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas. O DNPH reage com as proteínas formando a base Schiff produzindo a hidrazona correspondente, a qual se pode analisar espectrofotometricamente no comprimento de onda entre 360-385 nm.

4.7.2. Dosagem de Proteínas Totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada através do método do biureto, utilizando kit comercial (Labtest® Minas Gerais – Brasil). O método é facilmente aplicado em analisadores semi-automáticos e automáticos capazes de medir com exatidão entre 530 e 550 nm, sendo assim realizado no aparelho COBAS Mira Plus. Nesse método, íons cobres em meio alcalino (reagente de biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

4.7.3. Dosagem de Ceruloplasmina

A dosagem de ceruloplasmina foi realizada através do método proposto por Schosinsky *et al.*, 1974. O método usa como substrato a substância ortodiansidina, tampão de acetato e solução de ácido sulfúrico a 9 mol/L. O método baseia-se na adição do substrato, do tampão e da amostra em dois tubo de ensaio, aquecer em banho maria em 30°C, e adicionar o ácido sulfúrico em 5 minutos em um tubo e em 15 minutos no segundo tubo. Agitar, ler as soluções obtidas em espectrofotômetro com absorvância em 540 nm, zerando o aparelho com água deionizada.

4.7.4. Dosagem de Ferritina

A dosagem de ferritina foi realizada através do método de imunoturbidimetria utilizando kit comercial (Labtest® Minas Gerais – Brasil). O método é facilmente aplicado a analisadores automáticos capazes de medir absorvâncias de 570 nm (550 a 580 nm), sendo assim realizado no aparelho COBAS Mira Plus. O princípio do teste parte de partículas de látex estabilizadas e sensibilizadas com anticorpo anti-ferritina humana que são aglutinados pela ferritina presente na amostra. A intensidade da aglutinação está associada à quantidade de ferritina presente na amostra, cuja concentração é obtida através de curva de calibração.

4.7.5. Dosagem de Albumina

A dosagem de albumina foi realizada através do método do verde de bromocresol, utilizando kit comercial (Labtest® Minas Gerais – Brasil). O método é facilmente aplicável à maioria dos analisadores semi-automáticos e automáticos, sendo assim também realizado no aparelho COBAS Mira Plus capazes de medir uma reação de ponto final entre 625 e 640 nm. O princípio do método parte da capacidade da albumina em se ligar à uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes.

4.7.6. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas plasmática foi realizada pelo método proposto por Naoum (1990) com adaptações. O método baseia-se na eletroforese de proteínas em tiras com acetato de celulose gelatinizado onde será utilizado o tampão Tris-glicina para corrida, solução corante de ponceau-S, solução descorante de ácido acético, solução de transparentização e

tiras de acetato de celulose gelatinizado Cellogel®. As bandas eletroforéticas serão quantificadas pelo método de densitometria com auxílio de um software.

4.7.7. Dosagem de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Os pacientes também foram testados para deficiência de G6PD, pelo teste funcional qualitativo de Brewer *et al.*, 1965.

5. RESULTADOS

Durante o período de dezembro de 2008 a agosto de 2009, foram coletadas amostras de 27 pacientes com malária *vivax* na FMT-AM, sendo 10 pacientes no esquema I, 9 pacientes no esquema II e 8 pacientes no esquema III. Os resultados a seguir estão divididos em clínicos e laboratoriais.

Dos 27 pacientes participantes do projeto contabilizou-se 20 do sexo masculino (74,07%) e 7 do sexo feminino (25,93%) (gráfico 01).

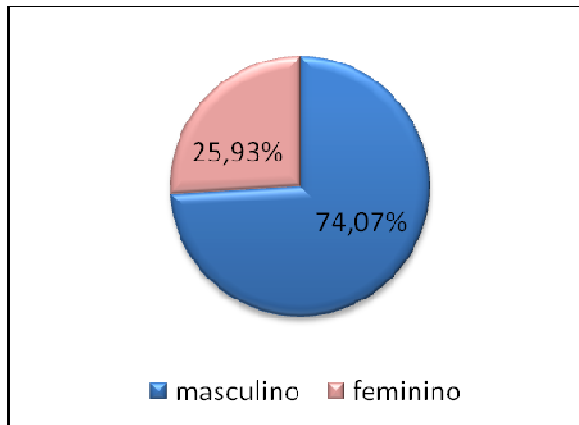


Gráfico 1 - Porcentagem de pacientes do sexo masculino e feminino participantes do estudo

Dentre os pacientes alocados na pesquisa 13 estavam com parasitemia de duas cruzes (48,15%), 8 com parasitemia de meia cruz (29,63%), 5 com parasitemia de uma cruz (18,52%) e 1 com parasitemia menor que meia cruz (3,70%) (gráfico 02).

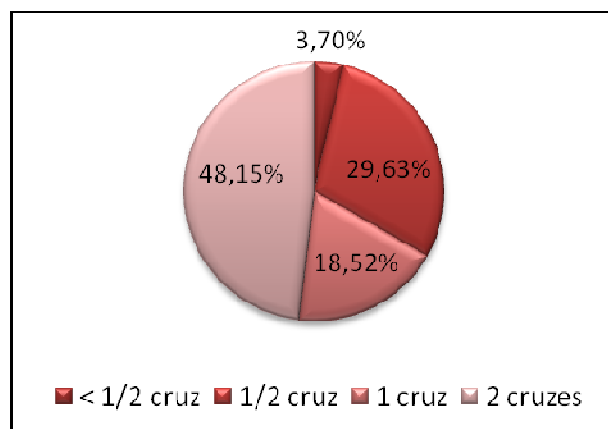


Gráfico 2 - Porcentagem de pacientes com diferentes tipos de parasitema para malária vivax

Ao total de 27 pacientes inseridos no projeto, 8 eram fumantes (29,63%) e 19 não possuíam o hábito de fumar (70,37%) (gráfico 3).

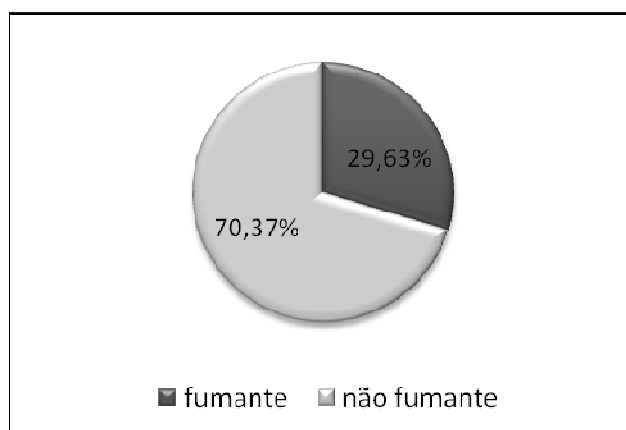


Gráfico 3 - Porcentagem de pacientes não fumantes e fumantes do projeto

O gráfico a seguir permite observar os níveis plasmáticos de proteínas totais nos três esquemas de tratamento.

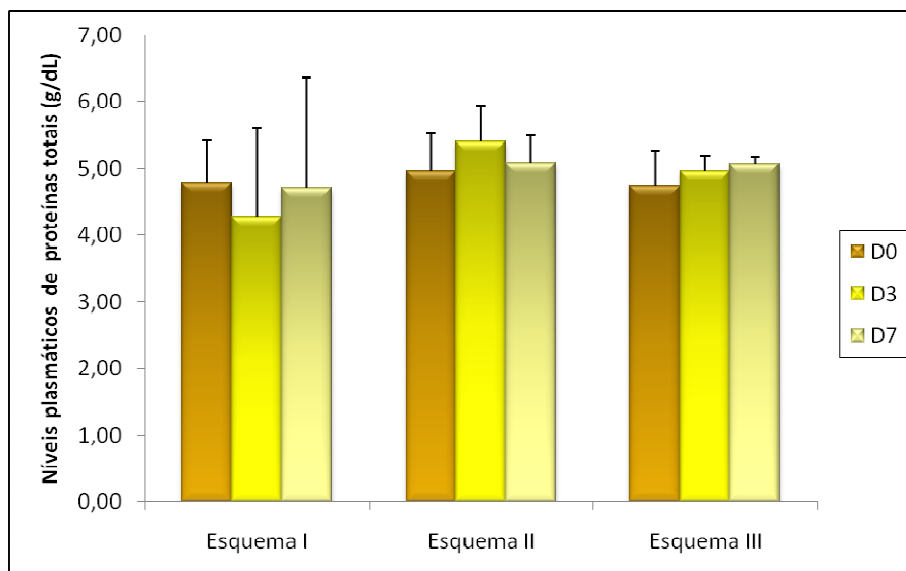


Gráfico 4 - Níveis plasmáticos de proteínas totais em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento

Todos os pacientes incluídos no projeto possuem atividade enzimática normal de glicose 6-fosfato desidrogenase. Apenas um paciente mostrou atividade enzimática anormal para G6PD sendo, portanto, excluído do projeto.

No gráfico abaixo é possível observar os níveis plasmáticos de proteínas carboniladas em cada esquema de tratamento.

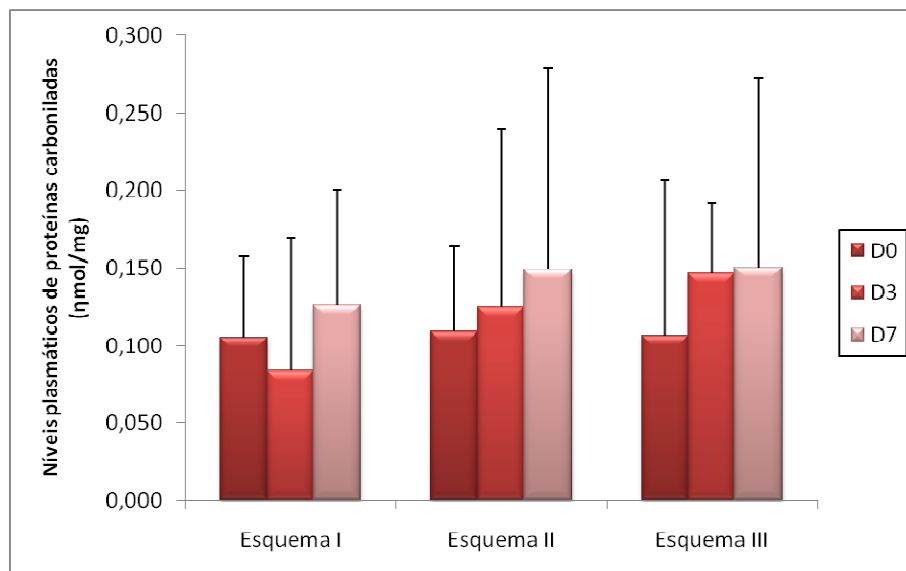


Gráfico 5 - Níveis plasmáticos de proteínas carboniladas em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento

Os níveis de ceruloplasmina plasmática em cada esquema de tratamento podem ser observados no gráfico abaixo:

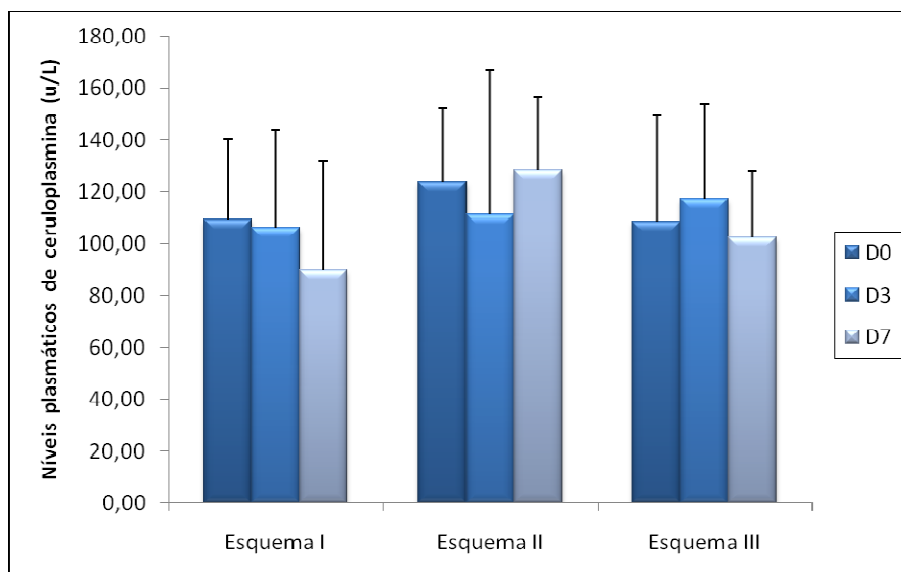


Gráfico 6 - Níveis plasmáticos de ceruloplasmina em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento

O gráfico abaixo permite observar os níveis plasmáticos de ferritina em cada esquema de tratamento:

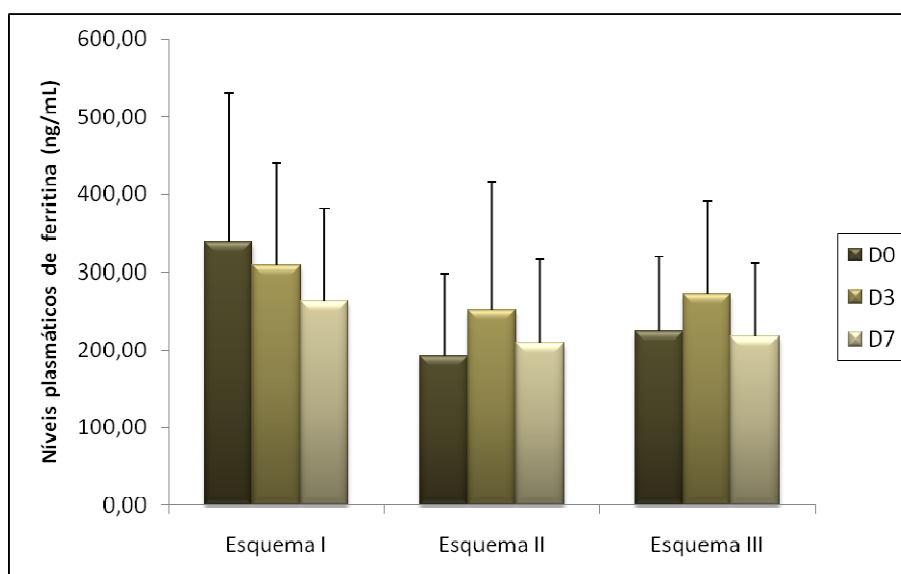


Gráfico 7 - Níveis plasmáticos de ferritina em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento

A dosagem de albumina foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM e os resultados podem ser observados no gráfico abaixo:

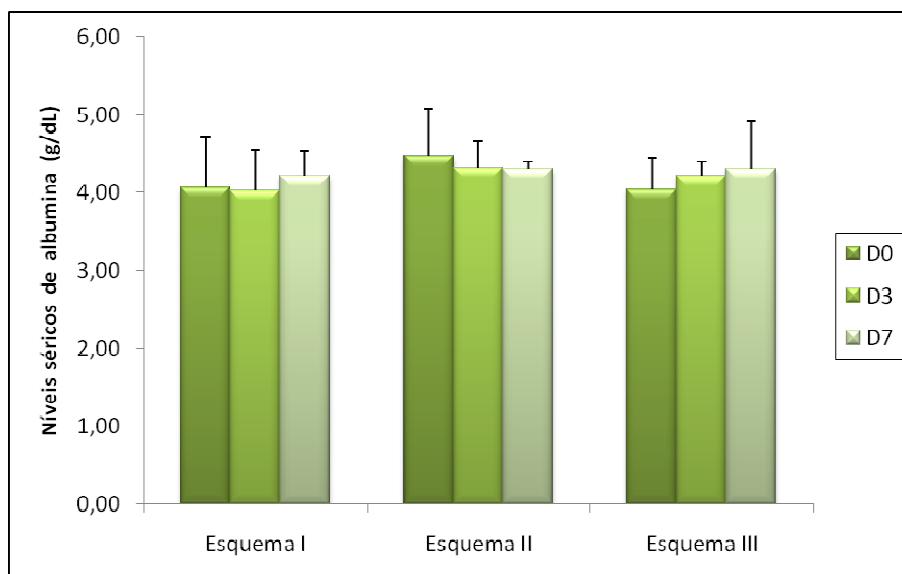


Gráfico 8 - Níveis séricos de albumina em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento

Os níveis plasmáticos de MDA em cada esquema de tratamento são exibidos no gráfico abaixo:

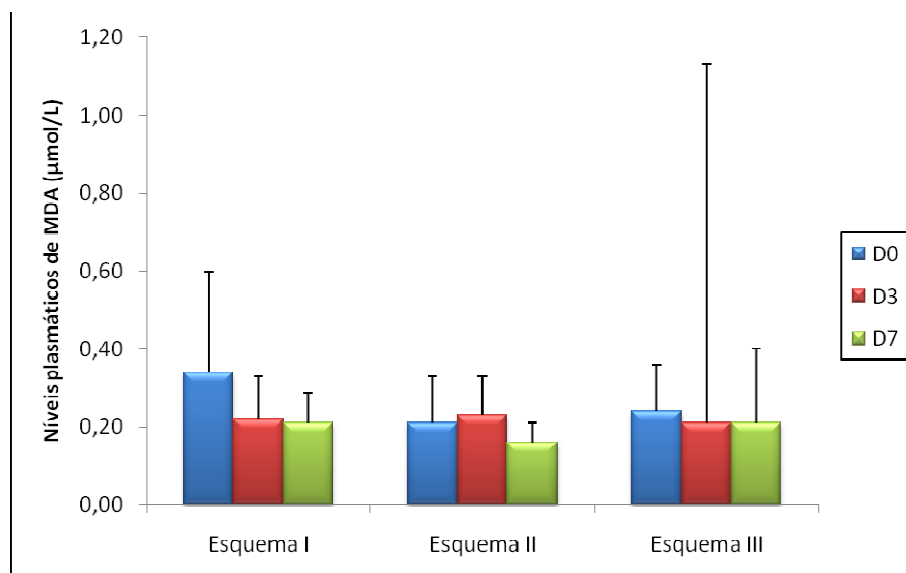


Gráfico 9 – Níveis plasmáticos de MDA em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento.

As dosagens de bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD) e bilirrubina indireta (BI), realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM, são expostas a seguir:

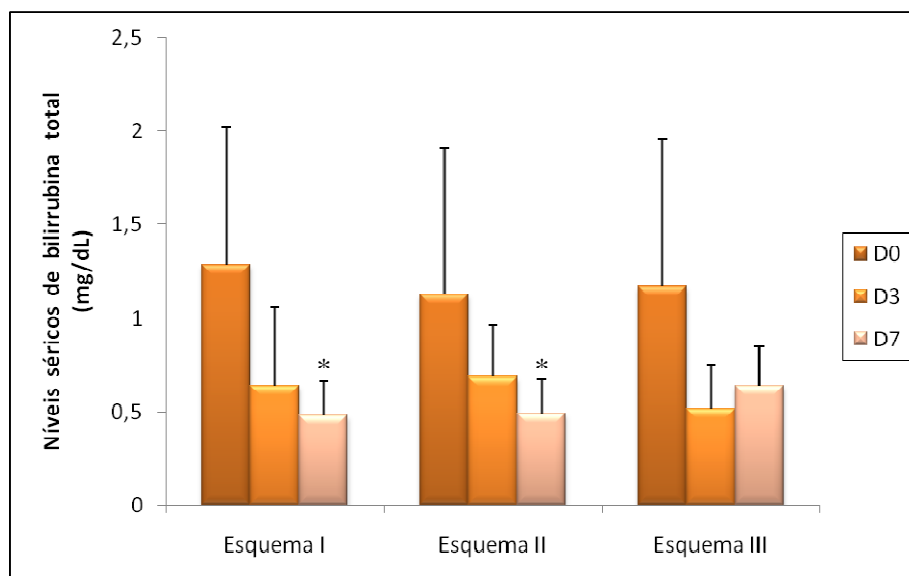


Gráfico 10 - Níveis séricos de BT em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento. (*) indica diferença estatisticamente significativa - $p < 0,05$ quando comparado ao D0.

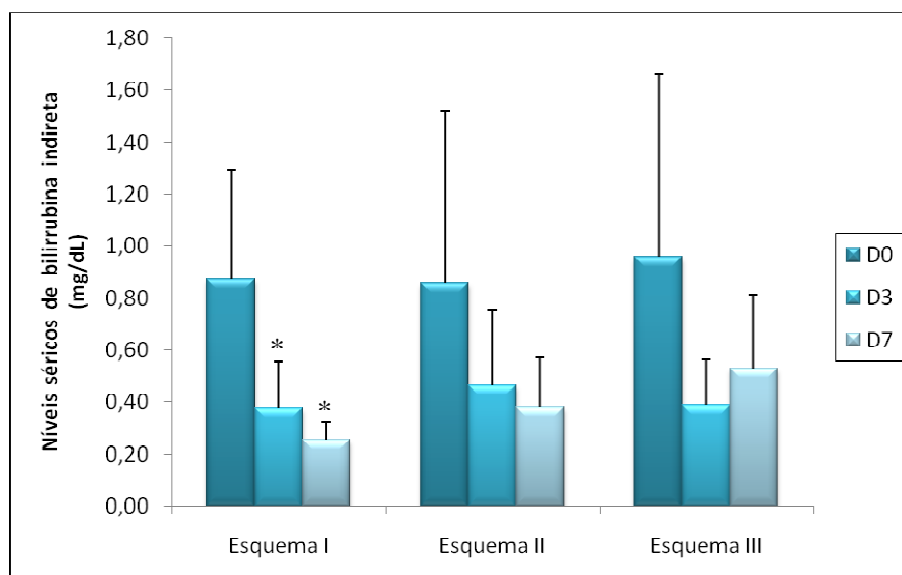


Gráfico 11 - Níveis séricos de BI em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento. (*) indica diferença estatisticamente significativa - $p < 0,05$ quando comparado ao D0.

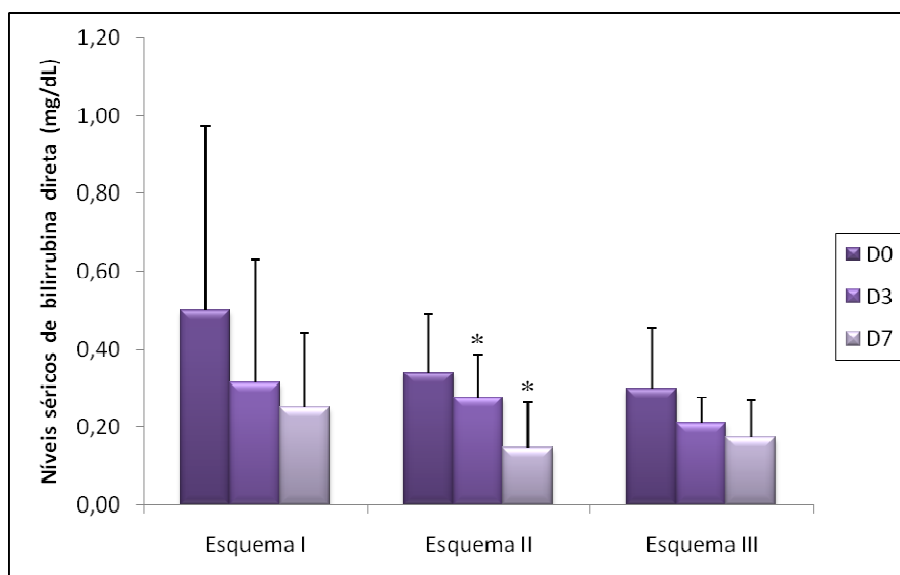


Gráfico 12 - Níveis séricos de BD em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento. (*) indica diferença estatisticamente significativa - $p < 0,05$ quando comparado ao D0.

A determinação das proteínas plasmáticas por eletroforese, a qual tinha sido inicialmente prevista, não foi realizada devido a problemas técnicos na etapa de padronização da metodologia. A princípio, a dosagem seria realizada em gel de agarose, porém, um problema técnico de origem desconhecida impossibilitava a separação das bandas protéicas. A metodologia em acetato de celulose foi realizada em um segundo momento, mas o tempo limite para finalização da pesquisa não permitiu a padronização da técnica. Contudo, os ensaios eletroforéticos continuarão em uma tentativa de não se negligenciar esta análise.

6. DISCUSSÃO

A partir dos resultados pode-se observar que os pacientes alocados dentro da pesquisa foram na maioria homens (74,07%), não fumantes (70,37%) e com parasitemia heterogênea que variou de menor que meia cruz a duas cruces.

Foram priorizados pacientes sem o hábito de fumar durante a pesquisa, pois estudos comprovam que pessoas que possuem este hábito estão ligadas a numerosos efeitos vasculares tais como: diminuição dos níveis séricos de antioxidantes (vitaminas E e C), aumento dos produtos de peroxidação lipídica, agregação plaquetária e aterogênese (KNIGHT-LOZANO *et al.*, 2002). Dessa forma o estresse oxidativo causado pelo cigarro poderia interferir nas dosagens de estresse oxidativo que possui o intuito de mostrar apenas o dano causado pelo parasita responsável pela malária e pelos medicamentos utilizados no tratamento.

Em relação à parasitemia, desde o início do projeto, existiram dificuldades para inserir pacientes, pelos seguintes fatores: no início foi determinado que participassem pacientes com malária *vivax*, primo-infectados e com parasitemia de 2 cruces, entretanto, uma baixa significativa de casos de malária ocorreu durante o primeiro trimestre de 2009, onde os 2.096 casos positivos ocorridos entre janeiro e março de 2008 diminuíram para 934 casos positivos durante o mesmo período de 2009 (FMT-AM, 2009). Além disso, a dificuldade de obter casos de pacientes primos-infectados era de grande proporção, pois a maioria já havia contraído malária mais de uma vez. Desta maneira, alguns critérios de inclusão foram mudados e a partir do mês de dezembro adicionaram-se pacientes com malária *vivax*, com qualquer parasitemia, sendo primo-infectado ou não.

O nível de proteínas totais mostrou-se semelhante nos três esquemas de tratamento, fazendo-se necessária a realização de todas as dosagens e posterior análise estatística, a fim de afirmar se houve acréscimo ou decréscimo do nível de proteínas totais. Os resultados obtidos

necessitariam ser comparados com os resultados da eletroforese de proteínas (não realizada), logo, não é permitida uma discussão apropriada.

As proteínas carboniladas são amplamente utilizadas como marcador de dano oxidativo em proteínas sob condições de estresse oxidativo. No entanto, as dosagens realizadas não permitiram a observação de diferença significativa entre os esquemas de tratamento.

As dosagens das proteínas antioxidantes, ceruloplasmina e ferritina, apresentaram um perfil semelhante no esquema I, onde ocorreu um decréscimo do D0 para o D7. Nos outros esquemas de tratamento essa característica não foi observada. De acordo com Kogika *et al.* (2003), em processos inflamatórios, infecciosos e parasitários ocorre um aumento dos níveis de ceruloplasmina. Harboe-Gonçalves *et al.* (2007) também mencionam que ferritina e ceruloplasmina são proteínas de fase aguda e que há evidências de que a ferritina está relacionada à resposta antioxidante endógena que se segue a uma lesão tecidual, que consiste na quelação do ferro livre liberado no plasma como resultado da degradação da heme. Dessa forma, os níveis aumentados no D0 dos esquemas terapêuticos são explicados. Com a cura dos sintomas e eliminação das formas eritrocitárias, devido a administração de cloroquina e primaquina, era esperado o decréscimo dos níveis ao decorrer dos dias.

Os níveis de albumina não foram alterados durante o período de tratamento da doença. Os esquemas I e III mostram que no D7 há um pequeno aumento de concentração de albumina em relação ao D0. Santos *et al.* (2004) cita que, a síntese de albumina depende de uma interação complexa entre vários fatores e que em meio a tantos, a liberação de citocinas pró-inflamatórias durante a origem da inflamação a inibe. Um exemplo é a IL-6 que, particularmente no fígado, inibe a síntese de albumina. Segundo o mesmo estudo, o reduzido nível sérico de albumina seria um dos mais sensíveis marcadores de resposta inflamatória. Consentindo com o que foi dito, Naoum (1990) alegou que a diminuição de albumina pode

estar relacionada a um defeito de sua síntese hepática (nas hepatopatias graves crônicas) e aos processos inflamatórios agudos, porém, a hipoalbuminemia é frequentemente uma evidência tardia, especialmente nas hepatopatias, pois seu longo período de vida média não permite sua rápida depleção, o que reduz a extensão da queda nos seus níveis séricos (SANTOS *et al.*, 2004). Dessa forma, os baixos níveis de albumina no D0 são compreendidos, uma vez que sua síntese está inibida pelo processo inflamatório e pela hepatopatia decorrente da malária, contudo a alteração brusca não é observada devido à administração dos medicamentos que levam à cura relativamente rápida.

As dosagens de bilirrubina total, bilirrubina indireta e bilirrubina direta mostraram um decréscimo nas concentrações do D0 para o D7. Isso se deve ao fato de que a hiperbilirrubinemia está correlacionada com a intensidade da parasitemia da doença, pois o parasita ocasiona hemólise, liberando hemoglobina, substância a qual, quando degradada, é o principal componente para a formação de bilirrubina (PIRES *et al.*, 2001). Logo, ao decorrer dos dias, com a cura da doença, era-se esperada a queda dos níveis de bilirrubinas totais e frações dos pacientes do projeto. Entretanto não foi possível apontar qual dos três esquemas causa um menor dano oxidativo através desses resultados, pois com as análises dos gráficos pode-se notar que os níveis de bilirrubina total e frações ficaram semelhantes em todos os esquemas.

7. CONCLUSÃO

Não foram observadas modificações significativas nos níveis plasmáticos das proteínas analisadas quando comparados os diferentes esquemas de tratamento. Quanto aos marcadores de estresse oxidativo MDA e proteínas carboniladas, também não se observou diferença significativa entre os tratamentos, sugerindo que, com base nesses dois parâmetros, os esquemas terapêuticos podem não colaborar para o aumento do estresse oxidativo durante o período de tratamento. Houve uma redução significativa dos níveis de bilirrubinas nos esquemas I e II, indicando melhor eficácia desses esquemas de tratamento neste parâmetro, uma vez que os níveis reduzidos de bilirrubinas demonstram que há uma diminuição da hemólise ocasionada pelo parasita. Os resultados observados indicam não haver modificações significativas nos níveis de proteínas plasmáticas ou biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo durante o período de tratamento na malária *vivax*. Estes achados também sugerem que o estresse oxidativo relatado na malária pode estar sendo compensado ou ocorrer em outros sítios específicos, como na membrana dos eritrócitos ou plaquetas, fatores estes não avaliados no presente estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, T; MAEDA, H. *Nitric oxide and virus infection*. Immun., n. 100, p. 300-308, 2000.

ALECRIM M.G.C, ALECRIM W.D, ALBUQUERQUE B.C, ARAÚJO M.A.A, SANTANA FILHO F.S, LACERDA M.V.G. *Malária*. In: *Manual de Rotinas da Fundação de Medicina Tropical. Amazonas (Brasil)*. Disponível em: <<http://www.fmt.am.gov.br/manual/index.htm>>. Acesso em: 09 mar 2007.

ALECRIM, M. G. C. *Estudo Clínico, Resistência e Polimorfismo Parasitário na Malária pelo Plasmodium vivax em Manaus/AM*. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, 2000.

ALEXANDRE, A. M. *Estudo Clínico e Epidemiológico da Malária Grave em Pacientes Atendido na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, 2004.

BAIRD, J. K; HOFFMAN, S. L. *Primaquine therapy for malaria*. Clin Infect. v. 39, n. 9, p. 1336-1345, 2004.

BAIRD, J.K. *Effectiveness of Antimalarial Drugs*. N Engl J Med. v. 352 n. 15, p. 1565-1577, 2005.

BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry. v. 248, n. 72, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Terapêutica da Malária*. Brasília: [Atualizada em Dezembro de 2001;]; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_terapeutica_malaria.pdf. Acesso em: 6 mar 2007.

BREWER, G. J.; JOHN, G.; RAYMOND, J. D. *Studies of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity of Individual Erythrocytes: The Methemoglobin-Elution Test for Identification of Females Heterozygous for G6PD Deficiency*. Am J Hum Genet. v. 17, n. 4, p. 359-368, 1965.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm>. Acesso em: 10 nov 2005.

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

EREL, O. *A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions*. Clin. Biochem., v. 37, p. 112-119, 2004.

FAIRHURST, R. M.; WELLEMS, T. E. *Plasmodium* species (Malaria). In: MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. *Principles and practice of infectious diseases*. USA: Churchill Livingstone, 6.ed, v. 2, p 3121-3138, 2000.

FREVERT, U.; NARDIN, E. *Arrest in the Liver — A Genetically Defined Malaria Vaccine?*. Eng. J. Med., v. 352, n. 15, p. 1600-1602, 2005.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS - FMTAM. Informe Epidemiológico nº 11 - ano IV/2009. Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/informe/2009/MURAL%20MALARIA2007A2009_Final.pdf>. Acesso em: 20 jan 2010.

GUTTERIDGE, J. M. C. *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clin. Chem., v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE J. M. C. *The antioxidants of human extracellular fluids*. Arch. Biochem. Biophys., v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

HARBOE-GONÇALVES, L.; VAZ, L. V.; BUZZI, M. *Avaliação dos níveis de hiperhomocisteinemia, vitamina E, selênio, cobre, ceruloplasmina e ferritina em pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico*. J Bras Patol Med Lab, v. 43, n. 1, p. 9-15, fevereiro, 2007.

KISZEWSKI, A. E.; TEKLEHAIMANOT, A. *A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 71, n. 2, p. 128-135, 2004.

KNIGHT-LOZANO, C. A.; YOUNG, C. G.; BUROW, D. L. *Cigarette Smoke Exposure and Hypercholesterolemia Increase Mitochondrial Damage in Cardiovascular Tissues*. Circulation, v. 105, p. 849-854, 2002.

KOCHAR, D. K.; SAXENA, V.; SINGH, N.; KOCHAR, S. K.; KUMAR, S. V.; DAS, A. **Plasmodium vivax malaria**. Emerg. Infect. Dis., v. 11, n. 1, 2005.

KOGIKA, M. M.; PEREIRA, D. A.; ELIAS, F.; NOTOMI, M. K.; DELAYTE, E. H.; KAWAHARA, R.; HAGIWARA, M. K. **Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e α -glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica**. Ciência Rural, Santa Maria, v.33, n.3, p.513-517, mai-jun, 2003.

LECLERC, M. C.; MENEGON, M.; CLIGNY, A.; NOYER, J. L.; MAMMADOV, S.; ALIYEV, N.; GASIMOV, E.; MAJORI, G.; SEVERINI, C. **Genetic diversity of Plasmodium vivax isolates from Azerbaijan**. Malaria Journal, v. 3, n. 40, 2004.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas**. Rev. Bras. Ciênc. Farm., v. 37, n. 3, 2001.

LIMA, S. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J; CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica – técnica e interpretação**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

MENDES, J. F. R. **Biomarcadores do Estado Nutricional do Ferro e Estresse Oxidativo em Adultos**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2008.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, B. **The neglected burden of Plasmodium vivax malaria**. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 64, n. 1, p. 97-106, 2001.

MÜLLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R. D.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. **Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites**. Trends in Parasitology, v. 19, n. 7, p. 320-328, 2003.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: Técnicas e Diagnósticos**. São Paulo: Livraria Santos, 1990.

PATEL, U.; GANDHI, G.; FRIEDMAN, S.; NIRANJAN, S. **Thrombocytopenia in malaria**. J. Nat. Med. Assoc., v. 96, n. 9, 2004.

PAULA E SILVA, R. O; LOPES, A. F; FARIA, R. M. D. **Eletroforese de Proteínas Séricas: Interpretação e Correlação Clínica**. Revista Médica de Minas Gerais. v. 18, n.2, p.116-122, 2008.

PIRES, A.; BORGES, A.; ADRAGÃO, T. **Malária e Rim**. Medicina Interna, v. 8, n. 2, 2001.

P.R. Vade-Mécum Brasil – Medicamentos. Disponível em: <www.prvademecum.com>. Acesso em: 01 abr 2008.

REY, L. *Bases da parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.115-136, 1992.

ROLL BACK MALARIA. Disponível em: <<http://rbm.who.int/>>. Acesso em: 20 jan 2010.

SANTOS, N. S. J.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; CUPPARI, L. *Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise*. Rev. Nutr., Campinas, 17(3):339-349, jul./set., 2004.

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*. Clin Infect Dis. v. 1, n. 3, p. 381-385, 2004.

SHERMAN, I.W. *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. American Society for Microbiology, p. 575, 1998.

SIGNORINI, J. L.; SIGNORINI, S. L. *Atividade física e radicais livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos*. 2ª ed. São Paulo: Ícone, p. 192, 1995.

SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. *Malária*. Can. Med. Assoc. J, v. 170, n. 11, p. 1693-1702, 2004.

TADEI, W. P. & THATCHER, B. D. *Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 42:87-94, 2000.

TEKWANI, B.L; WALKER, L.A. *8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs*. Curr Opin Infect Dis. v. 16,n. 6, p. 623-631, 2006.

VASCONCELOS, S. M; GOULART, M. O; MOURA, J. B; *Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação*. Quim. Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WATKINS, E. R; MESHNICK, S. R. *Drugs for Malaria*. Semin Pediatr Infect Dis. v. 11, n. 3, p. 202-212, 2004.

WORLD MALARIA REPORT 2009. Disponível em:
<http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf>. Acesso em: 20 jan 2010.

WHO Recommendations. Malaria Control Today. Current. Geneva: WHO; 2005 [Atualizada em Março de 2005; acesso em Mar 18 2007]; Disponível em: www.who.int/malaria/docs/MCT_workingpaper.pdf.

9. CRONOGRAMA

Descrição	Ago 2009	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2010	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Padronização de Técnicas	X	X										
Coleta de Amostras		X	X	X	X	X	X	X	X			
Análise de Material		X	X	X	X	X	X	X	X			
Elaboração do Resumo e Relatório Parcial (atividade obrigatória)						X						
Análise dos Resultados		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Elaboração do Resumo e Relatório Final e preparação da Apresentação Final para o Congresso												X

X = Atividades realizadas

X = Atividades não realizadas

10. ANEXOS

- Anexo 01



PROJETO

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COMO BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX SOB DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está com malária e ainda não deu início ao tratamento e está sendo convidado a participar do estudo *“Avaliação do Estresse Oxidativo em Pacientes com Malária Vivax sob Diferentes Esquemas de Tratamento com Cloroquina e Primaquina”*. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste projeto é estudar e comparar os diferentes tipos de tratamento (esquema recomendado pelo Ministério da Saúde, esquema recomendado pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e esquema recomendado pela Organização Mundial da Saúde), com os medicamentos primaquina e cloroquina em pacientes com malária *vivax*. Caso você participe, será necessário fazer 03 (três) coletas de sangue da veia no dia do diagnóstico, no dia 3 e no dia 7 depois do início das medicações. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto maior ou risco à sua vida, exceto o fato que você sentirá uma pequena pontada (dor) quando receber uma picada para colher o sangue do seu braço.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em

dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e quais procedimentos a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Manaus,/...../.....

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador que conversou com o paciente

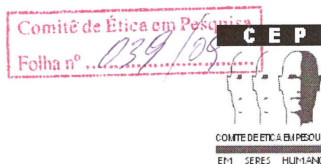
Em caso de dúvidas: Prof. Dr. Marcus Lacerda (092) 3656 0620/

Prof. Dr. Emerson Lima (092) 3633 3241

- **Anexo 02:**



Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro
Cep: 69040-000
Manaus – Amazonas - Brasil



APROVAÇÃO Nº 1904

Registro CEP Nº 1176-08

CAAE – 0016.0.114.000-08

Processo Nº1176/2008-FMT-AM

Projeto de Pesquisa: Avaliação do Estresse oxidativo em pacientes com malária vivax sob diferentes esquemas de tratamento com cloroquina e primaquina.

Pesquisador responsável: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda

Instituição Sediadora: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas-FMT-AM

Instituição Vinculada: Não se aplica

Área Temática Especial: Não se aplica

Patrocinador: CNPq

Registro para armaz. de mat. Biológico humano: Não se aplica

Ao se proceder à análise relativo do Projeto em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em sessão ordinária do dia 18 de junho de 2008 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Protocolo: APROVADO

Manaus, 18 de junho de 2008.


Luiz Carlos de Lima Ferreira
Coordenador de Ética em Pesquisa
FMT-AM


24/06/08

Obs: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c") conforme o Formulário de acompanhamento dos Projetos aprovados no CEP, disponível em nossa home Page.