

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

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX SOB DIFERENTES ESQUEMAS DE
TRATAMENTO COM CLOROQUINA E PRIMAQUINA

BOLSISTA: CAMILA FABBRI, CNPq

MANAUS

2009

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/0034/2008

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX SOB DIFERENTES ESQUEMAS DE
TRATAMENTO COM CLOROQUINA E PRIMAQUINA

BOLSISTA: CAMILA FABBRI, CNPq

ORIENTADOR: PROF. DR. EMERSON SILVA LIMA

MANAUS

2009

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

Malária é uma doença infecciosa febril aguda ou crônica, causada por protozoários transmitidos por vetores. Reveste-se de importância epidemiológica por sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação em áreas com densidade vetorial que favoreça a transmissão. Além do tratamento utilizado para a doença, o parasitismo por si só gera grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo. Com o intuito de investigar o estresse oxidativo em pacientes com malária *vivax* sob diferentes esquemas de tratamento com cloroquina e primaquina, foram selecionados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, 18 pacientes sob três diferentes esquemas terapêuticos. Em amostras de sangue, mensurou-se marcadores do estresse oxidativo malondialdeído, proteínas carboniladas, bilirrubinas totais, indireta, direta e albumina nos dias 0, 3 e 7 de cada esquema. Em todos os parâmetros analisados houve uma tendência a diminuição do dia 0 para o dia 7 (exceto nas dosagens de albumina). Os valores de malondialdeído (MDA) mostraram uma diminuição significativa em relação ao D0 e D7 no esquema terapêutico com 3 dias de cloroquina com intervalo de um dia e 7 dias de primaquina. Os níveis médios foram ($\mu\text{mol/L}$): D0 = $0,44 \pm 0,24$; D3 = $0,23 \pm 0,12$ e D7 = $0,19 \pm 0,05$. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem como um melhor esquema terapêutico em relação ao dano oxidativo, o esquema com 3 dias de cloroquina com intervalo de um dia e 7 dias de primaquina.

Palavras Chave: Malária, Estresse Oxidativo, Primaquina.

ABSTRACTS

Malaria is an infectious disease or acute febrile disease caused by protozoa transmitted by vectors. Is of epidemiological importance for its clinical severity and high potential for spread in areas with a density which favors vector transmission. Besides the treatment used for the disease, parasitism by itself generates large amounts of reactive oxygen species, causing oxidative stress. In order to investigate the oxidative stress in patients with vivax malaria under different schemes of treatment with chloroquine and primaquine, were selected in the Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, 18 patients from three different treatment regimens. In blood samples, measure up markers of oxidative stress malondialdehyde, protein carbonyl, total bilirubin, indirect, direct and albumin on days 0, 3 and 7 of each scheme. In all parameters examined there was a tendency to decrease from day 0 to day 7 (except at doses of albumin). The values of malondialdehyde (MDA) showed a significant decrease in the D0 and D7 in the therapeutic regimen of chloroquine in 3 days with an interval of one day and 7 days of primaquine. Mean levels were (mmol / L): D0 = 0.44 ± 0.24 , D3 = 0.23 ± 0.12 and D7 = 0.19 ± 0.05 . The results of this study suggest as a better therapeutic scheme in relation to oxidative damage, the scheme with 3 days of chloroquine with an interval of one day and 7 days of primaquine.

Keywords: Malaria, Oxidative Stress, Primaquine.

LISTA DE SIGLAS

AMVN	Azodi (2,4 –dimetilvaleronitrila)
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
BD	Bilirrubina Direta
BI	Bilirrubina Indireta
BT	Bilirrubina total
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Albumina Bovina Sérica
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
CAT	Capacidade antioxidante Total
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COT	Capacidade Oxidante Total
CP	Concentração de Proteína
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	Acido dinitrobenzóico
FMT-AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Aglutinationa
G6PD	Glicose 6 –fosfato desidrogenase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MDA	Malondialdeído
PC	Proteína Carbonila
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.	06
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> SP.	07
Figura 3 - Reação utilizada para detecção de malondialdeído (MDA) em plasma humano.	12
Figura 4 - Picos de absorvância de um comprimento de onda específico em HPLC da substância padrão (tetraetoxipropano-MDA) e amostra de paciente com adição de BHT 0,2% respectivamente.	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de pacientes do sexo masculino e feminino participantes do projeto.	25
Gráfico 2 - Porcentagem de pacientes com diferentes tipos de parasitema para malária <i>vivax</i> .	26
Gráfico 3 - Porcentagem de pacientes não fumantes e fumantes do projeto.	27
Gráfico 4 - Curva padrão de albumina soro bovina (BSA) nas concentrações entre 0,25 – 2,0 mg/ml.	28
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.	31
Gráfico 6 - 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.	32
Gráfico 7 - 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.	32
Gráfico 8 - 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.	33
Gráfico 9 - 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.	33
Gráfico 10 - Níveis plasmáticos 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.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Os três esquemas de tratamento para malária <i>vivax</i> utilizados no projeto.	20
Tabela 2 - Valores de absorvâncias das amostras e controles utilizados na padronização do teste de proteínas carboniladas.	28
Tabela 3 - Absorvâncias dos controles com diluição de 1:10.	29

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA	03
2. OBJETIVOS	05
2.1. Geral	05
2.2. Específicos	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1. Aspecto geral da malária	06
3.2. Estresse oxidativo	10
3.3. Estresse oxidativo relacionado à malária	11
3.4. Sistema antioxidante nos estados maláricos	13
3.5. Medicamentos utilizados para o tratamento da malária: primaquina e cloroquina	15
4. METODOLOGIA	18
4.1. Tipo de estudo	18
4.2. População de estudo	18
4.3. Critério de exclusão e inclusão	18
4.4. Delineamento experimental	19
4.5. Amostragem	20
4.6. Considerações éticas	21
4.7. Métodos	21
5.7.1 Dosagem de malondialdeído (MDA)	21
5.7.2 Dosagem das vitaminas A e E	22
5.7.3 Dosagem da capacidade antioxidante e oxidante do plasma	23
5.7.4 Dosagem de proteínas carboniladas	23
5.7.5 Dosagem de estresse oxidativo nas hemácias	24

5.7.6	Dosagem de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)	24
5.	RESULTADOS	25
5.1.	Clínicos	25
5.1.1	Sexo dos pacientes	25
5.1.2	Parasitemia dos pacientes	26
5.1.3	Relação de Pacientes não fumantes e fumantes	26
5.2.	Laboratoriais	27
5.2.1	Dosagem de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)	27
5.2.2	Padronização do método de proteínas carboniladas	27
5.2.3	Dosagem de proteínas carboniladas	30
5.2.4	Dosagens Bioquímicas	31
5.2.5	Dosagem de MDA	34
6.	DISCUSSÃO	37
6.1	Resultados Clínicos	36
6.2	Resultados Laboratoriais	37
7.	CONCLUSÃO	41
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
9.	CRONOGRAMA	48
10.	ANEXOS	49

1. JUSTIFICATIVA

Em virtude da 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 anti-oxidante 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, nas mesmas doses recomendadas, 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 estresse oxidativo em pacientes com malária *vivax* submetidos a diferentes esquemas de tratamento com cloroquina e primaquina.

2.2 Específicos:

Definir parâmetros do estresse oxidativo (malondialdeído, vitamina A, vitamina E, proteínas carboniladas, capacidade anti-oxidante total e capacidade oxidante total) no plasma e nas hemácias de pacientes sob os diferentes esquemas terapêuticos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspecto geral da malária

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 (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, 2005; FREVERT & NARDIN, 2005). No Estado do Amazonas, no ano de 2004, foram registrados 146.933 casos de malária notificada, com um incremento de 6% em relação a 2003 (FMTAM, 2005).

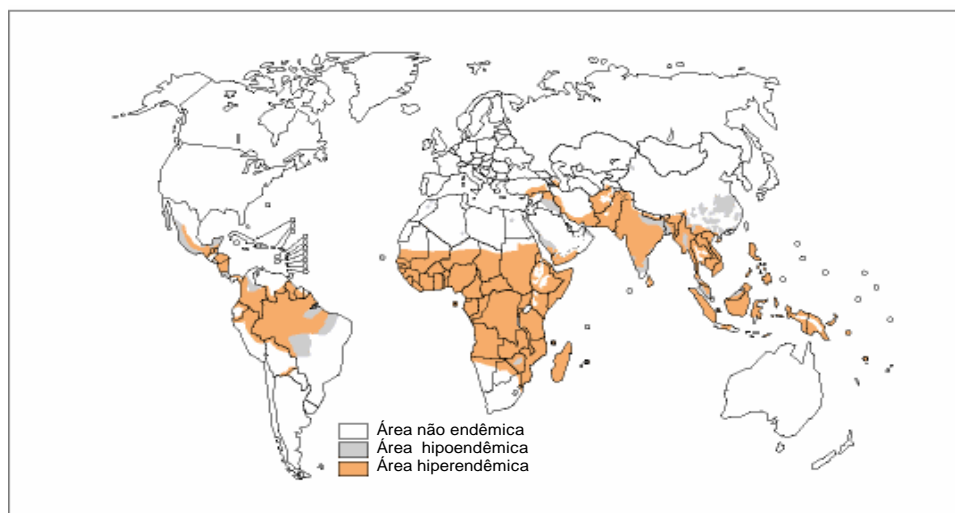


Figura 1: Mapa da distribuição da malária no mundo.

Fonte: Adaptado de ROLL BACK MALARIA (2003).

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; CIVES, 2005).

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).

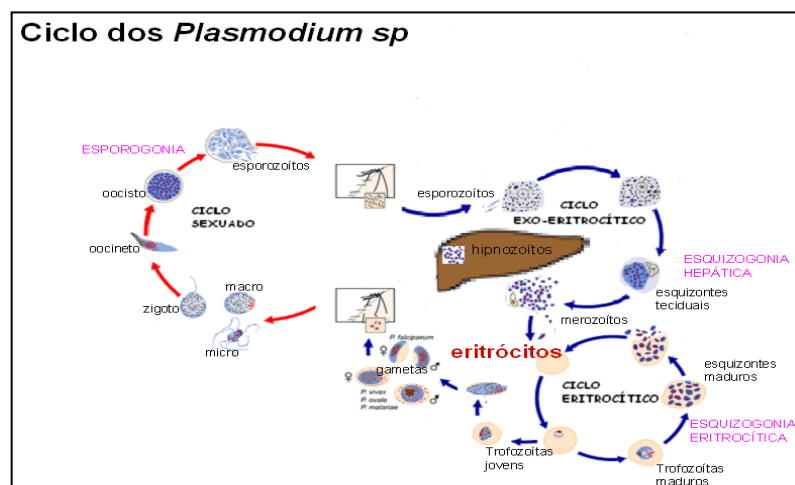


Figura 2: Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.

Fonte: Adaptado de Center for Diseases 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 sexuadas chamadas de gametócitos femininos e masculinos que ao serem ingeridos pela fêmea do *Anopheles*, dão início ao ciclo sexuado 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; FAIRHUST & WELLENS, 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 infectam 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 sangüíneo 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 ($^1\Delta_g O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hipoclorito ($HOCl^-$) e radicais hidroxila (OH^\cdot) bem como espécies reativas de nitrogênio (ERN) como óxido nítrico ($\cdot NO$) 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).

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. Esse método baseia-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam ferro II a ferro III, o qual reage com *xilenol orange*, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima em 560nm (LIMA & ABDALLA, 2001).

Outra 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).

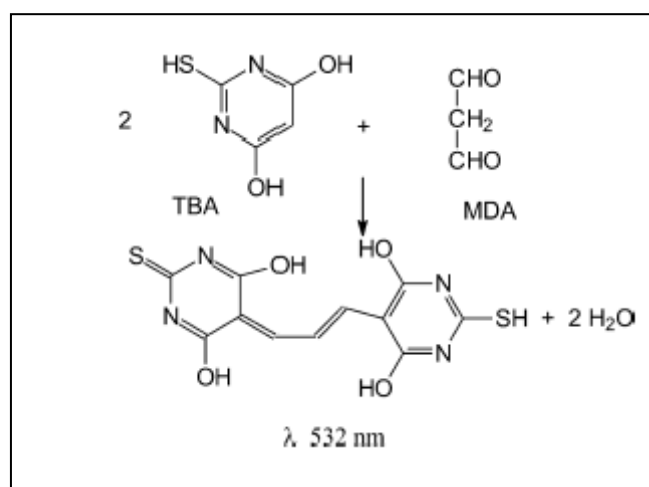


Figura 3: reação utilizada para detecção de malondialdeído (MDA) em plasma humano. Ao plasma é adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA), que reage com MDA e forma um cromógeno que absorve a 532 nm. Fonte: VASCONCELOS *et al*, 2007.

Também se pode avaliar o estresse oxidativo por marcadores de oxidação de proteínas. Uma das maneiras é pelos grupos carbonila em proteínas. 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. 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 & TEKLEHAINOT (2004) afirmam que a malnutrição pode contribuir para a maior severidade da epidemia malárica. Eles ainda sugerem que outros estudos devem ser conduzidos para se detectar a associação entre malnutrição 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^*) 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 **glutathiona peroxidase (GPx)**, que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathiona 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 (alfa tocoferol), vitamina C (ascorbato), beta 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).

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 prooxidante imposto, sendo difícil determinar qual é o mais importante.

No que se refere aos antioxidantes, faz-se o estudo da capacidade antioxidante total (CAT), onde leva-se em conta a ação acumulativa de todos os antioxidantes presentes; obtém-se um parâmetro integrado, capaz de revelar nuances acerca do delicado equilíbrio redox existente *in vivo*. A medida de CAT auxilia na avaliação dos fatores nutricionais, fisiológicos e ambientais do balanço redox em seres humanos. É útil registrar que o decréscimo da CAT não significa necessariamente que o dano oxidativo ocorreu; pode significar simplesmente que o mecanismo de defesa cumpriu sua função habitual. (VASCONCELOS et al, 2007).

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

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,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,2004;BAIRD,2004).

Pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) podem desenvolver um grave efeito colateral da droga, a anemia hemolítica, em função da ação oxidante da primaquina, sendo, portanto, contra-indicada em pacientes nos quais se conhece previamente a referida deficiência enzimática (14). Além dos efeitos hemolíticos, a primaquina pode causar distúrbios gastrintestinais como dor abdominal, diarreia, 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 gastrintestinal; 55% do fármaco circulante encontram-se ligados a constituintes plasmáticos não-difundíveis. A excreção é lenta e 50% do que é excretado na urina correspondem a cloroquina não metabolizada (VADE-MÉCUM,2008).

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Estudo-piloto prospectivo, onde foram realizadas dosagens de marcadores do estresse oxidativo no plasma e nas hemácias 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 FMT-AM.

4.3 Critério de inclusão e exclusão

Foram selecionados pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos, com diagnóstico de malária *vivax* pela gota espessa e que puderam comparecer às consultas de retorno na FMT-AM. Foram excluídos os pacientes com história de alguma co-morbidade, gestantes e deficientes de G6PD.

4.4 Delineamento Experimental

Os pacientes que preencherem os critérios acima foram convidados a participar da pesquisa, em seguida assinando um 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 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 (150 mg/comp.)	X	X	X											
Primaquina (30mg/dia)					X	X	X	X	X	X	X			
II Cloroquina (150 mg/comp.)	X	X	X											
Primaquina (30 mg/dia)	X	X	X	X	X	X	X							
III Cloroquina (150 mg/comp.)	X	X	X											
Primaquina (15 mg/dia)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
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 foi alocado 10 pacientes em cada grupo de tratamento, com os devidos cuidados (vide critérios de inclusão) em se manter uma

amostra o mais homogênea possível, em termos de idade, parasitemia e histórico de infecção malárica.

4.6 Considerações Éticas

A pesquisa foi iniciada após a liberação formal e aceitação por parte da instituição em questão, FMT-AM, aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP) (anexo 02) sob o número 0016.0.114.000-08 e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos indivíduos que foram sujeitos à pesquisa, tendo em vista o atendimento às disposições da resolução CNS nº196/96, visando o bem estar dos participantes.

Todos os pacientes incluídos foram atendidos e acompanhados pelo Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda ou pela Dra. Maria Paula Mourão, ambos médico-pesquisador da FMT-AM.

4.7 Métodos

4.7.1 Dosagem do malondialdeído (MDA)

A determinação da concentração de malondialdeído (MDA) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando um sistema LC-20 A Prominence (Shimadzu, Japan) conforme método previamente proposto (FUKUNAGA et al, 1995). Brevemente, em uma amostra de 250 µl de plasma foi adicionado uma

quantidade de 250 µl de ácido tricloroacético a 10 %. Em seguida, adicionou-se 500 µl de ácido tiobarbitúrico a 1 % com posterior agitação em vortex. Logo após a agitação, incubou-se a amostra a 100° C por 30 minutos com a utilização de bolas de gude para evitar a evaporação dos reagentes. Ao passar o tempo exigido, esfriou-se a amostra em banho de gelo por cerca de 5 minutos. Adicionou-se 500 µl de isobutanol e levou-se ao vortex por 2 minutos. Centrifugou-se a amostra a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se a 150 µl de metanol diretamente no vial do aparelho (HPLC). 50 µl da amostra foi injetada no sistema contendo uma coluna C₈, 15 cm, 4.6mm (supelco). A fase móvel A foi tampão Fosfato pH 6,2 e a fase móvel B foi metanol HPLC 100%, com fluxo final de 10mL / minutos e leitura da absorbância de 532 nm..

4.7.2 Dosagem das Vitaminas A e E

A determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando um sistema LC-20 A Prominence (Shimadzu, Japan) conforme método previamente proposto (PAVLOS et al, 2004) Brevemente, numa amostra de 250 µl de plasma foi adicionado 25 µl do padrão interno (α - acetato de tocoferol) e 250 µl de metanol. Após isto, agitou-se a solução em vortex por 30 segundos com posterior adionamento de 2mL de hexano. Agitou-se novamente no vortex por mais 2 minutos e centrifugou-se a mistura por 5 minutos em 3000 rpm. Após a centrifugação retirou-se o sobrenadante e levou-se a resíduo com nitrogênio. Em seguida ressuspendeu-se em 250 µl de metanol: diclorometano (90:10) ,agitando até completa mistura. Injetou-se no aparelho 50 µl da solução. Foi utilizada uma coluna LC₁₈, 25 cm, 4,6 nm. A fase móvel

A foi composta de MeOH/H₂O e a fase móvel B de MeOH/diclorometano, em temperatura de 38°C, com fluxo constante de 1mL/min.

4.7.3 Dosagem da capacidade antioxidante e oxidante do plasma

A dosagem da Capacidade antioxidante Total (CAT) foi determinada pelo método de Erel et al 2004. Os resultados foram expressos em mmol equivalente de Trolox./L. A capacidade oxidante total (COT) no soro foi determinada pelo método de Erel 2005, que é baseado na oxidação do íon ferroso para íon férrico na presença de várias espécies oxidativas em meio ácido e na determinação do íon férrico pelo laranja de xilenol. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}$. Os métodos CAT e COT são colorimétricos e foram realizaddos de forma automatizada, utilizando o aparelho COBAS Mira Plus.

4.7.4 Dosagem de proteínas carboniladas

É um marcador da oxidação das proteínas. Pela ação das espécies reativas de oxigênio (ERO) alguns aminoácidos são modificados como a lisina e a arginina fornecendo derivados carbonílicos, os quais são os 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 pode-se analisar espectrofotometricamente no comprimento de onda entre 360-385 nm.

4.7.5 Dosagem do estresse oxidativo nas hemácias

Os mesmos testes acima descritos foram também realizados em hemácias lisadas, a fim de estudar os marcadores intra-eritrocitários.

4.7.6 Dosagem de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)

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

5. RESULTADOS

Durante o período de dezembro de 2008 a maio de 2009, foram coletadas amostras de 18 pacientes com malária *vivax* na FMT-AM, sendo 7 pacientes no esquema I, 6 pacientes no esquema II e 5 pacientes no esquema III. Os resultados a seguir estão divididos em clínicos e laboratoriais.

5.1 CLÍNICOS:

5.1.1 Sexo dos pacientes:

Dos 18 pacientes participantes do projeto contabilizou-se 13 (72,22%) do sexo masculino e 5 (27,78%) do sexo feminino (gráfico 01).

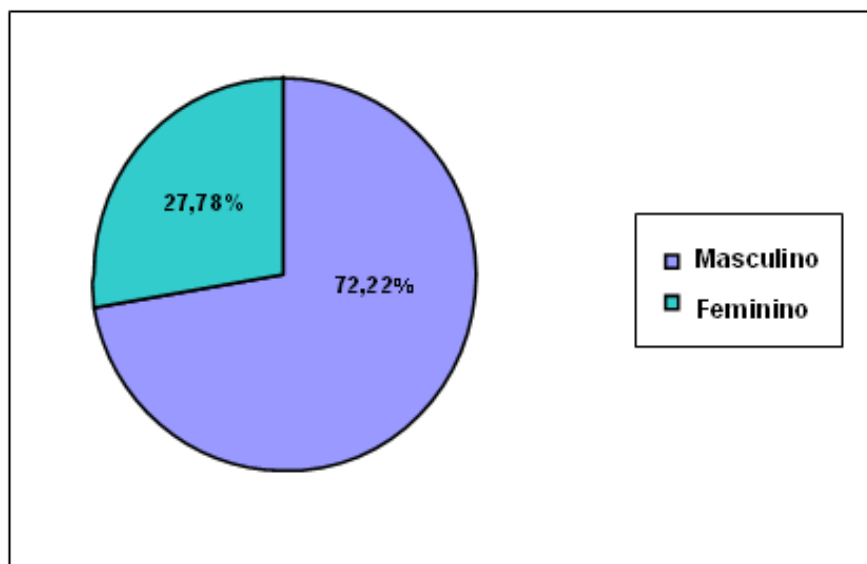


Gráfico 1: Porcentagem de pacientes do sexo masculino e feminino participantes do projeto.

5.1.2 Parasitemia dos pacientes:

Dentre os pacientes alocados na pesquisa 8 estavam com parasitemia de duas cruces (44,5%), 6 com parasitemia de meia cruz (33,3%) e 4 com parasitemia de uma cruz (22,2%) (gráfico 02).

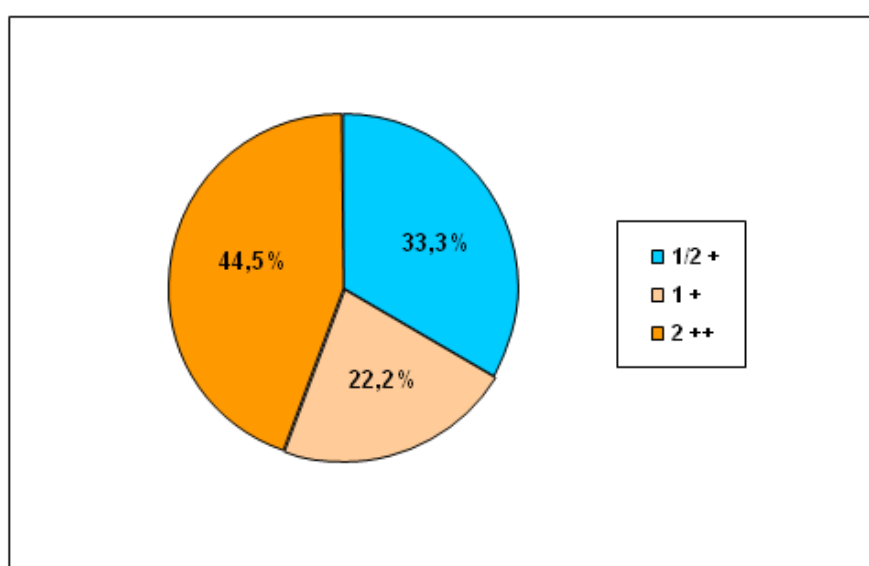


Gráfico 2: Porcentagem de pacientes com diferentes tipos de parasitemia para malária *vivax*.

5.1.3 Relação de Pacientes não fumantes e fumantes:

Ao total de 18 pacientes inseridos no projeto, apenas 5 (27,78%) era fumantes e 13 (72,22%) não possuíam o hábito de fumar (gráfico 3).

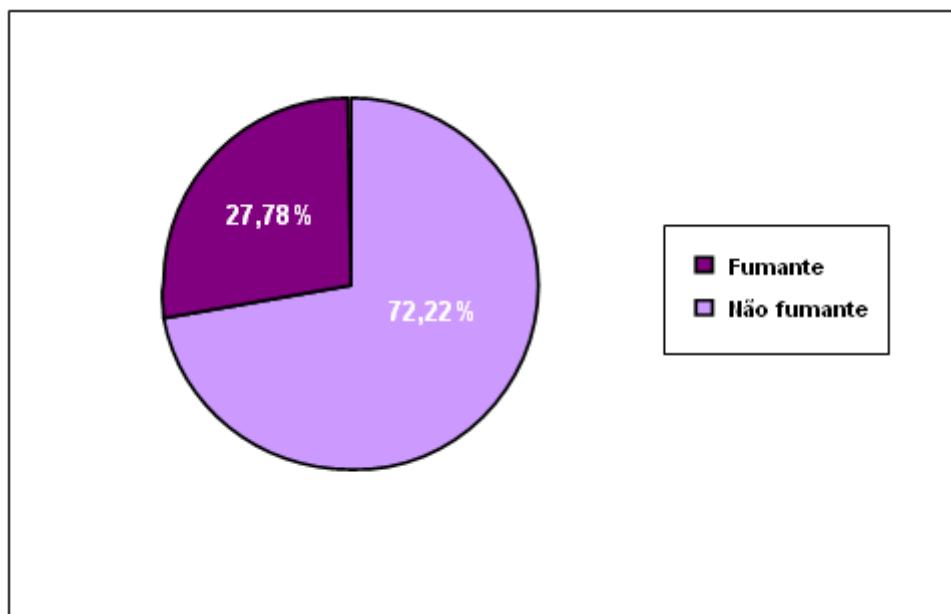


Gráfico 3: Porcentagem de pacientes não fumantes e fumantes do projeto.

5.2 LABORATORIAIS:

5.2.1 Dosagem de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)

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

5.2.2 Padronização do método de proteínas carboniladas

A padronização foi realizada com amostra de plasma de pessoa saudável, sendo que uma alíquota dessa amostra foi oxidada com AMVN adicionando 100 μ l/ml.

	Comprimento de onda
Amostra	0,381nm
Amostra oxidada	0,650 nm
Controle	0,244 nm
Controle Oxidado	0,223 nm

Tabela 2: valores de absorbâncias das amostras e controles utilizados na padronização do teste de proteínas carboniladas.

Realizada a leitura das amostras, foi montada uma curva padrão (gráfico 01), seguida da leitura dos controles em diluição 1:10 para posteriormente calcular a concentração de proteínas carboniladas em η mol/ml nas amostras.

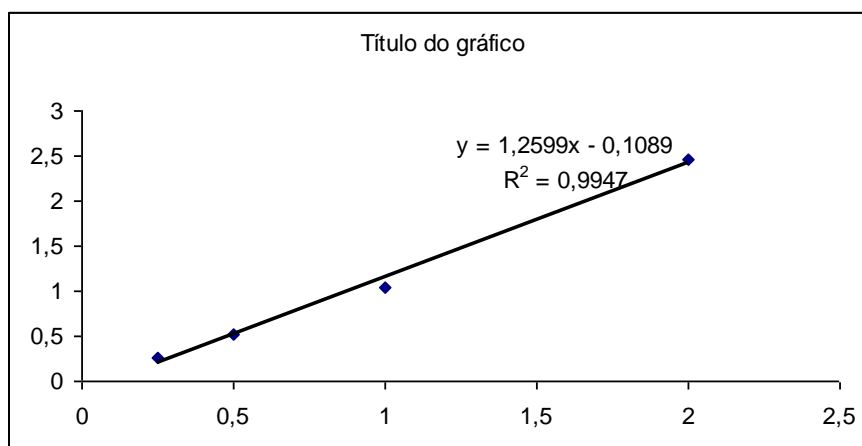


Gráfico 4: curva padrão de albumina soro bovina (BSA) nas concentrações entre 0,25 – 2,0 mg/ml.

Posteriormente, foi realizada a leitura dos controles com diluição de 1:10 com hidróclorido de guanidina:

	Comprimento de onda
Controle	0,200 nm
Controle oxidado	0,239 nm

Tabela 3: absorvâncias dos controles com diluição de 1:10.

A partir desses dados, pode-se fazer os seguintes cálculos:

$$\text{Proteína Carbonila (PC) } (\eta\text{mol/ml}) = \frac{\text{CA}}{0,22^*} \times 2,5$$

* é o coeficiente para dinitrofenilhidrazina em 370 nm

Onde: $\text{CA} = \text{Abs. amostra} - \text{Abs. controle}$

Com as absorbâncias dos controles diluídos em 1:10, pode-se fazer a relação com a concentração de albumina no gráfico e fazer o seguinte cálculo:

$$\text{Concentração de proteína (CP) (mg/ml)} = \text{a abs. do controle diluído em relação a curva} \times 2,5 \times 10$$

Então,

$$\text{Conteúdo de Carbonila } (\eta\text{mol/mg}) = \text{PC } (\eta\text{mol/ml}) / \text{CP } (\text{mg/ml})$$

A partir desses cálculos chegou-se aos seguintes resultados:

Conteúdo de carbonila = 2,4 $\mu\text{mol/mg}$

Conteúdo de carbonila oxidada = 7,5 $\mu\text{mol/mg}$

Vale ressaltar que em um plasma de pessoa saudável a concentração de proteínas carboniladas varia entre 0,5 – 4,0 $\mu\text{mol/mg}$

5.2.3 Dosagem de proteínas carboniladas

No gráfico abaixo pode-se observar os níveis plasmáticos de proteínas carboniladas em cada esquema de tratamento.

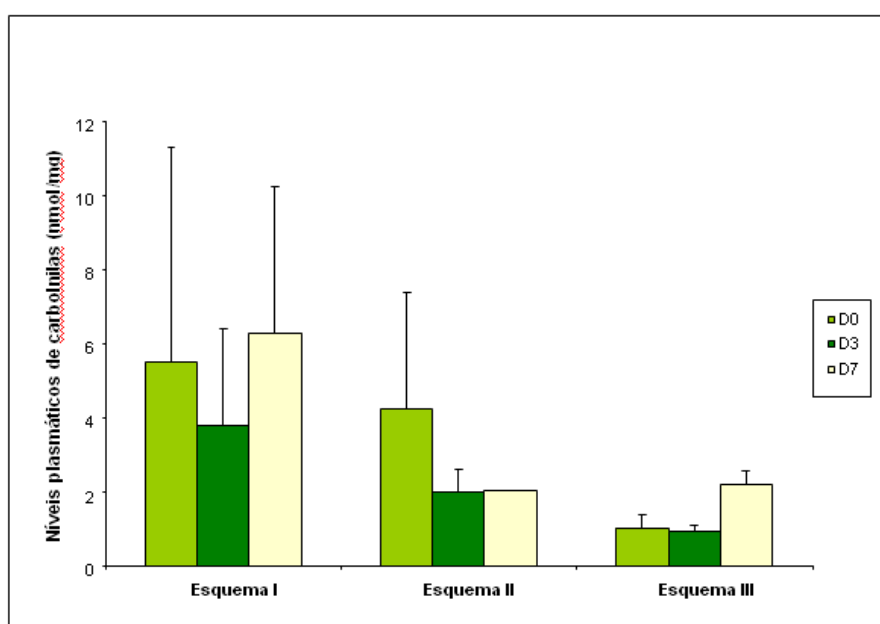


Gráfico 5: Níveis plasmáticos de proteínas carboniladas em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento.

5.2.4 Dosagens Bioquímicas

As dosagens de bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e albumina foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM onde pode-se observar os seguintes resultados:

- Bilirrubina Total (BT):

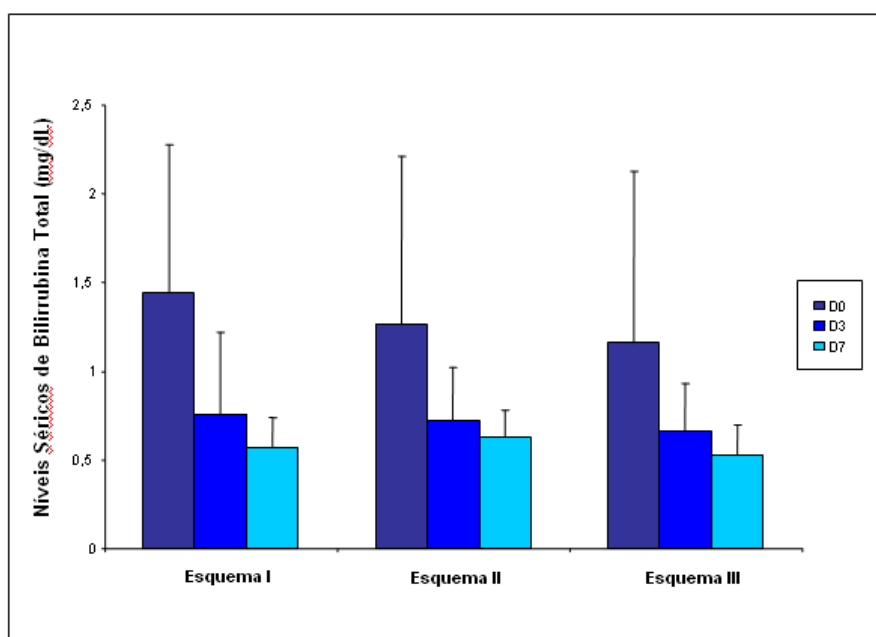


Gráfico 6: Níveis séricos de BT em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento.

- Bilirrubina Indireta (BI):

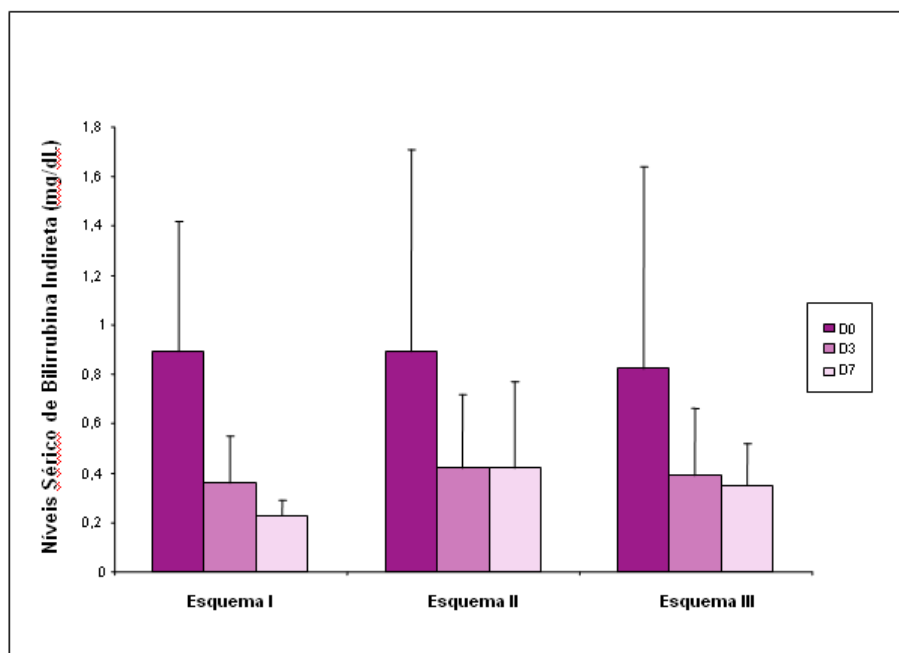


Gráfico 7: Níveis séricos de BI em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento.

- Bilirruina Direta (BD):

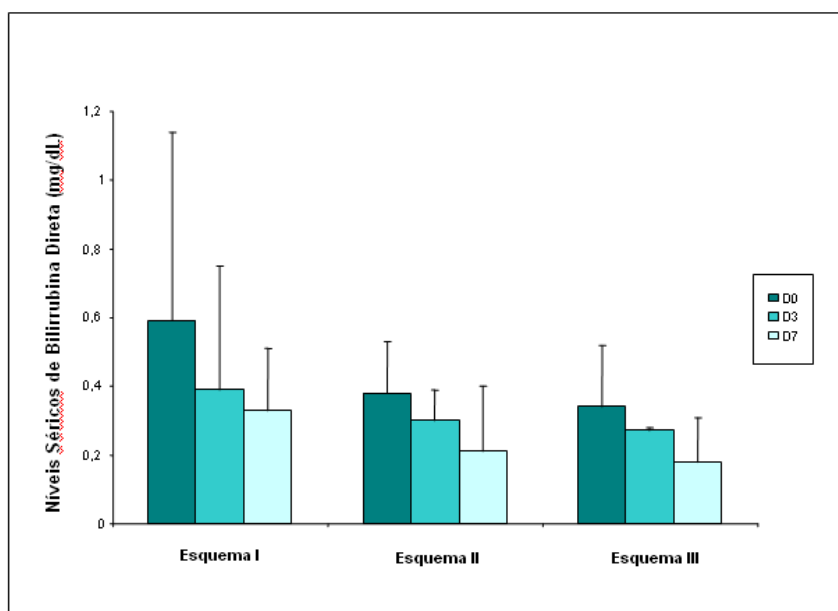


Gráfico 8: Níveis séricos de BI em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento.

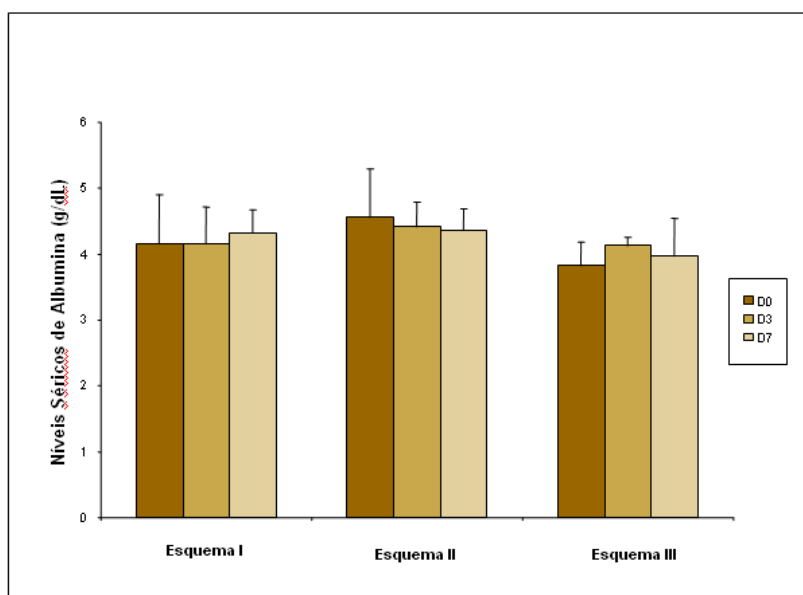
- Albumina:

Gráfico 9: 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.

5.2.5 Dosagem de MDA

Todas as amostras foram doseadas através do aparelho HPLC onde pode-se observar um pico no mesmo tempo de retenção do pico da substância padrão (figura 4):

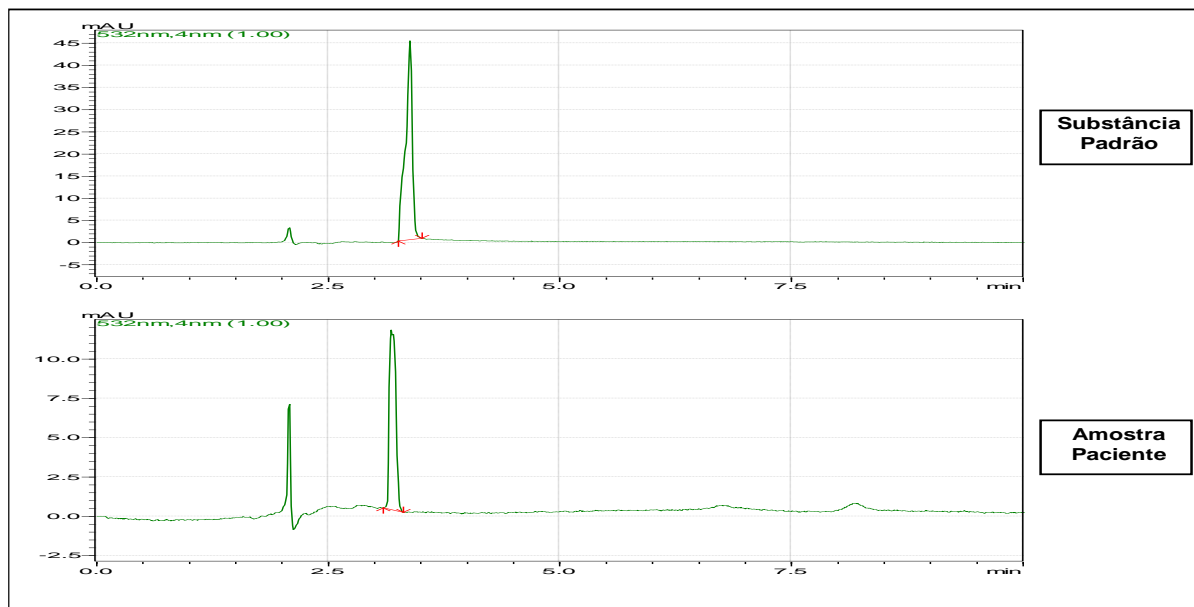


Figura 4: Picos de absorvância de um comprimento de onda específico em HPLC da substância padrão (tetraetoxipropano-MDA) e amostra de paciente com adição de BHT 0,2% respectivamente.

Posteriormente, através dos resultados obtidos, gerou-se o gráfico abaixo com os níveis plasmáticos de MDA em cada esquema de tratamento.

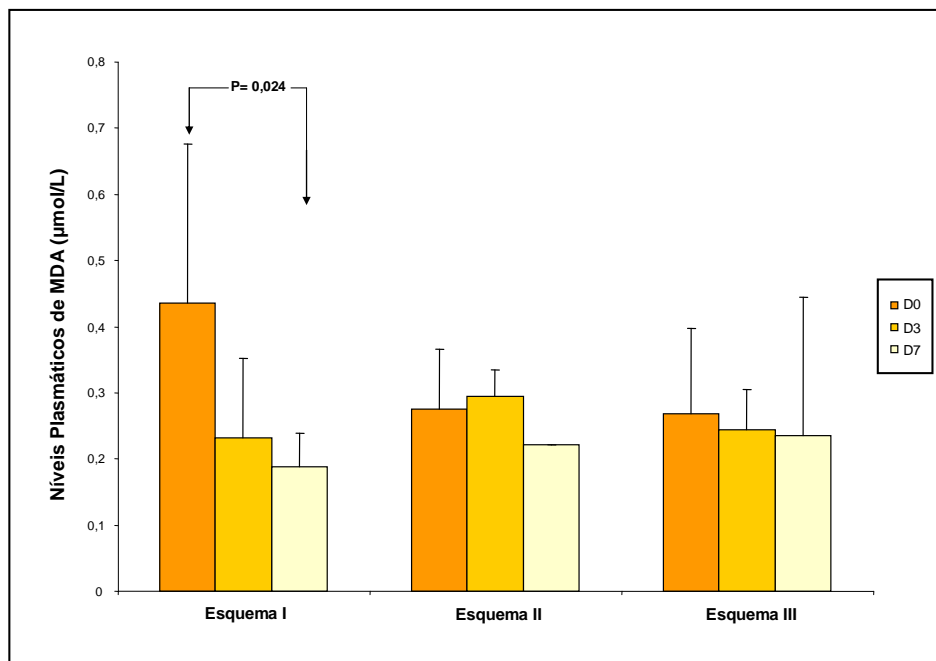


Gráfico 10: Níveis plasmáticos de MDA em cada esquema de tratamento para malária *vivax* com cloroquina e primaquina durante os dias 0, 3 e 7 do tratamento. Através do programa Sigma Stat, com o teste Man Whitney (não paramétrico), obteve-se um $P= 0,024$, mostrando que quando comparado o dia 0 com o dia 7 do esquema I de tratamento, há um decréscimo de concentração de MDA significativo.

6. DISCUSSÃO

6.1 Resultados clínicos:

A partir dos resultados pode-se observar que os pacientes alocados dentro da pesquisa foram na maioria homens (72,2%), não fumantes (72,2%) e com parasitemia heterogênea que variou de 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 de 2.096 casos positivos para malária no período entre Janeiro a Março de 2008, ocorreu uma queda significativa 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 e sendo primo-infectado ou não.

6.2 Resultados Laboratoriais:

As dosagens em concentrado de hemácia dos biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e Proteínas Carboniladas) não foram realizadas pelos seguintes fatores: espaço de tempo pequeno para realizar todos os testes, desta maneira, as dosagens plasmáticas e séricas foram priorizadas. Devido à mesma justificativa, não foi possível também padronizar os testes de Proteínas Carboniladas e MDA para dosear em concentrado de hemácias. Entretanto, o projeto foi renovado com o intuito de terminar todos os testes proposto na metodologia desde projeto.

Não foi possível realizar as dosagens de vitamina A e E pois os pacientes devem estar em jejum para uma dosagem com valores que indiquem a real concentração das vitaminas no organismo. Como a maioria das pessoas que procuram o serviço de diagnóstico de malária na FMT-AM não estão em jejum e também pelas coletas serem realizadas a qualquer hora do dia, não foi possível coletar de pacientes em jejum.

Também não foi possível dosear os parâmetros de CAT e COT. Ambos os métodos devem ser realizados dentro de 3 horas após a coleta da amostra. Como as

amostras eram coletadas na FMT-AM, ficava inviável transportar as amostras até o Laboratório de Bioquímica, situado na Faculdade de Ciência Farmacêuticas, durante essas três horas, dependendo do horário em que a coleta era realizada. Além disso, outros problemas técnicos ocorreram como dificuldades com o método automatizado.

Apesar do conteúdo carbonílico de proteínas ser amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo, não foi possível determinar um parecer em relação a qual esquema de tratamento causa um menor dano oxidativo ao organismo, de acordo com os resultados analisados. Provavelmente isso se deve ao fato de, dos 18 pacientes alocados na pesquisa, apenas as amostras de 9 pacientes foram doseadas por problemas técnicos, como, por exemplo, o término do reagente necessário no ensaio e que, no momento, está em falta no país. Dessa forma, não houve resultado suficiente para uma análise apropriada.

As dosagens bioquímicas (bilirrubina total, bilirrubina indireta e bilirrubina direta) mostraram um decréscimo significativo nas concentrações do dia 0 para o dia 7. 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.

Os níveis de albumina não foram alterados de forma significativa durante o período de tratamento da doença. No dia 07 pode-se observar um pequeno aumento de concentração de albumina em relação ao dia 0, o qual é um aspecto positivo (em situações patológicas como doenças hepáticas os níveis de albumina caem), todavia não foi um resultado relevante.

Em relação à dosagem de MDA, biomarcador padrão para o dano oxidativo, pode-se observar que o esquema I apresenta uma maior queda entre os dias 0, 3 e 7, em relação a concentração de MDA no plasma quando comparado com os outros dois esquemas terapêuticos. Utilizando o teste estatístico Mam Whitney (não paramétrico), pode-se observar que concentração de MDA do dia 0, quando comparada com a do dia 7, mostrou um $P= 0,024$ apontando uma queda significativa de MDA no plasma dos pacientes deste esquema.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho, apesar das limitações de contar com uma casuística relativamente pequena pelos obstáculos encontrados principalmente para inclusão de pacientes, permitiu concluir como um possível melhor esquema terapêutico para a doença em questão, o esquema preconizado pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, ou seja, o esquema com 3 dias de cloroquina com intervalo de dois dias e 7 dias de primaquina.

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). [Acesso em 09 de Março 2007]; Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/manual/index.htm>

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.; *Analyses. Biochemistry.* v. 248, n. 72, 1976.

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.

FUKUNAGA, K; TAKAMA, K; SUZUKI, T. High performance liquid chromatography determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure, *Anal. Biochem.*, v. 230, p20-23, 1998.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS - FMTAM. Informe Epidemiológico nº 1/2005.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS - FMTAM. Informe Epidemiológico Nº 11 - ano IV / 2009.

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.

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.; et al. 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.

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. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2001 .Manual de Terapêutica da Malária. Brasília (Brasil): [Atualizada em Dezembro de 2001; acesso em 6 de Março 2007]; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_terapeutica_malaria.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - Notificação de Casos. Brasil: 2007 [Acesso em: 05 de Maio de 2007]. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp.

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.

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

PAVLOS, F; CHATZIMICHALAKIS, V.F. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B* v. 805, n. 2, p. 289-296, 2004.

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

P.R Vade-Mécum Brasil – Medicamentos. Disponível em: : www.prvademecum.com, acesso em 01.04.08 às 13:00.

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 10.out.2005.

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. 2 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.

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; *et al.* 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.

VERONESI, R; FACACCIA, R. Tratado de Infectologia. Editora Atheneu, p. 1260-1500, 1998.

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

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

Nº	Descrição	Ago 2008	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2009	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Padronização de Técnicas	X	X	X									
	Coleta das Amostras				X	X	X	X	X	X			
	Análises Laboratoriais				X	X	X	X	X	X			
	Elaboração do Resumo e Relatório Parcial (atividade obrigatória)					X	X						
	Análise dos Resultados				X	X	X	X	X	X	X	X	
	Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												X

X = Atividades já realizadas

X = Atividades não realizadas.

10. ANEXOS

- Anexo 01:



PROJETO

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX SOB DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMENTO COM CLOROQUINA E PRIMAQUINA

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 armazen. 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.