



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PLASMA E ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX GRAVE**

CAMILA FABBRI

**MANAUS
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

CAMILA FABBRI

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PLASMA E ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX GRAVE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus V. G. Lacerda

**MANAUS
2012**

A todos os seres humanos que sofrem de
alguma forma com esta doença endêmica.
Que esta dissertação seja um avanço nas
pesquisas para combater este mal que
atinge milhões a cada ano.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos meus pais, Telma e Celso. Sem vocês a minha existência não teria menor sentido;

Ao namorado e companheiro Marco Antonio, sem ele as horas difíceis teriam sido insuportáveis. Obrigada pelo amor e pela paciência, sempre!

Ao meu orientador, Emerson Silva Lima e co-orientador, Marcus Vinícius Lacerda, por todo ensinamento e experiência que pude absorver nessa parceria que vem desde a iniciação científica;

Ao pessoal da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado: Ericilda, Stefanie, Marcela, Belisa, André, Márcia, Gisely, Tereza e Helena.

Aos pacientes controles que gentilmente cederam alíquotas de sangue para o desenvolvimento desta pesquisa;

A todos os alunos de graduação e pós-graduação dos laboratórios de Atividade Biológica I e II. Mas em especial as parceiras Giselle Bonfim, Patrícia Danielle e a Técnica Roseane;

Ao Seminário Laveran e Deane no qual pude participar e conhecer alunos e professores maravilhosos que pesquisam a doença malária. Obrigada por compartilhar a experiência de cada um de vocês!

À doutoranda, Rita de Cássia, por dividir seus conhecimentos, os momentos difíceis e cansativos dessa nossa jornada;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a CAPES pela bolsa concedida e o suporte financeiro do INCT Redoxoma;

E um agradecimento especial a todos os pacientes com malária. Sem a participação de vocês nesta pesquisa nada seria possível.

RESUMO

A malária humana é uma doença infecciosa, febril, aguda ou crônica, causada por protozoários transmitidos por vetores, sendo a doença mais amplamente distribuída no mundo e uma das doenças parasitárias mais prevalentes da atualidade. Cerca de 300 a 500 milhões de casos ocorrem anualmente e cerca de 1 a 2 milhões de pessoas - na maioria crianças - morrem de malária. 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. Embora a malária por *Plasmodium vivax* seja considerada a forma benigna da doença, com uma taxa de letalidade baixa em relação ao *Plasmodium falciparum*, ela pode causar uma doença grave, onde complicações como icterícia, anemia grave, insuficiência renal e complicações pulmonares são descritas. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio na concentração de substâncias oxidantes, os radicais livres, e antioxidantes, como enzimas, vitaminas C e E, β -caroteno. Na malária, o estresse oxidativo pode ser desenvolvido por dois mecanismos: através do parasita quando este ao se reproduzir gera espécies reativas e o sistema imunológico do hospedeiro, que lança mão dessas espécies reativas para tentar combater o parasita. Com o intuito de estudar o estresse oxidativo em pacientes com malária vivax grave que desenvolveram icterícia ao decorrer doença no plasma e eritrócitos, além de verificar a influência desta alta concentração de bilirrubina no estresse oxidativo, os seguintes grupos de pacientes foram estudados: malária não grave, malária grave apresentando icterícia, malária e co-infecção com dengue, pacientes saudáveis sem histórico de malária (grupo controle) e um paciente portador da deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase que contraiu malária. Em todos os pacientes foram mensurados os níveis de enzimas antioxidantes e o marcador de lipoperoxidação malondialdeído no dia zero (quando diagnosticado com malária) e no dia quatorze (livre de sintomas e parasitemia). Os níveis de malondialdeído e das enzimas celuoplasmina, lactato desidrogenase e glutatona redutase estavam aumentados ($p < 0,02$) no plasma de pacientes com malária grave em comparação ao grupo controle, diferentemente das enzimas catalase, superóxido dismutase e tioredoxina redutase onde os níveis estavam diminuídos ($p < 0,03$) em comparação ao grupo controle. Os níveis da enzima glutatona redutase e do marcador malondialdeído também mostraram níveis significativamente mais elevados no grupos malária grave quando comparado com o grupo malária não grave. A correlação entre os níveis de bilirrubina e glutatona redutase foi significativa ($p < 0.0001$) em todos os pacientes de cada grupo. Pacientes que desenvolveram malária e dengue apresentaram níveis de estresse oxidativo semelhante aos pacientes com malária grave. Com todos estes resultados, podemos concluir que os pacientes com malária vivax grave que desenvolveram icterícia apresentaram um maior estresse oxidativo do que os pacientes que contraíram a doença na forma mais branda. Dessa forma, estas altas concentrações de bilirrubina podem estar desempenhando a função de sinalizadoras do processo oxidativo em pacientes com malária.

Palavras-chave: malária, estresse oxidativo, antioxidante

ABSTRACT

The human malaria is an infectious disease, febrile, acute or chronic, caused by protozoa transmitted by vectors, being the disease more widely distributed in the world and one of the most prevalent parasitic diseases today. About 300 to 500 million cases occur annually and about 1 to 2 million people - mostly children - die from malaria. In the state of Amazonas, between January 2007 and March 2009, 22,081 cases of malaria were diagnosed and reported, with the largest record (14,249) in 2007. Although *Plasmodium vivax* malaria is considered a benign form of the disease with a low mortality rate in relation to *Plasmodium falciparum*, it can cause a serious disease where complications such as jaundice, severe anemia, renal failure and pulmonary complications are described. Oxidative stress occurs when there is an imbalance in the concentration of oxidants, free radicals, and antioxidants, such as enzymes, vitamins C and E, β -carotene. During the malaria disease, oxidative stress may be developed by two mechanisms: by the parasite, when it is to reproduce, generates reactive species and the host immune system, which makes use of these reactive species to try to combat the parasite. In order to study oxidative stress in patients with severe vivax malaria who developed jaundice in the course of the disease in plasma and erythrocytes, and also to check the influence of this high concentration of bilirubin in oxidative stress, the following groups of patients was studied: non-severe malaria, severe malaria presenting jaundice, concurrent malaria and dengue, healthy patients with no history of malaria (control group) and one patient with deficiency in the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase which contracted malaria. In all patients were measured the levels of antioxidant enzymes and lipid peroxidation marker malondialdehyde on day zero (when diagnosed with malaria) and on day fourteen (free of symptoms and parasitemia). The levels of malondialdehyde and the enzymes celuroplasmin, lactate dehydrogenase and glutathione reductase were increased ($p < 0.02$) in plasma of patients with severe malaria compared with the control group, unlike the enzymes catalase, superoxide dismutase and thioredoxin reductase where levels were decreased ($p < 0.03$) compared to the control group. The levels of glutathione reductase and malondialdehyde marker also showed significantly higher levels in severe malaria groups when compared with non-severe malaria group. The correlation between glutathione reductase and total bilirubin was significant ($p < 0.0001$) in all patients of each group. Patients who developed malaria and dengue fever showed levels of oxidative stress similar to patients with severe malaria. With all these results, we conclude the patients with severe vivax malaria who developed jaundice had a higher oxidative stress than the patients who contracted the disease in milder form. Thus, these high concentrations of bilirubin may develop the role of signaling to oxidation in patients with malaria.

Key-words: malaria, oxidative stress and antioxidant

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Malária no mundo.....	03
Figura 2	Número de casos de malária notificados nos meses do ano de 2011.....	04
Figura 3	Ciclo da malária.....	06
Figura 4	Esquema representativo de algumas reações presentes no processo de estresse oxidativo.....	18
Figura 5	Esquema representativo do sistema de defesa endógeno antioxidante do <i>Plasmodium falciparum</i>	19
Figura 6	Esquema de atividade oxireductase do sistema tioredoxina.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios de gravidade para malária.....	11
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CQ	Cloroquina
EO	Estresse oxidativo
FP	Ferroprotoporfirina
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro férrico
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida ou somente glutaciona
GSSG	Glutationa oxidada
G6PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
H ₂ O	Água
HO ₂ [·]	Hidroperoxila
HOCl	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN- γ	Interferon gama
IPA	Índice parasitário anual
L [·]	Alquila
LO [·]	Alcoxila
LOO [·]	Peroxila
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{-·}	Superóxido
OH [·]	Hidroxila
O ₃	Ozônio
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PQ	Primaquina
Prx	Peroxiredoxina
RBM	Roll back malária
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RL	Radical livre
SARA	Síndrome de angústia respiratória do adulto
SOD	Superóxido dismutase
-SH	Grupo tiol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Th1	Célula T com resposta 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral
Trx	Tioredoxina
TrxR	Tioredoxina redutase
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Epidemiologia e patologia da malária.....	03
2.2 Malária grave.....	10
2.3 Estresse oxidativo: conceito, impacto na doença malárica e enzimas antioxidantes.....	15
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Geral.....	24
3.2 Específicos.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Tipo de estudo.....	25
4.2 População de estudo.....	25
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	25
4.4 Amostragem.....	26
4.5 Considerações éticas.....	26
4.6 Procedimentos de coleta.....	27
4.7 Métodos.....	28
4.7.1 Análises bioquímicas e hematológicas.....	28
4.7.2 Teste qualitativo de Brewer para enzima G6PD.....	29
4.7.3 Isolamento de membrana eritrocitária (GHOST).....	29
4.7.4 Avaliação da estabilidade de membrana do eritrócito contra choque hipotônico.....	29
4.7.5 Determinação de malondialdeído (MDA).....	30
4.7.6 Determinação de tióis totais.....	30
4.7.7 Determinação de proteínas totais.....	31
4.7.8 Determinação da atividade das seguintes enzimas:.....	32
4.7.8.1 Catalase.....	32
4.7.8.2 Ceruloplasmina.....	32
4.7.8.3 Glutathiona peroxidase.....	33
4.7.8.4 Glutathiona redutase.....	33
4.7.8.5 Superóxido dismutase.....	33
4.7.8.6 Tioredoxina redutase.....	34
4.8 Análise Estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Manuscrito.....	37
6 CONCLUSÃO.....	60
7 REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES	

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país endêmico para malária ocasionada pelo *Plasmodium vivax*, sendo responsável por quase 50% do número total de casos de malária na América Latina. No ano de 2011, na cidade de Manaus, foram notificados cerca de 4.187 casos de malária (16,25% casos positivos de um total de 25.760 exames realizados) (FMT-HVD, 2011).

Embora o *P. vivax* seja conhecido como a terçã benigna, nos últimos anos foram relatadas complicações da infecção por malária *vivax* em áreas endêmicas, contrariando os paradigmas que apenas a malária ocasionada pelo *P. falciparum* era capaz de causar formas mais graves da doença. As complicações mais comuns encontradas são: icterícia, anemia grave, insuficiência renal aguda e complicações hepáticas (PRICE et al., 2009). Em um estudo publicado em 2010 realizado na cidade de Manaus, observaram-se dezessete pacientes os quais contraíram malária *vivax* apresentando complicações, sendo a mais comum, icterícia. Na malária, altas concentrações de bilirrubina podem estar ligadas a causas diretas como hepatite e hemólise, esta última, consequência da destruição de eritrócitos ocasionada pelo parasita. Como uma das causas indiretas, a hemólise ocasionada em pacientes com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase induzida pelos medicamentos antimaláricos. Sabe-se que a bilirrubina pode desenvolver propriedades antioxidantes ou pró-oxidantes. Em altas concentrações no organismo, ela pode gerar efeitos deletérios em tecidos gerando estresse oxidativo e lipoperoxidação (ANAND & PURI, 2005; KUMAR et al., 2008; ALEXANDRE et al, 2010).

O estresse oxidativo, definido como o desequilíbrio de substâncias oxidantes e antioxidantes no organismo, é mantido no corpo humano como um mecanismo de

defesa contra infecção malarial além de o próprio parasita gerar radicais livres ao se reproduzir no organismo (EREL et al., 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Nos eritrócitos, as atividades de todas as enzimas diminuem ou aumentam, dependendo da resposta do organismo, e células fagocíticas liberam mediadores imunológicos para o ambiente ao redor dos eritrócitos. Como resultado, o estresse oxidativo é intensificado no sangue devido ao conjunto: agente infeccioso e a resposta imune do organismo. (DONDORP et al., 2000; KOCHAR et al., 2005)

Diante de todos os fatores expostos, estudar a malária e o estresse oxidativo é de vital importância para elucidar possíveis complicações da doença ocasionadas pelos mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, o estresse oxidativo não está completamente elucidado na malária, ainda existem diversos mecanismos de ação de enzimas antioxidantes e oxidantes que não foram abordados na literatura. Como também, existem poucos estudos que caracterizam a malária grave ocasionada pelo *P. vivax*. Dessa forma, estudar o perfil de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com malária vivax grave serão de grande importância para apontar caminhos para o entendimento da patogênese da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia e patologia da malária

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica com manifestações de caráter agudo, crônico ou recorrente. É causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* o qual é inoculado pelo mosquito do gênero *Anopheles*. As quatro espécies que infectam os seres humanos são *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. vivax*. Em 2008, foram estimados cerca de 243 milhões de casos de malária no mundo (Figura 1). A maioria dos casos foi na região da África (85%), seguida pela Ásia (10%) e o leste de regiões mediterrâneas (4%). No Brasil, 83,7% dos casos são ocasionados pelo *P. vivax*, 16,3% pelo *P. falciparum* e uma pequena proporção por *P. ovale*. (ROLL BACK MALARIA, 2005; FREVERT & NARDIN, 2005; OMS, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA, 2010).

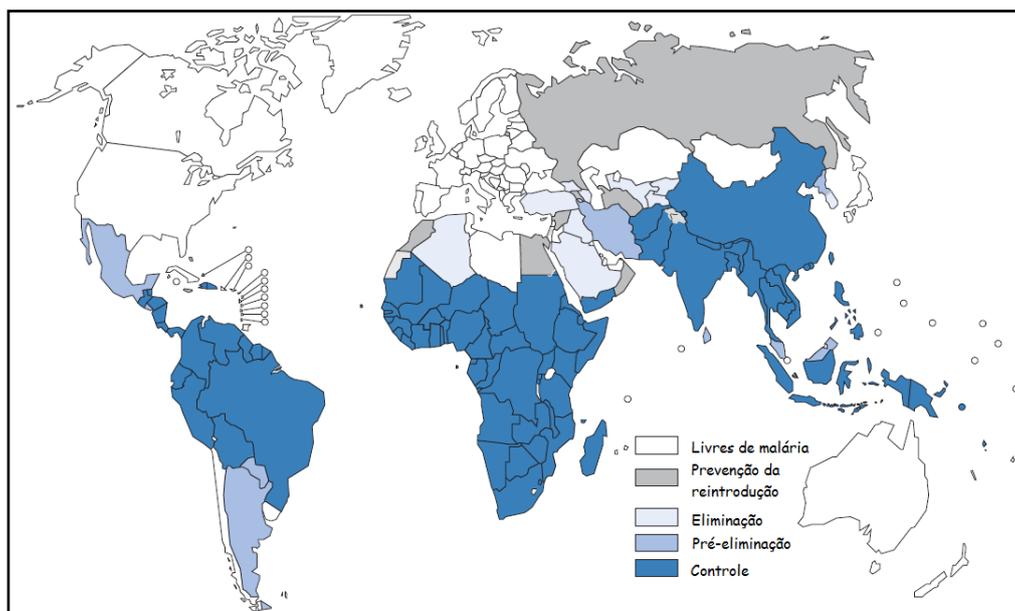


Figura 1: Malária no Mundo. Fonte: Adaptado de World Malaria Report (2009).

No Brasil, aproximadamente 99,5% dos casos de malária ocorrem na Região Amazônica, sendo que no ano de 1999 houve o maior número de casos, cerca de 637.470. 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 (SANTANA et al., 2007; FMT-HVD, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA, 2010). Durante este ano de 2011, embora a doença continue sendo endêmica na região, os números continuaram decrescendo. No estado do Amazonas foram diagnosticados 4.187 casos de malária (16,25% de um total de 25.760 exames realizados), sendo que no mês de julho ocorreu o maior número com 579 (13,8% do total de casos positivos) casos notificados (Figura 2) (FMT-HVD, 2011).

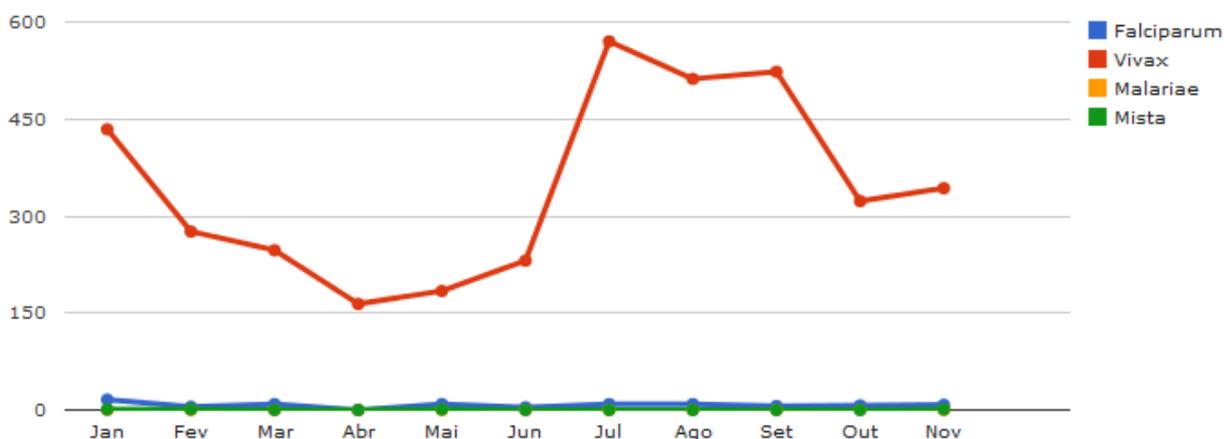


Figura 2: Número de casos de malária notificados nos meses do ano de 2011. Fonte: FMT-HVD (2011).

O ciclo da malária (Figura 3) é composto por duas etapas: a sexuada, que ocorre dentro do mosquito vetor da doença, e a fase assexuada. Esta última se inicia quando a fêmea do gênero *Anopheles* injeta cerca de quinze a vinte esporozoítos na circulação. Estes atingem as células do fígado (hepatócitos), em média dentro de um minuto, e

começam a se reproduzir, tornando-se esquizontes. Essa etapa é conhecida como esquizogonia hepática. Os esquizontes rompem os hepatócitos e centenas de merozoítos são liberados na corrente sanguínea (um esquizonte gera cerca de trinta e dois merozoítos). O tempo de ruptura dos hepatócitos pelos esquizontes é geralmente entre uma a duas semanas, dependendo da espécie do plasmódio. Na corrente sanguínea os merozoítos invadem os eritrócitos e se transformam em trofozoítas jovens (forma em anel) que originam os esquizontes hemáticos. Essa etapa é conhecida como esquizogonia eritrocítica. A ruptura do esquizonte libera novos merozoítos que parasitam outras hemácias repetindo o ciclo. Desde a invasão dos eritrócitos até a liberação de novos merozoítos na corrente sanguínea o *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* utilizam 48 horas, ao passo que o *P. malarie* gasta 72 horas. Os merozoítos podem, ainda, se transformar em formas sexuadas, os gametócitos. A ingestão destes pelo vetor da doença dá início ao ciclo sexuado, onde 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 (FAIRHUST & WELLENS, 2000; ASHLEY et al., 2006).

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).

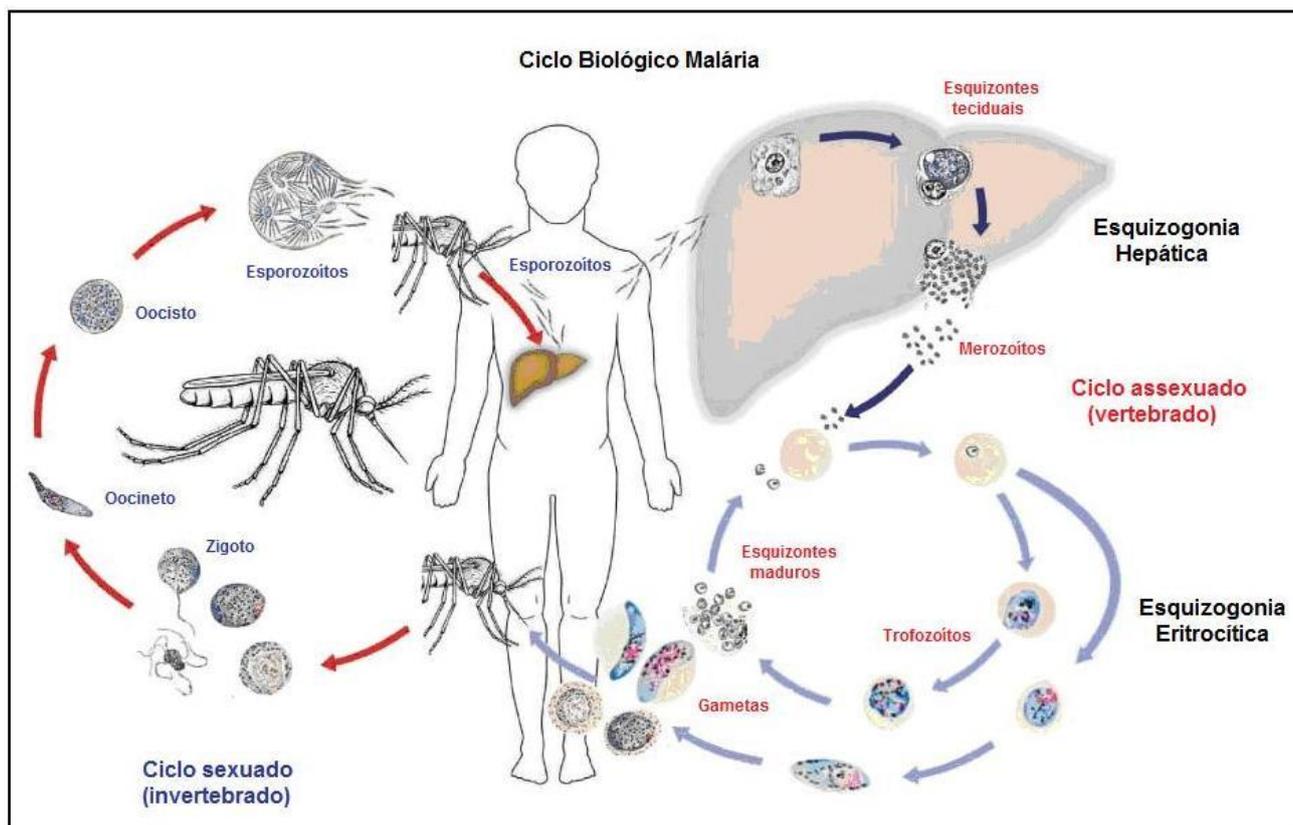


Figura 3: Ciclo da malária. Fonte: Adaptado de atlas-malaria.com (2010).

Os sintomas da doença surgem durante o ciclo eritrocítico do parasita. Eles desenvolvem-se cerca de 7 a 10 dias após a picada do mosquito. Na malária *vivax*, entretanto, os sintomas podem surgir após meses devido ao período de latência do protozoário, explicado anteriormente (WALKER et al., 2009; GARCIA, 2010).

Os primeiros sinais e sintomas da doença tendem a ser inespecíficos e são semelhantes aos sintomas de uma doença sistêmica viral menor. Caracteriza-se por: febre, dor de cabeça, falta de apetite, dor no corpo, vômito e calafrios. Estes acontecem durante o “acesso malárico”, que ocorre durante a lise das hemácias pelo parasita. (LIMA et al., 1992; ASHLEY, 2006). Nesta fase inicial, sem evidência de disfunção de órgãos vitais, os pacientes podem ser prontamente tratados com rápida recuperação, desde que o tratamento seja eficaz. Se, no entanto, os medicamentos são ineficazes ou

se o tratamento for tardio, a carga parasitária continua a aumentar e, como consequência, uma malária grave pode ocorrer (OMS, 2010).

Além da carga parasitária, a intensidade dos sintomas irá também depender 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).

A fisiopatologia da doença não é completamente elucidada. O *Plasmodium falciparum* é conhecido como a terçã maligna. Em alguns casos pode desenvolver malária grave, a qual será discutida no próximo tópico (WALKER et al., 2009).

A virulência do *P. falciparum* é multifatorial e envolve (WALKER et al., 2009; GARCIA, 2010):

- Sequestração de eritrócitos da microcirculação causando hipóxia nos tecidos, especialmente no cérebro.
- Infecção de toda a fase de maturação dos eritrócitos (por exemplo, reticulócitos) diferentemente das outras espécies de *Plasmodium*, tendo a capacidade de constituir uma alta parasitemia.
- Ativação de vários complexos do sistema imune, liberando citocinas. Tem sido demonstrado que o pigmento malárico e complexos de anticorpos estimulam macrófagos, monócitos e outras células a liberarem citocinas. Estas podem causar febre e mediar a morte do parasita, liberando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Esses fatores podem gerar uma doença mais complicada, denominada malária grave. Esta é mais comum em pacientes infectados por *Plasmodium falciparum*.

A malária ocasionada pelo *Plasmodium vivax* é conhecida como a terçã benigna e, geralmente, se manifesta de uma forma mais branda. É a espécie mais importante

causadora da doença e é responsável por cerca de 40% dos casos em todo o mundo (OMS, 2010).

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 e baixa morbidade (MENDIZ et al., 2001; ALEXANDRE, 2004).

Apesar da implementação de estratégias de controle da malária no Brasil, as crianças continuam sendo afetadas em grande escala. Em 2008, o índice parasitário anual (IPA), em crianças maiores de 14 anos, era de 11 casos/1000 habitantes, entretanto o IPA em crianças de 5 a 14 anos apresentou um índice de 14,3/1000 habitantes. A maioria das crianças vive em áreas endêmicas e sofrem de múltiplos episódios antes de chegarem à fase adulta. Geralmente, os episódios são agudos, sem complicação, e após tratamento adequado, a recuperação das crianças é aparentemente satisfatória (VITOR-SILVA, 2009).

A meta estabelecida pela parceria entre os Estados-Membros na Assembléia Mundial da Saúde e da Roll Back Malária (RBM), uma instituição mundial que através de ações coordenadas tem como objetivo erradicar a malária, é reduzir o número de casos e de óbitos registrados em 2000 por 50% ou mais até o final de 2010 e por 75% ou mais até 2015 (OMS, 2009).

O método mais utilizado para o diagnóstico da doença é o da microscopia da gota espessa de sangue, colhida por punção digital e corada pelo método de Walker. Ele é considerado o padrão-ouro para a detecção e identificação dos parasitos da malária, e ainda é sensível a densidades baixas de parasitos quando realizado de forma cuidadosa pelo microscopista. A gota espessa permite diferenciação entre as espécies e a

visualização dos estágios de evolução do parasito circulante (SUH et al., 2004; ASHLEY, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Outra forma de se realizar o diagnóstico é através de testes rápidos imunocromatográficos onde ocorre a detecção de antígenos por anticorpos monoclonais. A sensibilidade para *P. falciparum* é maior que 90%, quando comparado com a gota espessa, para densidades maiores que 100 parasitos por µl de sangue. Entretanto, não são capazes de distinguir *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Além disso, possuem um custo elevado em relação ao teste padrão-ouro. No Brasil, o teste é apenas indicado em locais onde a realização do diagnóstico é dificultada pela distância geográfica e a falta de serviço de saúde. (ASHLEY, 2006; WALKER et al., 2009; MS, 2009).

Para o controle da malária é necessário incluir estratégias de prevenção como vacinas e mosquiteiros tratados com inseticida. O tratamento contra malária *vivax* deve ser eficaz prevenindo recaídas (eliminação das formas hipnozoíticas nos hepatócitos). Essa eliminação é especialmente difícil porque as drogas disponíveis podem causar hemólise grave em indivíduos com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (ROGERSON & CARTER, 2008).

Vacinas contra o *P. vivax* estão em desenvolvimento. Um dos alvos é a proteína Duffy binding, que medeia a invasão de merozoítos de hemácias. Outro alvo são as proteínas de superfície Pvs25 dos gametócitos. Estes já estão na fase I nos testes em humanos. (ROGERSON & CARTER, 2008).

2.1 Malária grave

A malária grave geralmente se manifesta com uma ou mais das seguintes complicações: malária cerebral, anemia grave, trombocitopenia, icterícia, ruptura do baço, insuficiência renal aguda e síndrome respiratória aguda grave (PRICE et al., 2007; TAN et al., 2008; OMS, 2010). Nessa fase da doença, a letalidade nas pessoas que recebem o tratamento normalmente é de 10-20%. No entanto, se não for tratada, a malária grave é fatal na maioria dos casos. A Organização Mundial de Saúde possui critérios para determinar a gravidade da doença, que estão descritos na Tabela 1 (OMS, 2009).

Infecção por *P. vivax* são classificadas entre as malárias chamadas benignas, embora seja cada vez mais reconhecido que complicações graves e até fatais podem ocorrer, como na malária *P. falciparum*. Em regiões endêmicas, tem sido relatada uma proporção significativa de pacientes admitidos em hospitais com malária *vivax* grave. Recentes estudos na Indonésia, Papua Nova Guiné, Tailândia e Índia mostraram um aumento no índice de 20 a 40% (PRICE et al., 2009). Isso tem sido possível com a aplicação do diagnóstico molecular, o qual tornou evidente que a monoinfecção por *P. vivax* também pode estar envolvida na disfunção de múltiplos órgãos e doença grave com risco de vida (KOCHAR et al., 2009).

Os mecanismos subjacentes de manifestações graves não são totalmente compreendidos. E, atualmente, se sabe menos sobre a patogênese das complicações graves em *P. vivax* do que em *P. falciparum*. É sabido que alguns dos fatores que faz o *P. falciparum* ser a terçã maligna é a sequestração de eritrócitos da microcirculação e citoaderência (WALKER et al., 2009). Entretanto, CARVALHO et al. (2010) mostraram que algumas cepas de *P. vivax* também tem a capacidade de citoaderência *in*

vitro. Estas observações levam a uma alteração dos paradigmas atuais da patogenia da malária e encaminha para uma possível explicação para *P. vivax* também se manifestar na forma grave em alguns pacientes.

Tabela 1: Critérios de gravidade para malária de acordo com a OMS

Malária Cerebral	Definida como estado de coma não atribuível a outras causas
Anemia	Com hemoglobina ≤ 7 g/dL
Insuficiência renal aguda	Com creatinina $\geq 3,0$ mg/dL
Edemal pulmonar	
Síndrome de angústia respiratória do adulto (SARA)	
Hipoglicemia	Dosagem de glicose sanguínea de 40 mg/dL
Sangramento espontâneo	
Icterícia	Bilirrubina total ≥ 3 mg/dL
Hemoglobinúria	
Choque	
Parasitemia elevada	$>$ que 5% de eritrócitos parasitados ou $>$ que 250.000 parasitos/ μ L

Fonte: OMS (2009)

A malária vivax grave tem grande contribuição para a anemia em áreas endêmicas. Neste caso, ela recebe o termo de “anemia por malária grave” (TAN et al., 2008). Sabe-se hoje que o clearance de hemácias que ocorre em pacientes com a doença possui um número muito mais elevado de hemácias saudáveis, não infectadas, do que

hemácias parasitadas (FENDEL et al., 2010). Segundo HALDAR & MOHANDAS (2009), é possível que isso ocorra pelo fato de antígenos parasitários também estarem presentes durante a invasão do protozoário no eritrócito. Muitos desses antígenos são codificados por proteínas adesivas do eritrócito que também são encontradas em altos níveis no plasma. É possível que essas proteínas fixam-se a eritrócitos não infectados resultando em ação de IgG ou ainda, do sistema complemento. Dessa forma, eritrócitos não infectados são retirados da circulação sanguínea. Além desse possível mecanismo de clearance de eritrócitos, outros fatores podem influenciar na formação de uma anemia por malária grave como dano oxidativo e redução da deformabilidade do eritrócito, onde parâmetros como rigidez, volume e viscosidade são afetados. (DONDORP et al., 2000; HALDAR et al., 2007; HALDAR & MOHANDAS, 2009).

Além da anemia, uma das complicações que mais acometem os pacientes que desenvolvem malária vivax grave é a icterícia. Este mecanismo é ocasionado quando altas concentrações de bilirrubina são encontradas no sangue e nos tecidos. As causas da icterícia na malária podem ser diretas como a hepatite e a hemólise intravascular ocasionada pelo parasita, ou indiretas como ocorre em pacientes deficientes da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) que contraíram malária e desenvolveram hemólise induzida pelos medicamentos antimaláricos. Esta enzima tem como função proteger os eritrócitos assegurando estabilidade e viabilidade, gerando um potencial redutor regenerando o NADPH. Dessa forma, em pessoas que possuem esta deficiência, este potencial não é gerado, o eritrócito fica suscetível a danos ocasionados pelo parasita e pelos medicamentos utilizados para combatê-lo, gerando hemólise e um grande processo oxidativo em pacientes com malária (ANAND & PURI, 2005; BEUTLER & DUPARC, 2007).

Outros autores relataram casos isolados de pacientes que desenvolveram malária grave por *P. vivax*. TAN et al. (2008), descreveram um caso de viajante que retornou com infecção de *P. vivax* e desenvolveu lesão pulmonar aguda em três dias de tratamento. Malária cerebral também foi relatada, mas com menos frequência em outros casos. A literatura indica que os casos de malária cerebral associado a *P. vivax* foram descritos desde 1921. A presença da infecção por *P. falciparum* não pode ser definitivamente excluída, mas em quatro casos, a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada e confirmou apenas a presença de *P. vivax*. (ROGERSON & CARTER, 2008; TAN et al., 2008).

Em países como Índia e Nova Papua Guiné tem sido relatados diversos casos de malária grave ocasionada por *P. vivax*. Tem sido descrito pacientes apresentando complicações como: icterícia, insuficiência renal, anemia grave e disfunção hepática. Houve relatos de coma, mas raro quando comparado com os casos de malária *falciparum* grave. Trombocitopenia grave e acidose também foram relatadas (KOCHAR et al., 2009; PRICE et al., 2009; SINGH et al., 2011).

Nos últimos anos, complicações clínicas com casos fatais têm sido encontradas na Região Amazônica e preocupado a comunidade brasileira de malariologistas. Em 2004, uma pesquisa estudou clinicamente e epidemiologicamente pacientes com malária *vivax* grave no Amazonas. A maioria dos pacientes com a doença eram crianças menores de 4 anos (18,5%) e do sexo masculino (63,7%). No ano de 2010, foi publicado um estudo o qual relatou a caracterização de 17 pacientes diagnosticados por malária *vivax* grave internados em um hospital de referência na cidade de Manaus. Dentre as complicações relatadas estavam anemia grave, icterícia, insuficiência renal aguda, choque e SARA. Neste estudo, os pacientes estavam dentro de uma faixa etária extremamente ampla (de 28 dias a 80 anos de idade). Ambos os estudos confirmam um

perfil semelhante a outros casos da América Latina, como na Venezuela onde ocorreram casos em crianças e no estado de Rondônia, no qual casos em adultos foram confirmados. Estes dados mostram que a malária grave por *P. vivax* abrange uma ampla faixa etária (ALEXANDRE, 2004; DANIEL-RIBEIRO et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2010).

Alguns estudos recentes apontam possíveis marcadores para o diagnóstico de gravidade da doença. Citocinas inflamatórias, como TNF-alfa e agentes antioxidantes têm sido associados com a gravidade clínica de infecções por *P. vivax*. No entanto, os dados que validam a sua sensibilidade e confiabilidade ainda são escassos. Outro possível marcador são ácidos nucleicos circulantes (CNAs) no plasma. Eles estão significativamente aumentando em pacientes com malária vivax quando comparado com pessoas saudáveis e está altamente associado com parâmetros que apontam morbidade na malária vivax (ANDRADE et al., 2010; FRANKLIN et al, 2011).

Nas últimas duas décadas, cepas resistentes de *P. vivax* na Ásia, América do Sul e, mais recentemente, na África tem sido relatadas. A prevalência global e as consequências das drogas resistentes a *P. vivax* permanecem pouco documentadas, refletindo tanto as dificuldades associadas com o teste *in vivo* de malárias recorrentes e a crença, muitas vezes sem fundamento, que a cloroquina continua a ser eficaz (PRICE et al., 2009).

A resistência aos medicamentos em si poderia ser um controlador de gravidade, juntamente com a elevada força de transmissão da malária em determinadas regiões. Onde *P. vivax* é encontrada de forma mais ampla, as implicações para o controle da infecção são maiores, especialmente porque o *P. vivax*, invariavelmente, aumenta em relação a *P. falciparum* com a sua transmissão mais eficaz (ROGERSON & CARTER, 2008).

O tratamento da doença na sua forma grave deve ser eficaz, e é realizado da mesma forma na malária causada por *P. falciparum* e consiste em artesunato + clindamicina, artemether + clindamicina ou ainda, quinina + clindamicina (TAN et al., 2008; MS, 2009; OMS, 2010).

2.3 Estresse oxidativo: conceito, impacto na doença malárica e enzimas antioxidantes

O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e substâncias antioxidantes em nível celular, onde os pró-oxidantes estão em níveis mais elevados em relação às substâncias antioxidantes. As Espécies reativas de oxigênio (ROS) são os pró-oxidantes mais importantes (EREL et al., 1997; PABÓN et al., 2003).

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Além disso, as ROS têm importante função na fagocitose, fenômeno em que são produzidas para eliminar o agente agressor. Durante o processo de formação de H_2O citado acima, ocorre a formação de intermediários reativos, como os RL superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). O ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o ácido hipocloroso ($HOCl$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete ($^1\Delta_g O_2$) e o ozônio (O_3) não são RL, mas podem induzir reações radicalares no organismo, sendo assim também considerados como espécies reativas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; LIMA & ABDALLA, 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

Radicais livres (RL) são definidos como quaisquer átomos ou moléculas com um ou mais elétrons pareados na sua órbita externa que podem existir independentemente por um período de tempo. Eles sempre reagem com outras moléculas, buscando configuração eletrônica pareada e, portanto, quimicamente estável. Podem doar elétrons (atividade redutora) ou captar elétrons (atividade oxidante), ou simplesmente reagir com outros radicais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O radical $\text{OH}\cdot$ é considerado a ROS mais reativa e mais lesiva, sendo a principal responsável pelo dano oxidativo em moléculas. A combinação extremamente rápida do radical $\text{OH}\cdot$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzida confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o radical $\text{OH}\cdot$ ocasiona danos nas proteínas, inativação enzimática, e ainda, pode gerar um processo chamado lipoperoxidação (LPO), que será discutido posteriormente (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; EREL, 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

Apesar de não ser um RL, como foi dito anteriormente, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical $\text{OH}\cdot$ (Reação de Fenton). De vida longa, é um intermediário formado pela reação de dismutação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), pela redução de dois elétrons na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases *in vivo*, localizadas nos peroxissomas. É altamente tóxico para as células, sendo extremamente difusível entre elas. Sua toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro agindo como um catalisador. Reage lentamente com tióis, cobre reduzidos e proteínas do heme, além de também participar da reação de LPO (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007).



Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, como por exemplo, macromoléculas, tais como açúcares e DNA. Entretanto, a membrana e lipoproteínas são os mais atingidos em decorrência da LPO. Através dela, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; LIMA & ABDALLA, 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante de ataques de um RL (geralmente $\text{OH}\cdot$) sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente os radicais alquila ($\text{L}\cdot$), alcoxila ($\text{LO}\cdot$) e peroxila ($\text{LOO}\cdot$) (LIMA & ABDALLA, 2001; VASCONCELOS et al., 2007). A figura 4 apresenta um resumo de alguns mecanismos presentes no estresse oxidativo gerado pelos RL com conseqüente formação de LPO na célula lesionada.

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lípidos é a dosagem de malondialdeído (MDA). Ele é um dialdeído formado como um produto secundário da LPO, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico. É considerado um candidato potencial como um marcador geral de dano oxidativo em plasma. Reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) gerando cromógeno de cor rosa fluorescente, o TBARs. Este produto absorve luz no comprimento de onda de 532 nm. Possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (LIMA & ABDALLA, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007; ANTUNES et al., 2008).

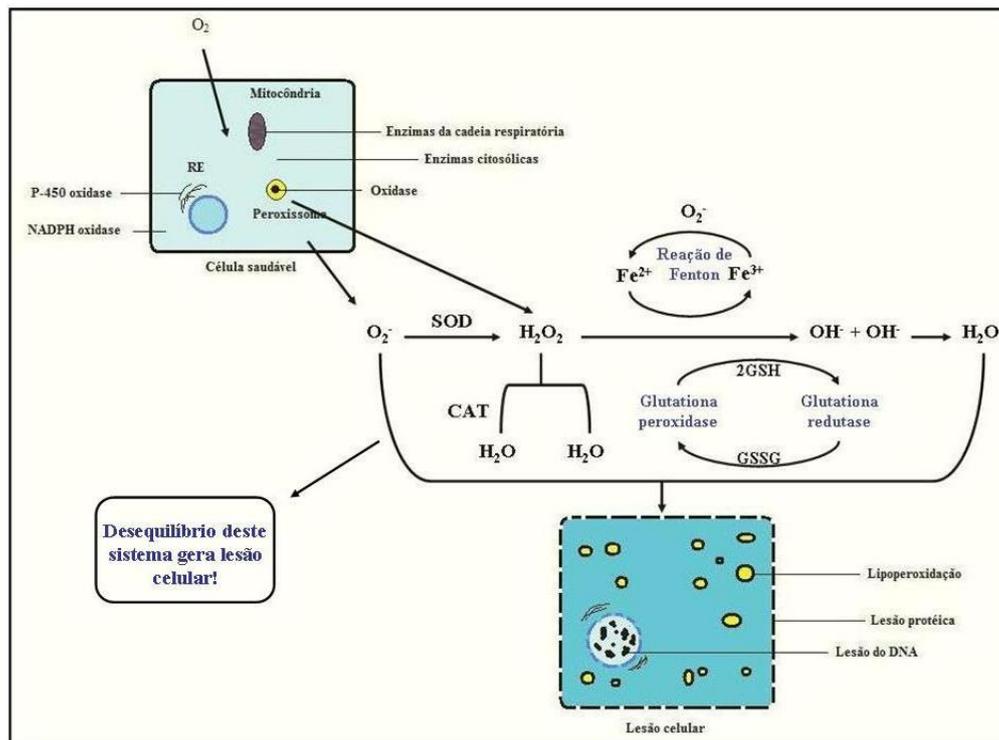


Figura 4: Esquema representativo de algumas reações presentes no processo de estresse oxidativo.

Fonte: Adaptado de lookfordiagnosis.com (2011).

Alguns estudos têm relatado que a geração de ROS e consequentemente, o EO possuem papel crucial no desenvolvimento de complicações sistêmicas na malária (DOCKRELL et al., 1986; GUHA et al., 2006; SOHAIL et al., 2010).

A produção de ROS durante a infecção da malária ocorre através de dois mecanismos separados. Um deles envolve a degradação da hemoglobina pelo parasita com o objetivo de gerar um bioproduto para a sua nutrição. Neste mecanismo, o Fe^{2+} é oxidado na forma Fe^{3+} , o heme é separado da globina, e os elétrons produzidos durante este processo reagem com o oxigênio molecular para formar as ROS, inclusive H_2O_2 e O_2^- . Para combater essas espécies radicais, o protozoário lança mão de enzimas antioxidantes, como SOD, glutaciona redutase (GR), glutaciona peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR). Alguns mecanismos envolvidos neste processo estão representados pela Figura 5 (KAPOOR & BANYAL, 2009). O segundo mecanismo

exige a ativação da resposta imune do hospedeiro, que conduz à produção das citocinas TNF- α e IFN- γ nas células Th1. Posteriormente, ocorre de patógenos por fagocitose de macrófagos ativados, que secretam óxido nítrico e ROS. A liberação dessas espécies radicalares neste mecanismo gera um trabalho semelhante a uma ação antimicrobiana (EREL et al., 1997; PABÓN et al., 2003; KAWAZU et al., 2008; IFOUE et al., 2009; KAPOOR & BANYAL, 2009).

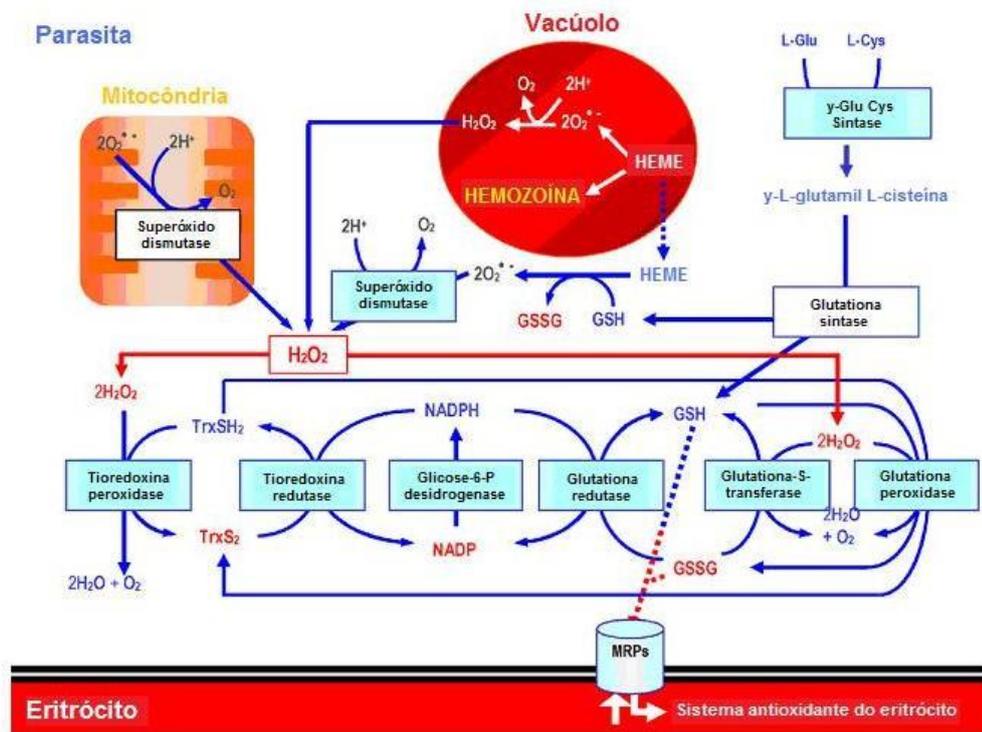


Figura 5: Esquema representativo do sistema de defesa endógeno antioxidante do *Plasmodium falciparum*. Fonte: Adaptado de NOGUEIRA et al. (2010).

Como foi dito no tópico anterior, um dos fatores que modificam a membrana do eritrócito é o EO gerado pelo parasita. Além deste mecanismo, o EO pode ser gerado nos eritrócitos pelos próprios medicamentos utilizados para combater a doença. Isto ocorre pelo fato de que o mecanismo de ação desses fármacos, em parte, utiliza ROS. A cloroquina (CQ), medicamento utilizado para eliminar as formas eritrocíticas, gera de

forma secundária, EO nas hemácias. Esta geração ocorre pelo acúmulo de heme oxidado (FP) resultante da ação do medicamento, que atua inibindo a enzima hemepolimerase. Esta enzima utiliza o FP como substrato para gerar o pigmento malárico ou hemozoína (DEHARO et al., 2003; BECKER et al., 2004; RANG et al., 2008). Outros medicamentos utilizados também geram EO. Acredita-se que a primaquina, durante o ciclo redox dos seus metabólitos, exerce um substancial EO. Já a artemisinina, reage com moléculas de heme formando radicais citotóxicos (BECKER et al., 2004).

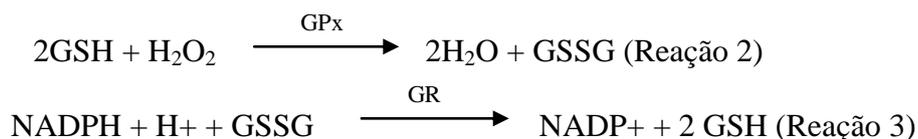
Recentemente, relatou-se que o EO pode ter um papel na etiopatogênese da trombocitopenia na malária. ALECRIM (2000) observou em pacientes com malária vivax na Amazônia Brasileira, plaquetopenia grave, abaixo de 50.000 plaquetas/mm³, em 18,8% das amostras. ARAÚJO et al. (2008) encontraram 72% de trombocitopenia em pacientes com malária vivax. Neste mesmo estudo, pacientes com este quadro clínico apresentavam níveis maiores de MDA ao passo que em pacientes com níveis normais de plaquetas, níveis menores deste marcador foram encontrados.

Além do mecanismo de trombocitopenia na malária, os RL também são responsáveis por danos ocasionados no fígado. Ratos infectados por *Plasmodium yoelii* apresentaram altos níveis de xantina oxidase (XO) e LPO no fígado, indicando o desenvolvimento de EO (SIDDIQI & PANDEY et al., 1999). GUHA et al. (2006) e DEY et al. (2009), demonstraram em, seu trabalho, que a infecção malárica, pela indução da geração de radicais ·OH, causa apoptose nos hepatócitos.

Para proteger-se das ROS, as células lançam mão de dois tipos de sistema antioxidante: enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes SOD, catalase (CAT), GPx, GR e peroxiredoxina (Prx). O sistema antioxidante não enzimático é composto de substâncias extracelulares, fazendo parte: vitaminas C e E, complexo B, além dos β-carotenos,

cisteína, minerais como selênio, zinco, magnésio e cobre. A vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a LPO. O β -caroteno interage com as ERO especialmente quando ocorrem baixas tensões de O_2 e a vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERO (EREL et al., 1997; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; MARTINS, 2007; VASCONCELOS et al., 2007; KAWAZU et al., 2008).

O ciclo redox da glutathiona é o maior sistema de defesa para desintoxicação de ERO dentro dos eritrócitos (EREL et al., 1997). Ele é composto pelas formas glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), glutathiona e pelas enzimas GPx e GR. Alterações qualitativas e quantitativas neste sistema são consideradas índices de dano oxidativo (MONOSTORI et al., 2009). A GSH é um tripeptídeo contendo tiol (-SH), que desempenha um papel central nas vias de sinalização e na defesa contra o dano oxidativo, eliminando produtos da LPO (FORMAN et al., 2009; MONOSTORI et al., 2009). A GPx, enzima que faz parte da família das selenoenzimas, catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG (Reações 2 e 3). (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007). A atividade da GPx também está fortemente relacionada com os níveis plasmáticos de substâncias reativas do TBA, que é um marcador de dano oxidativo às macromoléculas (MARTINS, 2007).



A GR é uma flavoenzima homodimérica da família disulfito redutase, NADPH dependente, que catalisa a redução da GSSG à GSH (Reação 1). Ela é essencial para

manter íntegro o sistema de proteção celular. Possui uma relação com diversos fenômenos celulares, incluindo a resposta de defesa contra as ERO (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; PATEL et al., 1998; LI et al., 2004; KAPOOR et al., 2009; KIM et al., 2010). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de G6PD, há prejuízo da função da GR, podendo ocasionar o acúmulo de GSSG, o que resulta na geração de um estado de EO. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; KIM et al., 2010).

Da mesma forma que a GPx, a TrxR também compõem a família das selenoenzimas. A TrxR faz parte do sistema tioredoxina, composto por um pequeno peptídeo tioredoxina (Trx) e o cofator NADPH, envolvido na manutenção do estado redox (Figura 6). A enzima TrxR transfere elétrons da NADPH para Trx, a qual age como redutora de disulfeto. Dessa forma, a tioredoxina oxidada carrega um disulfeto (Trx-S₂) e a tioredoxina reduzida carrega um ditiol [Trx-(SH)₂] (ARNÉR & HOLMGREN, 2000; KAPOOR et al., 2009; HOLMGREN & LU, 2010).

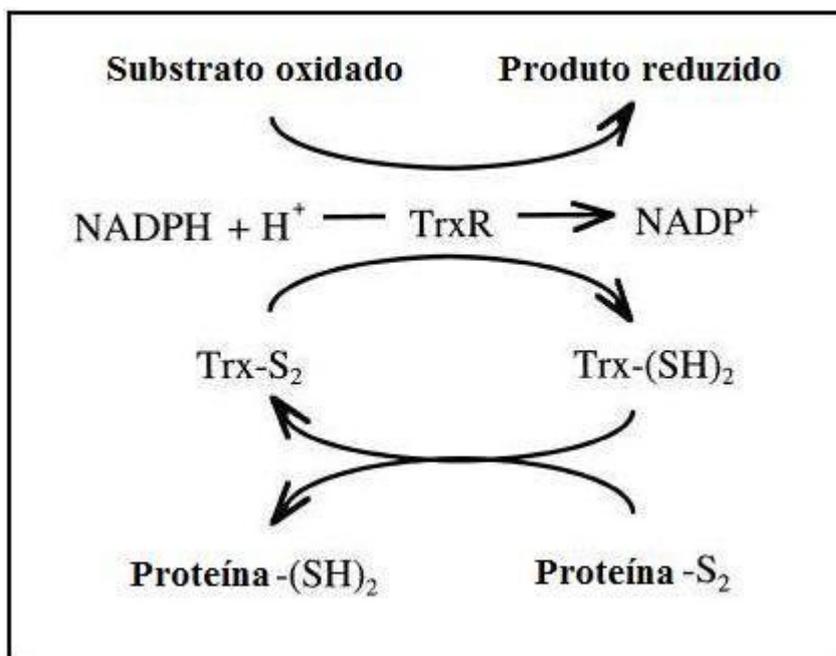


Figura 6: Esquema de atividade oxireductase do sistema tioredoxina. Fonte: Adaptado de ARNÉR & HOLMGREN (2000).

A enzima SOD é a primeira enzima do processo antioxidante e catalisa a dismutação do ânion $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 e O_2 (Reação 3) (VASCONCELOS et al., 2007; LABIÓS et al., 2009). Dessa forma, protege as células contra os efeitos nocivos dos radicais livres (BERNHARDT et al., 2009). A análise da atividade da SOD pode revelar indiretamente a quantidade de radicais gerados e pode ser útil para estimar os efeitos de agentes farmacológicos sobre a produção de radicais. São realizadas geralmente por adição ao eritrócito do sistema xantina - xantina oxidase como fonte de $O_2^{\bullet -}$ e um composto que seja reduzido pelo $O_2^{\bullet -}$ (GIROTTI et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2007).



A Catalase (CAT) é uma hemoproteína tetramérica citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (Reação 4). É mediadora na sinalização da proliferação celular, apoptose, metabolismo de carboidratos e a ativação plaquetária (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; MAES et al., 2010; MIN et al., 2010). Encontra-se livre no citoplasma de eritrócitos maduros e é dependente de NADPH. Tem como uma das suas principais funções proteger a hemoglobina, removendo mais de metade do peróxido de hidrogênio gerado em eritrócitos humanos normais, que são expostos a altas concentrações de oxigênio substancial (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007; GOYAL & BASAK, 2010).



3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o estresse oxidativo em plasma e eritrócitos de pacientes com malária vivax grave.

3.2 Específicos

- Comparar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo em plasma e eritrócitos de pacientes com malária vivax grave, não grave e pacientes controle.

- Estabelecer o perfil da atividade de enzimas antioxidantes em pacientes com malária vivax grave;

- Testar a estabilidade dos eritrócitos frente ao estresse oxidativo em pacientes com malária;

- Comparar o estresse oxidativo ocasionado entre pacientes com malária com os que desenvolveram malária e dengue no mesmo momento;

- Determinar qual a relação entre o estresse oxidativo gerado na doença com as altas concentrações de bilirrubina em pacientes com malária vivax grave.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Estudo prospectivo, onde foram realizadas dosagens de marcadores do estresse oxidativo no plasma, eritrócitos e na membrana de eritrócitos em pacientes com malária vivax grave e não grave.

4.2 População de Estudo

Pacientes diagnosticados com malária vivax na Fundação de Medicina Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) internados (malária grave), ambulatoriais (malária não grave) e que desenvolveram co-infecção com dengue. O estudo também foi composto de um grupo controle o qual foi recrutado nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) sem história de infecção por qualquer tipo de malária e um único paciente que é portador da deficiência na enzima G6PD e contraiu malária.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionados pacientes internados e ambulatoriais na FMT-HVD com diagnóstico de malária vivax, de ambos os sexos, a partir dos 18 anos de idade. O diagnóstico foi realizado pela gota espessa, expresso em cruzeiros e por mm^3 . Foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com o objetivo de confirmar o diagnóstico e excluir infecções mistas por *P. falciparum*. Foram considerados pacientes

com malária vivax grave os que apresentaram icterícia, um dos critérios de gravidade de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Foram excluídos os pacientes que apresentaram comorbidades, como diabetes e hipertensão. Os pacientes controle seguiram o mesmo perfil dos pacientes com malária (maiores de 18 anos, ambos os sexos e sem histórico de comorbidade) exceto pelo fato de serem livres de infecção por qualquer tipo de malária. Pacientes com malária vivax grave e não grave receberam tratamento medicamentoso semelhante em todos os casos.

A cidade de Manaus é uma área endêmica para o vírus da dengue, como também é comum ocorrer co-infecção e os pacientes desenvolverem malária e dengue ao mesmo tempo, agravando os sintomas da malária ocasionando uma “falsa malária grave”. Dessa forma, pacientes que foram alocados no grupo malária grave tiveram alíquotas de soro testadas por diagnóstico molecular. Os pacientes que apresentaram ambas as doenças foram transferidos para o grupo denominado co-infecção.

4.4 Amostragem

Em nove meses de coleta (março a novembro de 2011), foram selecionados 9 pacientes diagnosticados com malária vivax grave apresentando icterícia. Três pacientes que apresentavam malária e dengue foram alocados no grupo co-infecção. Os grupos controle e malária não grave foram constituídos por 28 e 34 pacientes respectivamente.

4.5 Considerações Éticas

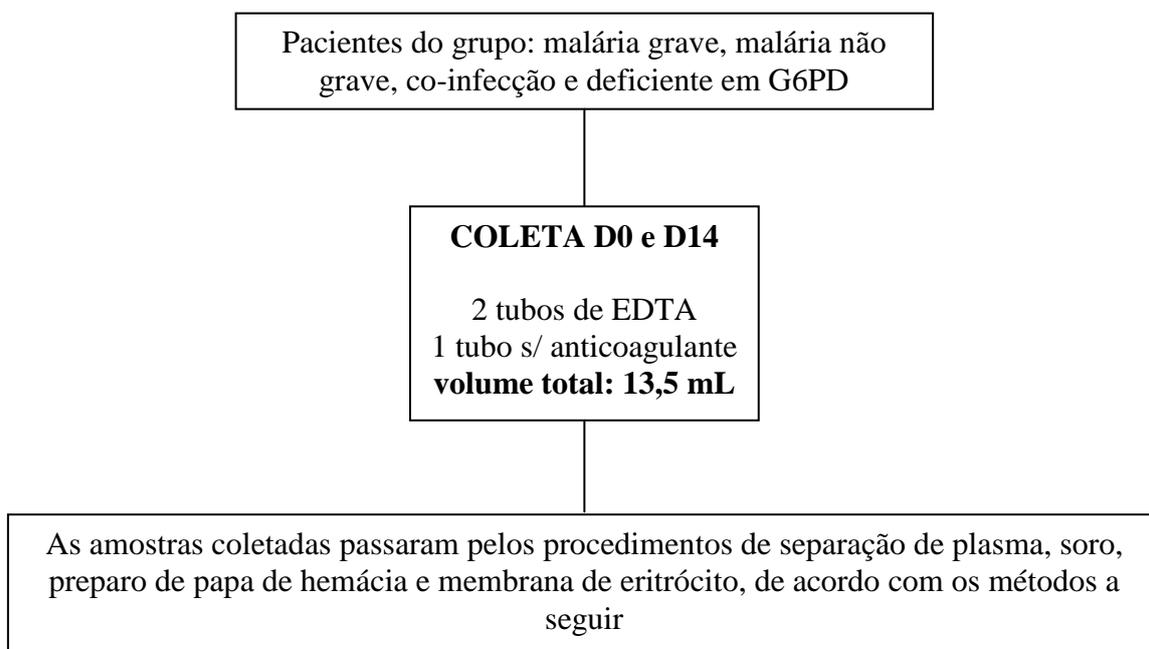
A pesquisa iniciou-se com a liberação formal e aceitação por parte da instituição em questão, FMT-HVD, após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP)

(CAAE-0075.0.115.114-11) (Apêndice B) e assinatura do Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) 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 pela Dra. Márcia Almeida de Araújo Fernandes, médica-pesquisadora da FMT-HVD.

4.6 Procedimentos de Coleta

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar da pesquisa assinando o TCLE. Amostras de sangue venoso foram coletadas nos dias 0, e 14 (D0 e D14, respectivamente) de cada paciente com malária vivax grave, não grave, apresentando co-infecção e portador da deficiência em G6PD de acordo com o fluxograma abaixo:



As coletas no D0 foram realizadas com o paciente em jejum e diagnosticado com malária vivax através da gоста espessa. As coletas do D14 também ocorreram em jejum e quando o paciente estava livre de sintomas e parasitemia.

Os pacientes com malária vivax grave que foram incluídos também estavam participando do projeto *Caracterização Clínica de Malária Complicada por P. vivax*. Dessa forma, informações úteis que não puderam ser coletadas durante a coleta de sangue foram buscadas no prontuário completo do paciente incluído neste projeto.

Os voluntários que participaram do grupo controle foram submetidos a apenas uma coleta de sangue de 13,5 mL em jejum.

Os testes de marcadores de estresse oxidativo foram todos realizados no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.7 Métodos

4.7.1 Análises bioquímicas e hematológicas

Foram realizadas as análises bioquímicas dos seguintes perfis: lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides), hepático (ALT, AST, fosfatase alcalina, bilirrubinas totais e frações, gama-GT, lactato desidrogenase), renal (creatinina, ácido úrico, uréia) e glicose. Todos os perfis foram realizados no aparelho COBAS mira plus® através dos kits LabTest®. Os procedimentos foram de acordo com a instrução de uso do fabricante e em todos foram utilizados alíquotas de soro dos pacientes.

Através do contador automático de células sanguíneas SYSMEX KX-21N® foram realizadas as análises hematológicas em sangue total colhido em tubos contendo EDTA incluindo: células brancas, vermelhas e plaquetárias.

4.7.2 Teste qualitativo de Brewer para enzima G6PD

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por BREWER et al. (1960). O método se baseia na redução da metahemoglobina com adição azul de metileno no tubo teste. O teste é qualitativo onde se compara a cor formada do tubo teste após três horas de incubação em banho-maria a 37°C com as cores do tubo de controle negativo (atividade de G6PD normal) e do controle positivo (atividade da enzima G6PD deficiente).

4.7.3 Isolamento de membrana eritrocitária (GHOSTS)

Após a coleta do sangue total em tubos contendo anticoagulante EDTA, as membranas dos eritrócitos foram extraídas a partir do método proposto por MARCHESI & PALADE (1967). Este método consiste na separação da membrana dos eritrócitos através de várias lavagens em centrífuga para a extração de hemoglobina utilizando os seguintes reagentes: tampão Tris-HCl 5 mM + 0,1 mM EDTA, Tris-HCl 0,05 mM + 0,1 mM EDTA, Tris-HCl 5 mM + 1 mM EDTA todos em pH 7,0. Após as lavagens, o ghost foi ressuspensionado em tampão PBS pH 7,4.

4.7.4 Avaliação da estabilidade de membrana dos eritrócitos contra choque hipotônico

O teste de fragilidade osmótica (FO) expressa a habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico

(ALDRICH & SAUNDERS, 2001). O método que foi adotado, descrito por JAIN (1986), define FO como a resistência dos eritrócitos à hemólise contra soluções de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.42, 0.43, 0.44, 0.46, 0.48, 0.50, 0.53, 0.56, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 g/dL de NaCl em água destilada. O teste foi realizado com sangue total coletado em jejum. Após pipetagem em microplaca de cada solução de NaCl nas concentrações especificadas acima, ocorreu a incubação em 37°C, por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado o sangue total, homogeneizado e novamente foi incubado a 37°C, por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi mensurado no leitor de Elisa (DTX-800®, Multimode Detector, Beckman Coulter) em 540 nm.

O comportamento da membrana foi monitorado através da lise de eritrócitos mediante a leitura de absorbância da hemoglobina (MOECKEL et al., 2002).

4.7.5 Determinação do malondialdeído (MDA)

A determinação do MDA, um produto da oxidação de lipídios, foi realizada através do método descrito por ESTERBAUER & CHEESEMAN (1990). Este método consiste na reação do MDA, presente no plasma e na membrana de eritrócito, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) gerando um produto denominado TBARs. Este possui uma coloração rosa a qual é mensurada no espectrofotômetro 70 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd. no comprimento de onda de 535 nm.

4.7.6 Determinação de Tióis Totais

Os tióis são descritos como os principais responsáveis pelos efeitos antioxidantes das proteínas plasmáticas. Além disso, diversos estudos mostram uma correlação positiva entre os níveis séricos de tióis e a capacidade antioxidante total. O método foi realizado a partir do proposto por ELLMAN (1959) e HU (1994) através dos

reagentes ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico (DTNB) a 0,1 M, tampão Tris 0,25 mM + 20 mM EDTA pH 8,2 e, como padrão, a glutationa (GSH) nas concentrações 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mM. Utilizou-se como amostra alíquotas de plasma. O procedimento ocorreu de forma automatizada, utilizando o equipamento Cobas Mira Plus®.

4.7.7 Determinação de Proteínas Totais

Utilizou-se o método proposto por LOWRY et al. (1951) para a determinação de proteínas em membrana de eritrócitos (ghost) e o método do biureto para soro (GORNALL et al., 1949). O procedimento para mensurar proteínas em membrana de eritrócito se inicia com a hidrólise das proteínas a partir de TCA a 10% e NaOH a 2N. Posteriormente, foi adicionado o reagente complexo (Na_2CO_3 , CuSO_4 e tartarato de sódio). A reação iniciou-se com a adição do reagente Folin-Ciocalteau, onde ocorreu a redução de cadeias laterais de alguns aminoácidos, *e.g.* tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina, gerando, na presença do catalisador cobre (II), um composto com absorção máxima em 750 nm onde foi mensurado utilizando o leitor de Elisa (DTX-800®, Multimode Detector, Beckman Coulter)

Para a determinação de proteínas totais em soro pelo método do biureto foi utilizado kit da Labtest® em equipamento automatizado Cobas Mira Plus®. O procedimento estava todo de acordo com a instrução de uso do fabricante.

4.7.8 Determinação da atividade das seguintes enzimas:

4.7.8.1 Catalase (CAT)

A enzima catalase tem com uma das suas funções decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, atuando, dessa forma, como uma enzima antioxidante. O método para dosagem de catalase se baseia em AEBI (1984), e possui como princípio de reação o acompanhamento da decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima através da diminuição da absorbância em 240 nm. O procedimento utilizou tampão fosfato 50 mM pH 7.0, peróxido de hidrogênio 30 mM e tampão fosfato 0,1M pH 7.4. A amostra consiste na preparação de um hemolisado que posteriormente foi diluído na proporção de 1:500, o qual é estável entre 5 a 10 minutos. A diminuição da absorbância foi mensurada durante 15 segundos através do espectro T70 UV/VIS PG Instruments Ltd.. Os valores das absorbâncias dos tempos 0 e 15 foram ser anotados.

4.7.8.2 Ceruloplasmina (CP)

Ceruloplasmina (CP) é uma enzima sintetizada principalmente no fígado que contem grande quantidade de cobre. Catalisa a conversão de ferro ferroso para o ferro férrico, necessária para a homeostase de ferro celular (TORDSDOTTIR et al., 2010). A dosagem desta enzima foi realizada em plasma de acordo com o método de SCHOSINSKY et al. (1974) onde é utilizado orto-dianisidina e ácido sulfúrico, resultando em uma reação de cor rosada com absorção no comprimento de onda 540 nm.

4.7.8.3 Glutationa Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a oxidação da GSH pelo hidroperóxido de cumeno. Na presença da GR e NADPH a GSSG é imediatamente convertida na forma reduzida como uma oxidação concomitante da NADPH a NADP^+ . Realizou-se o teste através do kit RANSEL da marca RANDOX® baseado na metodologia de PAGLIA & VALENTINE (1967) utilizando amostras de sangue total. A determinação ocorreu com a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 340 nm. O procedimento foi todo realizado de acordo com as orientações do fabricante.

4.7.8.4 Glutationa Redutase (GR)

A glutaciona redutase catalisa a redução da glutaciona oxidada (GSSG) na presença de NADPH o qual é oxidado em NADP liberando glutaciona reduzida (GSH). A determinação da atividade da enzima foi realizada através do kit GLUT RED da marca RANDOX® utilizando amostras de plasma, tampão fosfato com EDTA, substrato contendo GSSG e NADPH. Todo o procedimento foi automatizado utilizando o equipamento Cobas Mira Plus® e estava todo de acordo com a instrução de uso do fabricante.

4.7.8.5 Superóxido Dismutase (SOD)

Utilizou-se o kit RANSOD da RANDOX® para a determinação da enzima em papa de hemácia. O kit se baseia na adição de xantina e xantina oxidase ao sistema para gerar radicais superóxido utilizando amostras de papa de hemácia. Estes radicais reagem com o composto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5- cloreto de feniltetrazolium, conhecido como INT, formando o produto rosado formazan. Este é mensurado através

leitor de Elisa (DTX-800®, Multimode Detector, Beckman Coulter) em 505 nm. Realizou-se o procedimento de acordo com as orientações do fabricante.

4.7.8.6 Tioredoxina Redutase (TrxR)

O sistema da tioredoxina é um dos principais sistemas envolvido na defesa celular contra o dano oxidativo, sendo composto por tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (TrxR) - uma enzima selenocisteína – e o NADPH, como cofator. (ARNÉR & HOLMGREN, 2000). Determinou-se a atividade da enzima através do método proposto por HOLMGREN & BJORNSTEDT (1995). O procedimento incluiu o preparo do seguinte complexo de reação: NADPH 40 mg/mL, EDTA 0,2 M, tampão fosfato de potássio 1M pH 7.0, albumina 20 mg/mL e DTNB 25mg/mL. A reação iniciou-se com a adição da amostra (plasma), zerando o aparelho com o complexo de reação e tampão. O princípio consiste na enzima TrxR transferindo elétrons da NADPH para a Trx a qual age como redutora de disulfeto. Essa transferência gera uma mudança de cor e um aumento na absorbância em 412 nm a qual foi monitorada através do leitor de microplaca Thermo Plate.

4.8 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados e apresentados como médias e desvio padrão como também, em gráficos do tipo barra. Para classificar os dados em distribuição normal ou não normal foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks. Para estimar a significância entre dois grupos utilizou-se o teste *T de student* em dados paramétricos e o teste Mann-Whitney para dados não-paramétricos. Ao comparar mais de dois grupos utilizou-se os testes ANOVA-*one way* e Tukey em dados paramétricos, já os testes ANOVA Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls foram utilizados para dados não

paramétricos. As correlações entre as variáveis foram realizadas utilizando o teste de Pearson ou Spearman para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Todas as análises foram realizadas nos programas BioStat 5.0 e OriginPro 8.0, e os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito que se encontra aqui organizado. Além dos resultados, também estão inseridos o item Discussão e as referências utilizadas neste manuscrito. A apresentação do mesmo está baseada na versão que será submetida à **Revista Free Radical Biology & Medicine**. A versão final da dissertação constará do artigo com as sugestões da banca examinadora e revisão do texto em língua inglesa por empresa especializada. Resultados que não foram inseridos no manuscrito foram incluídos como dados complementares- **Apêndice A** .

5.1 Manuscrito

Lipid peroxidation and variations of antioxidant enzymes in plasma and erythrocytes of patients with vivax malaria presenting jaundice

Camila Fabbri^a, Rita de Cássia M. Netto^b, Gisely Cardoso de Melo^c, Belisa Maria L. Magalhães^c, Márcia Almeida de A. Alexandre^c, Marcus V.G. de Lacerda^c, Emerson Silva Lima^{a,*}

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences - Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

^bInstitute of Biochemistry and Genetics, Federal University of Uberlândia, Brazil

^cFoundation for Tropical Medicine Dr Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brazil

Mailing address: Emerson Silva Lima, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rua: Alexandre Amorim, 330, Aparecida, CEP: 69010-300
Manaus, AM, Brazil.

Telephone: +55(92)3305.5000

Email: eslima@ufam.edu.br

Highlights:

- Imbalance of redox process contributes to complicated malaria pathogenesis.
- We noted the difference in antioxidant profile in patients with jaundice.
- Bilirubin shows an association directly proportional with exacerbation of oxidative stress.

Abstract

In order to elucidate the lipid peroxidation and variations of antioxidant enzymes in plasma and erythrocytes of patients infected with *Plasmodium vivax* who developed jaundice in the course of the disease and also check the influence of high concentration of bilirubin in oxidative stress, the following groups of patients was studied: *P. vivax* malaria without jaundice, *P. vivax* malaria without jaundice and healthy individuals with no history of malaria (control group). All patients had their levels of antioxidant enzymes and lipid peroxidation marker malondialdehyde measured on day zero (when diagnosed with malaria) and fourteen (malaria free). The levels of malondialdehyde ($p = 0.014$) and the enzymes celuroplasin ($p = 0.004$) and glutathione reductase were increased ($p < 0.01$) in plasma of patients with *P. vivax* with jaundice compared to control group. Differently, the enzymes catalase ($p = 0.0342$), superoxide dismutase ($p = 0.0033$) and thioredoxin reductase ($p < 0.01$) were decreased compared to the control group. The enzymes glutathione reductase ($p < 0.01$), thioredoxin reductase ($p = 0.0067$) and malondialdehyde ($p = 0.0309$) also showed significant higher in patients *P. vivax* malaria with jaundice when compared with patients *P. vivax* without jaundice. The correlation between glutathione reductase and total bilirubin was significant ($p = 0.0018$, $r = 0.4841$) all patients of each group. We can conclude that patients who develop severe malaria and presented jaundice have a greater oxidative stress than patients who developed the disease in mild form and that these high concentrations of bilirubin may be a signaling of oxidative process and contributes to malaria pathogenesis.

Keywords: Malaria vivax, antioxidant enzymes, oxidative stress, jaundice

Introduction

Malaria affects millions of people every year around the world. In Brazil, approximately 99.5% of malaria cases occur in the Amazon Region [1, 2]. The infection caused by *Plasmodium vivax* are classified as benign malarias, although it is increasingly recognized that serious and even fatal complications can occur, as in malaria caused by *Plasmodium falciparum*. In endemic areas, has been reported a significant proportion of patients admitted to hospital with severe vivax malaria. This has been possible with the application of molecular diagnostics, which became evident that the mono-infection by *P. vivax* can also be involved in multiple organ dysfunction or severe disease causing deaths [3, 4]. In Manaus, an area endemic for the disease, several cases confirmed of severe vivax malaria have been reported across a wide age range, where children and adults are affected by the disease. Among the most common complications in these patients, it is possible to find jaundice [5, 6]. The jaundice is caused by high levels of bilirubin in the blood. In malaria, jaundice can be caused directly by two factors: hemolysis, where the levels of indirect bilirubin are predominant or liver damage, when direct bilirubin levels are increased [7].

The malaria infection results in increased of reactive oxygen species (ROS) just as that reduces antioxidants, e.g. some enzymes that protect the body such as glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase [8, 9]. Oxidative stress (OS) in malaria can be caused by two main mechanisms. The first occurs by the parasite, which reproduce in the erythrocytes, changing the structure and affecting parameters such as stiffness, viscosity and volume, and also oxidizing the heme iron atoms to generate a byproduct for his nutrition. The second mechanism involves the host immune response, which in trying to combat the parasite uses cytokines, which initiates a

cascade of mechanisms culminating with the release of free radicals by activated macrophages. Moreover, species such as reactive hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) participate in the mechanisms that generate apoptosis in liver during malaria infection [10-15].

The present work aims to study the oxidative stress in plasma and erythrocytes of patients with malaria by *P. vivax* presenting jaundice, to understand and know the behavior of antioxidant enzymes against oxidative stress caused in these patients. Although there are several studies in the literature discussing this topic, no study has characterized the oxidative stress in patients with vivax malaria presenting jaundice and other complications, which is a recent topic in the literature.

Materials and methods

Reagents and equipments

For the oxidative stress markers tests were used reagents Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Randox kits (County Antrim, United Kingdom). For biochemical test were used Labtest (Minas Gerais, Brazil) and Bioclin (Minas Gerais, Brazil) kits. The spectrophotometer used in the tests was 70 UV / VIS Spectrometer PG Instruments Ltd (Beijing, China). The Microplate readers used were DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) and Thermo Plate, TP -Reader (Germany). For biochemical and hematological test the following equipments were used: Cobas Mira Plus, Roche Diagnostics (MA, USA) and Sysmex KX-21-N (Kobe, Japan).

Study design

Were selected patients with malaria caused by *P. vivax* diagnosed by thick smear and confirmation by molecular diagnostics (to rule out mixed infections) in the Tropical

Medicine Foundation Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) in Manaus, Amazonas, Brazil. These patients were divided into two groups: *P. vivax* malaria with jaundice and *P. vivax* malaria without jaundice. In addition to these two groups, healthy subjects who never had a history of malaria infection were added in a group called control. All groups had blood collected on day zero (D0), where they were diagnosed with *P. vivax* malaria, and on day fourteen (D14), when they were without symptoms and free of malaria parasites, except the control group, which had only one blood collection (D0).

All subjects signed an informed consent (IC) according to the ethics committee of the FMT-HVD (CAAE - 0075.0.115.114-11) in which the study was submitted. The participants of the three groups were male and female, from 18 years old, without comorbidities like diabetes, hypertension and Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. As the Amazon region is endemic for dengue fever, all patients had serum samples tested for the disease by molecular diagnosis to rule out co-infections.

Blood samples

About 13 mL of venous blood were collected in fasting on BD Vacutainer tubes ® K2 EDTA and without anticoagulant from each patient. Were stored aliquots of plasma, serum, whole blood and packed red blood cells and was performed the procedure for the separation of erythrocyte membrane [16] in the same day of blood collection. After separation, the erythrocyte membrane proteins were quantified using Folin-Ciocalteu reagent [17].

Biochemical and hematological parameters

In all patients were performed the hepatic function markers (ALT, AST, gamma-GT, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and bilirubin total and fractions) and complete blood count. All procedures were accomplished in automated equipment.

Qualitative test for G6PD enzyme

It was performed the qualitative test for G6PD enzyme to exclude these patients of the groups on this study [18]. This is an important test because patients who have this enzyme deficiency and had malaria will have an increased oxidative stress because the enzyme can not be developing his purpose, which is to protect the erythrocytes against hemolysis. In the erythrocytes, the enzyme catalyzes first step of pentose cycle, producing reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), which is important for the antioxidant mechanism of erythrocytes [19].

Biochemical markers of oxidative stress

The activity of the enzyme catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6) was measured using a spectrophotometer in packed red blood cells [20]. The enzymes superoxide dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1), glutathione peroxidase (GPx; E.C. 1.11.1.9) and glutathione reductase (GR; E.C. 1.6.4.2) were measured using Randox Kits ® on a microplate reader. The SOD activity was measured in whole blood, GPx in packed red blood cells and GR in plasma. The activity of the enzyme thioredoxin reductase (TrxR; E.C. 1.8.1.9) [21] and ceruloplasmin (CP; E.C. 1.16.3.1) [22] were performed in plasma by microplate reader. The thiol compounds, main responsible for the antioxidant effects of plasma proteins, were measured using the modified method [23, 24] where 300 µL of 0.25 mM Tris + 20 mM EDTA pH 8.2, 3,8 µL of 5,5-dithiobis acid-2-nitrobenzoic

(DTNB) 0.1 M and 7,5 μ L of standard (0.5 mM glutathione) sample or water (blank) were incubated at room temperature for 15 minutes and measured in a microplate reader at a wavelength of 412 nm. Malondialdehyde (MDA) was measured using a spectrophotometer by reaction with thiobarbituric acid (TBA) in plasma and erythrocyte membrane [25].

Data analysis

The results were analyzed and presented as mean and standard deviation. To sort the data in normal distribution or not was used the Shapiro-Wilk test. Parametric data were analyzed by ANOVA-one way to estimate the significance in more than two groups. When the data analyzed in ANOVA- one way was significant, Tukey test was performed to compare data between groups. For non-parametric data was used the ANOVA Kruskal-Wallis test and Student-Newman-Keuls test. To compare two groups was used de Student T and Mann-Whitney test for parametric and non-parametric data respectively. Correlations between variables were performed using the Spearman test. All tests were performed in programs BioStat 5.0 (Federal University of Pará, Belem, Brazil) and OriginPro 8.0 (Microcal, Northampton, Massachusetts, USA), and the data is considered significant when $p < 0.05$.

Results

Biochemical and hematological parameters and qualitative test for G6PD enzyme

A total of 28 subjects control patients, 34 with *P. vivax* malaria without jaundice and 8 with *P.vivax* malaria with jaundice were matched and included for analysis as

shown in Table 1. We observe the groups of patient with malaria have lower hemoglobin levels ($p = 0.0041$) and platelets ($p < 0.001$) compared to patients of control group. Regarding the profile of liver, patients with malaria also had significantly higher levels than healthy subjects in the following strengths in serum: AST ($p = 0.001$), ALT ($p < 0.0001$), Gamma-GT ($p = 0.0001$), Total bilirubin ($p < 0.0001$), Indirect Bilirubin ($p < 0.001$) and Direct bilirubin ($p < 0.0001$). In addition to these results, the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) showed increased levels ($p < 0.0001$ for both groups) in *P. vivax* with jaundice patients when compared with *P. vivax* without jaundice and control patients. All patients had a negative result for deficiency of the enzyme G6PD.

Malondialdehyde: marker of lipid peroxidation

In figure 1, it is possible observe that MDA levels, an oxidative stress marker, measured in plasma are significantly increased in patients of the group *P. vivax* malaria with jaundice compared with the control group ($p = 0.014$) and the group *P. vivax* malaria without jaundice ($p = 0.0309$). The MDA measured in erythrocyte membrane did not show significant results. When we compared the day zero with day fourteen in each group of malaria (data not show), the levels of MDA decreased in *P. vivax* without jaundice ($p = 0.0025$) and *P. vivax* with jaundice ($p = 0.0286$) groups on day fourteen.

Antioxidant enzyme profile

Some antioxidant enzymes had significantly decreased activities in relation to control group, like CAT ($p = 0.0342$, $p < 0.0001$), SOD ($p = 0.0033$, $p < 0.0001$), TrxR ($p < 0.01$ for both groups) when compared with the groups without jaundice and with

jaundice respectively as seen in figures 1 and 2. The enzyme GPx had a significantly decreased only when the control group was compared with the *P. vivax* malaria without jaundice group ($p < 0.01$) (Figure 2). Only the TrxR enzyme activity had significantly decreased ($p = 0.0067$) when compared with the group *P. vivax* without jaundice and *P. vivax* with jaundice group (Figure 1).

The others enzymes GR ($p < 0.01$ for both groups) and CP ($p = 0.0004$, $p < 0.0001$) had the activities significantly increased when compared the control group with the groups *P. vivax* without jaundice and *P. vivax* with jaundice respectively as seen in Figure 1. Only the GR enzyme activity had significantly increased ($p < 0.01$) when compared with the group *P. vivax* without jaundice and *P. vivax* with jaundice group (Figure 1). The activity of enzyme GR also showed a significant correlation between total bilirubin levels in all patients analyzed in this study (Figure 3).

When we compared the day zero with day fourteen in each group of malaria in this enzymes (data not show), the levels of the enzymes CP was significantly decreased ($p = 0.0003$) in *P. vivax* without jaundice group. The GR enzyme levels was significantly decreased ($p = 0.0417$) in *P. vivax* with jaundice group on day fourteen. In contrast to results, the CAT and TrxR enzyme levels was increased significantly ($p = 0.0004$, $p = 0.0053$, respectively) in *P. vivax* without jaundice group and only the TrxR enzyme had levels increased significantly ($p = 0.0302$) in the *P. vivax* with jaundice group.

Discussion

In the present study, we have provided evidence that malaria infection can induce an oxidative process in the body, specifically in erythrocytes and human plasma.

The significantly increased levels of MDA in plasma in the groups *P. vivax* malaria without jaundice and with jaundice indicate lipid peroxidation due to damage from free radicals. This have been implicated in a number of diseases, including malaria [15, 26, 27], and have been shown to be cytotoxic to various cell types. The parasites of malaria do not have a triglyceride synthesis pathway, they must obtain all their lipid requirements from the host serum. On this way, the parasite destabilize the cell membrane, in particular the erythrocyte membrane [8, 28].

The antioxidant enzymes CAT, GPx, SOD and TrxR had activities significantly decreased when we compared the groups *P. vivax* malaria with and without jaundice with control group. These enzymes are responsible for fighting reactive oxygen species and reduction of oxidative. On this way, these results may be an indicator of increased levels of oxidative stress in the body where, because of this, these enzymes activities were decreased in an attempt to counteract oxidative stress, trying to restore the body's balance. CAT, GPx and SOD are the primary intracellular antioxidant mechanism against oxidative stress. Both GPx and CAT have the ability to inactivate the intracellular H₂O₂ [15]. The TrxR is an enzyme NADPH-dependent TrxR transfers which itself acts as a reductant for disulphide containing process, such as ribonucleotide reductase. This enzyme may be inactivated during a major exhibition of nitric oxide ([•]NO), a reactive species of oxygen found in high levels during malaria infection [29]. This can explain the fact we found decreased levels of this enzyme on the patients with *P. vivax* malaria who presenting or not jaundice. The high levels of [•]NO are associated with the immune response of the host during the malaria infection.

On the other hand, the antioxidant enzymes GR and CP activities had significantly increased when we compared the groups *P. vivax* malaria presenting or not jaundice with the control group. Other studies also found increased levels of the enzyme

GR, although in malaria caused by *P. berghei* and *P. falciparum* [11]. One possible explanation for this phenomenon is that the GR is involved in maintaining an intracellular reducing environment, which is crucial to the cell against oxidative stress. Thus, with increased oxidative stress, an overexpression of the enzyme was needed to combat it [30]. Some studies confirmed our results about the activity of CP. Although it is known that enzyme is an antioxidant acute phase reactant, in studies it has been shown that intact human ceruloplasmin has a potent oxidant activity. On this way, during the malaria infection, the CP may exhibit an oxidant character [12, 31, 32].

According to the majority of our results - MDA and the enzymes CAT, CP, GR and TrxR - after fourteen days, when the patient was free of malaria parasites, the organism may to reestablish in relation to oxidative stress, with levels of MDA marker and antioxidant enzymes similar to patients in the control group. Patients who had *P. vivax* malaria with jaundice showed a significant higher oxidative stress compared with *P. vivax* malaria without jaundice patients. These can be seen on the activities of the enzymes GR and TrxR and on the marker of lipid peroxidation MDA.

It is known that the high levels of serum bilirubin can be a complication in patients with malaria [7]. A study conducted in 2010 showed that over 50% of patients admitted to a reference hospital in the city of Manaus had jaundice as complication for *P. vivax* malaria [6]. Bilirubin has antioxidant properties as well as pro-oxidant. At low concentrations, it acts as a scavenger of reactive oxygen species, reducing the damage caused to the cells. However, at high concentrations, as is the case of the patients with *P. vivax* malaria who developed jaundice in this study, bilirubin has deleterious effects on tissues. It develops oxidative stress by generating intracellular ROS in hepatic cells and cause lipid peroxidation [33]. Furthermore, bilirubin can also induce apoptosis [33], complementing the information that malaria infection induces the generation of

hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) in the liver, which may be responsible for the induction of oxidative stress and apoptosis in cells of this organ [34]. To confirm these facts, the figure 3 shows the correlation between the levels of GR and total bilirubin. It can observe that the bigger bilirubin levels, the higher the levels of glutathione reductase. This result shows that high levels of bilirubin may be related to the mechanism of oxidative stress. In addition, high levels of glutathione reductase confirm the data already found in the literature [11], as mentioned earlier. In table 1 it was verified that the direct bilirubin is the predominant fraction in patients who presented jaundice, showing this high concentration of total bilirubin is due to cholestatic injury in these patients. This damage can be confirmed with other biochemical parameters which can also be seen in table 1, as the enzyme gamma-GT, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). In addition to these parameters, in figure 1 is notable that the levels of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), present in the liver, are significantly elevated in patients of the group *P. vivax* with jaundice when compared with the groups *P. vivax* malaria without jaundice and control.

Other studies also confirmed that the jaundice can be involved with oxidative stress. In 2004, a study showed the relation between hyperbilirubinemia and oxidative injury, contributing to the pathogenesis of encephalopathy. The bilirubin induced oxidative stress, due to a rise in lipid and protein oxidation, ROS content, and impairs the glutathione metabolism (decrease the GSH/GSSG ratio) [35]. Moreover, other authors have demonstrated that oxidative stress is increased in patients with cholecystectomy bile duct injury as well as in patients who developed other diseases associated with jaundice of different origin and severity [36, 37]

All these results allow us to relate potential causes of oxidative stress trigger with the liver damage caused by the parasite, associating this process with exacerbation

of release of high concentrations of bilirubin in blood. The combination of these factors creates a major oxidative process in the organism of patients with malaria.

Conclusions

In summary, the oxidative stress in patients who presenting jaundice is increased compared to patients who does not developing jaundice. These levels of reactive species may be closely linked to the damage caused by the parasite and the subsequent release of high concentrations of bilirubin in the body. For all these factors, oxidative stress plays a significant role in the pathogenesis of *P. vivax* malaria.

Acknowledgements

To the patients and the personnel of the Fundação de Medicina Dr. Heitor Vieira Dourado and and the financial support provided by CAPES and INCT Redoxoma.

References

- [1] Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M. V. G.; Brasil, P.; Ladislau, J. L. B.; Tauil, P. L.; Daniel-Ribeiro, C. T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria J* **9**:1-15; 2010.
- [2] Amazonas, F. d. M. T. d. Informe Epidemiológico Número 12 - Ano V/2010. In: Pública, D. d. E. e. S., ed. Manaus: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas; 2010.
- [3] Kochar, D. K.; Das, A.; Kochar, S. K.; Saxena, V.; Sihori, P.; Garg, S.; Kochar, A.; Khatri, M. P.; Gupta, V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: A report on serial cases from Bikaner in Northwestern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**:194-198; 2009.

- [4] Price, R. N.; Douglas, N. M.; Anstey, N. M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **22**:430-435; 2009.
- [5] Daniel-Ribeiro, C. T.; Lacerda, M. V. G.; Oliveira-Ferreira, J. Paludisme dû à *Plasmodium vivax* en Amazonie brésilienne: quelques aspects de son épidémiologie, de ses manifestations cliniques et des réactions immunitaires naturellement acquises. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **101**:243-248; 2008.
- [6] Alexandre, M. A.; Ferreira, C. O.; Siqueira, A. M.; Magalhães, B. L.; Mourão, M. P. G.; Lacerda, M. V.; Alecrim, M. G. C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* **16**:1611-1614; 2010.
- [7] Anand, A. C.; Puri, P. Jaundice in malaria. *J Gastroen Hepatol* **20**:1322-1332; 2005.
- [8] Sohail, M.; Kaul, A.; Raziuddin, M.; Adak, T. Decreased glutathione-S-transferase activity: Diagnostic and protective role in *vivax* malaria. *Clin. Biochem.* **40**:377-382; 2007.
- [9] Steinbrenner, H.; Sies, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1790**:1478-1485; 2009.
- [10] Dey, S.; Guha, M.; Alam, A.; Goyal, M.; Bindu, S.; Pal, C.; Maity, P.; Mitra, K.; Bandyopadhyay, U. Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free Radic. Biol. Med* **46**:271-281; 2009.
- [11] Kapoor, G.; Banyal, H. S. Glutathione reductase and thioredoxin reductase: novel antioxidant enzymes from *Plasmodium berghei*. *Korean J. Parasitol.* **47**:421-424; 2009.

- [12] 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.* **30**:631-639; 1997.
- [13] Kawazu, S.; Yasuda-Komaki, K.; Oku, H.; Kano, S. Peroxiredoxins in malaria parasites: Parasitologic aspects. *Parasitol Intl* **57**:1-7; 2008.
- [14] Dondorp, A. M.; Kager, P. A.; Vreeken, J.; White, N. J. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today* **16**:228-233; 2000.
- [15] Araujo, C. F.; Lacerda, M. V. G.; Abdalla, D. S. P.; Lima, E. S. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**:517-521; 2008.
- [16] Marchesi, V. T.; Palade, G. E. The localization of Mg-Na-K- Activated Adenosine Triphosphatase on red cell ghost membranes. *J Cell Biol* **35**:385 - 404; 1967.
- [17] Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *Biol Chem* **193**; 1951.
- [18] Brewer, G. J.; Tarlov, A. R.; Alving, A. S. Methaemoglobin reduction test. *Bull. Org. Mond. Sante.* **22**:633-640; 1960.
- [19] Beutler, E.; Duparc, S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**:779-789; 2007.
- [20] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**:121-126; 1984.
- [21] Holmgren, A.; Bjornstedt, M. Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Methods Enzymol* **252**:199-208; 1995.
- [22] Schosinsky, K. H.; Lehmann, H. P.; Beeler, M. F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of *o*-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem* **20**:1556-1563; 1974.

- [23] Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**:70-77; 1959.
- [24] Hu, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* **233**:380-385; 1994.
- [25] Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* **186**:407-421; 1990.
- [26] Narsaria, N.; Mohanty, C.; Das, B. K.; Mishra, S. P.; Praosad, R. Oxidative Stress in Children with Severe Malaria. *J Trop Pediatrics*:1-4; 2011.
- [27] Pabón, A.; Carmona, J.; Burgos, L. C.; Blair, S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clin. Biochem.* **36**:71-78; 2003.
- [28] Sohail, M.; Kumar, R.; Kaul, A.; Arif, E.; Kumar, S.; Adak, T. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to *Plasmodium vivax* compared to *P. falciparum* and upregulates the GST level during malarial infection. *Free Radic. Biol. Med* **49**:1746-1754; 2010.
- [29] Nordberd, J.; Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med* **31**:1287-1312; 2001.
- [30] Kim, S.; Jung, H.; Hyum, D.; Park, E.; Kim, Y.; Lim, C. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie* **92**:927-932; 2010.
- [31] Ehrenwald, E.; Chisolm, G. M.; Fox, P. L. Intact Human Ceruloplasmin Oxidatively Modifies Low Density Lipoprotein. *J. Clin. Invest.* **93**:1493-1501; 1994.
- [32] Das, B. S.; Patnaik, J. K.; Mohanty, S.; Satpathy, S. K. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**; 1993.
- [33] Kumar, S.; Guha, M.; Choubey, V.; Maity, P.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Bandyopadhyay, U. Bilirubin inhibits *Plasmodium falciparum* growth through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med* **44**:602-613; 2008.

- [34] Guha, M.; Kumar, S.; Choubey, V.; Maity, P.; Bandyopadhyay, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *FASEB J* **20**:339-449; 2006.
- [35] Brito, M. A.; Brites, D.; Butterfield, D. A. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. *Brain Res* **1026**:33-43; 2004.
- [36] Miranda-Díaz, A. G.; Hermosillo-Sandoval, J. M.; Ortiz, G. G.; Lizardi-García, D. Serum oxidative stress is increased in patients with post cholecystectomy bile duct injury. *Rev Esp Enferm Dig* **102**:353-356; 2010.
- [37] Silina, E. V.; Stupin, V. A.; Garkhramanov, T. V.; Khokonov, M. A.; Bolevich, S. B.; Men'shova, N. I.; Sinel'nikova, T. G. Oxidative stress in patients with mechanical jaundice of different origin and severity. *Klin Med* **89**:57-63; 2011.

Figures legends:

Fig. 1: Antioxidant enzymes and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in plasma on day zero (D0) of the groups: control, *P. vivax* malaria without jaundice and *P. vivax* malaria with jaundice. Significant differences between the groups are indicated in each graph.

Fig. 2: Antioxidant enzymes and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in erythrocytes on day zero (D0) of the groups: control, *P. vivax* malaria without jaundice and *P. vivax* malaria with jaundice. Significant differences between the groups are indicated in each graph.

Fig. 3: Correlation between the levels of total serum bilirubin and glutathione reductase in the plasma of all patients in each group (n = 44). Significant difference between parameters is indicated in the graph.

Table 1: Clinical, hematological and biochemical parameters

	Control (C)	<i>P. vivax</i> malaria without jaundice (WJ)	<i>P. vivax</i> malaria with jaundice (J)	p-value
n=	28	34	8	CxWJxJ
Age (mean±sd)	25.4±4.6	37.6±15.2	33.5±14.0	0.0033
Sex (%)	male (32)/fem(68)	male(82)/fem(18)	male(38)/fem(63)	
Parasitemia (mm ³)		2428±4276	5353±10598	0.9214
First infection/multiple infection (%)		first(24)/multiple(76)	first(63)/multiple(38)	
Red blood cells (x10 ⁶ /uL)	4.59±0.51	4.65±0.65	4.10±0.68	0.0565
Hemoglobin (g/dL)	13.0±1.35	12.8±1.83	10.8±1.95	0.0041
Platelets (x10 ³ /uL)	228.5±62.0	93.7±52.0	85.1±54.2	<0.0001
Total bilirubin (µmol/L)	18.1±8.55	26.3±10.1	109.3±81.9	<0.0001
Indirect bilirubin (µmol/L)	10.1±6.16	15.7±7.18	28.6±15.2	<0.0001
Direct bilirubin (µmol/L)	8.0±6.67	10.6±6.33	80.7±79.3	<0.0001
AST (U/L)	21.5±8.86	34.5±17.4	74.7±67.1	0.0001
ALT (U/L)	16.4±8.72	34.5±27.0	93.0±91.8	<0.0001
Alkaline Phosphatase (U/L)	57.6±21.4	72.4±28	103.9±68.2	0.1063
Gamma-GT (U/L)	11.5±5.5	45.7±37.3	106.4±92.1	0.0001

RBC: red blood cells, TB: total bilirubin, IB: indirect bilirubin, DB: direct bilirubin, AST: aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase,

AP: alkaline phosphatase

Figure 1:

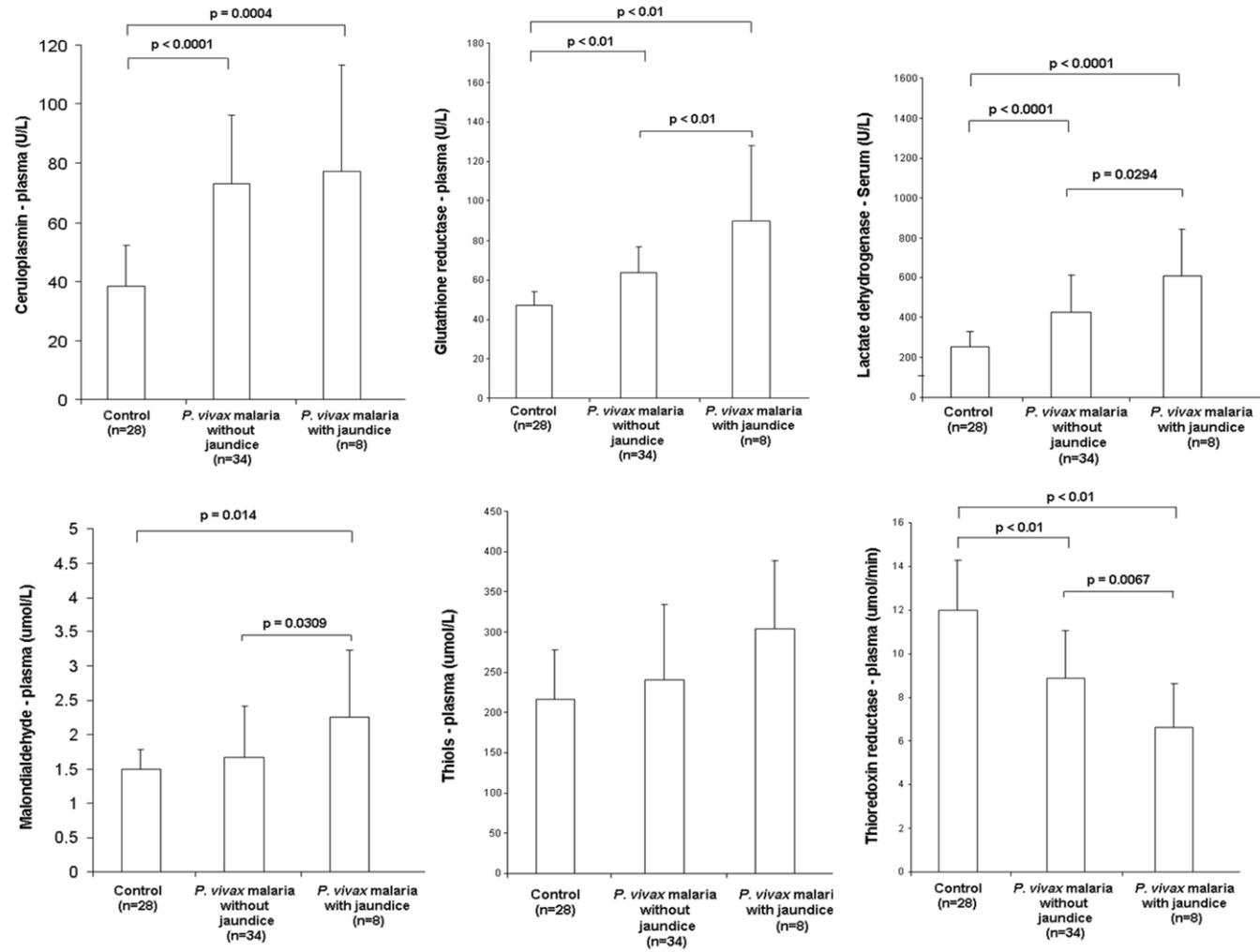


Figure 2:

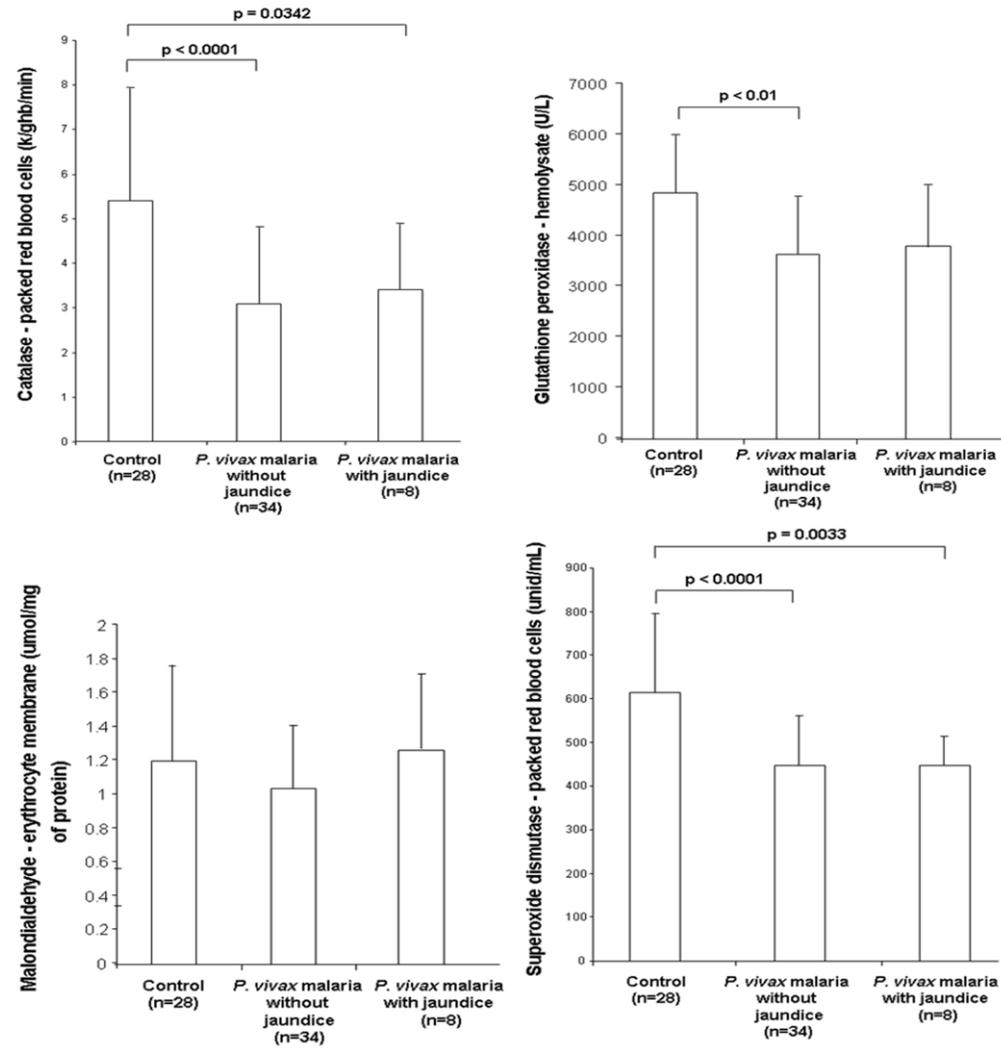
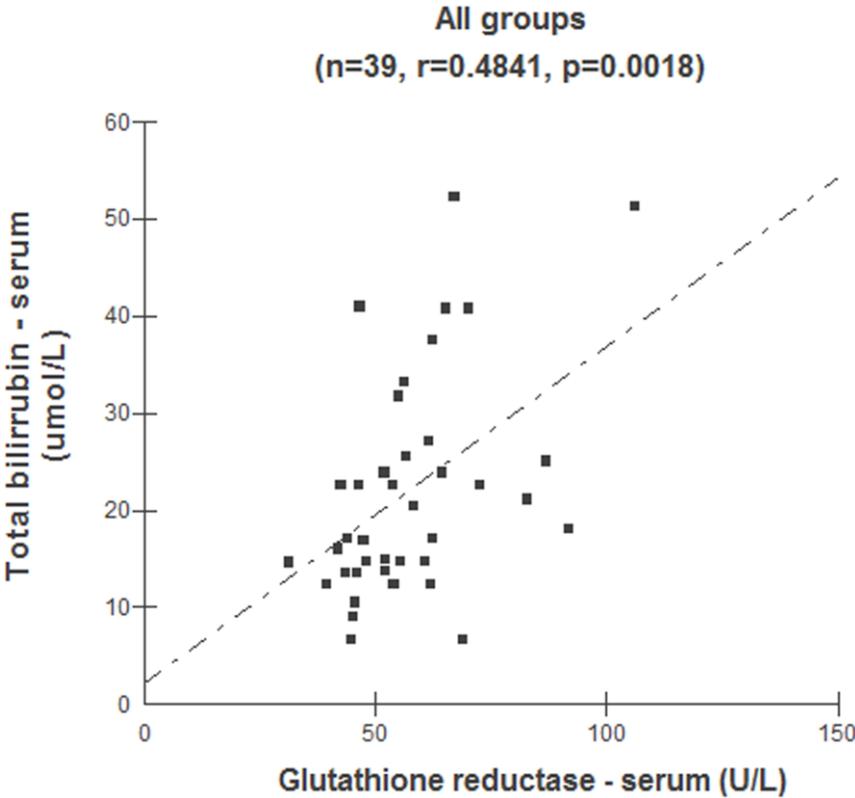


Figure 3:



6 CONCLUSÃO

- Pacientes com malária apresentaram altos níveis de estresse oxidativo em relação aos pacientes saudáveis, que nunca contraíram a doença;
- Pacientes que desenvolveram malária grave com altos níveis de bilirrubina apresentaram maior estresse oxidativo em relação aos pacientes com malária vivax não grave;
- As enzimas antioxidantes apresentaram dois comportamentos frente à doença malárica: as enzimas ceruloplasmina e glutathione redutase tiveram sua atividade aumentada ao passo que as enzimas catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e tioredoxina redutase tiveram suas atividades reduzidas;
- Os pacientes que contraíram malária e dengue no mesmo momento desenvolveram um estresse oxidativo maior que pacientes que desenvolveram apenas malária, e semelhante aos pacientes com malária grave;
- Altos níveis de bilirrubina apresentados pelos pacientes com malária grave podem desempenhar a função de sinalizadores do processo oxidativo em pacientes com esta doença.

7 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, p. 121-126, 1984.
- AKANBI, O.M.; ODAIBO, A.B.; OLATOREGUN, R.; ADEMOWO, A.B. Role of malaria induced oxidative stress on anaemia in pregnancy. *Asian Pacific Journal Tropical Medicine*, v.3, n.3, p.211-214, 2010.
- 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, M.A.D.A. Estudo clínico e epidemiológico dos casos graves de malária vivax em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil. Tese de Mestrado. Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2004. 67 p.
- ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P. G.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, p. 1611-1614, 2010.
- ALDRICH, K; SAUNDERS, D.K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. *Journal of Thermal Biology*, v.26, p. 79-182, 2001.
- ANAND, A.C.; PURI, P. Jaundice in malaria. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.20, p.1322-1332, 2005.
- ANDRADE, B.B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S.M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L.M.A. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, v.9, n.13, 2010.
- ANTUNES, M.V.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G.D.; LINDEN, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.2, p.279-287, 2008.
- ARAÚJO, C.F.; LACERDA, M.V.G.; ABDALLA, D.S.P.; LIMA, E.S. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 517-521, 2008.
- ARNÉR, E.S.J. e HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, v.267, p.6102-6109, 2000.
- ASHLEY, E.; MCGREADY, R; PROUX, S; NOSTEN, F. Malaria. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v.4, p.159-173, 2006.

BECKER, K.; TILLEY, L.; VENNERSTROM, J.L.; ROBERTS, D.; ROGERSON, S.; GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International Journal of Parasitology*, v.34, n.2, p.163-189, 2004.

BERNHARDT V.G.; PINTO, J.R.T.; PAI, V.R. Superoxide dismutase: An alternate target for Plasmodium. *Biomedical Research*, v.20, p.127-135, 2009.

BEUTLER, E.; DUPARC, S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, n.4, p.779-789, 2007.

BREWER, G.J.; TARLOV, A.R.; ALVING, A.S. Methaemoglobin reduction test. *Bull Org Mond Sante*, v.22, p.633-640, 1960.

CARVALHO, B.O.; LOPES, S.C.P.; NOGUEIRA, P.A.; ORLANDI, P.P.; BARGIERI, D.Y.; BLANCO, Y.C.; MAMONI, R.; LEITE, J.A.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, I.S.; OLIVEIRA, T.R.; WUNDERLICH, G.; LACERDA, M.V.G.; PORTILLO, A.D.; ARAUJO, M.O.G.; RUSSEL, B.; SUWANARUSK, R.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L.; COSTA, F.M.T. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-Infected erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, v.202, n.4, p.638-647, 2010.

DANIEL-RIBEIRO, C.T.; LACERDA, M.V.G.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Paludisme dû à Plasmodium vivax en Amazonie brésilienne: quelques aspects de son épidémiologie, de ses manifestations cliniques et des réactions immunitaires naturellement acquises. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, v.101, n.3, p.243-248, 2008.

DEHARO, E.; BARKAN, D.; KRUGLIAK, M.; GOLENSER, J.; GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent by drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochemical Pharmacology*, v.66, p.809-817, 2003.

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

DOCKRELL, H.M.; ALAVI, A.; PLAYFAIR, J.H.L. Changes in oxidative burst capacity during murine malaria and the effect of vaccination. *Clinical & Experimental Immunology*, v.66, p. 37-43, 1986.

DONDORP, A.M.; KAGER, P.A.; VREEKEN, J.; WHITE, N.J. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitology Today*, v.16, n.6, p.228-233, 2000.

EGAN, T.J.; COMBRINCK, J.M.; HEARNE, G.R.; MARQUES, H.M.; NTENTENI, S.; SEWELL, B.T.; SMITH, P.J.; TAYLO, D.; VAN SCHALKWYK, D.D.; WALDEN, J.C. Fate of haem iron in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Biochemistry Journal*, v.365, p.343-347, 2002.

ELAHI, M.M.; KONG, Y.X.; MATATA, B.M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2, n.5, p.259-269, 2009.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, p. 70-77, 1959.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, v. 186, p. 407-421, 1990.

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

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

FENDEL, R.; BRANDTS, C.; RUDAT, A.; STEUR, C.; APPELMANN, I.; RUEHE, B.; SCHRODER, P.; BERDEL, W.E.; KREMSNER, P.G.; MORDMULLER, B. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. *Plos one*, v.5, n.4, p.1-8, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação de Medicina Brasileira*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FORMAN, H.J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, v.30, p.1-12, 2009.

FRANKLIN, B. S.; VITORINO, B. L. F.; COELHO, H. C.; MENEZES-NETO, A.; SANTOS, M. L. S.; CAMPOS, F. M. F.; BRITO, C. F.; FONTES, C. J.; LACERDA, M. V.; CARVALHO, L. H. Plasma Circulating Nucleic Acids Levels Increase According to the Morbidity of *Plasmodium vivax* Malaria. *Plos one*, v. 6, 2011.

FREVERT, U.; NARDIN, E. Arrest in the Liver — A Genetically Defined Malaria Vaccine? *The New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 15, p. 1600-1602, 2005.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR HEITOR VIEIRA DOURADO. Informe Epidemiológico Número 12 - Ano V/2010. Manaus: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, 2010.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR HEITOR VIEIRA DOURADO. VigiWeb - Sistema de Informações Operacionais e Epidemiológicas - Ano 2011. Manaus: Fundação de Medicina Dr. Heitor Vieira Dourado, 2011

GARCIA, L.S. Malaria. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, p. 93-129, 2010.

- GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes chemiluminescent assay. *Talanta*, v.51, p.685-692, 2000.
- GOYAL, M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*, v.1, n.10, p.888-897, 2010.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 177, p. 751-766, 1949.
- GUHA, M.; KUMAR, S.; MAITY, P.; BANDYOPADHYAY, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *FASEB Journal*, v.20, p.339-449, 2006.
- HABDOUS, M.; VINCENT-VIRY, M.; VISVIKIS, S.; SIEST, G. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, v.326, p.131-142, 2002.
- HALDAR, K.; MURPHY, S.C.; MILNER, D.A.; TAYLOR, T.R. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v.2, p.217-249, 2007.
- HALDAR, K.; MOHANDA, N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology*, v.1, p.87-93, 2009.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press. Fourth Edition. 2007
- HOLMGREN A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Methods in Enzymology*, v.252, p.199-208, 1995.
- HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.396, p.120-124, 2010.
- HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 380-385, 1994.
- IFOUE, S.H.T.; MOFOR, C.T.; GOUADO, I.; TETO, G.; ASONGANYI, T.; ZOLLO, P.H.A. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status of pregnant women suffering from malaria in Cameroon. *Indian Journal Clinical Biochemistry*, v.24, n.3, p.288-293, 2009.
- IMAI, Y.; KONDO, H.; ISHIKAWA, T.; TSUBOTA, K.; YAMAGUCHI, T. A numerical model of blood flow with malaria-infected red blood cells. *Journal of Biomechanics*, v.41, n.1, p.S429, 2008.
- JAIN, N.C. Hematology techniques. In: JAIN, N.C. *Shalm's Veterinary Haematology*. Philadelphia: Lea&Febiger, 1986.

KAPOOR, G.; BANYAL, H.S. Glutathione reductase and thioredoxin reductase: novel antioxidant enzymes from *Plasmodium berghei*. *Korean Journal of Parasitology*, v.47, n.4, p.421-424, 2009.

KAWAZU, S.; YASUDA-KOMAKI, K.; OKU, H.; KANO, S. Peroxiredoxins in malaria parasites: Parasitologic aspects. *Parasitology Internacional*, v.57, p.1-7, 2008.

KIM, J. S.; OH, J. S.; CHANG, E.; BAE, S. Y.; NAM, D. H.; LEE, C. H.; YANG, J. H.; LEE, C. K.; LEE, W. J.; KIM, H. C.; KLEIN, T. A.; LIM, C. S.; KIM, Y. K. Alteration of platelet counts and lipid profiles after treatment of acute *Plasmodium vivax*. *Acta Trop*, v.106, p.39-43, 2008.

KIM, S.; JUNG, H.; HYUM, D.; PARK, E.; KIM, Y.; LIM, C. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie*, v.92, p.927-932, 2010.

KOCHAR, D. K.; SAXENA, V.; SINGH, N.; KOCHAR, S. K.; KUMAR, S. V.; DAS, A. *Plasmodium vivax* Malaria. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p.132-134, 2005.

KOCHAR, D.K.; DAS, A.; KOCHAR, S.K.; SAXENA, V.; SIHORI, P.; GARG, S.; KOCHAR, A.; KHATRI, M.P.; GUPTA, V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: A report on serial cases from Bikaner in Northwestern India. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, n.2, p.194-198, 2009.

KUMAR, S.; GUHA, M.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K.; BANDYOPADHYAY, U. Bilirubin inhibits *Plasmodium falciparum* growth through the generation of reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, v.44, p.602-613, 2008.

LABIÓS, M.; MARTÍNEZ, M.; GABRIEL, F.; GUIRAL, V.; DASÍ, F.; BELTRÁN, B.; MUÑOZ, A. Superoxide dismutase and catalase anti-oxidant activity in leukocyte lysates from hypertensive patients: effects of eprosartan treatment. *Journal of Renine Angiotensin Aldosterone System*, v.10, p.24-30, 2009.

LI, Y.; WEI, G.; CHEN, J. Glutathione: a review on biotechnological production. *Application of Microbiological Biotechnology*, v.66, p.233-242, 2004.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37, n.3, p.293-303, 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.

LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, 1951.

MAES, M.; CALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2010.

MARCHESI, V.T.; PALADE, G.E. The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. *The Journal of Cell Biology*, v. 35, p. 385-404, 1967.

MARTINS, M.M.R. Influência da atividade física e do ambiente sobre os níveis de glutathione peroxidase e perfil lipídico em grupo de terceira idade. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Gestão Tecnologia, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2007. 74 p.

MARTINEZ-HERVAS, S.; REAL, J.T.; IVORRA, C.; PRIEGO, A.; CHAVES, F.J.; PALLARDO, F.V.; VIÑA, J.R.; REDON, J.; CARMENA, R.; ASCASO, J.F. Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v.20, p.734-739, 2010.

MENDIS, K; SINA, B.J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, n. 1-2, p. 97-106, 2001.

MIN, J.Y.; LIM, S-O.; JUNG, G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Letters*, v.584, p.2427-2432, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília-DF. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2009.

MONOSTORI, P.; WITTMANN, G.; KARG, E.; TÚRI, S. Determination of glutathione disulfite in biological samples: An in-deph review. *Journal of Chromatography B*, v.877, p.3331-3346, 2009.

MONTAGNER, G.F.F.S. Efeito in vitro do polimorfismo ALA16VAL do gene da superóxido dismutase dependente de manganês no metabolismo oxidativo de linfócitos. Tese de Mestrado. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

MOECKEL, G.W.; SHADMAN, R.; Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. *Life Sciences*, v.71, p. 2413-2424, 2002.

MOHANTY, J.G.; JAFFE, J.S.; SCHULMAN, E.S.; RAIBLE, D.G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*, v. 202, p. 133-141, 1997.

NOGUEIRA, F. ; DIEZ, A.; RADFAR, A.; BENAVENTE, S.; ROSARIO, V.E.; PUYET, A.; BAUTISTA, J.M. Early transcriptional response to chloroquine of the *Plasmodium falciparum* antioxidant defence in sensitive and resistant clones. *Acta Tropical*, v.114, n.2, p.109-115, 2010.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. World Malaria Report 2009. Geneva: WHO Press 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. World Malaria Report 2010. Geneva: WHO Press 2010.

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

PAGLIA, D.E; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal Laboratory Clinical Medical*, v.70, p. 158-169, 1967.

PATEL, M.P.; MARCINKEVICIENE, J.; BLANCHARD, J.S. Enterococcus faecalis glutathione reductase: purification, characterization and expression under normal hyperbaric O₂ conditions. *FEMS Microbiology Letters*, v.166, p.155-163, 1998.

PEREIRA, A.L. Efeitos dos Flavonóides na oxidação da hemoglobina e peroxidação lipídica em eritrócitos normais e deficientes em glicose-6-fosfato desidrogenase. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

PRICE, R.N.; TJITRA, E.; GUERRA, C.A.; YEUNG, S.; WHITE, N.J.; ANSTEY, N.M. Vivax Malaria: neglected and not benign. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, n.6, p.79-87, 2007.

PRICE, R.N.; DOUGLAS, N.M.; ANSTEY, N.M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Current Opinion of Infected Diseases*, v.22, p.430-435, 2009.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*: Elsevier. 2008 (6^a Edição)

ROGERSON, S.; CARTER, R. Severe vivax malaria: Newly Recognised or Rediscovered? *Plos Medicine*, v.5, n.6, p.875-877, 2008.

ROLL BACK MALARIA. Disponível em: <<http://rbm.who.int/>>. Acesso em 10.out, 2005.

SANTANA, M.S.; ROCHA, M.A.F.; ARCANJO, A.R.L.; SARDINHA, J.F.J.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.A. Associação de metemoglobina e deficiência de

glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.5, p.533-536, 2007.

SCHOSINSKY, K. H.; LEHMANN, H. P.; BEELER, M. F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clinical Chemistry*, v.20, p.1556-1563, 1974.

SCHEETZ, E. Erythrocyte biology and its impact on Plasmodium vivax invasion. Department of Pathology, Case Western Reserve University, 2008. 43 p.

SIDDIQI, N.J.; PANDEY, V.C. Studies on hepatic oxidative stress and antioxidant defence systems during artemether treatment of Plasmodium youllei nigeriensis infected mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.196, p.169-173, 1999.

SINGH, H.; PARAKH, A.; BASU, S.; RATH, B. Plasmodium vivax malaria: Is it actually benign? *Journal of Infection and Public Health*, v. 4, p. 91-95, 2011.

SOHAIL, M.; KUMAR, R.; KAUL, A.; ARIF, E.; KUMAR, S.; ADAK, S. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to Plasmodium vivax compared to P. falciparum and upregulates the GST level during malarial infection. *Free Radical Biology & Medicine*, v.49, p.1746-1754, 2010.

SUH, K.N.; KAIN, K.C.; KEYSTONE, J.S. Malária. *The Canadian Medical Association Journal*, v. 170, n. 11, p. 1693-1702, 2004.

TAN, L.K.K. ; YACOUB, S.; SCOTT, S.; BHAGANI, S. ; JACOBS, M. et al. Acute lung injury and other serious complications of Plasmodium vivax malaria. *Lancet Infectious Diseases*, v.8, p.449-454, 2008.

TORDSDOTTIR, G.; KRISTINSSON, J.; SNAEDAL, J.; SVEINBJORNSDÓTTIR, S.; GUDMUNDSSON, G.; HREIDARSSON, S.; JÓHANNESSON, T. Case-control on ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in neurodegenerative diseases: A short review. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 299, p. 51-54, 2010.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v.30, n.5, p.1323 – 1338, 2007.

VITOR-SILVA, S.; REYES-LECCA, R.C.; PINHEIRO, T.R.A.; LACERDA, M.V.G. Malaria is associated with poor school performance in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Malaria Journal*, v.8, n.230, 2009.

WALKER, N.; NADJM, B.; WHITTY, C.M.J. Malaria. *Medicine*, v.38, n.1, p.41-46, 2009.

Apêndice A – Dados complementares

Tabela 1: Parâmetros hematológicos no dia zero (D0) dos grupos controle, deficiência em G6PD, malária não grave, malária grave e co-infecção

	Controle	Deficiência em G6PD	Malária não grave	Malária grave	Co-infecção	p
	C	-----	M	MG	CI	CxMxMGxCI
Células brancas (x10³/uL)	6,69±1,65	5,8	5,33±1,59	5,41±1,18	5,40±2,52	0,1351
HCT (%)	39,8±3,84	40,6	41,3±5,46	34,5±6,88	35,4±5,51	0,0065
VCM (fL)	89,9±4,54	93,3	88,9±3,79	83,9±5,66	88,5±2,56	0,5404
RDW (%)	12,8±0,71	15,6	14,5±1,49	15,7±1,29	14,6±1,37	0,0000
HCM (pg)	28,5±2,12	28	27,6±1,41	26,3±2,28	28,4±1,25	0,0161
MCHC (g/dL)	32,7±1,26	30	31,1±1,60	31,3±2,04	31,5±0,93	0,0031
Linfócito (%)	34,64±7,92	36,7	29,4±10,4	30,5±9,55	39,8±9,09	0,0760
Mix (%)	10,9±3,31	18,2	16,9±8,7	12,9±7,06	12,00±8,27	0,0092
Neutrófilo (%)	54,4±9,67	45,1	53,3±11,1	56,7±13,9	51,6±8,34	0,8493
VPM (fL)	10,0±0,89	9,5	10,6±1,1	10,3±1,49	10,1±0,21	0,2891

HCT: hematócrito, VCM: volume corpuscular médio, RDW: distribuição da largura das células vermelhas, HCM: hemoglobina corpuscular média, MCHC: concentração de hemoglobina globular média, Mix: basófilo, eosinófilo e monócito, VPM: volume plaquetário médio.

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos no dia zero (D0) dos grupos controle, deficiência em G6PD, malária não grave, malária grave e co-infecção

	Controle	Deficiência em G6PD	Malária não grave	Severe malária	Co-infecção	p
	C	-----	M	MG	CI	CxMxMGxCI
Glicose (mg/dL)	85,0±13,9	70	82,9±18,8	71,9±10,7	77±1,73	0,2187
Creatinina (mg/dL)	0,84±0,13	1,4	0,97±0,2	0,68±0,26	0,92±0,14	0,0010
Ácido úrico (mg/dL)	3,87±1,72	3,1	4,18±1,66	3,09±1,42	4,73±1,22	0,1916
Proteínas totais (g/dL)	6,06±1,12	5,8	6,25±0,63	5,76±0,95	6,21±0,34	0,4709
Albumina (g/dL)	4,16±0,43	3,9	3,67±0,49	3,19±0,58	3,31±0,62	0,5300
Uréia (mg/dL)	27,7±5,88	33,8	31,7±10,3	31,9±12,3	44,6±21,3	0,0306
Colesterol total (mg/dL)	179,1±33,4	100	107,8±35,6	115,6±14,2	90±15,5	0,0000
Triglicerídeos (mg/dL)	86,9±39,9	103	158,3±80,3	148,9±52,7	286,7±44,8	0,0000
VLDL (mg/dL)	17,9±8,38	20,6	29,9±12,8	29,8±12,6	57,5±9,06	0,0000
LDL (mg/dL)	66,2±36,2	51,4	35,8±25,7	47,6±25,2	17±14,3	0,0022
HDL (mg/dL)	93,8±34,4	28	46,3±14,8	37,7±23,5	15,7±6,35	0,0000

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade, LDL: lipoproteína de baixa densidade, HDL: lipoproteína de alta densidade.

Tabela 3: Correlação no dia zero (D0) das enzimas antioxidantes e do marcador malondialdeído com bilirrubina total e frações em todos os grupos de pacientes

	n	Bilirrubina total soro (mg/dL)		Bilirrubina indireta soro (mg/dL)		Bilirrubina direta soro (mg/dL)	
		p	r	p	r	p	r
Catalase – papa de hemácia (k/ghb/min)	73	0,1608	-0,1658	0,1328	-0,1775	0,3013	-0,1226
Ceruloplasmina – plasma (U/L)	73	0,0010	0,3768	0,0002	0,4227	0,2388	0,1396
Glutaciona peroxidase – hemolisado (U/L)	73	0,0190	-0,2738	0,0083	-0,3065	0,2571	-0,1343
Glutaciona redutase – plasma (U/L)	45	< 0,0001	0,6146	0,0005	0,4945	< 0,0001	0,5650
Malondialdeído – plasma (µmol/L)	73	0,0341	0,2483	0,0355	0,2465	0,1853	0,1567
Malondialdeído – membrana de eritrócito (µmol/mg de proteína)	73	0,9300	0,0105	0,7663	0,0354	0,5126	-0,0779
Superóxido dismutase – papa de hemácia (unid/mL)	73	0,0003	-0,4146	0,0016	-0,3618	0,0044	0,3296
Tioredoxina redutase – plasma (µmol/min)	58	0,0008	-0,4271	0,0698	-0,2397	0,0024	-0,3913
Tióis - plasma (µmol/L)	73	0,0022	0,3530	0,0385	0,2426	0,0067	0,3143

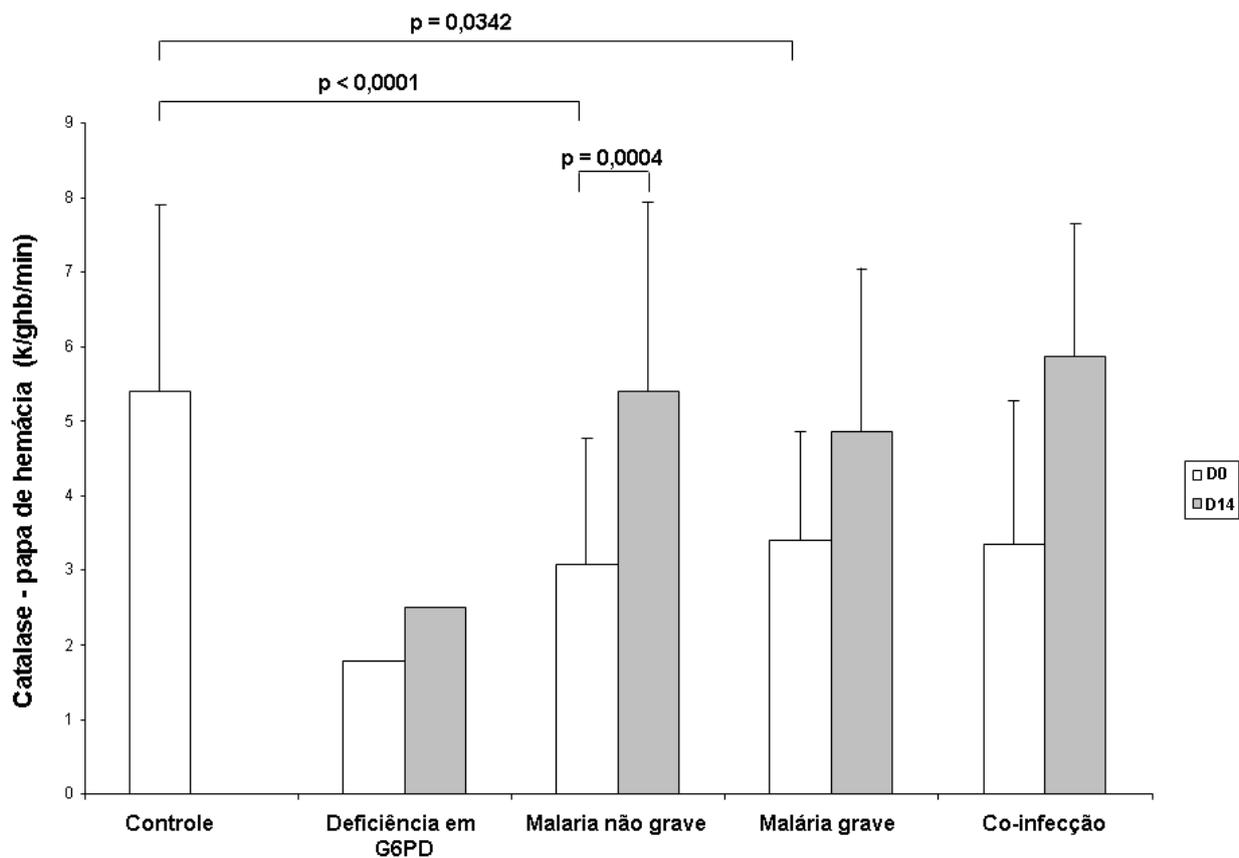


Figura 1: Níveis de Catalase expresso em k/ghb/min em papa de hemácias de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foram encontradas diferenças significativas do grupo controle quando comparado com os grupos malária grave e não grave (D0). No grupo malária não grave observou-se diferença significativa entre os dias 0 e 14.

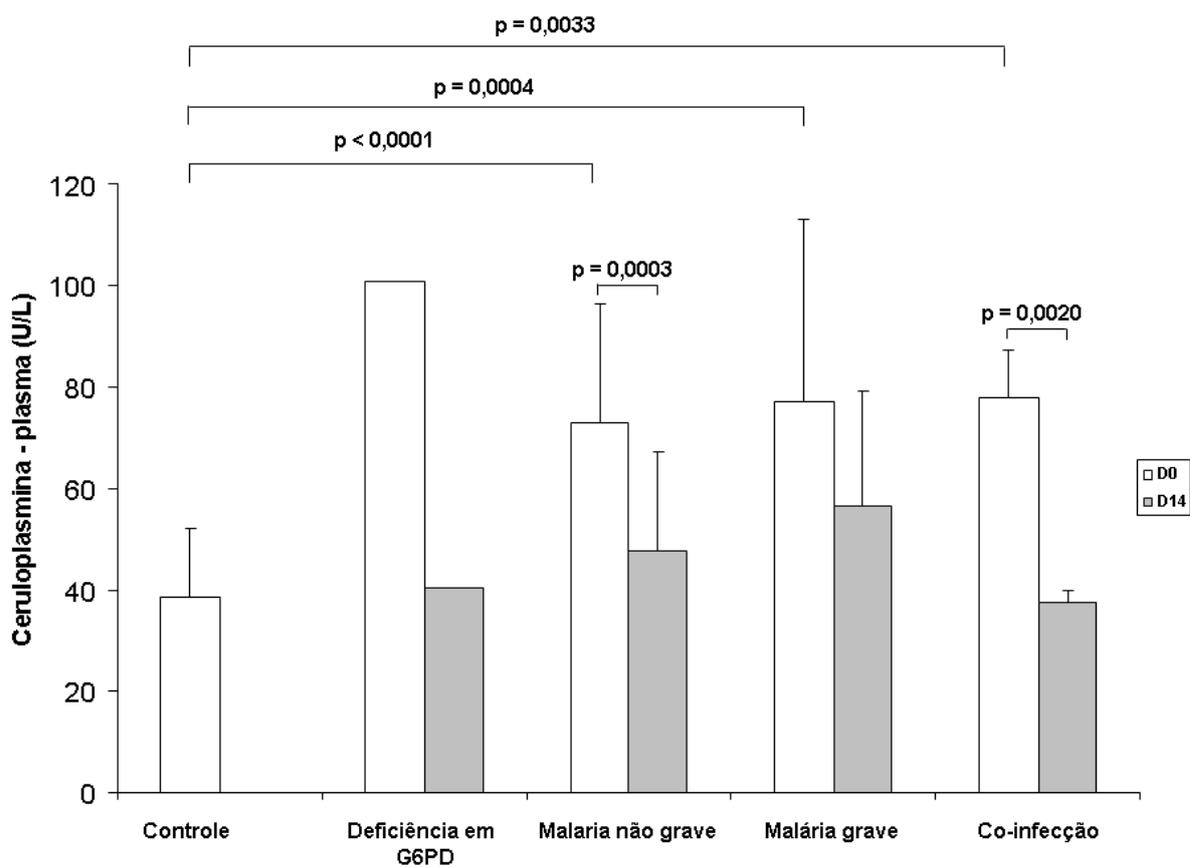


Figura 2: Níveis de Ceruloplasmina expresso em U/L no plasma de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foram encontradas diferenças significativas do grupo controle quando comparado com os grupos malária não grave, malária grave e co-infecção (D0). Nos grupos malária não grave e co-infecção observaram-se diferenças significativas entre os dias 0 e 14.

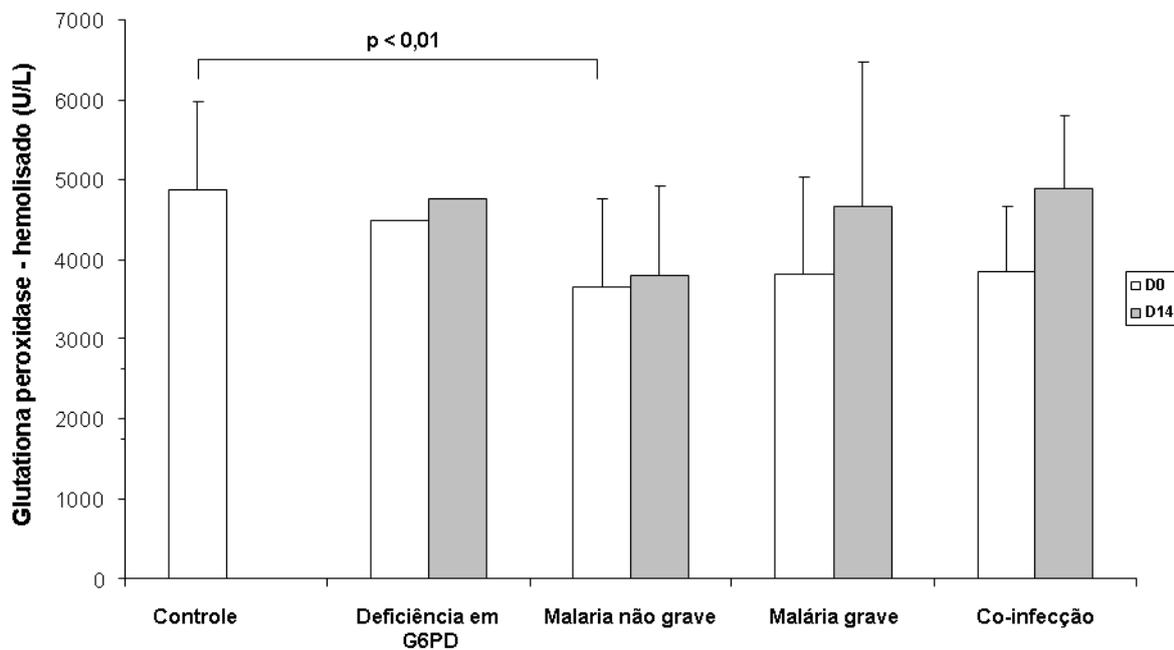


Figura 3: Níveis de Glutathione peroxidase expresso em U/L no hemolisado de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foi encontrada diferença significativa do grupo controle quando comparado com o grupo malária não grave (D0).

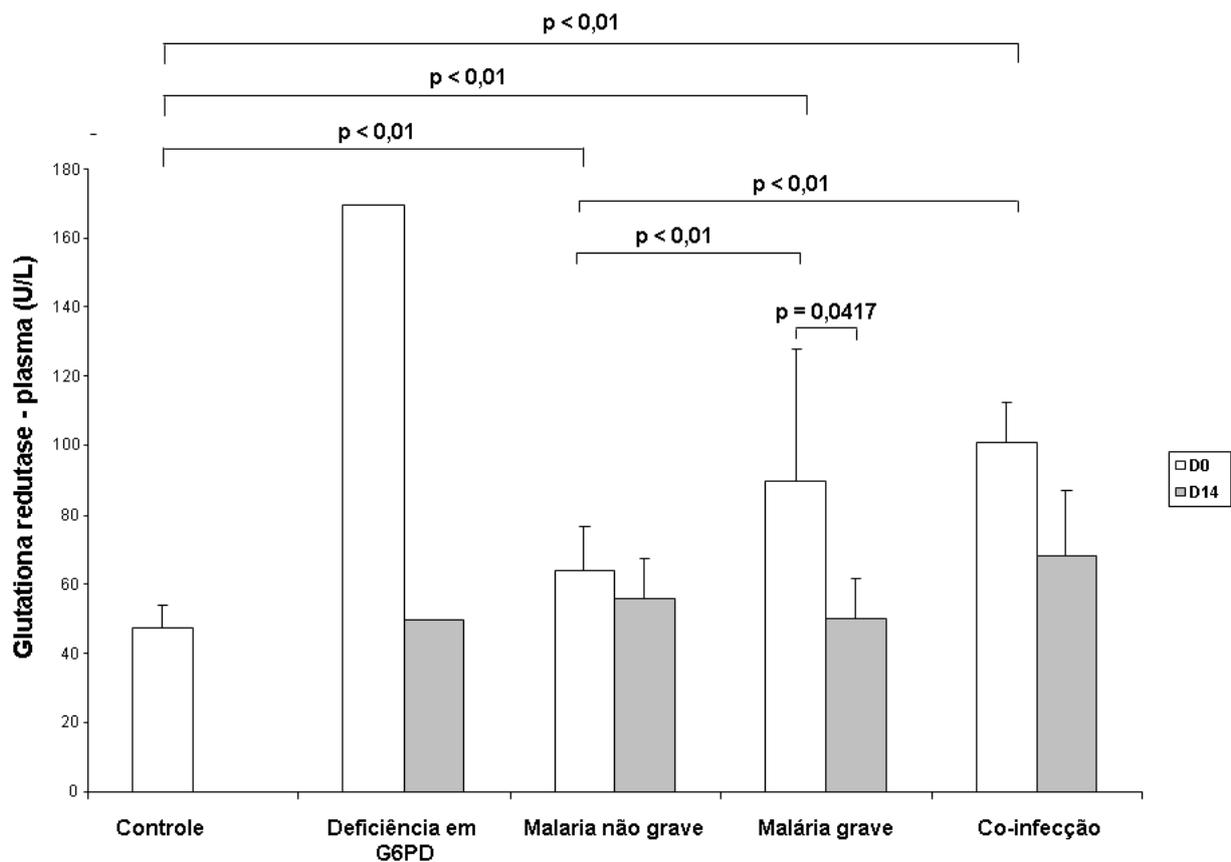


Figura 4: Níveis de Glutathione redutase expresso em U/L no plasma de pacientes dos grupos: controle (n=18), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=19, D14 n=7), malária grave (D0 n=5, D14 n=4) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foram encontradas diferenças significativas do grupo controle quando comparado com os grupos malária não grave, malária grave e co-infecção como também, do grupo malária não grave quando comparado com os grupos malária grave e co-infecção (D0). No grupo malária grave observou-se diferença significativa entre os dias 0 e 14.

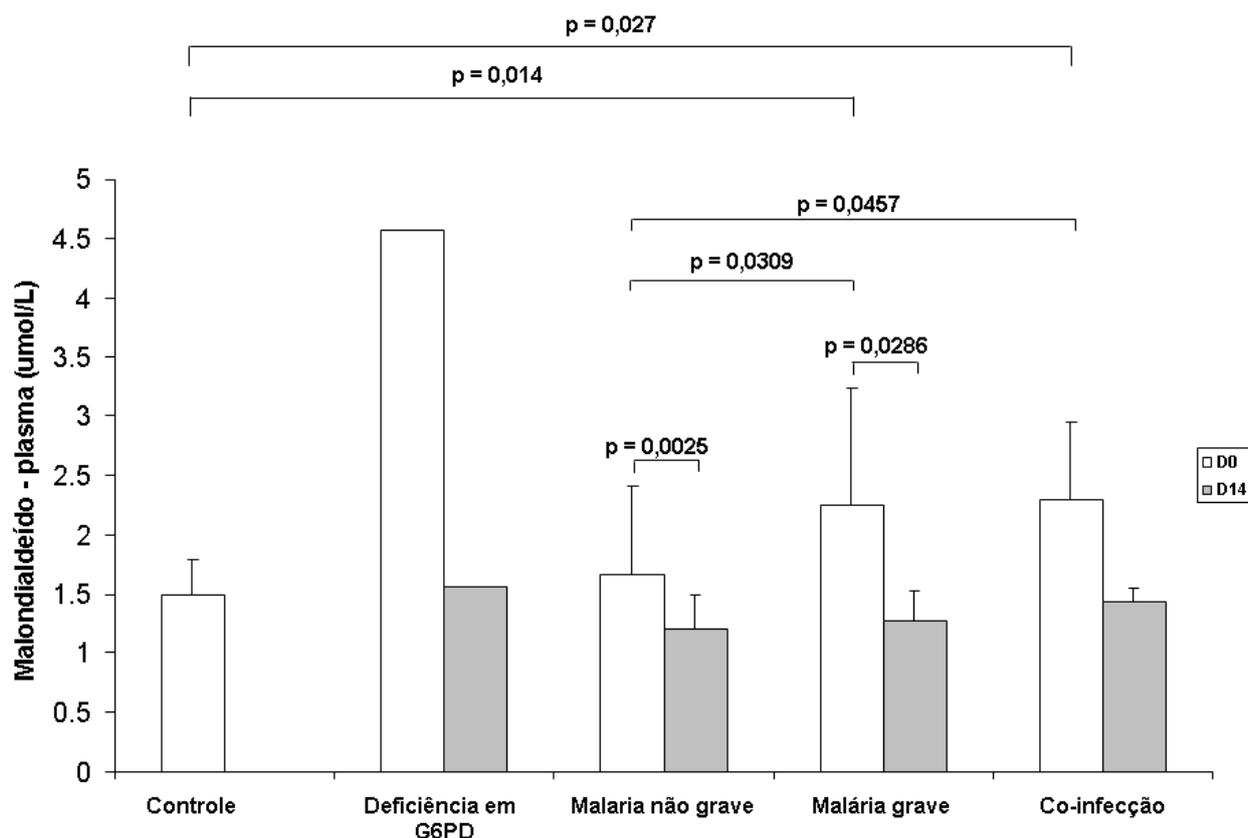


Figura 5: Níveis de Malondialdeído expresso em $\mu\text{mol/L}$ no plasma de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foram encontradas diferenças significativas do grupo controle quando comparado com os grupos malária grave e co-infecção como também, do grupo malária não grave quando comparado com os grupos malária grave e co-infecção (D0). Nos grupos malária não grave e malária grave observaram-se diferenças significativas entre os dias 0 e 14.

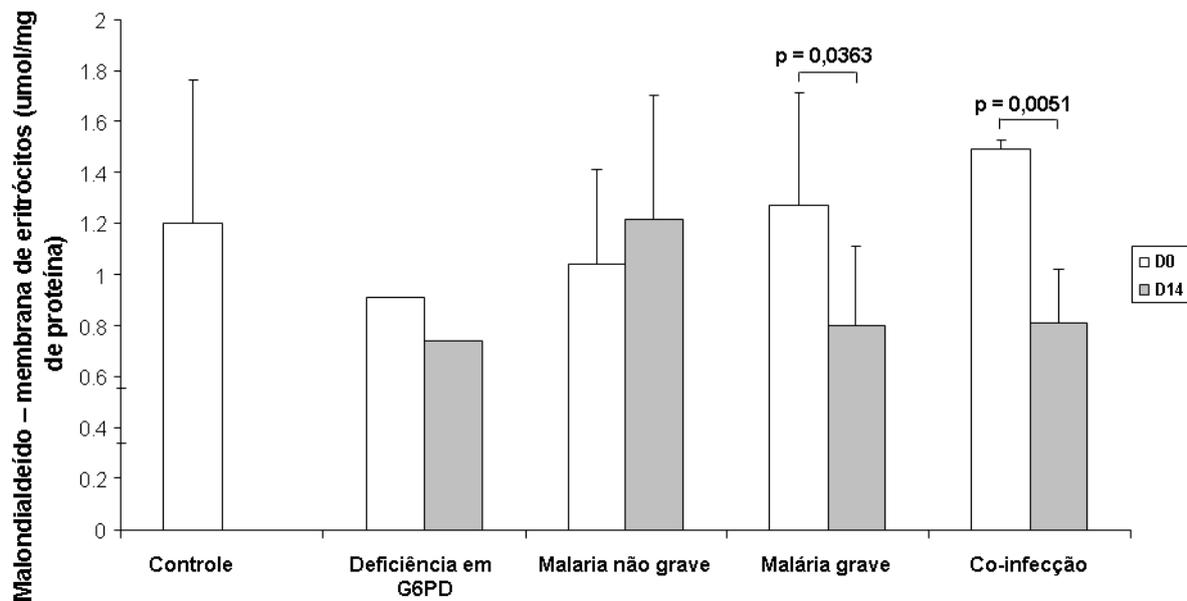


Figura 6: Níveis de Malondialdeído expresso em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína em membrana de eritrócitos de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Nos grupos malária não grave e co-infecção observaram-se diferenças significativas entre os dias 0 e 14.

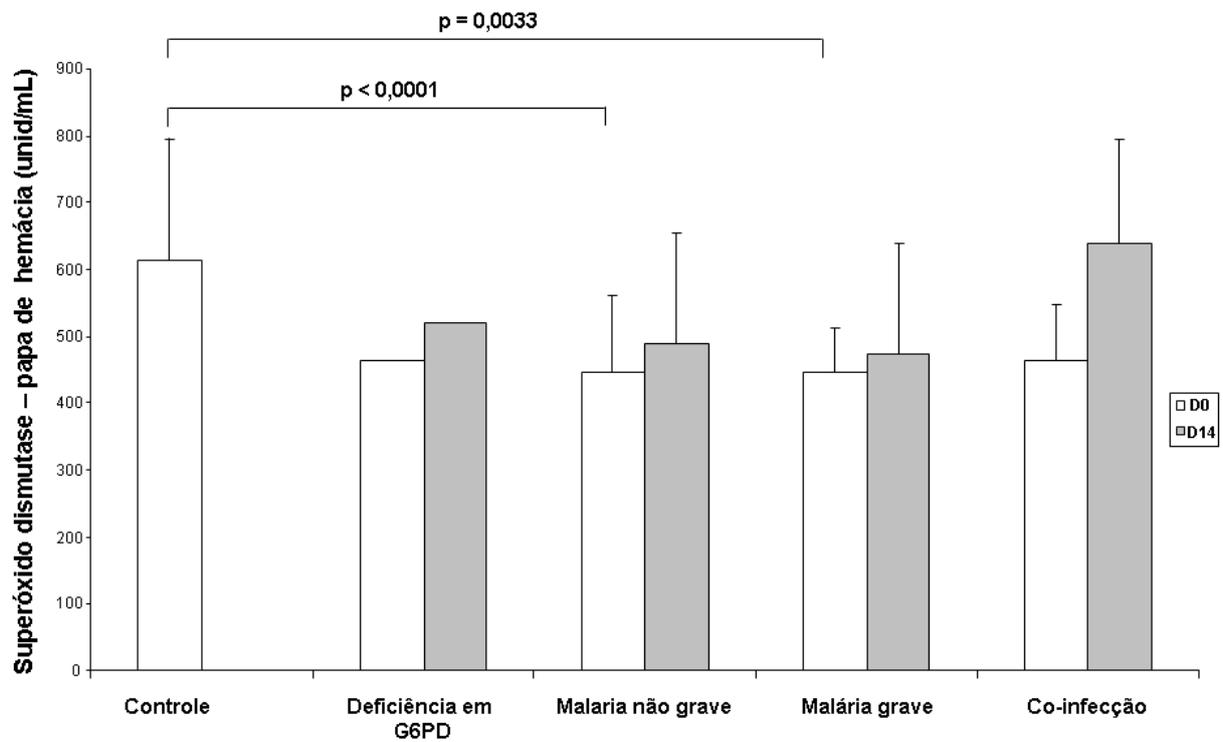


Figura 7: Níveis de Superóxido dismutase expresso em unid/mL em papa de hemácia de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foram encontradas diferenças significativas do grupo controle quando comparado com os grupos malária não grave e malária grave (D0).

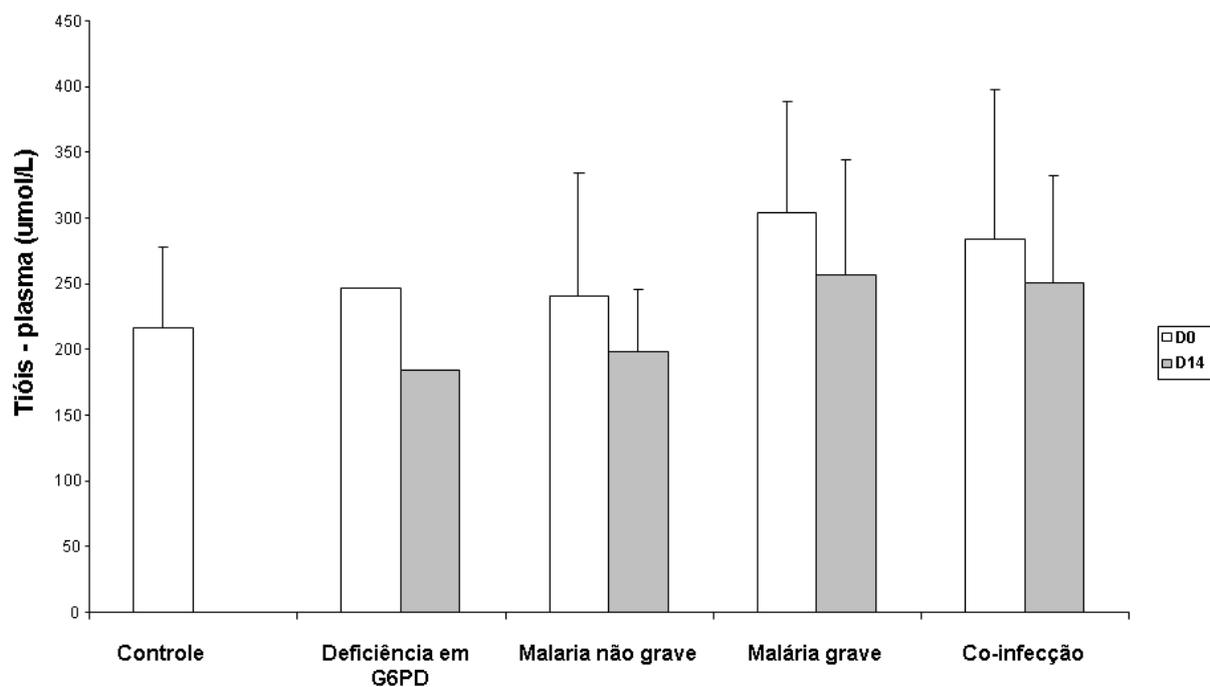


Figura 8: Níveis de Tióis expresso em $\mu\text{mol/L}$ em plasma de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3).

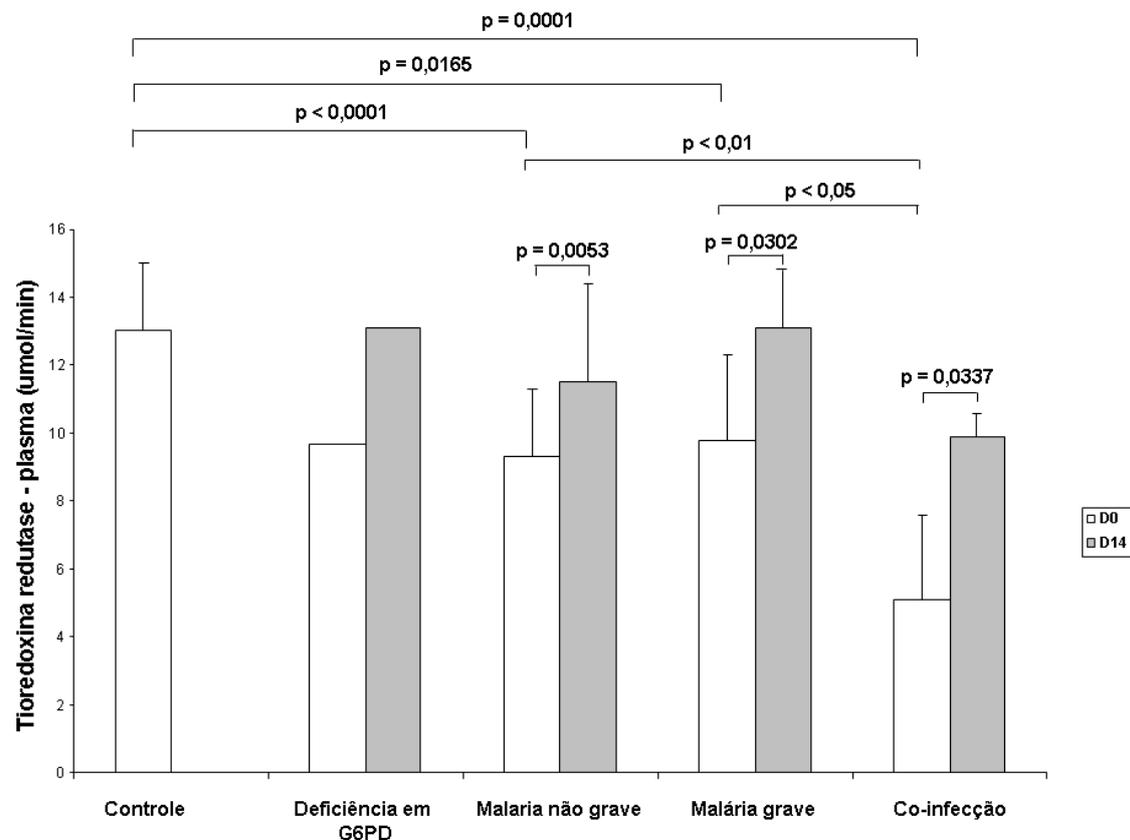


Figura 9: Níveis de Tioredoxina redutase expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}$ no plasma de pacientes dos grupos: controle (n=19), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=31, D14 n=13), malária grave (D0 n=6, D14 n=5) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foram encontradas diferenças significativas do grupo controle quando comparado com os grupos malária não grave, malária grave e co-infecção, como também, dos grupos malária não grave e malária grave quando comparados com o grupo co-infecção (D0). Nos grupos malária não grave, malária grave e co-infecção observaram-se diferenças significativas entre os dias 0 e 14.

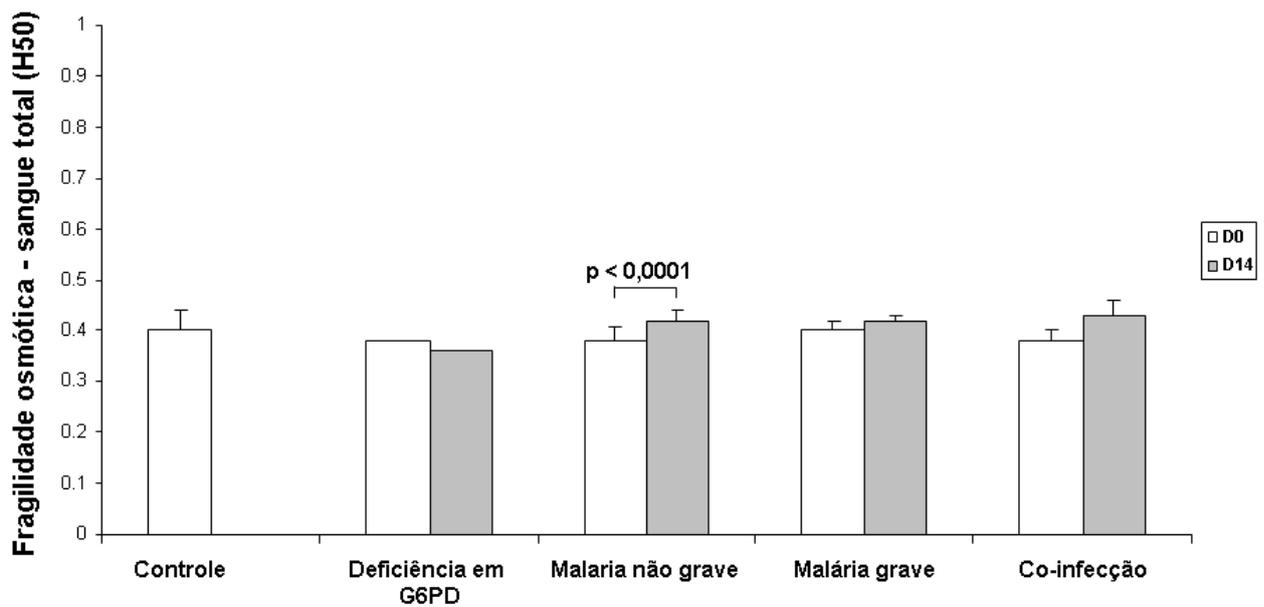


Figura 10: Níveis de Fragilidade osmótica expresso em H₅₀ no sangue total de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). No grupo malária não grave observou-se diferenças significativas entre os dias 0 e 14.

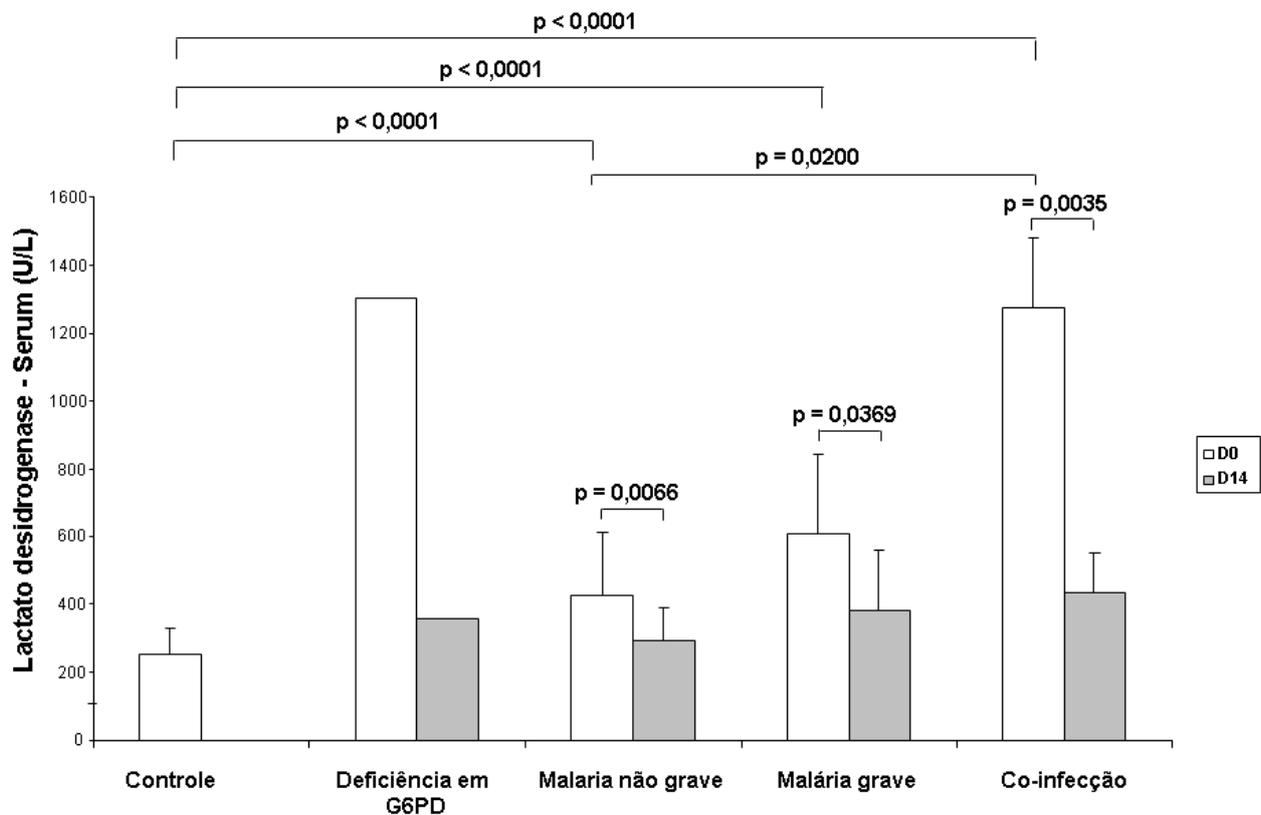


Figura 11: Níveis de Lactato desidrogenase expresso em U/L no soro de pacientes dos grupos: controle (n=28), deficiência em G6PD (D0 n=1, D14 n=1), malária não grave (D0 n=34, D14 n=18), malária grave (D0 n=8, D14 n=7) e co-infecção (D0 n=3, D14 n=3). Foram encontradas diferenças significativas do grupo controle quando comparado com os grupos malária não grave, malária grave e co-infecção, como também, do grupo malária não grave quando comparado com o grupo co-infecção (D0). Nos grupos malária não grave, malária grave e co-infecção observaram-se diferenças significativas entre os dias 0 e 14.

Apêndice B – Aprovação do Comitê de Ética



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 2045

Registro CEP Nº912-11

CAAE – 0075.0.115.114-11

Processo Nº912/2011-FMT-AM

Projeto de Pesquisa: Marcadores de estresse oxidativo em plasma, plaquetas e eritrócitos de pacientes com malária vivax grave.

Pesquisador responsável: Camila Fabbri.

Instituição Sediadora: Universidade Federal do Amazonas.

Instituição Vinculada: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Área Temática Especial: Não se aplica.

Patrocinador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq.

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

Ao se proceder à análise relativa 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 28 de abril de 2011 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, 28 de abril de 2011.

Luiz Carlos de Latta Nemeiro
Diretor do Comitê de Ética em Pesquisa
FMTAM

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

