



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**RELAÇÃO ENTRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A  
PLAQUETIMETRIA DE PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX**

**CLAUDIO FERNÁNDEZ ARAUJO**

**MANAUS  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**CLAUDIO FERNÁNDEZ ARAUJO**

**RELAÇÃO ENTRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A  
PLAQUETIMETRIA DE PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima**

**MANAUS  
2007**

**CLAUDIO FERNÁNDEZ ARAUJO**

**RELAÇÃO ENTRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A  
PLAQUETIMETRIA DE PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 10 de julho de 2007.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Emerson Silva Lima, Presidente.  
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Ivete de Araújo Roland, Membro.  
Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, Membro.  
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Dedico este trabalho a todas as pessoas que fazem da ciência um meio para construir um mundo melhor, onde as qualidades das pessoas devem ser ressaltadas em detrimento às suas limitações.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus pelo dom divino da vida.
- Aos meus pais, José e Antônia, pelas suas condutas singulares e corretas que proporcionaram manter-me firme nos objetivos.
- Aos meus irmãos, Sandra e Franklin, que mesmo à distância, deram apoio constante, confiança e incentivaram no desenvolvimento do Mestrado.
- À minha esposa, Janayna, pela paciência e afeto nos momentos conturbados durante este estudo.
- Ao meu amigo e orientador, Prof. Emerson Silva Lima, que com seu trabalho estimula pelo exemplo.
- Ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, pela oportunidade de trabalhar conjuntamente e pelas dicas sempre muito construtivas e fundamentais para este projeto.
- À Dra. Carolina Marinho Costa pelo auxílio vital na realização das dosagens laboratoriais.
- Aos amigos do Laboratório de Estresse Oxidativo e Aterogênese – LEOA, pelo convívio harmonioso e espírito de grupo.
- Aos professores e colegas do programa de Mestrado em Patologia Tropical que propiciaram, através da troca de experiências, um campo fértil para o meu desenvolvimento.
- À FMTAM que permitiu o desenvolvimento deste estudo.
- E a todos que direta ou indiretamente pelo convívio ou com sugestões contribuíram para a elaboração deste trabalho.

*Mesmo que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver caridade, não sou nada.*

*Coríntios, 13:2*

## RESUMO

Em países de clima predominantemente tropical como o Brasil, a malária permanece ainda como problema de saúde pública importante. A plaquetopenia é uma complicação freqüente na malária, mas seu mecanismo não está bem esclarecido. O estresse oxidativo tem sido um dos fatores implicados na ocorrência de plaquetopenia em pacientes com malária. Este trabalho objetivou investigar o papel do estresse oxidativo na plaquetopenia de pacientes com malária vivax, por meio da avaliação de marcadores bioquímicos oxidantes e antioxidantes no plasma e nas plaquetas isoladas. Participaram do estudo 86 pacientes com malária vivax, divididos em dois grupos: pacientes plaquetopênicos ( $<150.000 \text{ plt/mm}^3$ ) e pacientes não-plaquetopênicos. Após a confirmação da infecção, foram coletadas amostras de sangue para dosar a capacidade antioxidante total, capacidade oxidante total, albumina, proteínas totais, ácido úrico, zinco, magnésio, bilirrubina, tióis totais, glutathiona peroxidase, malondialdeído, anticorpos contra lipoproteínas de baixa-densidade eletronegativa e nitrito/nitrato no plasma e glutathiona peroxidase e malondialdeído nas plaquetas isoladas. A média dos níveis plasmáticos de malondialdeído ( $\mu\text{mol/L}$ ) foi mais alta nos pacientes plaquetopênicos ( $3,57 \pm 2,4$ ) que nos não-plaquetopênicos ( $2,52 \pm 0,4$ ). Os níveis plaquetários elevados da glutathiona peroxidase e malondialdeído nos pacientes com malária de vivax foram significativamente mais altos em pacientes com plaquetopenia ( $p < 0,001$ ). Foram observadas diversas correlações importantes entre os marcadores de estresse oxidativo nas plaquetas e os marcadores de gravidade e da progressão da infecção por malária vivax. Os resultados sugerem que o dano oxidativo causado nas plaquetas pode ser importante na etiopatogênese da plaquetopenia que ocorre na malária e GPx e MDA podem ser marcadores importantes deste achado.

Palavras chaves: malária, estresse oxidativo, plaquetopenia, malondialdeído e glutathiona peroxidase.

## ABSTRACT

In tropical countries like Brazil, malaria remains an important health problem. Thrombocytopenia frequently complicates malarial infections but the mechanism has not been elucidated. Oxidative stress has been implicated as mediators of thrombocytopenia in patients with malaria. This work aimed to investigate the role of oxidative stress in thrombocytopenia of malaria vivax through of the measurement of oxidant and antioxidant biochemical markers in plasma and isolated platelet of the malaria patients. This study included 86 patients of vivax malaria which were divided into two groups: malaria thrombocytopenic ( $<150,000\text{plt}/\text{mm}^3$ ) patients and malaria non-thrombocytopenic patients. Blood samples was analyzed for total antioxidant status, total oxidant status, albumin, total protein, uric acid, zinc, magnesium, bilirubin, total thiols, glutathione peroxidase activity, malondialdehyde, antibodies against mildly oxidized low-density lipoproteins and nitrite/nitrate levels in plasma and glutathione peroxidase and malondialdehyde in isolated platelets. Plasma malondialdehyde level ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) was higher in thrombocytopenic ( $3.57\pm 2.4$ ) than in non-thrombocytopenic ( $2.52\pm 0.4$ ). Platelet glutathione peroxidase and malondialdehyde levels of patients with vivax malaria also were higher in platelets thrombocytopenic patients. Several significant correlations were observed between platelet oxidative stress markers and progression and severity markers of malaria vivax ( $p<0.001$ ). The results suggest that oxidative damage of platelets might be important in the ethiopathogenesis of thrombocytopenia occurring in malaria and GPx and MDA can be important markers of this finding.

**Keywords:** malaria, oxidative stress, thrombocytopenia, malondialdehyde and glutathione peroxidase.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa da distribuição da malária no mundo .....	16
<b>Figura 2</b>	Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp.</i> .....	18
<b>Figura 3</b>	Fluxograma de execução do estudo .....	42

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Níveis plasmáticos de malondialdeído de pacientes não-plaquetopênicos e plaquetopênicos com malária vivax .....	55
<b>Gráfico 2</b>	Níveis plaquetários de glutaciona peroxidase de pacientes não-plaquetopênicos e plaquetopênicos com malária vivax .....	56
<b>Gráfico 3</b>	Níveis plaquetários de malondialdeído de pacientes não-plaquetopênicos e plaquetopênicos com malária vivax .....	56
<b>Gráfico 4</b>	Correlação entre o tempo de infecção e a plaquetimetria de pacientes com malária vivax .....	57
<b>Gráfico 5</b>	Correlação entre a plaquetimetria e a parasitemia de pacientes com malária vivax .....	57
<b>Gráfico 6</b>	Correlação entre MDA plaquetário e a plaquetimetria de pacientes com malária vivax .....	58
<b>Gráfico 7</b>	Correlação entre o tempo de infecção e MDA plaquetário de pacientes com malária vivax .....	58
<b>Gráfico 8</b>	Correlação entre a parasitemia e a dosagem de MDA plaquetário de pacientes com malária vivax .....	59
<b>Gráfico 9</b>	Correlação entre GPx plaquetário e a plaquetimetria de pacientes com malária vivax .....	59
<b>Gráfico 10</b>	Correlação entre o tempo de infecção e GPx plaquetário de pacientes com malária vivax .....	60
<b>Gráfico 11</b>	Correlação entre MDA plaquetário e GPx plaquetária de pacientes com malária vivax .....	60
<b>Gráfico 12</b>	Correlação entre a os níveis plasmáticos de ácido úrico e os níveis plasmáticos da capacidade antioxidante total de pacientes com malária vivax .....	61
<b>Gráfico 13</b>	Correlação entre a os níveis plasmáticos de ácido úrico e os níveis plasmáticos de tióis de pacientes com malária vivax .....	61
<b>Gráfico 14</b>	Correlação entre a os níveis plasmáticos da capacidade antioxidante total e zinco .....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação da malária quanto a gravidade do quadro clínico .....	19
<b>Tabela 2</b>	Conteúdo das organelas plaquetárias .....	23
<b>Tabela 3</b>	Contagem de plaquetas e a gravidade da plaquetopenia .....	24
<b>Tabela 4</b>	Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio .....	27
<b>Tabela 5</b>	Contribuição estimada dos antioxidantes presentes no soro no teste da capacidade antioxidante total .....	37
<b>Tabela 6</b>	Características gerais dos participantes do estudo infectados com o <i>Plasmodium vivax</i> .....	53
<b>Tabela 7</b>	Plaquetimetria, tempo de infecção e parasitemia em pacientes primoinfectados e não-primoinfectados com malária vivax .....	54
<b>Tabela 8</b>	Níveis plasmáticos de antioxidantes e indicadores de estresse oxidativo de pacientes plaquetopênicos e não-plaquetopênicos com malária vivax .....	54
<b>Tabela 9</b>	Níveis plaquetários de antioxidantes e indicadores de estresse oxidativo de pacientes plaquetopênicos e não-plaquetopênicos com malária vivax .....	55

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo A</b>	Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da FMTAM .....	80
----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS	2,2' azinobis (3-ethylbenzeno-thiazoline-6-sulfonate)
Ac	Anticorpos
ADP	Adenosina difosfato
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CDC	Center for Diseases Control and Prevention
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DTNB	5,5-dithiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
EDTA-Na	Sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido Nítrico Sintase constitutiva endotelial
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FMN	Flavina Adenina Mononucleotídeo
FMT-AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Fe <sup>2+</sup>	Ferro ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Ferro férrico
fL	Fentolitro
GDP	Guanosina difosfato
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
GTP	Guanosina trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
HOO <sup>•</sup>	Radical hidroperoxila
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
LDL <sup>-</sup>	Lipoproteína de baixa densidade minus
LDL <sub>n</sub>	Lipoproteína de baixa densidade nativa
LOOH	Hidroperóxidos

LOO <sup>•</sup>	Radical peroxila
LO <sup>•</sup>	Radical alcoxila
MDA	Malondialdeído
mL	Mililitro (10 <sup>-3</sup> L)
µL	Microlitro (10 <sup>-6</sup> L)
M	Mol/Litro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
mM	Milimolar
N	Normal
NADPH	Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido Nítrico Sintase constitutiva neuronal
•NO	Óxido Nitríco
•NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NO <sub>3</sub>	Peroxinitrito
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion Superóxido
O <sub>3</sub>	Ozônio
OCl <sup>-</sup>	Ânion hipoclorito
OH <sup>•</sup>	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
plt	Plaqueta
pH	Potencial de hidrogênio
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
rpm	Rotações por minuto
SH	Grupos Sulfidril
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
vWF	Fator de Von Willebrand
WHO	World Health Organization
<sup>1</sup> Δg O <sub>2</sub>	Oxigênio Singlet

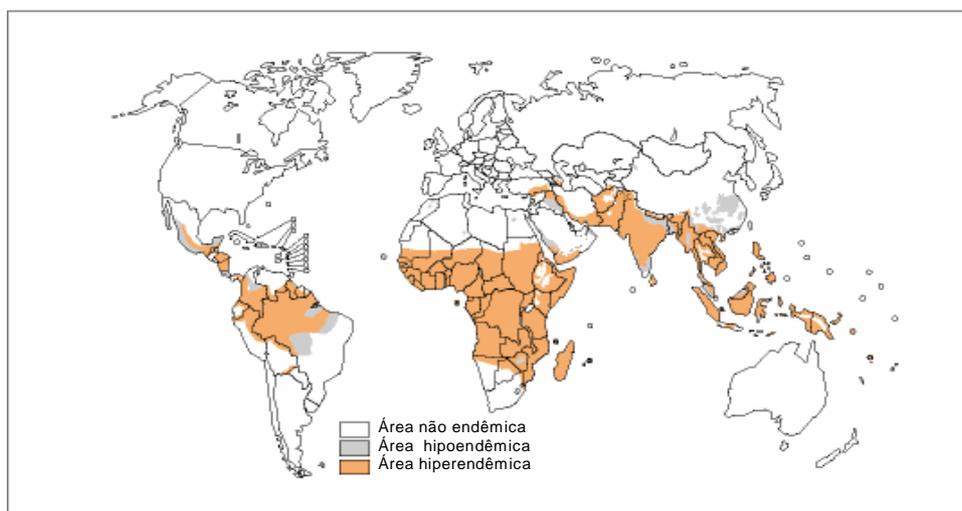
# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 Epidemiologia e etiopatogênese da malária</b> .....	16
<b>1.2 Plaquetopenia na malária</b> .....	21
<b>1.3 Estresse oxidativo nos processos infecciosos</b> .....	26
<b>1.4 Estresse oxidativo na malária</b> .....	30
<b>1.5 Sistemas antioxidantes</b> .....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	40
<b>2.1 Geral</b> .....	40
<b>2.2 Específicos</b> .....	40
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
<b>3.1 Modelo de Estudo</b> .....	41
<b>3.2 Universo de Estudo</b> .....	41
3.2.1 Participantes .....	41
3.2.2 Critérios de seleção de pacientes .....	41
<b>3.3 Procedimentos</b> .....	42
3.3.1 Triagem dos pacientes .....	42
3.3.2 Amostras biológicas .....	43
3.3.3 Análises hematológicas .....	44
3.3.4 Análises bioquímicas .....	44
3.3.5 Confirmação da malária .....	51
<b>3.4 Análise Estatística</b> .....	52
<b>4. RESULTADOS</b> .....	53
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	70
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71
<b>ANEXOS</b> .....	80

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia e etiopatogênese da malária

A malária é uma doença infecciosa, não-contagiosa, de evolução natural crônica na ausência de terapêutica, com manifestações de caráter agudo, crônico ou recorrente, sendo a doença mais amplamente distribuída no mundo e uma das doenças parasitárias mais incidentes da atualidade (Figura 1). Estima-se que quarenta por cento da população mundial tem risco de contrair a doença, com 300 a 500 milhões de casos ocorrem anualmente e a cada ano, um a dois milhões de pessoas (na maioria crianças) morre com malária. É uma doença de grande impacto no continente africano, onde estão concentrados 59% dos casos mundiais, seguidos da Ásia (38%) e das Américas (3%). Na África Sub-Saariana, acontecem 89% dos óbitos por malária (ROLL BACK MALARIA, 2005; FREVERT; NARDIN, 2005).



**Figura 1:** Mapa da distribuição da malária no mundo.  
Fonte: Adaptado de ROLL BACK MALARIA (2005).

Nas Américas, a malária ocorre principalmente nos países da Bacia Amazônica, sendo que o Brasil responde pelo maior número de casos (40,1%). No Estado do Amazonas, no ano de 2006, foram registrados 180.290 casos de malária, sendo 51.089 (28,3% do total) somente em Manaus (SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2007).

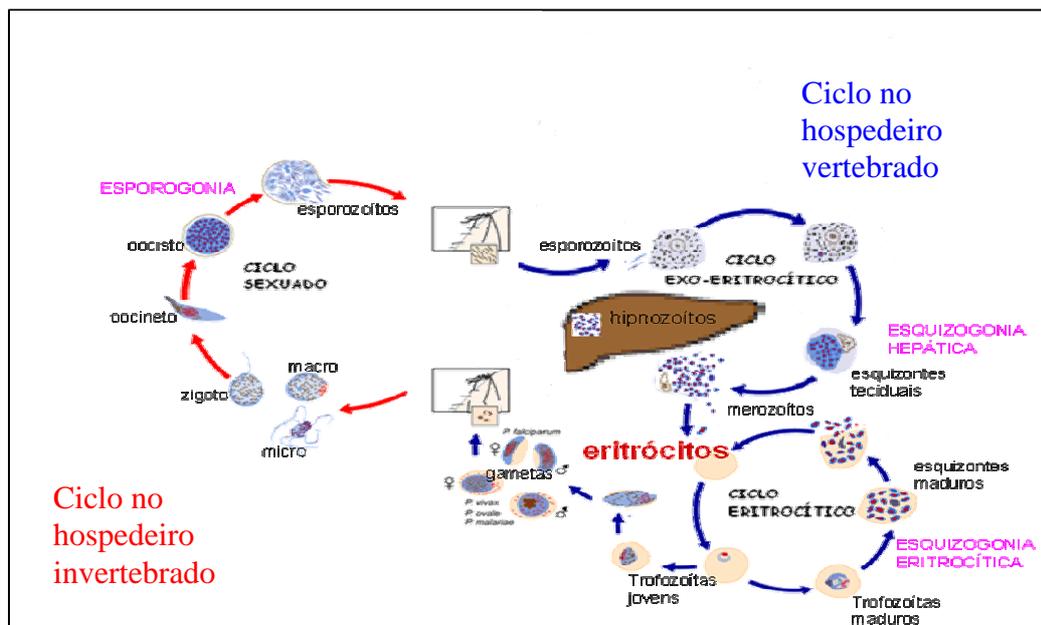
O conhecimento técnico sobre a malária vem se acumulando desde a antigüidade, passando pela descoberta do agente etiológico por Laveran em 1880, e do mecanismo natural de transmissão, por meio da identificação do mosquito do gênero *Anopheles* como vetor da doença por Ross, em 1897 (PNCM, 2004).

Em 1880, o médico francês Alphonse Laveran observou parasitos dentro das hemácias de pacientes febris. Esses parasitos são hoje conhecidos como pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Na sistemática zoológica, os mesmos são classificados no filo *Protozoa*, classe *Sporozoa* e família *Plasmodidae*. Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium* conhecidas (SUH et al., 2004). Destas, apenas quatro parasitam o homem preferencialmente: *P. malariae* (LAVERAN, 1881), *P. vivax* (GRASSI; FELETTI, 1890), *P. falciparum* (WELCH, 1897) e *P. ovale* (STEPHENS, 1922). Em 1897, Ronald Ross descreveu o desenvolvimento de oocistos na parede do estômago de mosquitos *Anopheles*, confirmando que a transmissão da doença ao homem se dá por esse vetor invertebrado.

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

O esporozoítio é introduzido no homem durante o repasto sangüíneo dos anofelinos, que inoculam esta forma infectante e, os que não são fagocitados pelos macrófagos, atingem os capilares subcutâneos e chegam aos hepatócitos em 30 minutos. No fígado, estes se

desenvolvem por esquizogonia (reprodução assexuada). Após alguns dias, o esquizonte formado se rompe e libera merozoítos nos capilares e estes invadem os eritrócitos e se transformam em trofozoítas jovens (forma em anel), que originam os esquizontes hemáticos. A ruptura do esquizonte libera novos merozoítos que parasitam outros glóbulos vermelhos, repetindo o ciclo. Na malária causada por *P. vivax*, permanecem algumas formas latentes no fígado chamadas hipnozoítos, às quais são responsáveis pelas recaídas tardias de malária vivax (FERREIRA, 1996). Após sucessivas esquizogonias, alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuadas conhecidas como gametócitos (femininos e masculinos), que ao serem ingeridos pela fêmea do *Anopheles*, dão início ao ciclo sexuado ou gametogênico e, após algumas etapas de desenvolvimento, liberam os esporozoítos, que migram para as glândulas salivares dos mosquitos, onde permanecem viáveis por cerca de dois meses, até serem inoculados no homem (REY, 1992; FAIRHUST; WELLENS, 2000).



**Figura 2:** Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.

Fonte: Adaptado de Center for Diseases Control and Prevention (2004).

A doença se caracteriza historicamente por acessos de febre intermitente, sobrevivendo de dois em dois dias (febre terçã) ou de três em três dias (febre quartã), seguindo a evolução cíclica de cada espécie do parasito. Os acessos febris podem, entretanto, ocorrer diariamente, em virtude de eclosão diária da nova geração de parasitos ou por infecções em tempos distintos por populações diferentes de mosquitos. Durante o acesso malárico, o doente passa por três fases: calafrio, hipertermia e sudação. Em geral, ocorre esplenomegalia e anemia (ALECRIM; ALECRIM, 2003).

A sintomatologia malárica depende do estado imune do paciente. Na primeira infecção, em pacientes não imunes, a febre pode alcançar 40°C e os sinais e sintomas podem ser mais acentuados. Nas recidivas, os sintomas geralmente são mais brandos (ALECRIM; ALECRIM, 2003).

A gravidade da doença malárica pode ser quantificada de acordo com a classificação dos sinais e sintomas apresentados no quadro clínico do paciente, conforme apresentado na Tabela 1. Os critérios apresentados foram padronizados para malária por *P. falciparum*.

Tabela 1: Classificação da malária quanto à gravidade do quadro clínico.

Gravidade	Sinais e Sintomas
Malária não-grave	Presença de astenia, cefaléia, febre, náuseas, vômitos e calafrios
Malária grave	Sinais e sintomas clássicos da malária, associados a uma ou mais das complicações como anemia, coma, hipoglicemia, insuficiência renal, CID, choque e edema agudo de pulmão.

Fonte: OMS (2000).

A doença malárica contribui com 8% das mortes em crianças com menos de cinco anos em países em desenvolvimento. A alta prevalência de doenças parasitárias e bacterianas nestes países contribui grandemente para a malnutrição, que aumenta susceptibilidade e a gravidade das infecções (MÜLLER; KRAWINKEL, 2005).

A malária aflige geralmente populações imunologicamente vulneráveis, e a doença é agravada devido à diminuição da capacidade imunológica das pessoas infectadas para o combate ao patógeno. Portanto, a doença se torna preocupante devido à fragilidade imunológica (KISZEWSKI; TEKLEHAIMANOT, 2004).

*Plasmodium falciparum* produz a febre terçã maligna com quadro clínico em que os acessos febris repetem-se ciclicamente com 36 a 48 horas. É uma doença mais grave, sendo responsável pela maioria dos casos fatais. Os eritrócitos parasitados por *P. falciparum* aderem às células endoteliais em capilares e vênulas pós-capilares, levando a uma obstrução funcional. Este bloqueio mecânico dos vasos do cérebro e de outros órgãos resulta em hipóxia, causando a maioria das mudanças observadas na malária grave, que pode ser fatal (WEIR, 2005).

*Plasmodium vivax* é o agente da febre terçã benigna, com ciclo febril que retorna a cada 48 horas. É o parasito humano que infecta o homem mais extensamente distribuído no mundo. Causa uma doença menos grave que o *P. falciparum*, sendo raramente fatal (ALECRIM; ALECRIM, 2003).

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

Kochar et al. (2005) verificaram que *P. vivax* pode causar todas as complicações relatadas da malária grave, incluindo malária cerebral, falência renal, colapso circulatório, anemia grave, hemoglobinúria, síndrome respiratória aguda e sangramentos anormais que são comumente atribuídos às infecções por *P. falciparum*.

Com exceção da África, a malária vivax é considerada a principal causa de morbidade por doença infecciosa no mundo, se concentrando em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (MENDIS et al., 2001).

Apesar de ser um tipo de malária que classicamente não cursa com doença grave, o aumento do número de casos de infecção pelo *P. vivax* pode conduzir a aumento da letalidade absoluta. O maior acometimento de pessoas com doenças crônicas pode contribuir para uma descompensação clínica, pelo maior risco de evolução genética do parasita, o que aumenta a chance de expressão de gravidade (ALEXANDRE, 2004).

O diagnóstico de malária, na rotina clínica, utiliza como padrão-ouro é o esfregaço sangüíneo e a gota espessa corados pelo método de Giemsa (ou alternativamente pelo método de Wright) (ALECRIM; ALECRIM, 2003). A lâmina de malária permite tanto a identificação da espécie como a quantificação (expressa pela percentagem dos eritrócitos infectados ou por parasitas por microlitro). Todavia, o processamento e a interpretação das lâminas requerem equipamento apropriado, bem como treinamento profissional (SUH et al., 2004).

## **1.2 Plaquetopenia na malária**

As plaquetas sangüíneas são os menores elementos morfológicos do sangue. Apresentam-se em forma de corpúsculos arredondados ou ovais, medindo de 2 a 6µm de diâmetro e com volume médio de 5 a 8fL, podendo ser maiores. São produzidas na medula óssea pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. Os megacariócitos localizados na medula óssea originam-se da diferenciação de uma célula precursora segundo um modo de divisão e de maturação único de endomitose. O núcleo se multiplica sem que a célula se divida: se  $2n$  é o número de cromossomos da célula precursora, os megacariócitos tornam-se

sucessivamente 4n, 8n, 16n, 32n, 64n, ao mesmo tempo em que o citoplasma cresce e que as plaquetas se formam. Os megacariócitos que liberam plaquetas são habitualmente 32n, mas 16n e 64n liberam igualmente plaquetas que representam pequenos territórios do citoplasma do megacariócito, delimitados por membranas de demarcação. Quanto mais jovem for o núcleo, maior é o território delimitado (grandes plaquetas). A trombocitopoiese é regulada por um fator de crescimento hematopoiético chamado trombopoietina, que é produzido principalmente pelo fígado e rim. A meia-vida das plaquetas no homem é estimada em uma semana (podendo chegar a 12 dias) (PITNEY, 1972; BERNARD et al., 2000).

As funções das plaquetas são numerosas e nem todas estão ainda claramente identificadas. As principais estão relacionadas à hemostasia e à coagulação, mas atuam igualmente na resposta inflamatória por ativação dos fatores quimiotáticos e pela secreção de aminas vasopressoras; carregam essas aminas vasopressoras na circulação; têm função de fagocitose, podendo eliminar pequenas partículas e bactérias; participam da retração do coágulo por intermédio de uma proteína contrátil, a trombostenina; finalmente, parecem ter papel protetor do endotélio (BITHELL, 1998).

Hemostasia pode ser definida como um conjunto de mecanismos e processos que mantém a fluidez do sangue evitando e corrigindo lesões, hemorragias e processos trombóticos. Vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação e fibrinólise, bem como anticoagulantes naturais são os elementos envolvidos no processo. Os vasos e as plaquetas compõem a hemostasia primária, que permite a formação de um trombo plaquetário, de efeito transitório. A fibrina, que tem por objetivo reforçar o trombo plaquetário primariamente formado, é o produto final de uma série de reações enzimáticas envolvendo proteínas da coagulação. A fibrinólise degrada o trombo formado, a fim de restaurar o fluxo sanguíneo (MORELLI, 2001).

Quando ocorre a lesão do vaso, ocorre vasoconstricção reflexa que reduz o fluxo sanguíneo para a região afetada. Em seguida, pela ação da serotonina, do tromboxano A<sub>2</sub> e do difosfato de adenosina (ADP) liberadas pelas plaquetas, agregam-se e aderem à superfície do ferimento, formando tampão para inibir o sangramento (LIMA et al., 1992).

Avaliando-se a ultra-estrutura das plaquetas humanas, pode-se verificar a existência de várias organelas, e nestas estruturas várias substâncias são encontradas, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Conteúdo das organelas plaquetárias.

Organela	Conteúdo
Grânulo $\alpha$	Proteínas específicas das plaquetas: PF-4, $\beta$ -tromboglobulina, fator de crescimento derivado da plaqueta, trombospondina. Homólogos de proteínas plasmáticas: fibrinogênio, albumina, fator V, plasminogênio, vWF, fator D, glicoproteína rica em histidina, globulinas do sistema complemento.
Corpúsculo denso	ADP, ATP, GTP, GDP, serotonina não metabólicos, cálcio secretável
Sistema tubular denso	Enzimas conversoras de prostaglandinas, cálcio contrátil.
Peroxisomos	Catalase
Lisossomos	Hidrolases ácidas

Fonte: Adaptado de Reed (2002).

O estudo das plaquetas é usado na avaliação da hemostasia e pode ser feito de duas maneiras: quantitativa e qualitativa. A análise quantitativa é realizada normalmente através da contagem eletrônica em aparelhos automáticos ou contagem ao microscópio ótico em câmara de Neubauer. As alterações quantitativas permitem o diagnóstico de plaquetopenia e plaquetose. Já na análise qualitativa, realizada por meio do exame ao microscópio da distensão do sangue, que permite uma estimativa da avaliação numérica das plaquetas (normal, aumentada ou diminuída) e da alteração morfológica das plaquetas (macroplaquetas, plaquetas gigantes e dimorfismo plaquetário). A contagem plaquetária é essencial para o monitoramento do paciente com malária, porém eventualmente os aparelhos automatizados

podem apresentar resultados falsamente elevados devido a interferências de agregados protéicos, fragmentos de hemácias e de leucócitos (CRABBE et al., 2002).

A concentração de plaquetas no indivíduo normal é de 150 a 500 x 10<sup>3</sup> por milímetro cúbico de sangue. O termo plaquetopenia é utilizado quando a concentração é inferior a 150 x 10<sup>3</sup> plaquetas/mm<sup>3</sup>. Utiliza-se o termo plaquetose para contagens superiores a 500 x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>. Podemos observar falsas plaquetopenias quando as plaquetas se aglutinam *in vitro* na presença de anticoagulante (EDTA) contido nos tubos. A plaquetopenia pode ter três mecanismos: de origem central (medular) que está relacionada à diminuição de produção (aplasia) para um número diminuído de megacariócitos; hiperdestruição, na qual as plaquetas produzidas normalmente são destruídas na circulação e; seqüestro das plaquetas por baço hipertrofiado, nesses casos a medula é rica em megacariócitos (BERNARD et al., 2000).

Patel et al. (2004) sugerem que a contagem de plaquetas pode ser usada como diagnóstico diferencial e de triagem de pacientes com febre, em regiões não-endêmicas de malária. Essa avaliação deve ser realizada em pacientes que retornam de regiões endêmicas, para se descartar a possibilidade de malária do viajante. Eles conseguiram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 70% nos pacientes do seu estudo e escalonaram a plaquetopenia em níveis, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Contagem de plaquetas e a gravidade da plaquetopenia.

Gravidade da plaquetopenia	Plaquetimetria
Plaquetopenia grave	< 50.000 plt/mm <sup>3</sup>
Plaquetopenia moderada	50.000 a 100.000 plt/mm <sup>3</sup>
Plaquetopenia discreta	100.000 a 150.000 plt/mm <sup>3</sup>
Plaquetopenia ausente	> 150.000 plt/mm <sup>3</sup>

Fonte: Patel et al., 2004 (adaptada).

Portieje et al. (2001), avaliando pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática, descrevem como grave apenas a plaquetopenia encontrada em pacientes com contagem de

plaquetas abaixo de 30.000/mm<sup>3</sup> e moderada com contagens entre 30.000 e 100.000 plt/mm<sup>3</sup>. Na terapia corretiva da púrpura trombocitopênica imune, o tratamento só é iniciado nos pacientes com plaquetimetria entre 30.000 e 50.000 plt/mm<sup>3</sup> e nos com plaquetimetria menor que 30.000/mm<sup>3</sup> é avaliado também o risco de sangramentos para iniciar a terapia corretiva (CINES; BLANCHETTE, 2002). Porém, o critério mais encontrado na literatura para avaliação de doença malárica é semelhante ao descrito por Patel et al. (2004).

A plaquetopenia é um achado freqüente em pacientes com malária. Marques (2000) encontrou plaquetopenia em 94% dos pacientes com malária vivax no seu estudo em Manaus. Scott et al. (2002) encontraram plaquetopenia (abaixo de 150.000/mm<sup>3</sup>) em 89% dos pacientes com microscopia positiva para malária em seu estudo, sendo que 30% tinham plaquetopenia grave. A diminuição grave na contagem de plaquetas é comum na malária falciparum isolada e em infecção mista de falciparum/vivax, mas é muito rara em infecção isolada de *P. vivax* (MAKKAR; MULKHOPADHYAY, 2002). Os pacientes atendidos em Manaus mostraram que a malária vivax é responsável por plaquetopenia mais intensa e mais freqüente, em comparação com a malária falciparum (LACERDA et al., 2002).

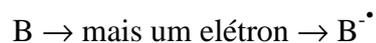
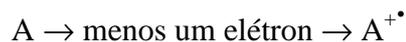
A plaquetopenia encontrada na malária é complicação freqüente desta enfermidade e pode ocorrer tanto na infecção pelo *P. falciparum*, quanto pelo *P. vivax* (OMS, 2000). Na maioria das vezes, no entanto, é de pequena magnitude e normaliza-se proporcionalmente ao clareamento da parasitemia com a medicação específica (WICKRAMASINGHE; ABDALLA, 2000). O mecanismo da plaquetopenia ainda não está bem elucidado.

A plaquetopenia tem sido observada na infecção malárica em humanos, com redução de cerca de 56%. As causas da diminuição podem se dever ao aumento nas funções plaquetárias, fagocitose plaquetária, coagulação intravascular disseminada (CID), formação defectiva de plaquetas, hiperesplenismo e estresse oxidativo (EREL et al., 1998; KELTON et al., 1983).

O estudo da plaquetopenia na malária ainda é muito incipiente. Apesar de existirem alguns estudos relativos à plaquetopenia na infecção malárica, ainda não se descobriu o real mecanismo que leva à ocorrência da diminuição da contagem plaquetária nesta doença, fato que estimulou o desenvolvimento deste estudo para verificar a relação do estresse oxidativo na infecção malárica causada pelo *Plasmodium vivax*.

### 1.3 Estresse oxidativo nos processos infecciosos

Radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula que contém elétrons desemparelhados e tem existência independente. Um ponto é usado para representar as espécies radicalares. A retirada ou a adição de um elétron a uma molécula não-radicalar pode (ou não) converter esta em espécie radicalar. Radicais livres podem ter cargas positivas, negativas ou neutras (HERMES-LIMA, 2004).



Os radicais livres são espécies de moléculas extremamente reativas, e que podem causar dano ou morte celular. Eles são continuamente produzidos pelo organismo, sendo a maioria por reações bioquímicas envolvendo oxigênio, que ocorrem normalmente no metabolismo (fontes endógenas) como na cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, na hipóxia, na explosão respiratória pelos macrófagos, sendo também formados por fagocitose, como parte do controle da reação inflamatória. Ocasionalmente podem ocorrer em resposta a exposição (fontes exógenas) a radiação ionizante, luz ultravioleta, poluição

ambiental, fumaça de cigarro, exercícios excessivos e isquemia (SIGNORINI; SIGNORINI, 1995).

Nas células, a retirada de um elétron pode levar à formação de radicais sulfrídria, oxigênio, carbono e nitrogênio. As principais espécies radicalares de oxigênio e espécies relacionadas de importância biológica estão apresentadas na Tabela 4.

Todos os organismos aeróbicos são expostos a espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânions superóxido, oxigênio singlet, peróxido de hidrogênio, ânion hipoclorito e radicais hidroxila bem como espécies reativas de nitrogênio (ERN) como óxido nítrico e peroxinitrito gerados pelo metabolismo (GUTTERIDGE, 1995; MÜLLER et al., 2003).

Tabela 4: Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Radicais	Não-radicais
Ânion Radical Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroperoxila ( $HOO^{\bullet}$ )	Hidroperóxidos (LOOH)
Peroxila ( $LOO^{\bullet}$ )	Oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) ou ( $^1\Delta_g O_2$ )
Alcoxila ( $LO^{\bullet}$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Hidroxila ( $^{\bullet}OH$ )	Ácido hipocloroso (HOCl)
Óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ )
Dióxido de nitrogênio ( $^{\bullet}NO_2$ )	

Fonte: Augusto, 2006 (adaptada).

A vida aeróbica depende da combustão controlada de oxigênio para o suprimento de energia. A combustão controlada é catalisada e regulada por eventos metabólicos que podem causar danos se ocorrer descontrole oxidativo destas reações na produção de energia. Devido a este controle ter que funcionar de forma ajustada existe um complexo sistema de controle antioxidante destes eventos. Ao mesmo tempo, o sistema enzimático envolvido produz espécies reativas, reações biossintéticas, defesas químicas e funções desintoxicantes (JONES, 2006).

ERO são derivadas do oxigênio molecular (NORDBERG; ARNER, 2001), dentre elas ânion radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Estas ERO são produzidas por ação de oxidases e oxigenases específicas, pela reação de Fenton e também pela cadeia transportadora de elétrons (TURRENS, 2004). As ERN incluem o óxido nítrico e seus derivados que são produzidos pela atividade enzimática da óxido nítrico sintase (NOS). Diferentes isoformas de NOS foram identificadas no citoplasma (iNOS), na mitocôndria (mtNOS), ou em tipos celulares específicos como as endoteliais (eNOS) (ANDREW; MAYER, 1999).

As ERO são instáveis e reagem rapidamente com outros radicais livres e macromoléculas em reações em cadeia, gerando aumento perigoso na quantidade de oxidantes (KIRKINEROS; MORAES, 2001). Acredita-se que os efeitos tóxicos das ERO variem tanto na proporção quanto na quantidade de oxidantes envolvidos. Enquanto o peróxido de hidrogênio não é muito reativo, é altamente difusível e é precursor de radical hidroxila.

O acúmulo de ERO ou de ERN causa danos à estrutura das biomoléculas, gerando estresse oxidativo (GUTTERIDGE, 1995), que também pode ser definido como qualquer distúrbio celular no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes (SIES, 2000). Em condições normais o organismo mantém o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a sua remoção por antioxidantes (incluindo a capacidade das células de reparar os danos oxidativos). Muitas doenças estão associadas com o aumento na geração de radicais livres ou no decréscimo da capacidade antioxidante ou ambos. O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes limita a saúde e a condição de doença, incluindo doenças neurodegenerativas, inflamação, aterosclerose, lesão de reperfusão, doenças cardiovasculares e diabetes (JONES, 2006).

A produção de ERO na explosão respiratória por células fagocitárias ativadas (macrófagos e neutrófilos) é crítica na função antimicrobiana, contribuindo direta ou

indiretamente para a morte do organismo intracelular. A mieloperoxidase produzida pelos neutrófilos converte peróxido de hidrogênio e íons cloreto em ácido hipocloroso (WINTERBOURN et al, 2000). A NADPH oxidase produzida por muitos tipos de fagócitos, reduz  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$  (BABIOR, 1999). Subseqüentemente,  $O_2^{\bullet-}$  e HOCl podem reagir para formar  $^{\bullet}OH$  (CANDEIAS et al., 1993).

Cada radical livre formado pelo corpo pode iniciar uma série de reações, que continuam até que sejam removidos. Podem desaparecer reagindo com outros radicais livres, ou devido a ações do sistema antioxidante.

Algumas espécies reativas de oxigênio parecem contribuir para os sinais e sintomas apresentados nas doenças tropicais, logo a avaliação do estresse oxidativo gerado nestas patologias pode ajudar a entender o mecanismo de atuação das doenças e suas conseqüências.

Na doença de chagas, o *Trypanosoma cruzi*, ativa a produção de interferon- $\gamma$  pelas células “natural killer”, ativando os macrófagos, e estes produzem fator de necrose tumoral- $\alpha$ , induzindo a produção de óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) que é tóxico para os parasitos *in vitro* (VESPA et al, 1994; MARTINS et al, 1998).

Gantt et al. (2001) sugerem que o  $O_2^{\bullet-}$  e o  $NO^{\bullet}$  contribuem para a morte intracelular da *Leishmania chagasi* no homem e em macrófagos murinos. Bildic et al. (2004) observaram aumento significativo da MDA sugerindo aumento da peroxidação lipídica quando analisaram o estresse oxidativo em cães infectados com Leishmaniose visceral.

A presença de *Schistosoma mansoni* nas veias mesentéricas hepáticas do hospedeiro coloca-os sob estresse oxidativo a partir de radicais gerados pelo parasita durante a respiração e a quebra e consumo da hemoglobina do hospedeiro com a liberação de heme tóxico e íons ferroso (SAYED et al., 2006).

Pal et al. (2006) observaram uma associação entre o estresse oxidativo e a filariose bancroftiana quando analisou pacientes crônicos ou com filariose oculta avaliando as dosagens de MDA e SOD.

As dosagens de SOD e outras proteínas antioxidantes têm sido descritas na dengue clássica, hemorrágica e síndrome de Shock por dengue (RAY et al., 1999). Os dados iniciais sugerem que a dengue gera radicais livres e causa alteração dos antioxidantes na fase aguda da doença (NOOR et al., 2002).

Pacientes com tuberculose ativa mostraram status antioxidante total significativamente menor que pacientes controles. Os valores de TAS aumentam durante a terapia antituberculosa. Os valores de micronutrientes, vitamina A e zinco também, porém vitamina E permanece inalterada (WIID et al., 2004).

Visca et al. (2002) afirmam que a liberação de  $\text{NO}^\bullet$  e o estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro infectado pelo *Micobacterium leprae* combinado com o pH baixo,  $\text{pO}_2$  baixo e  $\text{pCO}_2$  alto contribui para limitar o crescimento do bacilo. Quando comparado com o *M. tuberculosis* e *M. bovis* o bacilo da lepra tem perdido a maior parte dos genes envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A susceptibilidade ao  $\text{NO}^\bullet$  pode ser considerado para o crescimento excessivamente lento do *M. leprae*.

#### **1.4 Estresse oxidativo na malária**

Algumas espécies reativas do oxigênio parecem contribuir para os sinais e sintomas apresentados na malária, tanto agravando como atenuando este quadro, e podem explicar algumas alterações encontradas nos pacientes com malária. Os eritrócitos são expostos ao

estresse oxidativo endógeno e exógeno na malária vivax, que podem levar as várias alterações metabólicas no hospedeiro (EREL et al., 1997).

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

Para compensar o estresse oxidativo gerado pelo seu próprio metabolismo, o *Plasmodium*, reduziu sua produção de espécies reativas de oxigênio começando por um processo fermentativo para suavizar o dano oxidativo. Um destes métodos parece ser o desenvolvimento de um mecanismo compensatório para minimizar o estresse oxidativo através da aquisição, retenção e exploração de um ancestral endossimbiótico das algas vermelhas, agora chamado de apicoplasto. Este está localizado próximo a mitocôndria e parece sintetizar o ácido lipóico, que pode ser utilizado pelo *Plasmodium* como potente antioxidante (TOLER, 2005).

No tratamento da malária a grande geração de radicais livres é responsável pela diminuição da visão ectópica e mesópica, podendo evoluir para cegueira total, devido à peroxidação maciça dos lipídios da retina. O dano retiniano é mais frequentemente imputado à cloroquina (um derivado 4-aminoquinoleínico) (VENTURA et al., 2003).

Em pacientes infectados pelo *P. vivax* e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, frequentemente é observada hemólise quando são tratados com primaquina (droga de escolha para eliminar formas hipnozoíticas). Devido ao seu caráter oxidante, a primaquina é capaz de induzir anemia hemolítica grave nestes pacientes. Essa complicação causada pela medicação torna-se mais marcantes em áreas endêmicas tornando-se necessário o uso de testes de triagem a fim de minimizar os efeitos deletérios do tratamento (SILVA et al., 2004).

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

As alterações no status redox contribuem para as manifestações da doença incluindo malária cerebral, placentária, anemia e angústia respiratória. Estudando-se as hemoglobinopatias como as talassemias e a anemia falciforme, e outros defeitos nas hemácias que garantem proteção contra a malária permite uma avaliação equilíbrio fino nas interações redox (BECKER et al., 2004).

Durante a infecção malárica, o aumento das ROS que são gerados podem contribuir para o dano eritrocítico e a anemia. Griffiths et al. (2001) observaram que a infecção malárica pode estar associado ao dano oxidativo e a redução na reserva de  $\alpha$ -tocoferol na membrana do eritrócito, sugerindo que a depleção de antioxidantes locais podem contribuir para a perda de células vermelhas na malária grave.

O parasita intraeritrocítico da malária tem um único caminho para detoxificação pela formação de um cristal dimérico de ferriprotoporfirina IX conhecido como hemozoína (pigmento malárico ou pigmento escuro) que é formada na esquizogonia eritrocítica. A hemozoína é composta de 65% de proteínas, 16% de hematina (ferriprotoporfirina IX), 6% de carboidratos e pequena quantidade de lipídeos e ácidos nucleicos. Omodeo-Salã et al. (2001) mostraram uma grande peroxidação lipídica dependente do conteúdo pré-existente hidroperóxidos e eficientemente inibido por trifenilfosfina e por varredores lipofílicos. Verificaram também que agregados de hemozoína em pH ácido, baixas concentrações de glutatona reduzida e cloroquina sugerem uma mudança nos estados agregados de ferriprotoporfirina mais ativos como a peroxidação catalítica.

Clark e Cowden (1999) sugerem que o  $\bullet\text{NO}$  gerado pela iNOS pode estar envolvido na patogenia da malária. A atuação da iNOS no metabolismo renal, na função pulmonar, no sinergismo entre citocinas inflamatórias e a hipóxia, podem ajudar a explicar em nível molecular as diferenças encontradas na malária vivax e falciparum.

Em laboratório, usualmente, faz-se a dosagem dos subprodutos do óxido nítrico como os nitratos e nitritos (devido ao curto tempo de existência do  $\bullet\text{NO}$ ) pelo método colorimétrico de Griess (NICHOLAS; NASON, 1957).

Quando comparados indivíduos saudáveis e com malária, encontra-se significativa diminuição nos níveis de Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e grande peroxidação lipídica nas plaquetas (EREL et al., 2001). No intuito de combater o agente agressor, na explosão respiratória ocorre grande produção de espécies reativas de oxigênio como  $^1\text{O}_2$  (oxigênio singlet) que não é radical livre, pois não tem um elétron desemparelhado, mas é altamente reativo.

O conhecimento sobre o estresse oxidativo e a sua importância na infecção malárica é ainda incipiente, pois existem poucos estudos na área. Nas infecções causadas pelo *Plasmodium vivax*, os estudos são ainda mais escassos devido à dificuldade de cultivo desta espécie além de ser uma doença de curso menos grave, como citado anteriormente. A malária é uma doença de grande impacto nas regiões tropicais e sub-tropicais do planeta, como mostrado na figura 1 (continente africano, continente americano e sudeste asiático), em regiões onde os recursos são escassos para o desenvolvimento de pesquisas sobre a doença, levando à deficiência de estudos nestes locais onde ocorre preferencialmente. Os mecanismos do estresse oxidativo relacionados à plaquetopenia malárica são ainda mais raros, daí a importância no desenvolvimento deste estudo.

## 1.5 Sistemas antioxidantes

A defesa antioxidante é constituída basicamente de vitaminas e minerais presentes na dieta e sistemas enzimáticos endógenos. A terapia antioxidante parece promissora em atenuar os efeitos da produção descontrolada de radicais livres em pacientes graves. Há, porém, escassez de evidências que definam a melhor forma de suplementação e a fase da doença adequada para isso. Também os efeitos adversos de seu uso clínico devem ser levados em conta, pois todo antioxidante pode ter efeito pró-oxidante e aumentar a lesão tecidual. Portanto, considerando-se os riscos da carência, mas também do excesso, deve-se procurar não exceder as quantidades e combinações preconizadas de antioxidantes (LEITE; SARNI, 2003).

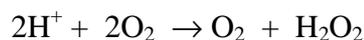
A alimentação é a base para a constituição do corpo e estabilização do organismo contra infecções e também na suplementação do sistema antioxidante. Kiszewski e Teklehainot (2004) afirmam que a desnutrição pode contribuir para a maior gravidade da endemia malárica. Eles ainda sugerem que outros estudos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

O sistema antioxidante protege os tecidos dos efeitos dos radicais livres. Três grupos principais fazem parte deste sistema e são classificados como antioxidantes primários, secundários e terciários. O objetivo do antioxidante é estabilizar a molécula por um tempo mais longo, e neste sentido, ocorre extrema cooperação entre seus componentes. Como vários deles constituem o sistema redox, a atividade de um é adjuvada pela do outro (OLIVEIRA et al., 2007).

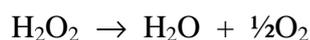
Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado a um substrato oxidável, inibe significativamente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL, 1999).

Os antioxidantes primários trabalham prevenindo a formação de novas espécies radicalares. Estes antioxidantes atuam convertendo os radicais livres existentes em moléculas menos reativas antes que eles possam reagir. São enzimas solúveis, isto é, não aderidas em sistemas de membranas, o que lhes faculta atuar no citossol, na matriz mitocondrial, nos peroxissomos e outros compartimentos subcelulares em praticamente todos os tecidos. Está bem estabelecido que os principais antioxidantes intracelulares são a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima presente em todos os organismos aeróbicos, que catalisa a dismutação do radical superóxido (converte o superóxido em peróxido de hidrogênio). Existem três classes de superóxido dismutase: Fe-SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD (LIMA et al., 1992), que atuam conforme reação a seguir:



A catalase é a enzima inativadora do peróxido de hidrogênio e está em maior concentração no organismo. Funciona convertendo peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, numa reação seqüencial à anterior, conforme demonstrado a seguir:



A glutatona peroxidase (GPx) representa a proteção orgânica contra a ação de radicais livres. Apresenta selênio em sua composição e age catalisando a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (converte peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos em moléculas inofensivas antes que eles formem radicais livres). Sua atividade reduz na hipóxia, havendo aumento da quantidade de radicais livres formados durante a reperfusão, quando se restabelece o nível elevado de oxigênio (LIMA et al., 1992).



As proteínas ligadoras de metais (ferritina e ceruloplasmina) agem limitando a disponibilidade de  $\text{Fe}^{2+}$  necessário para a formação do radical hidroxila. Antioxidantes

secundários atuam como armadilhas aos radicais, prevenindo reações em cadeia. Podem ser originários da dieta como, por exemplo, vitamina E (alfa-tocoferol), vitamina C (ascorbato), beta-caroteno, selênio, zinco e magnésio, ou são sintetizados no organismo como o ácido úrico, a bilirrubina e a albumina. Antioxidantes terciários reparam biomoléculas que foram lesadas por radicais livres. Enzimas reparadoras de DNA e metionina sulfóxido redutase são exemplos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Na atividade de redução de uma espécie radical livre, o próprio antioxidante sofre oxidação, e para ser regenerado necessita da intervenção de outro agente redutor. A vitamina C (ácido ascórbico), por exemplo, pode regenerar a vitamina E, originando o ácido dehidroascórbico (forma oxidada). Este pode ser regenerado pelo sistema enzimático da glutathione, que, por sua vez, exige o NADPH como cofator, no fornecimento de hidrogênios. O sistema é, assim, estreitamente interligado, tanto entre os componentes do sistema exógeno, como entre este e o sistema enzimático (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

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

As várias espécies de antioxidantes existentes nos organismos vivos servem para diminuir o dano causado pelas espécies reativas. Estes antioxidantes incluem SOD, catalase, GPx, macromoléculas como albumina, ceruloplasmina e ferritina além de pequenas moléculas como ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-caroteno, ácido úrico e bilirrubina. Devido à dificuldade da avaliação de cada antioxidante individualmente e as interações entre os diferentes antioxidantes é comumente usada a dosagem da capacidade antioxidante total (CAT), de forma a avaliar o potencial antioxidante do soro ou plasma (CAO; PRIOR, 1998).

A medida da CAT se baseia na propriedade do soro ou plasma de reduzir um substrato colorido oxidado, que ao ser reduzido por antioxidantes presentes na amostra, muda a coloração, que pode ser medida por espectrofotometria. Dentre os testes para avaliar a CAT, os baseados na oxidação do ABTS tem sido mais amplamente usados. Vários estudos têm relatado uma diminuição da CAT sérica ou plasmática em varios processos patológicos e sua correlação positiva com antioxidantes e negativa com outros marcadores do estresse oxidativo plasmáticos (GHISELLI et al., 2000).

Os tióis (SH) no plasma existem em substâncias de baixo peso molecular como cisteína, glutatona e albumina. Em geral, 80% dos tióis livres no plasma estão contidos na albumina e têm significante contribuição para a capacidade antioxidante sobre radicais peroxila (CHUNG et al., 2005).

Erel (2004) formulou uma tabela com a contribuição estimada dos antioxidantes presentes no soro no teste da CAT. As substâncias e a contribuição proporcional estão descritas na Tabela 5. A reação dos tióis plasmáticos com as ERO leva a uma redução oxidativa dos tióis. A reperfusão causa perda de grupos SH. Os grupos SH plasmáticos podem ser medidos espectrofotometricamente após reação com 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DNTB).

Tabela 5: Contribuição estimada de antioxidantes presentes no soro no teste da capacidade antioxidante total.

Antioxidantes presentes no soro	Contribuição estimada da resposta antioxidante contra reações de radicais livres (%)
SH total	48,89
Vitamina C	5,00
Ácido Úrico	3,83
Vitamina E	1,88
Bilirrubina	1,69
Outros	38,71
Total	100

Fonte: Adaptado de Erel (2004).

As proteínas são polímeros de aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas (resultante do enlace do grupo carboxílico de um aminoácido ao grupo amínico do outro). A dosagem das proteínas totais tem importante papel na avaliação do estado nutricional, na investigação de edemas e para fazer uma estimativa da capacidade antioxidante do organismo, pois são elementos celulares essenciais que desempenham inúmeras funções como na manutenção da pressão coloidosmótica do sangue, reserva protéica para reparo e crescimento tecidual, tamponamento do pH sangüíneo, transporte de metais, íons, lipídeos, etc (MCPHERSON, 1999).

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, é sintetizada pelas células do parênquima hepático e é reconhecidamente antioxidante. Apesar da albumina não ligar ferro, pode ligar íons metálicos como cobre, causando inativação deste metal pela reação com ERO, protegendo as macromoléculas. O ferro reage não enzimaticamente com os tióis do plasma, principalmente com a albumina, para gerar ERO, que podem levar a uma redução da capacidade antioxidante do plasma e um aumento da susceptibilidade de oxidação da LDL. Esta geração de radical livre dependente de tióis pela sobrecarga de ferro pode ser fator contribuinte para certas doenças (CHUNG et al., 2005).

A dosagem de albumina é utilizada para avaliação do estado nutricional e acompanhamento das doenças renais com proteinúria. Na restrição alimentar, embora tenha sido demonstrado que a pequena ou nula ingestão de proteínas, por períodos limitados, não afeta o nível normal de proteinemia, a privação dos protídeos por longos períodos (guerra, pobreza, ignorância) conduz a franca hipoproteinemia e suas conseqüências, entre elas o chamado “edema de nutrição” (hipoalbuminemia) (LIMA et al., 1992).

O ácido úrico tem papel fisiológico como antioxidante e é formado a partir da xantina oxidase como produto final do catabolismo das purinas. O ácido úrico é um ácido fraco e nos

fluidos do corpo existe quase que inteiramente na forma ânion urato. Seus níveis séricos estão relacionados diretamente com a velocidade de sua formação e inversamente com a velocidade de excreção. É um potente antioxidante especificamente de radicais hidroxila que são ativadores plaquetários (MULLER; SORREL, 1997).

Griffiths et al. (2001) avaliaram a importância do alfa-tocoferol na infecção por *P. falciparum* e sua relação na prevenção do estresse oxidativo. Eles concluíram que a concentração de vitamina E na membrana celular das hemácias parece ser o melhor indicador da exposição as ERO que o plasma.

O magnésio (Mg) é o quarto cátion mais abundante do organismo e é essencial para enzimas ligadas à respiração celular, glicólise e transporte (através da membrana) de outros cátions como cálcio e sódio. O magnésio é essencial para a preservação da estrutura molecular do DNA, RNA e ribossomos. Um terço do magnésio sérico é ligado a proteínas, principalmente a albumina, outros dois terços existem predominantemente como íon livre e um pequeno percentual como complexo de ânions. O magnésio ajuda estabilizar a capacidade de agregação plaquetária, sendo que sua carência aumenta as chances de formação de trombos (DUTRA et al., 2005).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Estudar a relação entre o estresse oxidativo e a plaquetimetria de pacientes atendidos numa Unidade Terciária de Atenção em Saúde (FMTAM) infectados com o *Plasmodium vivax*.

### **2.2 Específicos**

- 2.2.1 Descrever os níveis de marcadores do estresse oxidativo no plasma e nas plaquetas de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*;
- 2.2.2 Comparar os níveis de marcadores do estresse oxidativo entre pacientes infectados com e sem plaquetopenia;
- 2.2.3 Correlacionar os marcadores do estresse oxidativo com: a plaquetimetria, a carga parasitária e o tempo de infecção.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Modelo de Estudo**

Foi um estudo transversal, descritivo e analítico de avaliação do estresse oxidativo em amostras de pacientes com malária vivax.

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM) e aprovado (aprovação nº 1802/2006 em 14 de julho de 2006) conforme anexo A.

### **3.2 Universo de Estudo**

#### **3.2.1 Participantes**

Pacientes portadores de sinais e sintomas de malária que procuraram atendimento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (Unidade Terciária de Atenção em Saúde) com diagnóstico de malária no período de março a outubro de 2006. Foram selecionados aleatoriamente 86 pacientes com infecção por *Plasmodium vivax*. Para malária, a unidade também é de atenção primária.

#### **3.2.2 Critérios de seleção de pacientes**

- Foram selecionados pacientes que procuraram ou que foram encaminhados para o atendimento ambulatorial na FMT-AM, maiores de 18 anos, atendidos com diagnóstico

positivo para *Plasmodium vivax* no exame inicial da gota espessa e que concordaram em participar do estudo. Não foram incluídos no estudo pacientes que tinham infecção mista (vivax/falciparum), pacientes que tinham começado a terapia antimalárica, gestantes e pacientes portadores de outras doenças detectadas ou declaradas.

### 3.3 Procedimentos

#### 3.3.1 Triagem dos pacientes

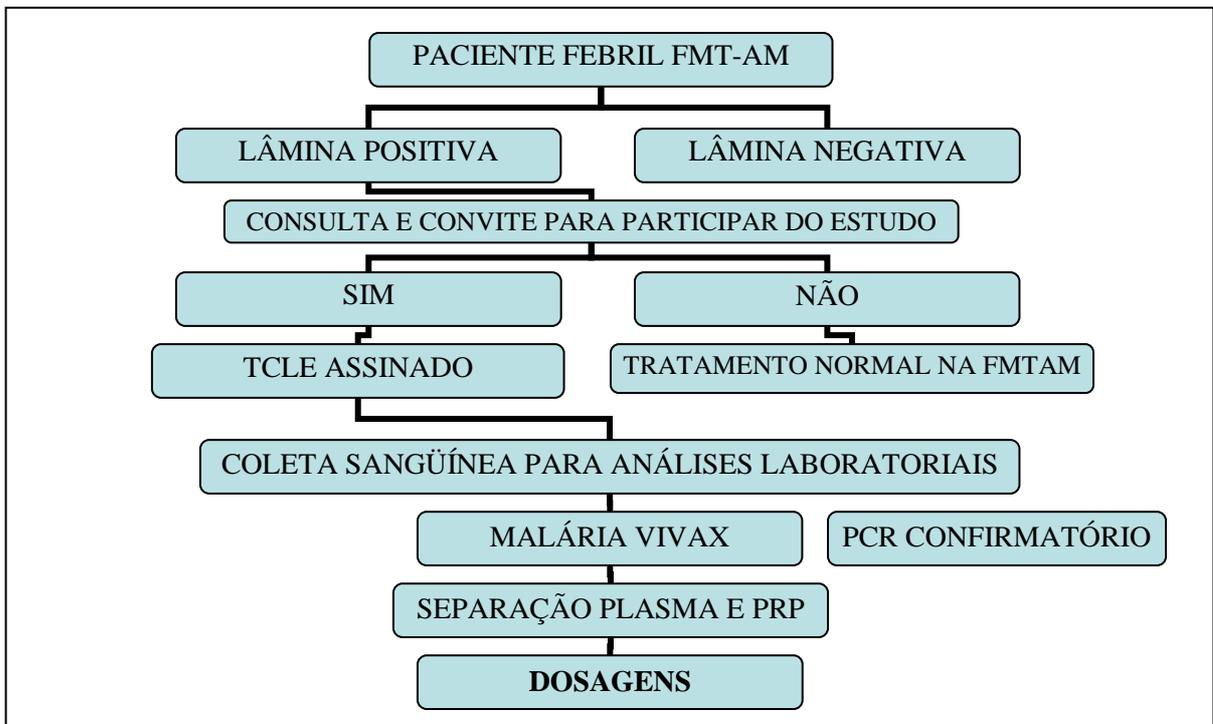


Figura 3 – Fluxograma de execução do estudo.

Os pacientes foram diagnosticados na Gerência de Malária da FMT-AM. Foi realizado o exame da gota espessa com a coleta de sangue capilar periférico para diagnóstico do tipo de malária e contagem da parasitemia em cruces.

O resultado do diagnóstico é expresso em cruces após exame de 100 campos microscópicos, onde:

Posteriormente, a contagem em  $\text{mm}^3$  de sangue foi aferida por outro microscopista. A densidade de parasitas na lâmina foi realizada por uma comparação da quantidade de parasitas com 100 células brancas do sangue. O resultado foi expresso em parasitas/ $\text{mm}^3$  relacionados à contagem total dos leucócitos. A parasitemia foi classificada em: baixa, até 15.000 parasitas por  $\text{mm}^3$  de sangue; média, de 15.001 a 60.000 parasitas por  $\text{mm}^3$  de sangue; alta, acima de 60.001 parasitas por  $\text{mm}^3$  de sangue (ALECRIM et al., 2000). O fluxograma de execução dos procedimentos está esquematizado na Figura 3.

### 3.3.2 Amostras biológicas

Após confirmação da malária por gota espessa (e antes do início da terapêutica) as amostras de sangue foram coletadas por punção venosa. O material colhido em tubos a vácuo de coleta contendo anticoagulante EDTA- $\text{K}_2$  e citrato-sódico para a realização dos testes laboratoriais. No sangue colhido com EDTA, foram realizadas dosagens hematológicas e determinação da contagem de plaquetas utilizando o contador hematológico automático (KX-21N, Sysmex®).

#### 3.3.2.1. Obtenção do lavado de plaquetas

No sangue colhido foram realizadas dosagens hematológicas (contagens plaquetárias) nos dois tubos no contador automático e em seguida a amostra do tubo com citrato-sódico foi centrifugada a 500 rpm, por 10 minutos, para separação do plasma rico em plaquetas (PRP). Após a centrifugação, foi retirada uma alíquota de 1mL e realizada nova contagem de plaquetas. O sangue que permaneceu no tubo foi novamente centrifugado a 2500 rpm, por 10 minutos e coletado o sobrenadante. O PRP foi transferido para um tubo plástico cônico e

diluído em igual volume de soro fisiológico (NaCl 0,9%) e centrifugado a 2500 rpm, por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi decantado e descartado, e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de soro fisiológico e centrifugado novamente a 2500 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e descartado, e subsequentemente o concentrado de plaquetas foi ressuspensionado em soro fisiológico para volume equivalente ao volume original de PRP. A concentração de plaquetas foi novamente medida através do contador hematológico automatizado (KX-21N, Sysmex®).

### 3.3.3 Análises hematológicas

As amostras de sangue foram processadas inicialmente para avaliação em equipamentos de hematologia para a contagem inicial das plaquetas e leucócitos na FMT-AM e no laboratório de bioquímica clínica da UFAM.

### 3.3.4 Análises bioquímicas

As amostras de plasma colhidas para análise do estresse oxidativo foram encaminhadas imediatamente para seu processamento no Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas. As análises bioquímicas foram realizadas em um auto-analizador Cobas Mira Plus (Roche corp.®). As amostras foram congeladas à -20°C até a realização das análises.

Foram realizadas dosagens bioquímicas dos seguintes antioxidantes: ácido úrico, proteínas totais, albumina, magnésio, tióis totais, bilirrubinas, zinco, glutathione peroxidase da capacidade antioxidante total e também foram feitas dosagens de oxidantes presentes malondialdeído, peróxidos (capacidade oxidante total). Anticorpos anti-LDL eletronegativa e

a determinação derivados do óxido nítrico – nitrito e nitrato (NOx) foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

#### 3.3.4.1 Peróxidos Totais (Capacidade Oxidante Total)

Para a determinação da concentração de peróxidos totais no plasma foi utilizado o método automatizado de Erel (2005) adaptado para o auto-analisador Cobas Mira plus<sup>®</sup> (Roche<sup>®</sup>). Os oxidantes presentes nas amostras oxidam o complexo íon ferroso-o-dianisidina a íons férricos. A reação de oxidação é aumentada por moléculas de glicerol, que estão presentes no meio reacional. Os íons férricos formam um complexo colorido com o xilenol orange em meio ácido. A intensidade da cor medida espectrofotometricamente é proporcional à quantidade de moléculas oxidantes presentes na amostra. O teste foi calibrado com peróxido de hidrogênio e os resultados foram expressos em termos de equivalentes micromolares de peróxido de hidrogênio por litro ( $\mu\text{mol/L}$ ).

#### 3.3.4.2 Malondialdeído (MDA)

A dosagem dos níveis plasmáticos e plaquetários de malondialdeído foram realizadas segundo Arguelles et al. (2004). Para determinação dos níveis de MDA adicionaram-se 100 $\mu\text{L}$  de amostra a 1mL de uma solução contendo ácido tricloroacético a 15%, ácido tiobarbitúrico a 0,38% em ácido clorídrico 0,25N. Esta mistura foi então aquecida em banho-maria por 30 minutos, e depois centrifugada. A absorbância do sobrenadante foi medida a 535nm. A concentração das amostras foi determinada a partir da leitura de uma amostra com concentração conhecida (padrão) de malondialdeído a 4 $\mu\text{mol/L}$ .

#### 3.3.4.3 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A caracterização da atividade antioxidante foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Erel (2004), no qual se estima a capacidade antioxidante total (CAT) do plasma baseado na oxidação do ABTS (2,2' azinobis 3-etilbenzeno-tiazolina-6-sulfonato) em relação ao TROLOX<sup>®</sup> (análogo hidrossolúvel da vitamina E). Uma quantidade de 0,384g de ABTS foi dissolvida em 100mL de água deionizada para produzir uma concentração de 7mM. O cátion radical ABTS (ABTS<sup>+</sup>) produzido por reação da solução estoque de ABTS com persulfato de potássio 2,45mM (concentração final) e deixada a mistura ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 4 a 16 horas antes do uso. Para o estudo das amostras, a solução estoque de ABTS<sup>+</sup> foi adicionada de salina tamponada com fosfato (5mM, pH 7,4) para uma absorvância de 0,70 a 734nm. Depois da adição de 1mL de ABTS<sup>+</sup> para 10µL de amostra, a absorvância lida foi feita 10 minutos após a mistura. Foi utilizada uma solução com concentração conhecida de TROLOX<sup>®</sup> como padrão.

#### 3.3.4.4 Tióis totais

A concentração de tióis foi determinada pelo método descrito originalmente descrito por Ellman e modificada por Hu (1994) e adaptada para automação em analisador bioquímico por Costa et al. (2006). No método de Ellman modificado por Hu os tióis interagem com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB), formando ânion colorido com pico máximo em 412nm ( $\epsilon_{412}=13.600M^{-1}cm^{-1}$ ).

#### 3.3.4.5 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada por método colorimétrico. Os íons cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) em meio alcalino (Reagente de biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas plasmáticas formando a cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra. É um método direto e rápido que tem elevada sensibilidade, associada com uma especificidade da reação de biureto que é uma das reações mais simples e exatas para determinação das proteínas em líquidos biológicos. Misturou-se 20 $\mu\text{L}$  de amostra e 1mL de reagente biureto (contendo hidróxido de sódio 600mmol/L, sulfato de cobre 12mmol/L), e incubou-se a 37°C durante 10 minutos. Determinou-se a absorvância em 545nm e o resultado foi expresso em g/dL. (BURTIS; ASHWOOD, 1986)

#### 3.3.4.6 Albumina

A concentração de albumina foi determinada por método colorimétrico. A solução de verde bromocresol tamponada em pH 4,0 reage especificamente com albumina, formando um complexo corado de cor verde que é lido em 630nm ou filtro vermelho. Nesse comprimento de onda não há interferência de bilirrubina ou hemoglobina em concentrações moderadas. A albumina tem a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvância máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre 620 e 640nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra. Misturou-se 1,0mL de reagente de cor (tampão 60mmol/L, pH 3,8; verde de bromocresol 300 $\mu\text{mol/L}$  e Brij 35 > 6,0mmol/L) e 0,01mL de amostra e após 2 minutos, determinou-se as absorvâncias em 630nm ou filtro

vermelho (600 a 640) e o resultado expresso em g/dL. (BARTHOLOMEW; DELANEY, 1966).

#### 3.3.4.7 Ácido Úrico

A concentração de ácido úrico foi determinada pelo método enzimático de trinder para determinação do ácido úrico por reação de ponto final em amostras biológicas. O ácido úrico é oxidado pela uricase à alantoína e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, reage com DHBS e a 4-aminoantipirina, formando o cromogênio antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra. Colocou-se 1mL de reagente de trabalho (tampão 80mmol/L pH7,0; 4-aminoantipirina 0,7mmol/L, DHTS 2,0 mmol/L, peroxidase 13300 U/L, uricase 100 U/L, azida sódica 0,8 mmol/L e octilfenol polioxietanol 1 g/L) e 0,02mL de amostra. Misturou-se e incubou-se em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Determinou-se as absorvâncias do teste em 520nm ou filtro verde (490-540), o resultado expresso em mg/dL (DUNCAN et al., 1982).

#### 3.3.4.8 Magnésio

A concentração de magnésio foi determinada pelo método colorimétrico de Mann e Yoe. Os íons magnésio produzem um complexo corado em meio alcalino, frente ao corante de Mann e Yoe. Os íons magnésio reagem com o magon sulfonado (cor azul) em meio alcalino formando um complexo de cor rósea que é proporcional à quantidade dos íons magnésio na amostra. Adicionou-se 2,0mL de reagente de uso (tampão 400mmol/L, carbonato de potássio 153mmol/L, pH 11,5; azida sódica 15,4mmol/L e magon sulfonado 0,1g/L) e 0,02mL de

amostra. Misturou-se, e após 2 minutos determinou-se as absorvâncias dos testes em 505nm ou filtro verde (500 a 540) e o resultado expresso em mEq/L (MANN; HOE, 1956).

#### 3.3.4.9 Bilirrubinas

As concentrações das bilirrubinas foram determinadas pelo método Sims-Horn. No sistema para a determinação das bilirrubinas direta e total em amostras biológicas por reação de ponto final. A bilirrubina foi dosada por diazotação e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525nm. A bilirrubina direta (diglicuronídeo) foi dosada em meio aquoso, enquanto a total (direta e indireta) foi dosada por ação de potente solubilizador de ação catalisadora. A intensidade da cor é proporcional ao teor de bilirrubina sérica e o resultado foi expresso em mg/dL. Na metodologia Sims-Horn usa-se ácido sulfanílico 5,75mmol/L, nitrito de sódio 72,5mmol/L e estabilizador. Misturou-se 1,8mL de acelerador (cafeína 130mmol/L, benzoato de sódio 260 mmol/L, acetato de sódio 460 mmol/L e surfactante), 0,15mL diazo reagente e amostra 0,05mL para bilirrubina total. Para bilirrubina direta substituir o acelerador por água destilada. Misturou-se e após 5 minutos, determinaram-se as absorvâncias das bilirrubinas direta e total em 525nm ou filtro verde (500 a 540). A bilirrubina indireta foi obtida pela diferença entre as bilirrubinas total e direta (SINS; HORN, 1958).

#### 3.3.4.10 Zinco

O zinco presente na amostra é quelado pela 5-Br-PAPS 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)-fenol presente no reagente kit Randox Laboratories Lld<sup>®</sup>. A formação do complexo é medida em 560nm (SAITO et al., 1982; HOMSTER; ZAK, 1985).

#### 3.3.4.11 Anticorpos anti-Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa

As concentrações de Ac anti-Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (LDL<sup>-</sup>), Lipoproteína Baixa Densidade Eletronegativa nativa (LDL<sub>n</sub>) e a proporção LDL-/LDL<sub>n</sub> foram determinadas segundo Damasceno et al. (2006) e Oliveira et al. (2006). As concentrações de LDL<sup>-</sup> no plasma foram determinadas por ELISA usando um anticorpo anti-LDL<sup>-</sup> monoclonal humano (mAb3D1036). Sucintamente, os 96 poços da placa de ELISA foram cobertos com 50µL de mAb3D1036 em tampão de carbonato-bicarbonato (pH 9,4, 0,1M) e incubou-se durante a noite a 4°C. Depois deste período, foram realizadas três lavagens com tampões específicos e incubados com estreptavidina-peroxidase-HRP conjugado entre as lavagens (Tressgen Biotechnologies Corp.) por 1h à 37°C. Para tornar as leituras de luminescência possíveis, foi adicionado o seguinte: luminol (2.3nM), piodophenol (0.9mM) e peróxido de hidrogênio (3,0nM). A intensidade de quimioluminescência foi determinada usando um leitor de microplacas imediatamente (LumiCount, Packard®; Medriden, CT, o E.U.A.) (DAMASCENO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Oxidação de Lipoproteínas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com a colaboração e supervisão da Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

#### 3.3.4.12 NO<sub>x</sub> (Nitrato e Nitrito)

A dosagem de  $\bullet$ NO foi determinada através do analisador de  $\bullet$ NO (NOA<sup>TM</sup>, Sievers Instruments, Boulder, CO) que utiliza detecção por quimiluminescência, através do decaimento do radical dióxido de nitrogênio triplete (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) formado pela reação do O<sub>3</sub> com o

\*NO presente. A quantificação do \*NO liberado, expresso em pmoles, foi determinada através de uma curva de calibração plotada a partir de NaNO<sub>2</sub>, utilizando cloreto de vanádio como agente redutor (LIMA; ABDALLA, 2001). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Oxidação de Lipoproteínas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo com a colaboração e supervisão da Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

#### 3.3.4.13 Glutationa Peroxidase (GPx)

Os níveis de Glutationa Peroxidase foram determinados no plasma e no lavado de plaquetas utilizando a metodologia de Paglia e Valentine (1967) (kit Randox laboratories Ltd<sup>®</sup>). Neste método a GPx catalisa a oxidação da glutatona (GSH) com óxido hidrocloroso de cumeno. Em presença de glutatona redutase e NADPH, a glutatona oxidada (GSSG) é imediatamente reduzida com concomitante oxidação de NADPH à NADP<sup>+</sup>, produzindo um decréscimo na absorbância em 340nm. A absorbância foi determinada após 1, 2 e 3 min. (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

#### 3.3.5 Confirmação da Malária

As amostras colhidas para análise foram encaminhadas para confirmação da espécie de *Plasmodium* e/ou verificação de possíveis infecções mistas que não tenham sido detectadas no exame de gota espessa. Apesar do método da gota espessa ser considerado como padrão-ouro, é usual a utilização da confirmação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em trabalhos científicos, por este apresentar maior sensibilidade. A confirmação ocorreu no Laboratório de Biologia Molecular da Gerência de Malária da FMTAM, conforme metodologia proposta por SNOUNOU et al.(1993 a, b).

### **3.4 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados e apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão. A hipótese de igualdade de duas médias foi verificada fazendo uso do teste *t* de Student para as variáveis com distribuição normal e teste de Mann-Whitney para as dosagens e/ou parâmetros que não passaram no teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) analisados pelo programa Epi Info 3.3 (CDC/Atlanta). As correlações entre as variáveis foram realizadas utilizando os testes de Pearson ou Spearman para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. O nível de significância considerado para os testes foi de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Foram avaliados 86 pacientes infectados por *Plasmodium vivax*, sendo 60 do gênero masculino e 26 do gênero feminino. As idades variaram de 18 a 60 anos, com média de 37,3 anos. O tempo médio de infecção foi de 4,9 dias, variando de 1 a 15 dias. Foi verificada parasitemia média de 3.070 parasitos/mm<sup>3</sup>.

Com relação à plaquetimetria, 62 pacientes (72%) apresentaram contagem abaixo de 150.000 plaquetas e 24 (28%) tinham plaquetimetria maior ou igual a 150.000 com uma plaquetimetria geral média de 122.700/mm<sup>3</sup> (38.000 a 252.000/mm<sup>3</sup>). As características gerais dos pacientes participantes do estudo estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Características gerais dos participantes do estudo infectados com o *Plasmodium vivax* (n=86).

Parâmetros	Plaquetimetria/mm <sup>3</sup>		Total	p
	<150.000	>150.000		
Idade (anos)	37,1 ± 11,2	37,8 ± 9,2	37,3 ± 10,6	0,847
Tempo de infecção (dias)	5,2 ± 3,5	4,3 ± 3,7	4,9 ± 3,5	0,076
Parasitemia (parasitos/mm <sup>3</sup> )	3.400 ± 5.376	2.034 ± 2.923	3.070 ± 4.909	0,308

Nota: Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão.  
Teste Mann-Whitney

O grupo estudado constituiu-se de 20 (23%) primoinfectados e 66 (77%) não-primoinfectados. Pôde-se verificar que não houve diferença entre os grupos com relação ao tempo de infecção e a parasitemia, porém houve diferença significativa na plaquetimetria conforme mostra a tabela 7.

Tabela 7: Plaquetimetria, tempo de infecção e parasitemia em pacientes primoinfectados e não-primoinfectados com malária vivax (n=86).

Variável	Primoinfectados	Não-primoinfectados	p
Plaquetimetria ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	96,6 $\pm$ 53,0	130,6 $\pm$ 48,2	0,008*
Tempo de infecção (dias)	5,6 $\pm$ 3,8	4,8 $\pm$ 3,5	0,371**
Parasitemia (parasitos/ $\text{mm}^3$ )	2288 $\pm$ 2540,1	3277,2 $\pm$ 5367,3	0,742**

Nota: Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

\*Teste *t*

\*\*Teste Mann-Whitney

Diferenças significativas entre os grupos foram observadas nas dosagens de bilirrubinas (total, direta e indireta), malondialdeído, LDLn e na proporção de LDL<sup>-</sup>/LDLn (Tabela 8).

Tabela 8: Níveis plasmáticos de antioxidantes e indicadores de estresse oxidativo de pacientes plaquetopênicos e não-plaquetopênicos com malária vivax (n=86).

Dosagens	Plaquetopênicos	Não-Plaquetopênicos	p
Ácido úrico (mg/dL)	3,68 $\pm$ 1,0	4,05 $\pm$ 1,2	0,331*
Proteínas (g/dL)	6,66 $\pm$ 0,5	6,74 $\pm$ 0,8	0,698*
Albumina (g/dL)	3,56 $\pm$ 0,4	3,74 $\pm$ 0,4	0,143**
Magnésio (mg/dL)	2,57 $\pm$ 0,3	2,58 $\pm$ 0,4	0,959*
CAT (mEq/TROLOX)	1,28 $\pm$ 0,3	1,28 $\pm$ 0,3	0,971*
SH ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,24 $\pm$ 0,1	0,27 $\pm$ 0,1	0,179**
Bilirrubina total (mg/dL)	1,13 $\pm$ 0,7	0,64 $\pm$ 0,2	0,024*
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,33 $\pm$ 0,3	0,16 $\pm$ 0,1	0,040**
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,8 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,2	0,014**
Zinco ( $\mu\text{mol/L}$ )	4,52 $\pm$ 1,3	4,35 $\pm$ 1,3	0,701*
Peróxidos ( $\mu\text{mol/L}$ )	23,14 $\pm$ 11,6	23,97 $\pm$ 8,9	0,785*
GPx (U/L)	221,43 $\pm$ 62,3	246,81 $\pm$ 100,5	0,516**
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	3,57 $\pm$ 2,4	2,52 $\pm$ 0,4	0,033**
Ac anti LDL <sup>-</sup> (abs)	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,992*
Ac anti LDLn (abs)	0,1 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,0	0,040*
LDL <sup>-</sup> /LDLn	4,01 $\pm$ 2,8	6,40 $\pm$ 3,1	0,019**
NOx ( $\mu\text{mol/L}$ )	12,55 $\pm$ 12,9	14,83 $\pm$ 20,1	0,915**

Nota: Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão

\*Teste *t*

\*\*Teste Mann-Whitney

O resultado da dosagem bioquímica de MDA plasmático, nos grupos plaquetopênicos e não-plaquetopênicos estão mostrados no Gráfico 1.

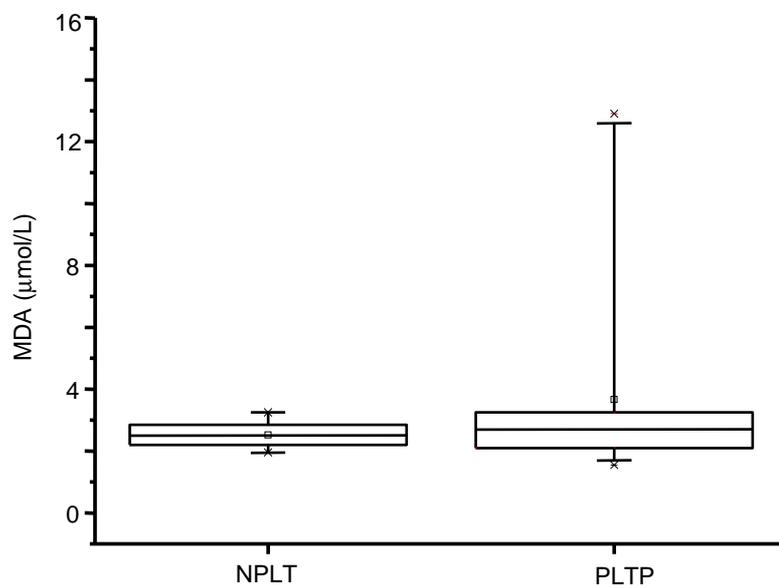


Gráfico 1. Níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) de pacientes não-plaquetopênicos (NPLT) e plaquetopênicos (PLTP) com malária vivax (p=0,033, teste Mann-Whitney).

Nas dosagens realizadas nas plaquetas ao agrupar-se os pacientes em plaquetopênicos e não-plaquetopênicos foram verificadas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 9). Os pacientes plaquetopênicos apresentaram níveis de MDA e GPx mais elevados que os não-plaquetopênicos. O resultado da dosagem bioquímica de glutathione peroxidase nas plaquetas, nos grupos plaquetopênicos e não-plaquetopênicos estão mostrados no Gráfico 2.

Tabela 9: Níveis plaquetários de antioxidantes e indicadores de estresse oxidativo de pacientes plaquetopênicos e não-plaquetopênicos com malária vivax (n=50).

Dosagens	Plaquetopênicos	Não-Plaquetopênicos	p
MDA (nmol/10 <sup>6</sup> plt)	119,4 ± 117	30,4 ± 26	<0,001
GPx (U/10 <sup>6</sup> plt)	7,21 ± 6	1,92 ± 0,7	<0,001

Nota: Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão  
Teste Mann-Whitney

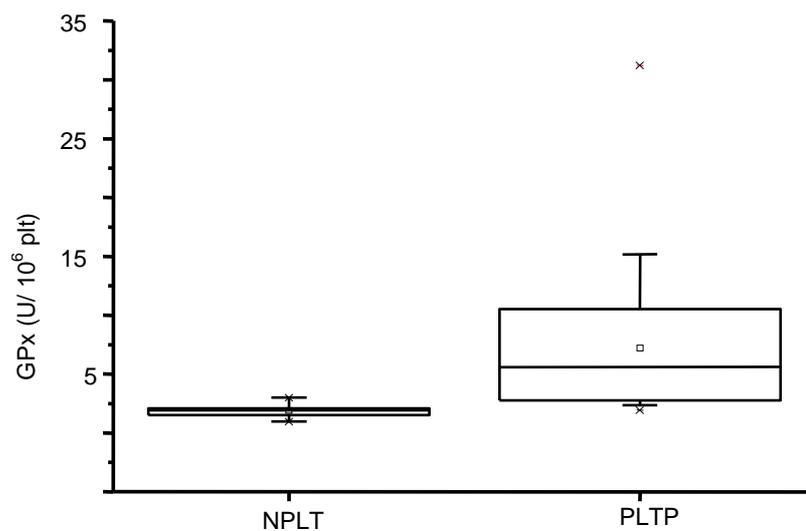


Gráfico 2. Níveis plaquetários de glutathiona peroxidase (GPx) de pacientes não-plaquetopênicos (NPLT) e plaquetopênicos (PLTP) com malária vivax ( $p < 0,001$ , teste de Mann-Whitney).

Foi verificada diferença significativa na dosagem bioquímica de malondialdeído nas plaquetas, entre os grupos plaquetopênicos e não-plaquetopênicos e os resultados estão apresentados no Gráfico 3.

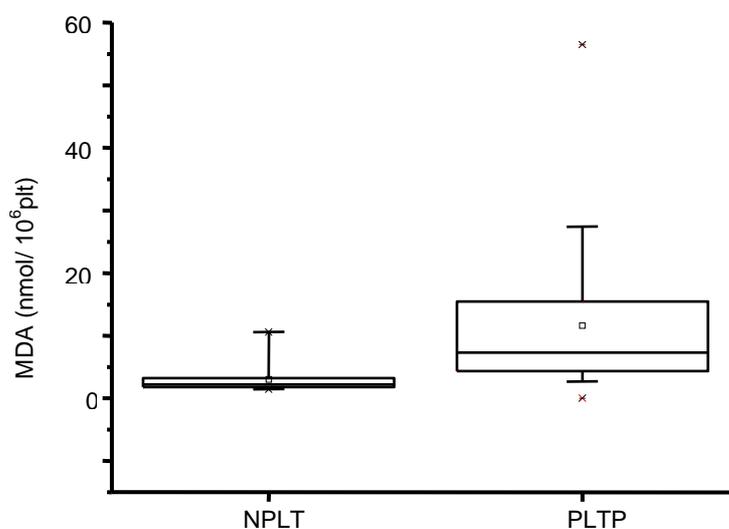


Gráfico 3. Níveis plaquetários de malondialdeído de pacientes não-plaquetopênicos (NPLT) e plaquetopênicos (PLTP) com malária vivax ( $p < 0,001$ , teste Mann-Whitney).

Diversas correlações foram observadas entre os diferentes parâmetros avaliados e os principais resultados estão apresentados nos gráficos de 4 a 11. As correlações estão apresentadas com a melhor reta e o intervalo de confiança de 95%.

Foram verificadas correlações negativas entre a plaquetimetria e o tempo de infecção (Gráfico 4) e entre a parasitemia e a plaquetimetria (Gráfico 5).

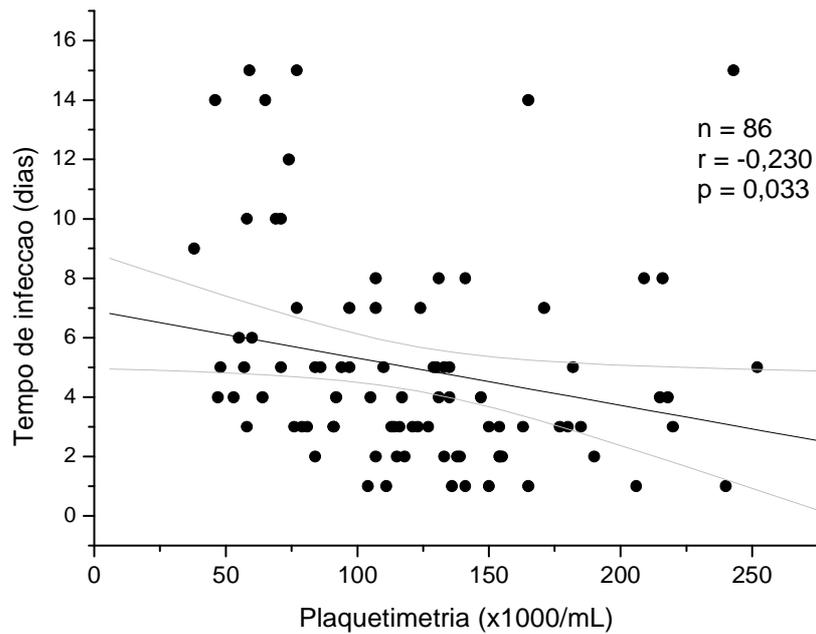


Gráfico 4. Correlação entre o tempo de infecção (dias) e a plaquetimetria ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de pacientes com malária vivax.

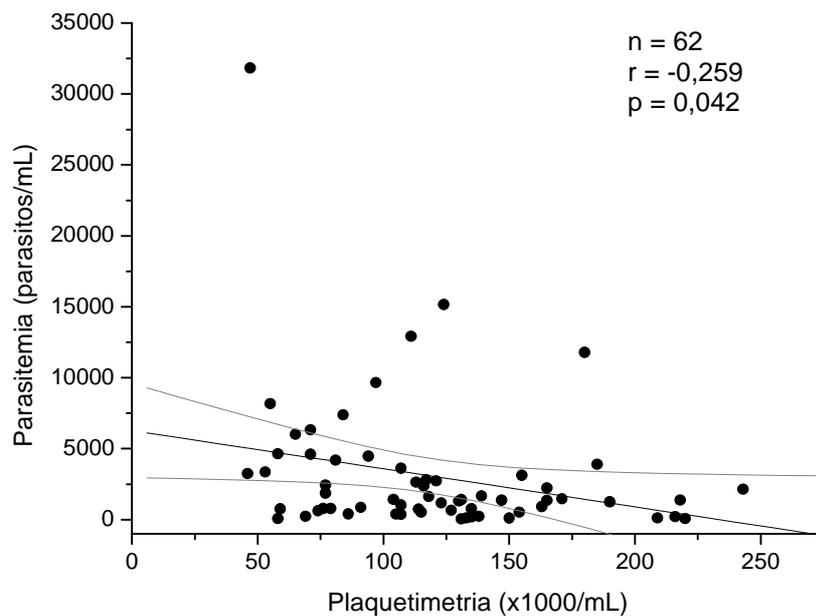


Gráfico 5. Correlação entre a plaquetimetria ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e a parasitemia (parasitos/mL) de pacientes com malária vivax.

A dosagem plaquetária de malondialdeído correlacionou-se negativamente com a plaquetimetria (Gráfico 6) e positivamente com o tempo de infecção (Gráfico 7) e com a parasitemia (Gráfico 8).

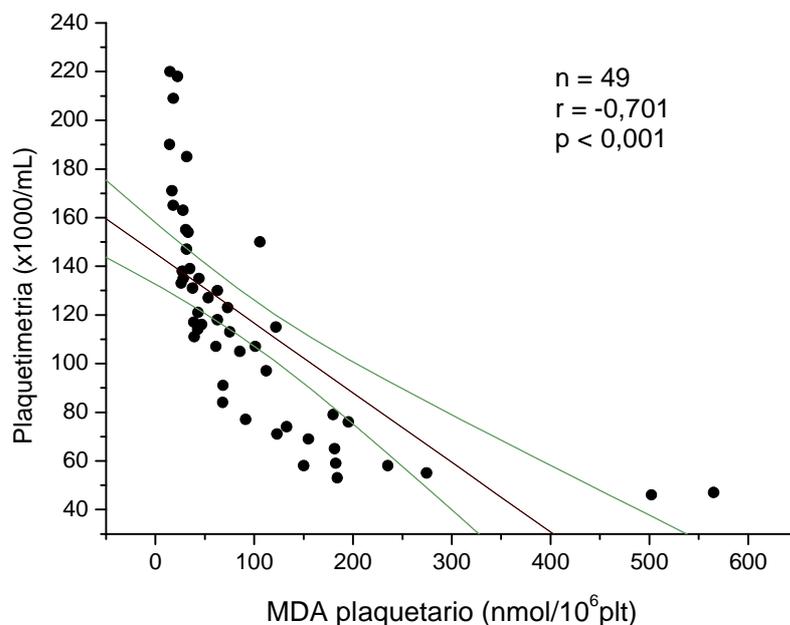


Gráfico 6. Correlação entre os níveis de MDA plaquetário ( $\text{nmol}/10^6\text{plt}$ ) e a plaquetimetria ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de pacientes com malária vivax.

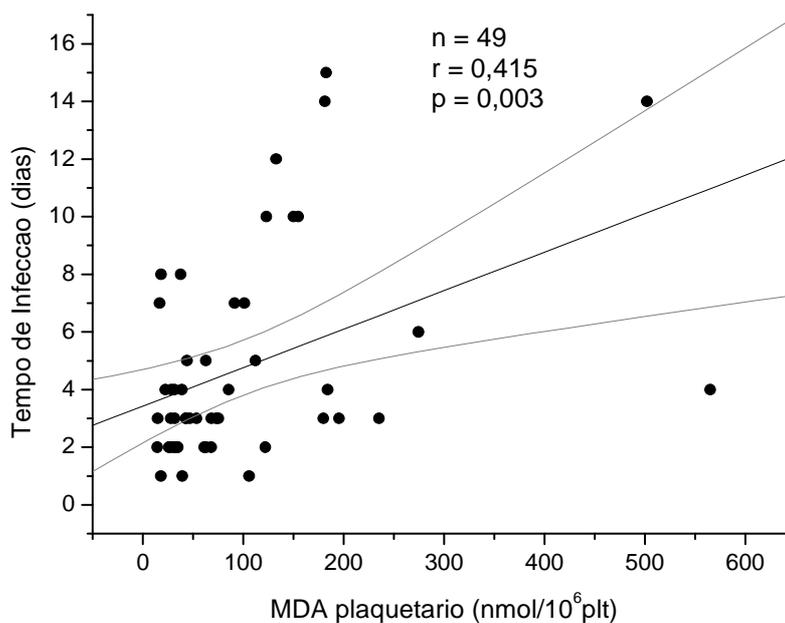


Gráfico 7. Correlação entre o tempo de infecção (dias) e a dosagem de MDA plaquetário ( $\text{nmol}/10^6\text{plt}$ ) de pacientes com malária vivax.

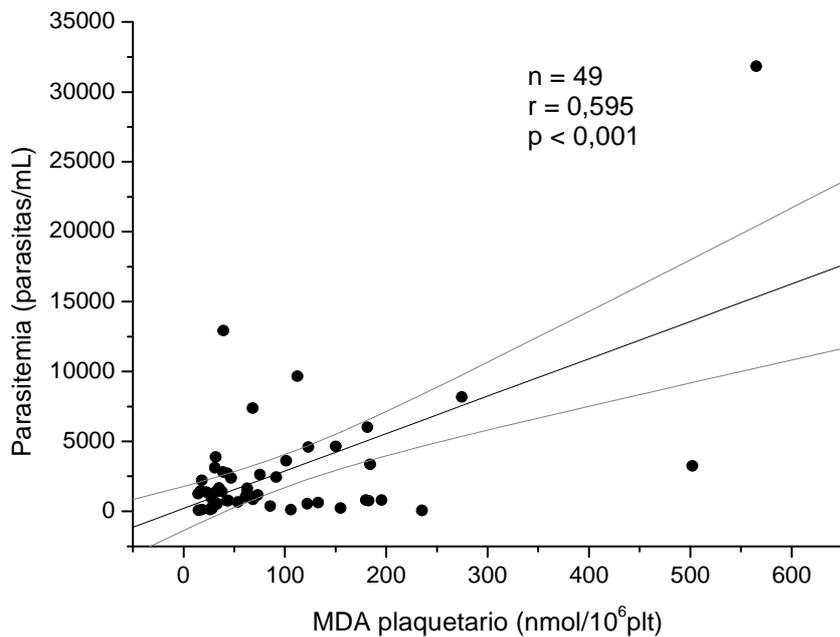


Gráfico 8. Correlação entre a parasitemia (parasitas/ $\mu$ L) e a dosagem de MDA plaquetário (nmol/10<sup>6</sup>plt) de pacientes com malária vivax.

A dosagem plaquetária de glutiona peroxidase correlacionou-se negativamente com a plaquetimetria (Gráfico 9) e positivamente com o tempo de infecção (Gráfico 10).

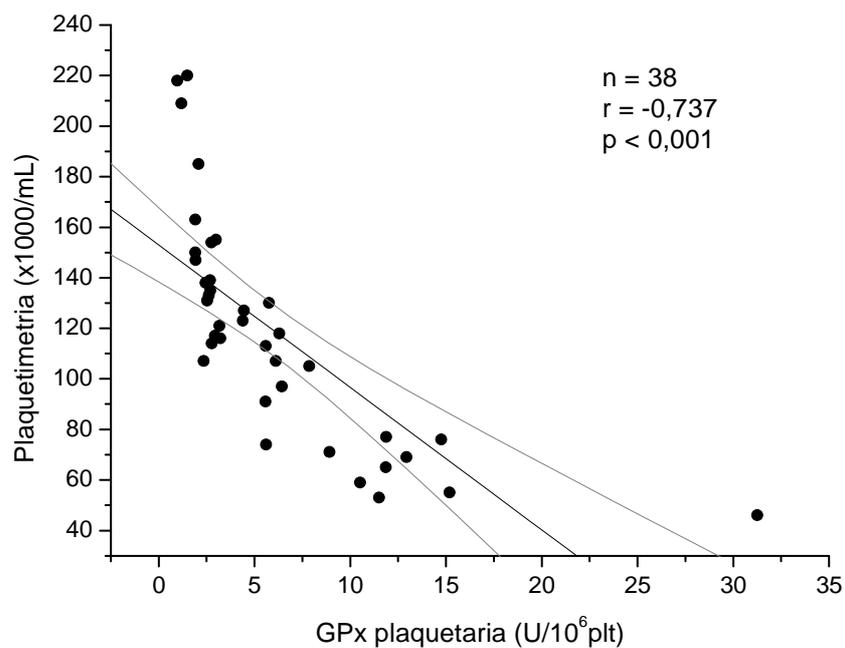


Gráfico 9. Correlação entre os níveis de GPx plaquetário (U/10<sup>6</sup>plt) e a plaquetimetria (x10<sup>3</sup>/ $\mu$ L) de pacientes com malária vivax.

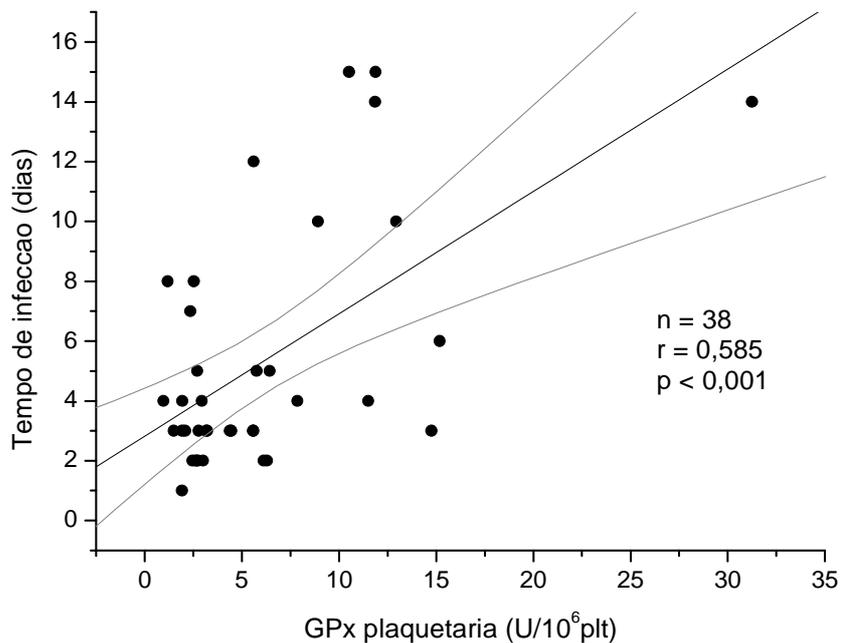


Gráfico 10. Correlação entre o tempo de infecção (dias) e a dosagem de GPx plaquetário (U/10<sup>6</sup>plt) de pacientes com malária vivax.

Houve uma correlação estatisticamente significativa e positiva entre as dosagens plaquetárias de MDA e GPx (Gráfico 11).

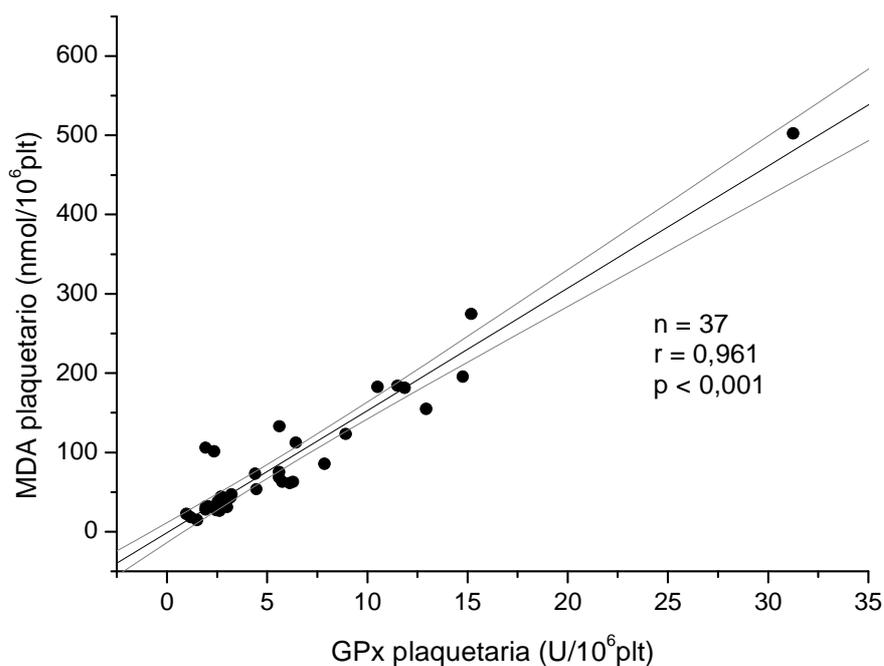


Gráfico 11. Correlação entre a dosagem de MDA plaquetário (nmol/10<sup>6</sup>plt) e a GPx plaquetária (U/10<sup>6</sup>plt) de pacientes com malária vivax.

Foi verificada correlação positiva entre as dosagens da CAT e o ácido úrico (Gráfico 12).

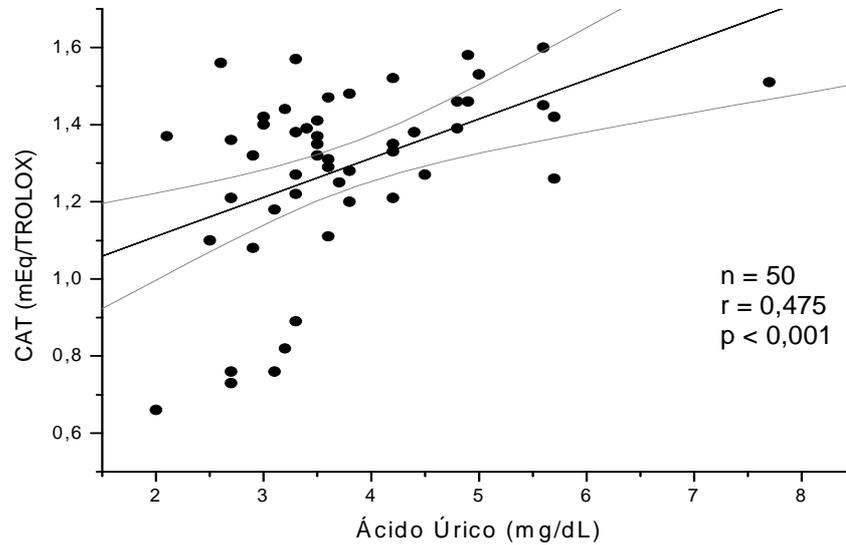


Gráfico 12. Correlação entre a os níveis plasmáticos de ácido úrico (mg/dL) e os níveis plasmáticos da capacidade antioxidante total (mEq/TROLOX) de pacientes com malária vivax.

Houve correlação positiva entre as dosagens de tióis e o ácido úrico (Gráfico 13).

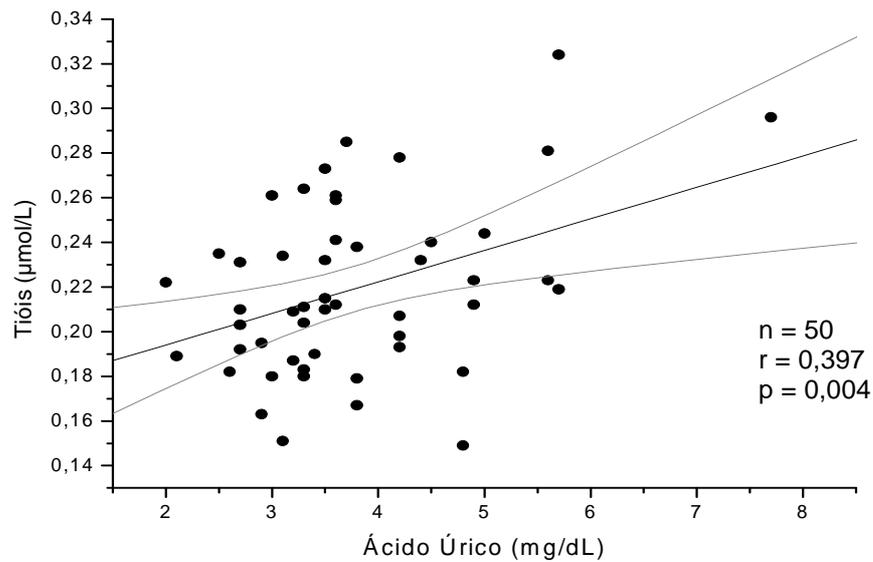


Gráfico 13. Correlação entre a os níveis plasmáticos de ácido úrico (mg/dL) e os níveis plasmáticos de tióis ( $\mu\text{mol/L}$ ) de pacientes com malária vivax.

Foi verificada importante correlação entre as dosagens da CAT e o zinco (Gráfico 14).

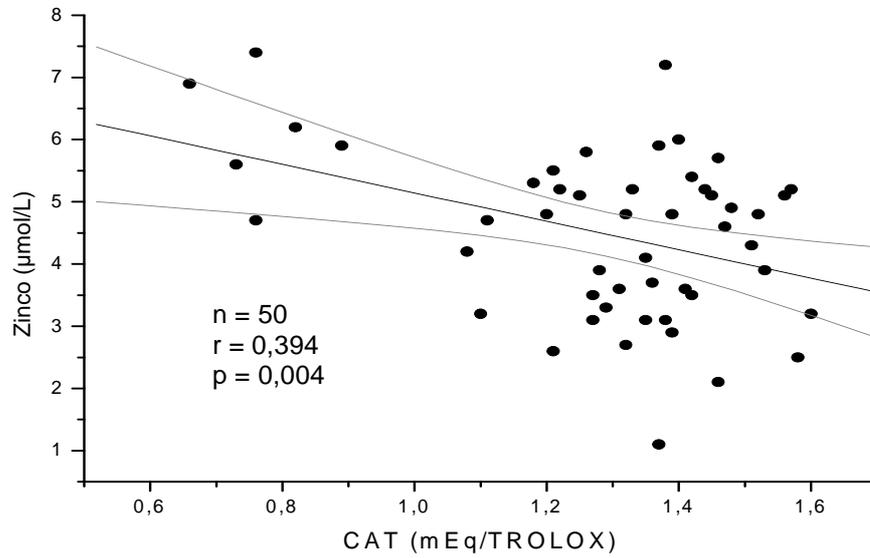


Gráfico 14. Correlação entre a os níveis plasmáticos da capacidade antioxidante total (mEq/TROLOX) e zinco (µmol/L).

## 5 DISCUSSÃO

A plaquetopenia é um dos principais achados e complicação freqüente na doença malárica (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2005). Este é um achado comum em infecções maláricas e eventualmente é usado como diagnóstico diferencial em regiões não-endêmicas para descartar a malária do viajante como sugeriu Patel et al. (2004). Dentre os pacientes plaquetopênicos 31 (50%) apresentaram plaquetimetria menor que  $100.000/\text{mm}^3$  e 4 (6,45%) apresentaram plaquetopenia grave ( $<50.000/\text{mm}^3$ ).

Uma revisão do estudo das plaquetas em pacientes com malária foi apresentada recentemente por Lacerda (2007) em sua tese de doutoramento, na qual foi apresentada uma revisão sistemática de estudos que avaliaram a contagem de plaquetas, em pacientes com malária. Nos 23 estudos apresentados, a plaquetopenia foi sempre o achado destacado, usando-se como critério de plaquetopenia a contagem  $<150.000/\mu\text{L}$ .

Dentre os pacientes analisados 23% eram primoinfectados e a plaquetimetria encontrada foi mais baixa nestes pacientes em relação aos que já tiveram eventos maláricos prévios, com uma diminuição média de cerca 25% na contagem de plaquetas nos pacientes plaquetopênicos, como mostrado na tabela 7. Isso pode ser justificado porque pacientes imunes têm uma malária tipicamente menos grave que os não-imunes, devido à exacerbação do sistema imune nestes pacientes (SUH et al., 2004).

Nossos resultados mostraram que a plaquetimetria correlacionou-se negativamente ( $r=-0,230$ ) com o tempo de infecção (Gráfico 4). A correlação negativa significa que a contagem de plaquetas diminui à medida em que o tempo de infecção aumenta. A tendência encontrada no tempo de infecção entre plaquetopênicos ou não ( $p = 0,076$ ) pode estar relacionada unicamente ao tempo de exposição ao parasita, já que o grupo plaquetopênico

teve, em média, um dia a mais de exposição em relação ao outro grupo (Tabela 6). Também foi verificada correlação negativa entre a plaquetimetria e a parasitemia ( $r=-0,259$ ) (Gráfico 5).

Foram verificadas diferenças significativas entre os grupos plaquetopênicos e não-plaquetopênicos nas dosagens das bilirrubinas e na dosagem de MDA (Gráfico 1) e, de LDL nativa onde os níveis foram maiores nos pacientes plaquetopênicos. Níveis aumentados de produtos da peroxidação lipídica e indicadores de estresse oxidativo foram observados em outros estudos em hemácias parasitadas por *P. falciparum* (WOZENCRAFT, 1986), *P. vinckei* (BUFFINTON et al., 1988), *P. berghei* (NAIR et al., 1984), *P. chabaudi* (NACKOMCHAI et al., 1992) e *P. knowlesi* (BEAUMELLE; VIAL, 1986). Também foi verificada a presença de estresse oxidativo em outros estudos com *P. vivax* como Sarin et al. (1993), Erel et al. (1998), Yazar et al. (2004) e Sohail et al. (2007).

O MDA produz aumento, independente, da parasitemia, nas dosagens plasmáticas conforme observou Sarin et al (1993), fato também observado em nosso estudo onde não foi observada correlação estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de MDA e a parasitemia ( $p=0,512$ ,  $r=-0,100$ ), Apesar disso, tem sido considerado que o aumento significativo de MDA durante a malária pode ser devido à ativação do sistema imune e devido à liberação de ânion radical superóxido durante a degradação da hemoglobina pelo parasito (SOHAIL et al., 2007). Já foi mostrado também que o trofozoíto de *P. falciparum* infectando as hemácias humanas produz  $H_2O_2$  e, conseqüentemente,  $OH^\bullet$  cerca de duas vezes mais que o eritrócito normal (NATHAN et al., 1979).

A diferença observada entre os grupos na dosagem plasmática de bilirrubinas deve-se ao fato desta ser um produto de hemólise mostrando que a ocorrência de hemólise foi mais intensa nos pacientes plaquetopênicos (Tabela 8). No estudo de Raposo et al. (2007) foi verificada alteração de bilirrubina total  $> 5\text{mg/dL}$ , além da plaquetopenia e outras alterações

clínicas em pacientes atendidos com malária vivax. Santana e Alecrim (2007) encontraram bilirrubinas alteradas acima de 7mg/dL em paciente com metemoglobinemia que foi relacionada com a utilização de agentes oxidantes, em sua maioria medicamentos. A bilirrubina, além de funcionar como marcador de hemólise fisiológica, também tem contribuição antioxidante secundária no organismo (YESILKAYA et al., 2000; HAMMERMAN et al., 2002). Erel (2004) mostrou que a bilirrubina contribui com 1,69% da capacidade antioxidante total do plasma e que outras substâncias como o ácido úrico também contribui de maneira efetiva (Tabela 5).

No presente trabalho não foi encontrada diferença significativa na dosagem da CAT entre os pacientes plaquetopênicos e não-plaquetopênicos. Apesar deste dado não ter sido mostrado anteriormente na literatura, isto pode ser explicado pelo fato de existirem vários mecanismos compensatórios para manter os níveis de CAT constantes. Também, as dosagens de tióis totais e ácido úrico não se mostraram alteradas. No estudo de Pabón et al. (2003), não se observaram diferenças entre pacientes infectados com malária e não-infectados. Apesar disso, parece haver, como relatado na literatura, uma interação entre os diferentes antioxidantes, como foi observado no presente trabalho. Foi verificada correlação positiva nas dosagens plasmáticas entre a CAT e o ácido úrico ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,475$ ), entre os tióis e o ácido úrico ( $p = 0,004$ ,  $r = 0,397$ ) e entre a CAT e o zinco ( $p = 0,004$ ,  $r = 0,394$ ). Estes achados corroboram a tabela proposta por Erel (2004) da contribuição antioxidante. Todas estas dosagens estão inter-relacionadas, sendo esperado que apresentem correlações positivas.

A  $LDL^-$ , representa uma fração mais eletronegativamente carregada da LDL, e tem sido relacionada ao aumento do risco cardiovascular e pode ser um biomarcador do estresse oxidativo endógeno (DAMASCENO et al., 2006 e OLIVEIRA et al., 2006). No presente trabalho, foram quantificados no plasma os níveis de Ac-anti $LDL^-$  e Ac-anti $LDL_n$ . Os resultados também foram expressos como relação entre os dois tipos de anticorpos. Quando

analisado isoladamente, não houve diferença nos níveis de Ac-antiLDL<sup>-</sup> entre os pacientes com ou sem plaquetopenia. Contudo, quando estes níveis foram expressos em relação aos Ac-antiLDL<sub>n</sub> (não-eletronegativa), o valor da relação foi mais baixo nos pacientes plaquetopênicos, isto porque os níveis de Ac-antiLDL<sub>n</sub> foi mais elevado 2,5 vezes nestes pacientes. Isto pode ser explicado, em parte, por exacerbação da resposta imune nos pacientes plaquetopênicos (Kelton et al., 1983). A dosagem de LDL<sup>-</sup> ou dos seus anticorpos ainda não tinha sido estudada na infecção malárica. Por isso, muito pouco se conhece a respeito deste marcador na infecção. A análise dos resultados aqui apresentados sugere um maior aprofundamento sobre o papel da oxidação ou eletronegativação da LDL na malária, e o uso de sua dosagem direta ou dos seus anticorpos como marcadores do estresse oxidativo nesta doença.

Foram também realizadas nas plaquetas as dosagens de MDA e GPx de forma a avaliar o desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes e seus efeitos diretamente na contagem das plaquetas de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Conforme apresentado na Tabela 9, os resultados das dosagens foram comparados entre os grupos plaquetopênico e não-plaquetopênico. Os pacientes plaquetopênicos apresentaram níveis mais elevados tanto de MDA como de GPx, quando comparados com os pacientes não-plaquetopênicos.

O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica. Este tem sido amplamente utilizado na literatura como um marcador endógeno de estresse oxidativo em diferentes sistemas biológicos e doenças de origem infecciosa e crônico-degenerativas. As concentrações de MDA podem ser dosadas pela sua reação com o ácido tiobarbitúrico, reação esta conhecida como “TBARS - thiobarbituric acid substances”. O complexo TBA-MDA formado pode ser quantificado em amostras biológicas por espectrofotometria, como foi realizado neste trabalho, ou por métodos mais precisos como cromatografia líquida de alta eficiência. Níveis elevados de MDA são indicativos de maior geração de EROs e,

conseqüentemente, de estresse oxidativo. O aumento do MDA observado nas plaquetas de indivíduos com malária e plaquetopenia sugere um aumento da produção de EROs ou da exposição das plaquetas a estas moléculas. Isto corrobora a etiopatogênese da doença já descrita, por exemplo, às hemácias, as quais estão mais expostas ou susceptíveis à oxidação mediada por radicais livres. Os níveis de MDA séricos aumentados na malária vivax já foram descritos em outros estudos de Yazar et al., 2004 e Erel et al., 2001. Nanda e Das (2000) verificaram que na malária falciparum aguda o plasma parece conter substâncias pró-oxidantes que podem contribuir para o estresse oxidativo extracelular nas hemácias parasitadas ou não.

Nos testes de correlação, o MDA plaquetário correlacionou-se positivamente com o tempo de infecção ( $r=0,415$ ) conforme apresentado no Gráfico 7 e com a parasitemia ( $r=0,595$ ) mostrado no Gráfico 8. Este também correlacionou-se negativamente com a plaquetimetria ( $r = -0,701$ ) como mostrado no Gráfico 6. As concentrações plaquetárias de MDA também correlacionaram-se positivamente com a parasitemia o que corrobora a hipótese da produção de EROs pelo parasita.

A GPx é a enzima-chave no sistema redox da glutathiona, responsável pela redução dos hidroperóxidos. GPx é requerida pela GSH como substrato para inativação por radicais hidroxila e superóxido (BLUM; FRIDOWICH, 1995). A glutathiona, juntamente com a catalase, tem a capacidade de eliminar o peróxido de hidrogênio intracelular, porém a GPx é preferida para eliminar baixas concentrações de  $H_2O_2$ . A glutathiona peroxidase tem sido estudada em infecções maláricas (GAMAIN et al., 1996, EREL et al., 2001). Um dos achados desses estudos foi que o aumento da GPx ocorre quando é feita a suplementação com selênio. Também foi observado aumento da atividade GPx quando os parasitos são submetidos a estresse oxidativo experimental (GAMAIN et al., 1996). Como os eritrócitos são incapazes de produzir novas proteínas, estes resultados sugerem a existência de GPx parasitária dependente

de selênio. No estudo realizado por Bozdech e Ginsburg (2004) no transcriptoma durante o ciclo intra-eritrocítico da malária falciparum, mostraram que a transcrição é coordenada com a participação de muitos genes e que ocorre um desvio quando utilizam glutatona e tioredoxina como antioxidantes em que estes são transcritos antes dos genes de elementos que controlam os substratos são transcritos.

No presente trabalho foi verificado um aumento da atividade GPx nas dosagens plaquetárias (Gráfico 2). O aumento da atividade de GPx no estresse oxidativo está em consonância com os achados de Pabón et al. (2003), onde se verificou ainda aumento de SOD e catalase. Estes trabalhos sugerem que o aumento de GPx poderia proteger os pacientes do desenvolvimento das complicações maláricas. A dosagem plaquetária de GPx e sua correlação positiva com a parasitemia ( $p=0,0587$ ,  $r=0,309$ ), e com o tempo de infecção ( $r=0,585$ ) apresentada no Gráfico 10, e negativa com a plaquetimetria mostrada no Gráfico 9 ( $r = -0,737$ ), indicam que os níveis plaquetários de GPx parecem responder a um aumento do estresse oxidativo ocorrido na infecção malárica. Isto também sugere que a GPx pode exercer um papel importante na defesa antioxidante nas plaquetas e poderia ser utilizada como um marcador deste processo. Os resultados também mostram que mecanismos plaquetários de ajuste ficam exacerbados quando ocorre diminuição na sua contagem absoluta das plaquetas e o tempo de exposição favorece o seu aumento. Contrariamente ao nosso achado, outros trabalhos como o de Sarin et al. (1993) detectaram redução de GPx nos lisados de hemácias de pacientes infectados com *P. vivax*, acompanhado de aumento da parasitemia.

A diminuição no número de plaquetas na malária pode ser causada pelo aumento nas funções plaquetárias, fagocitose plaquetária, formação insuficiente, bem como pelo estresse oxidativo gerado pelo parasito e pelo próprio organismo (KUMAR; SHASHIREKHA, 2006). Durante a progressão da doença, o organismo pode se defender da agressão mediada pelos radicais livres utilizando as reservas de antioxidantes de baixo peso molecular ou aumentando

a atividade de enzimas envolvidas nos processos de detoxificação das espécies reativas geradas, por exemplo, o aumento da atividade da GPx. O presente trabalho apresenta alguns dados inéditos como a correlação negativa entre a plaquetimetria e glutathiona peroxidase nas plaquetas e o aumento dos níveis plaquetários de GPx e MDA em pacientes plaquetopênicos com malária vivax. Também foi verificada uma forte correlação positiva entre estes dois indicadores ( $r=0,961$ ) como mostrado no Gráfico 11. Analisando conjuntamente estes resultados, ambos demonstram o aumento do estresse oxidativo e da resposta antioxidante compensatória na plaquetopenia de malária vivax.

Os achados deste estudo podem ser eventualmente extrapolados para a malária falciparum, uma vez que muitos achados estão em consonância com outros da literatura realizados com o *P. falciparum*, e também pelo fato de a malária vivax estar com características de gravidade antes só verificadas naqueles com malária falciparum. Todavia a dificuldade de cultivo deste tipo celular dificulta e limita o desenvolvimento de estudos na mesma frequência da malária falciparum.

Taoufiq el al. (2006) mostram o efeito benéfico da proteção antioxidante conferida pela suplementação de SOD1 na prevenção da citoaderência de hemácias parasitadas no tratamento da malária cerebral. A suplementação de antioxidantes pode ser uma possibilidade terapêutica no controle do desenvolvimento da infecção malárica, minimizando seus efeitos deletérios no organismo, já que como foi visto, o estresse oxidativo na malária tem conseqüências que podem ser minimizadas com uma suplementação adequada.

Para o nosso conhecimento, este trabalho pela primeira vez demonstra estes resultados os quais podem ser importantes no entendimento na etiopatogenia da malária e sua relação com o estresse oxidativo e a plaquetopenia. Estudos posteriores poderão ser realizados no sentido de entender melhor o estresse oxidativo presente nas plaquetas de pacientes com malária e plaquetopenia e a resposta antioxidante endógena presente nestes pacientes.

## 6 CONCLUSÕES

1. Os níveis plasmáticos de malondialdeído, bilirrubina e anticorpos anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa estão relacionados com a plaquetopenia nos pacientes com malária vivax;
2. Os níveis plaquetários de malondialdeído estão aumentados nos pacientes com plaquetopenia e malária vivax e se correlacionam positivamente com o tempo de infecção e a carga parasitária;
3. Níveis de glutathione peroxidase nas plaquetas estão aumentados nos pacientes com malária vivax e plaquetopenia. Sendo este aumento relacionado com o tempo de infecção;
4. As concentrações de malondialdeído e glutathione peroxidase nas plaquetas podem ser consideradas potenciais indicadores do estresse oxidativo da doença malárica e parecem ter uma forte relação com a diminuição do número de plaquetas nos pacientes com malária vivax.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

ALECRIM, M.C.G; ALECRIM W.D. Malária. In: Cimerman S e Cimerman B. *Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu, p. 105-118, 2003.

ALECRIM, M. G. C.; CARVALHO, L.M.; FERNANDES, M.C.; ANDRADE, S.D.; LOUREIRO, A.C.; ARCANJO, A.R.L.; ALECRIM, W.D. Tratamento da malária com artesunate (retocaps<sup>®</sup>) em crianças da Amazônia brasileira. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33, n. 2, mar-abr, p. 163-168, 2000.

ALEXANDRE, A. M. *Estudo clínico e epidemiológico da malária grave em pacientes atendido na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas. 2004.

ANDREW, P.J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. v. 43, p. 521-531, 1999.

ARAB, K.; STEGHENS, J.P. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal. Biochem.*, n. 325, p.158-163, 2004.

ARGUELLES, S.; GARCIA, S.; MALDONADO, M.; MACHADO, A.; AYALA, A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1674, p. 251-259, 2004.

AUGUSTO, O. *Radicais livres: bons, maus e naturais*. São Paulo: Oficina de textos, 2006.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. *Blood*, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BARTHOLOMEW, R.J.; DELANEY, A.M. Proc Austral Assoc *Clin. Biochem.*, v. 1, p. 214. 1966;

BEAUMELLE, B.D.; VIAL, H.J. Modification of the fatty acid composition of individual phospholipids and neutral lipids after infection of the simian erythrocyte by *Plasmodium knowlesi*. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 877, p. 262-270, 1986.

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

BERNARD, J.; LÉVY, J.P.; VARET, B.; CLAUVEL, J.P.; RAIN, J.D.; SAULTAN, Y. As plaquetas sanguíneas e suas anomalias quantitativas. *In: Hematologia*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, p. 189-205, 2000.

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

BILDIK, A.; KARGIN, F.; SEYREK, K.; PASA, S.; OZENSOY, O. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidant status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Res. Vet. Sc.*, v. 77, p. 63-66, 2004.

BITHELL, T.C. Plaquetas e megacariócitos. *In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. Wintrobe Hematologia Clínica*. São Paulo: Manole, p. 555-586, 1998.

BLUM, J.; FRIDOWICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 280, p. 500-508, 1995.

BOZDECH, Z; GINSBURG, H. Antioxidant in Plasmodium falciparum – data mining of the transcriptome. *Malaria J.*, n. 93, jul, p. 23, 2004.

BRÁS, R.M. Malária na região amazônica do Brasil no ano de 2005. Anais do XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Campos do Jordão; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 40 (Sup. I), p. 154, 2007.

BUFFINTON, G.D.; HUNT, N.H.; COWDEN, W.B. Detection of short chain carbonyl products of lipid peroxidation from malaria parasites (*Plasmodium vinckei*) infected red blood cells exposed to oxidative stress. *Biochem. J.*, n. 149, p. 63-68, 1988.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. Tietz. Textbook of Clinical Chemistry, 2a. Eds. Philadelphia: WB Saunders Company, 702-704, 1986.

CANDEIAS, L.P.; PATEL, K.B.; STRATFORD, M.R.; WARDMAN, P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett.*, v. 333, p. 151-153, 1993.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.*, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <[www.cdc.gov/malaria/biology/life\\_cycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm)>. Acesso em 10.nov.2005.

CHUNG, K.Y.; LEE, S.J.; CHUNG, S.M.; LEE, M.Y.; BAE, O.N.; CHUNG, J.H. Generation of free radical by interaction of iron thiols in human plasma and its possible significance. *Thrombosis Research*, n. 116, p. 157-164, 2005.

CINES, D.B.; BLANCHETTE, V.S. Immune thrombocytopenic purpura. *Eng. J. Medic.*, v. 346, n. 13, Mar 28, p. 995-1008, 2002.

CLARK, I.A.; COWDEN, W.B. Why is the pathology of falciparum worse than of vivax malaria? *Parasitol. today*, v. 15, p. 458-461, 1999.

COSTA, C. M.; SANTOS, R. C. C.; LIMA, E. S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 42, n. 5, p. 339-344, 2006.

CRABBE, G.; VAN POUCKE, M.; CANTINIEAUX, B. Artefactually-normal automated platelet counts due to malaria-infected RBC. *Clin. Lab. Haem.*, n. 24, p. 179-182, 2002.

DAMASCENO, N.R.T.; SEVANIAN, A.; APOLINÁRIO, E.; OLIVEIRA, J.M.A.; FERNANDES, I.; ABDALLA, D.S.P. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin. Biochem.*, v. 39, p.28-38, 2006.

DUNCAN, P.H.; GOCHMAN, N.; COOPER, T.; SMITH, E.; SAYZE, D. A candidate reference method for uric acid in serum. I. Optimization and evaluation. *Clin. Chem.*, v. 28, p. 284-290, 1982.

DUTRA L.R.; CANTOS, G.A.; MORAIS, E.C.; SILVA, C.S.M.; WALTRICK, C.D.; CURSINO, N.R.; BALEN, M.G.; HERMES, E.; NOLLA, A.C.; CARASEK, E. Influência do diestresse psicológico nos níveis de zinco, lipídios e outros parâmetros bioquímicos em duas diferentes populações na cidade de Florianópolis – SC- Brasil. *Rev. Bras. Anal. Clín.*, v. 37, n. 2, p. 123-128, 2005.

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

EREL, O.; KOCYIGIT, A.; BULUT, V.; AVCI, S.; AKTEPE, N. Role of lipids, lipoproteins and lipid peroxidation in thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Haematol.*, v. 29, n. 3, p. 207-212, 1998.

EREL, O.; VURAL, H.; AKSOY, N.; ASLAN, G.; ULUKANLIGIL, M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clin. Biochem.*, v. 34, p. 341-344, 2001.

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

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.*, v. 38, p. 1103-1111, 2005.

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

FERREIRA, M.S. Malária: Conceito etiologia e ciclo evolutivo. *In: VERONESI, R. Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu. p.1260-68, 1996.

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

GAMAIN, B.; ARNAUD, J.; FAVIER, A.; CAMUS, D.; DIVE, D.; SLOMIANNY, C. Increase in glutathione activity in malaria parasite after selenium supplementation. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 21, n. 4, p. 559-565, 1996.

GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; McCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, v. 165, n. 2, p. 893-901, 2001.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a toll to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 29, n. 11, p. 1106-1114, 2000.

GRIFFITHS, M.J.; NDUNGU, F.; BAIRD, K.L.; MULLER, D.P.; MARSH, K.; NEWTON, C.R. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Br. J. Haematol.*, v. 113, n. 2, p. 486-491, 2001.

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

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

HAMMERMAN, C.; GOLDSCHMIDT, D.; CAPLAN, M.S.; KAPLAN, M.; BROMIKER, R.; EIDELMAN, A.L.; GARTNER, L.M. HOCHMAN, A. Protective effect of bilirubin in ischemia-reperfusion injury in the rat intestine. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 35, n. 3, p. 344-349, 2002.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: K.B. Storey (Org.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, p. 319-368, 2004.

HOMSHER, R.; ZAK, B. Spectrophotometric investigation of sensitive complexing agents for the determination of zinc in serum. *Clin. Chem.*, v. 31, n. 8, p. 1310-1313, 1985.

HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Met. Enzymol.*, v. 223, p. 380-5, 1994.

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

KELTON, J.G.; KEYSTONE, J.; MOORE, J.; DENOMME, G.; TOZMAN, E.; GYNN, M.; NEAME, P.B.; GAULDIE, J. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. *J. Clin. Investig.*, v. 71, apr, p. 832-836, 1983.

KIRKINEROS, I.G.; MORAES, C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v. 12, p. 449-457, 2001.

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

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

LACERDA, M.V.G. *Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária*. Tese de doutorado, Universidade de Brasília. 2007.

LACERDA, M.V.G.; ALECRIM, M. G. C; ALECRIM, W. O papel das citocinas nas alterações hematológicas da malária por *P. vivax* e *P. falciparum*. In: 8<sup>a</sup>. Reunião Nacional de Pesquisa em Malária, Porto Velho. *Anais*. 2002.

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

LEE, G.R.; BITHHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. *Wintrobe Hematologia Clínica*. São Paulo: Manole, 1998. 2100p.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev. Bras. Nut. Clín.*, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

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

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

MAKKAR, R. P. S.; MUKHOPADHYAY, S. *Plasmodium Vivax* Malaria Presenting With Severe Thrombocytopenia. *Braz. J. Inf. Dis.*, v. 6, n. 5, p. 263-265, 2002.

MANN, C.K.; HOE, J.H. Spectrophotometric determination of magnesium with sodium 1-azo- 2- hidroxy-3- (2, 4-dimethylcarboxanilido) -naphthalene-1- (2-hidroxybenzene-5-sulfonate). *Anal. Chem.*, v. 28, p. 202, 1956.

MARQUES, H.O. *Alterações da hemostasia em pacientes com malária*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo, 2000.

MCPHERSON, R. A. In: HENRY, J.B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 19. ed. Manole: São Paulo, p. 237-252, 1999.

MENDIS, K.; SINA, B.J.; MARCHESINI, P.; CARTER, B. The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 64, n. 1-2 Suppl, p. 97-106, Jan-Fev. 2001.

MORELLI, D.M. Estrutura e funções das plaquetas e das células endoteliais. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P. *Hematologia Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu, p. 731-37, 2001.

MÜLLER, M; SORRELL, T.C. Oxidative stress and mobilization of arachidonic acid in stimulated human platelets: role of hydroxyl radical. *Prostaglandins*, v. 54, p. 493-510, 1997.

MÜLLER, O.; KRAWINKEL, M. Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Med Assoc. J.*, v. 173, n. 3, aug. 2, p. 279-286, 2005.

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

NAIR C.R.; GUPTA, P.H.; CHAUHAN, D.P.; VINAYAK, V.K. Peroxidative changes in erythrocytic enzymes in Plasmodium berghei induced malaria in mice. *Indian J. Med. Res.*, v. 80, p. 627-631, 1984.

NAKOMCHAI, S.; ANANTAVARA, S.; ONG, A.S.H.; PAKER, L. Editors. Oxygen free radicals in malaria. *Lipid-soluble antioxidants: biochemistry and clinical applications*. Basel: Birkhauser Verlag, p. 355-362. 1992.

NANDA, N.K.; DAS, B.S. Presence of pro-oxidants in plasma of patients suffering from falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 94, n. 6, p. 684-688, 2000.

NATHAN, C.; NOGUEIRA, N.; JUANGBHANICH, C.; ELLIS, J.; COHN, Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, v. 149, p. 1056-1068, 1979.

NICHOLAS, D.J.D.; NASON, A. Determination of nitrate and nitrite. *Met. Enzymol.*, n. 3, p. 982-984, 1957.

NOOR, R.; MITTAL, S.; IQBAL, J. Superoxide desmutase – applications and relevance to human diseases. *Med. Sci. Monit*, v. 8, n. 9, p. 210-215, 2002.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, J.A.; SEVANIAN, A.; RODRIGUES, R.J.; APOLINÁRIO, E.; ABDALLA, D.S.P. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin. Biochem.*, v. 39, p.708-714, 2006.

OLIVEIRA, K.J.F.; KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Micronutrientes e capacidade antioxidante em adolescentes sedentários e corredores. *Rev. Nutr.*, v. 20, n. 2, p. 171-179, 2007.

OMODEO-SALE, F.; MONTI, D.; OLLIARO, P.; TARAMELLI, D. Prooxidant activity of beta-haematin (synthetic malaria pigment) in arachidonic acid micelles and phospholipid large unilamellar vesicles. *Biochem. Pharmacol.*, v. 61, n. 8, p. 999-1009, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Severe falciparum malaria. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 94 Suppl 1, p. S1-90, Abr. 2000.

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

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PAL, B.K.; KULKARNI, S.; BHANDARI, Y.; GANESH, B.B.; GOSWAMI, K.; REDDY, M.U.R. Lymphatic filariasis: possible pathophysiological nexus with oxidative stress. *Trans. Royal society of Trop. Med and Hyg.* V. 100, n. 7, p. 650-655, 2006.

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

PITNEY, W.R. Haemostasis. *IN: HOFFBRAND, A.V.; LEWIS, S.M. Haematol.* Ed William Heinemann Medical Books LTD London, p. 566-612, 1972.

PORTIEJE, J.E.A.; WESTENDORP, R.G.J.; KLUIN-NELEMANS, H.C.; BRAND, A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, v. 97, n. 9, May 1, p. 2549-2554, 2001.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA MALÁRIA – PNCM / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil. 2ª. Ed. 2004. 28p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. Cap. 11. 2001.

RAPOSO, C.C.B.S.; GONÇALVES, E.G.R.; SANTOS, J.B.; MATOS, W.B.; OLIVEIRA, T.K.M.; SILVA, A.R. Malária vivax grave no Estado do Maranhão: série de casos. Anais do XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Campos do Jordão; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 40 (Sup. I), p. 149, 2007.

RAY, G.; KUMAR, V.; KAPOOR, A.V.; DUTRA, A.; BATRA, S. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. *J. Trop. Pediatr*, v. 45, p. 4-7, 1999.

REED, G.L. *Platelet secretion*. In: Platelets. MICHELSON, A.D. Academic press: San Diego, California. Cap. 11. p. 956, 2002.

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

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; SÁNCHEZ, E.; VARGAS, M.; PICCOLO, C.; COLINA, R.; ARRIA, M.; FRANCO-PAREDES, C. Occurrence of thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. *Clín. Inf. Diseas.*, v. 41, p. 130-131, 2005.

ROLL BACK MALARIA. Global distribution of malaria transmission risk. Disponível em: <<http://rbm.who.int/whr2005/html/map1.htm>>. Acesso em 8.jun.2007.

SANTANA, M.S. & ALECRIM, W.D. Metemoglobinemia e hemólise aguda após administração de primaquina. Anais do XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Campos do Jordão; **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, n. 40 (Sup. I), p. 144, 2007.

SANTOS, P.D. *Correlação entre os níveis séricos de Intermediários Reativos do Nitrogênio (INR) e malária em pacientes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT/IMT-AM)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, 2000.

SARAIVA, M.G.G.; QUEIROZ, J.M.T.; AMORIM, R.D.S. Situação da malária no município de Manaus. Anais do XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Campos do Jordão; **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, n. 40 (Sup. I), p. 150, 2007.

SARIN, K.; KUMAR, A.; PRAKASH, A.; SHARM, A. Oxidative stress and antioxidant defence mechanism in *Plasmodium vivax* malaria before and after chloroquine treatment. **Indian J. Malaria**, sep, v. 30, n. 3, p. 127-133, 1993.

SAYED, A.A.; COOK, S.K.; WILLIAMS, D.L. Redox balance mechanisms in schistosoma mansoni rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 25, p. 17001-17010, 2006.

SCOTT, C.S.; VAN ZYL, D.; HO, E.; RUIVO, L.; MENDELOW, B.; COETZER, T.L. Thrombocytopenia in patients with malaria: automated analysis of optical platelet counts and platelet clumps with the Cell Dyn CD4000 analyser. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 24, p. 295-302, 2002.

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

SIES, H. Oxidative stress. **Encyclopedia of stress 3**. Fink, G eds. Academic, San Diego, 102-105p, 2000.

SILVA, M.C.M.; SANTOS, E.B.; COSTA, E.G.; FILHO, M.G.S.; GUERREIRO, J.F.; PÓVOA, M.M. Alterações clínico-laboratoriais em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase tratados com 0,50mg/kg/dia de primaquina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 3, 2004.

SIMS, F.H.; HORN, C. Some observations powell's method for the determination of serum bilirubin. **Am. J. Clin. Path.**, v. 29, p. 412-417, 1958.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Mol. Biochem. Parasitol.**, n. 58, p.283-292, 1993a.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; ZHU, X.P.; JARRA, W.; PINHEIRO, L.; ROSARIO, V.E.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol. Biochem. Parasitol.**, n.61, p.315-320,1993b.

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

SUH, K.N.; KAIN, K.C.; KEYSTONE, J.S. Malária. *Can. Med. Assoc. J.*, v. 170, n. 11, May 25, p. 1693-1702, 2004.

TAOUFIQ, Z.; PINO, P.; DUGAS, N.; CONTI, M.; TELIF, M.; MAZIER, D.; VOULDOUKIS, I. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 150, n. 2, p. 166-173, 2006.

TOLER, S. The apicoplasto was retained under evolutionary selective pressure to assuage blood stage oxidative stress. *Med. Hypotheses.*, v. 65, n. 4, p. 583-690, 2005.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.*, v. 25, p. 211-220, 2004.

VENTURA, D.F.; SILVEIRA, L.C.L.; NISHI, M.; COSTA, M.F.; GUALTIERI, M.; SANTOS, R.M.A.; PINTO, C.T.; MOURA, A.L.A.; RODRIGUES, A.R.; SAKURADA, C.; SAUMA, M.F.L.C.; SOUZA, J.M. Color vision loss in patients treated with chloroquine. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v. 66, n. 5 sup, p. 9-15, 2003.

VISCA, P.; FABOZZI, G.; MHANI, M.; BOLOGNESI, M.; ASCENZI, P. Nitric oxide mycobacterium leprae pathogenicity. *IUBMB life*, v. 54, n. 3, p. 96-9, 2002.

WATSON, S.P.; AUTHI, K.S. *Platelets – A Practical Approach*. Oxford University Press, 1996. 370p.

WEIR, E. Malaria update. *Can. Med. Assoc. J.*, v. 174, n. 4, p. 473, 2005.

WICKRAMASINGHE, S.N.; ABDALLA, S.H. Blood and bone marrow changes in malaria. *Best Prac. Res. Clin. Haem.*, v. 13, n. 2, p. 277-299, Jun. 2000.

WIID, I.; SEAMAN, T.; HOAL, E.G.; BENADE, A.J., VAN HELDEN, P.D. Total antioxidant levels are low during active TB and rise with antituberculosis therapy. *IUBMB life*, v. 56, n. 2, p.101-6, 2004.

WINTERBOURN, C.C; VISSERS, M.C.; KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.*, v. 7, p. 53-58, 2000.

WOZENCRAFT, A.O. Damage to malaria infected erythrocytes following exposure to oxidant-generating systems. *Parasitol.*, v. 92, p. 559-567, 1986.

YAZAR, S; KILIC, E; SARAYMEN, R; OZBILGE, H. Serum malondialdehyde levels in patiens infected with Plasmodium vivax. *West Indian Med. J.*, v. 53, n. 3, p. 147-149, 2004.

YESILKAYA, A.; ALTINAYAK, R.; KORGUN, D.K. the antioxidant effect of free bilirubin on cumene-hydroperoxide treated human leucocytes. *Gen. Pharmacol.*, n. 35, v. 1, p. 17-20, 2000.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)