

MARCO ANDREY PEPATO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, DANO GENOTÓXICO E
APOPTOSE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES
PORTADORES DE MALÁRIA CAUSADA PELO *Plasmodium vivax***

Universidade Federal de Mato Grosso

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação

Mestrado em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais

CUIABÁ – MT

2012

Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciências da Saúde
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, DANO GENOTÓXICO E
APOPTOSE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES
PORTADORES DE MALÁRIA CAUSADA PELO *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito final para obtenção do grau de **Mestre em Ciências da Saúde**, Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais.

Orientadora: Profª Drª Carmen Lúcia Bassi Branco

Cuiabá – MT

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte

P428a Pepato, Marco Andrey.

Avaliação do estresse oxidativo, dano genotóxico e apoptose em células mononucleares de pacientes portadores de malária causada pelo *plasmodium vivax* / Marco Andrey Pepato. -- 2012.

118 f. ; 30 cm : il. algumas color. (incluem figuras e tabelas)

Orientadora: Carmen Lúcia Bassi Branco

Catalogação na fonte: Maurício S.de Oliveira CRB/1-1860.

UFMT
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Reitora

Dr. Maria Lúcia Cavalli Neder

Vice-Reitor

Prof. Dr. Francisco José Dutra Souto

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Dra. Leny Caselli Anzai

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador

Prof. Dr. Amilcar Sabino Damazo

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA:

“Aos meus pais, pelo presente da minha vida e pelos primeiros ensinamentos em direção ao conhecimento fundamentado no progresso intelecto-moral;

Àqueles que anonimamente contribuem para o progresso da ciência através do trabalho persistente e incansável;

À minha querida esposa, Rita de Cássia Campos Pepato, exemplo de amor e fidelidade, companheira e incentivadora para realização desse projeto. Agradeço a Deus por ter te conhecido e me colocado em seu caminho;

À minha família, através do qual realizo o meu aprendizado e que é meu grande alicerce;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Carmen Lúcia Bassi Branco, pelos ensinamentos, paciência, compreensão e oportunidade;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho que possibilitou obter mais detidamente o conhecimento sobre a doença, cuja diferença reside em salvar vidas”.

AGRADECIMENTOS

Ao criador de todo o Universo e todas as coisas, DEUS nosso Pai. Por estender sempre suas bênçãos concedidas. Fé, coragem, determinação, amor, saúde perseverança, vida, luz do meu caminho.

As pessoas mais importantes da minha vida, meus pais (Alcides Pepato (*in memoriam*) e Maria Neusa Volve Pepato) pelos valores que me ensinaram, pelo esforço de sempre lutarem para os filhos conseguirem alcançar os objetivos, doação, incentivo, dedicação, confiança, respeito e amor que é o grande alicerce que sustenta nossa maravilhosa família.

A minha esposa Rita de Cássia Costa Campos Pepato, pelo, amor, compreensão, paciência nas horas difíceis, pela ajuda no dia a dia e o incentivo incondicional.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Carmen Lucia Bassi Branco, pelos ensinamentos, carinho, amizade, paciência, compreensão, oportunidades e abertura de novos horizontes, permitindo não apenas nossa transformação intelectual, como também, a nossa elevação profissional e pessoal.

À UFMT (FM/ UFMT), pela oportunidade de conceder a Pós-Graduação e o Mestrado em Ciências da Saúde.

Ao Prof. Dr. Amílcar Sabino Damazo, coordenador da Pós-Graduação, pelo esforço em fazer crescer a pós-graduação e gentilezas prestadas.

À secretária Keylla Okada da Coordenação da Pós Graduação da FM/UFMT, pela presteza e dedicação.

Ao Prof. Dr. Cor Jesus Fontes, pelo apoio e contribuição para realização deste trabalho.

Aos professores, Dr^a Bianca Borsatto Galera e Dr. Amílcar Sabino Damazo pela presteza e colaboração na realização da análise microscópica das células apoptóticas.

A todos os professores:

Prof^o Dr. Cor Jésus Fernandes Fontes, Dr. Francisco José Dutra Souto, Dr^a Denise Bergamachi, Dr^a Carmen Lucia Bassi, Dr^a Bianca Borsatto Galera, Dr. Amílcar Sabino Damazo e todos os outros professores que iluminaram nossos caminhos com as sementes do conhecimento e da experiência.

Ao diretor do Hospital Universitário Júlio Muller, Dr. Elias Nogueira, pelo incentivo e liberação para a qualificação profissional, e ainda permitiu a realização deste projeto.

Todos os técnicos do Ambulatório III do HUJM, Laboratório de Investigação/UFMT e Laboratório de Histologia/UFMT, o meu reconhecimento e carinho de que não caminhei sozinho para conseguir alcançar esse sonho.

Agradecimento especial à técnica, Maria Celina, pela dedicação, apoio, competência, presteza, responsabilidade e participação neste trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do HUJM, pelo esforço e dedicação para a minha ausência neste período. Em especial a amiga, Silvana Salomão Cury Veloso, pela oportunidade, incentivo e colaboração.

As colegas do ambulatório III do HUJM, Maria da Guia e Márcia (Núcleo de Vigilância epidemiológica) que proporcionaram a informações dos pacientes.

A todos os funcionários do CEPEM/RO, em especial à Joana, Francisco, Tony e Dr. Mauro, pelo apoio na coleta de amostras que foi fundamental para realização deste trabalho.

Todos os colegas: Daniele, Renato, Letícia, Naiana, Samantha, Luciano, Fabio, Eduardo e Thamires, pelo apoio, amizade, respeito, confiança e pela experiência trocada, que na qual convivi e partilhei muitos momentos...

Às amigas, Marilene Borges e Regiane Festi, pela ajuda técnica e convivência agradável, meu carinho e gratidão.

A todas as pessoas que aceitaram a fazer parte deste estudo, cedendo suas amostras, o meu muito obrigado.

A todos os colaboradores na realização deste projeto, meu carinho e gratidão.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

1	<i>Introdução</i>	20
1.1	Malária	20
1.2	Estresse oxidativo e malária.	23
1.3	Dano celular, apoptose e malária.	27
2	<i>Objetivo</i>	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivo específico:	30
3	<i>Material e Métodos</i>	31
3.1	Amostras pacientes e controles	31
3.2	Determinação dos parâmetros hematológicos	32
3.3	Avaliação de genotoxicidade (Ensaio Cometa)	32
3.4	Deteção da Apoptose	36
3.4.1	Obtenção da suspensão de células mononucleares.....	36
3.4.2	Ensaio Microscópico - Caspase-3.....	38
3.4.3	Controle negativo e positivo.	39
3.5	Avaliação do estresse oxidativo	41
3.5.1	Dosagem da glutathiona peroxidase (GPx).....	41
3.5.2	Dosagem da superóxido dismutase (SOD)	42
3.5.3	Dosagem do Malondialdeído (MDA)	45

3.6	Análise estatística.....	46
4	Resultados	47
4.1	Características gerais dos indivíduos.....	47
4.2	Estresse oxidativo	52
4.2.1	Malondialdeído – MDA.....	52
4.2.2	Atividade da enzima - Glutathione peroxidase (GPx).....	57
4.2.3	Atividade da superóxido dismutase (SOD) (U/g Hb).....	60
4.3	Dano no DNA.....	66
4.4	Apoptose.....	70
5	Discussão.....	77
6	Conclusão.....	86
7	Referências	87
8	Anexos.....	97

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µL – microlitro

µM – micromolar

α – Alfa

% – Porcentagem

8-OH-G – 8-hidroxi guanina

A. albitarsis – *Anopheles albitarsis*

A. aqualasis – *Anopheles aqualasis*

A. bellator – *Anopheles bellator*

A. cruzii – *Anopheles cruzii*

A. darlingi – *Anopheles darlingi*

AIF – Apoptosis inducing factor

ANOVA – Analysis of variance

Apaf-1 – Apoptotic protease activating factor-1

APO-1 – Apoptosis antigen-1

BER – Base excision repair

CAT – Catalase

cc – Centímetro cúbico

CD4⁺ T - Linfócitos T citotóxicos

CD8⁺ T – Linfócitos T citotóxicos

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CEPEM – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

DAPI – 4'-6' diamino -2-phenylidole

dL – Decilitro

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

DSB – Double Strand Break

EDTA – Etileno diamino tetraacético

EP – Erro padrão

Fas-L – Fas-ligand

Fe – Ferro

FITC – Fluorescein isothiocyanate

FM – Faculdade de Medicina

FP – Ferroprotoporfirina

g – Grama

g/Hb – Grama de hemoglobina

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione oxidase

H⁺ – Hidrogênio

H₂ClO₄ – Ácido perclórico

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Hb – Hemoglobina

HCL – Ácido Clorídrico

HIV – Human Immunodeficiency Virus

HTLV – Human T - Linfotropic Virus

HUJM – Hospital Universitário Julio Muller

I.N.T. – 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de fenitetrazol

IAPs – Inhibitors of Apoptosis Proteins

IFN- γ – Interferon gama

KH_2PO_4 – Fosfato dibásico de Potássio

L – Litro

LMP – Low melting point

M – Molar

mA – Miliamperes

MDA – Malondialdeído

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm^3 – Milímetro cúbico

NaCl – Cloreto de Sódio

NADP^+ – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NaOH – Hidróxido de Sódio

NER – Nucleotide excision repair

NMP – Normal melting point

Nº - Número

NO – Oxido Nítrico

O_2^- – Ânion superóxido

O_2 – Oxigênio

OH⁻ – Radical Hidroxila

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

P. malariae – *Plasmodium malariae*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

P. vivax – *Plasmodium vivax*

PA – Analito puro

PBS – Buffer fosfate saline

pH – Potencial de hidrogênio

PPGCS – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

RO – Radical alcoxila

RO – Rondônia

RO₂ – Radical peroxila

ROS – Reactive oxygen species

RPM – Rotação por minuto

Smac/Diablo – Second mitochondrial activator of caspase/IAP-Binding Protein Directly with low PI

SOD – Superóxido dismutase

SSB – Simple strand break

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TM – Tail moment

TNF – Tumor necrosis factor

TNFR1 – Tumor necrosis factor receptor 1

TRAIL – Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing-ligant

TRAIL-R1 – Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing-ligant Receptor 1

U – Unidade

UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso

V – Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Nucleóides com ausência de dano no DNA.....	35
Figura 2 - Nucleóides com presença de dano no DNA.....	35
Figura 3 - Células não apoptóticas (corada em azul) e células apoptóticas (corada em azul esverdeado).....	39
Figura 4 - Célula apoptótica (corada em verde) com presença de corpos apoptóticos.....	39
Figura 5 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> e controles.....	52
Figura 6 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação à classificação da doença em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	54
Figura 7 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação a apoptose em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	56
Figura 8 - Concentração do MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação à atividade de SOD (U/g Hb) em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	57
Figura 9 - Atividade da GPx (U/L) em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> e controles.....	57
Figura 10 - Atividade da SOD (U/g Hb) em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> e controles.....	60
Figura 11 - Atividade da SOD (U/g Hb) em relação à idade dos pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	61
Figura 12 - Atividade da SOD (U/g Hb) em relação ao nº de dias com sintomas em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	63
Figura 13 . Atividade de SOD (U/g Hb) em relação à temperatura axilar em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	64
Figura 14 - Dano ao DNA "Tail moment-TM" de pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> e controles.....	66
Figura 15 - Dano no DNA (TM) em relação à classificação da doença em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	68

Figura 16 - Dano ao DNA (TM) em relação a apoptose em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	70
Figura 17 - Frequência de apoptose em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> e controles.....	71
Figura 18 - Frequência de apoptose em relação a parasitemia em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	73
Figura 19 - Frequência de apoptose em relação à classificação da doença em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	74
Figura 20 - Frequência de apoptose em relação à temperatura axilar em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das características gerais dos indivíduos segundo sexo, idade, etnia, hábito tabagista e consumo de álcool.....	48
Tabela 2 - Parâmetros hematológicos dos pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> e controles	49
Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	51
Tabela 4 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool	53
Tabela 5 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	55
Tabela 6 - Atividade da GPx (U/L) segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool.....	58
Tabela 7 - Atividade da GPx (U/L) em células de pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> segundo as características clínicas da doença	59
Tabela 8 - Atividade da SOD (U/g Hb) segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool.....	62
Tabela 9 - Atividade da SOD (U/g Hb) segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	65
Tabela 10 - Dano no DNA dos pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> , segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo alcoólico	67
Tabela 11 - Dano no DNA (TM) segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	69
Tabela 12 - Frequência de apoptose segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool.	72
Tabela 13 - Apoptose segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	76

RESUMO

A malária é uma das principais doenças infecciosas que afligem a humanidade e é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública do mundo. A malária causada pelo *Plasmodium vivax* é uma doença endêmica na Região Amazônica e é responsável por mais de 80% dos casos aí registrados. A infecção pelo *Plasmodium* é acompanhada por grande aumento do estresse oxidativo, resultado da produção das espécies reativa do oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*). As ROS são agentes causadoras de dano em macromoléculas, como o DNA, o que pode ter como consequência a indução de apoptose. O presente estudo teve como objetivo avaliar o nível de dano no DNA, bem como a frequência de apoptose, atividade de enzimas antioxidantes e marcador de estresse oxidativo em amostras de sangue periférico de indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* e controles normais. Amostras de 80 pacientes e 76 controles foram coletadas e submetidas ao ensaio cometa para avaliar danos no DNA, tendo como parâmetro o “tail moment” (TM). A detecção de apoptose (atividade da caspase 3) e a atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) foram realizadas utilizando-se kits comerciais. O marcador de estresse oxidativo (Malondialdeído – MDA) foi detectado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Os resultados obtidos demonstram que células mononucleares dos pacientes apresentaram maior nível de danos no DNA (TM= 26,71) em comparação com os controles (TM=10,05) ($p < 0,0001$). A frequência de células apoptóticas nos pacientes (39,3 %) também foi significativamente maior ($p < 0,0001$) do que a observada nos controles (21,6%), bem como a concentração do MDA (2,48 $\mu\text{M/L}$ e 1,93 $\mu\text{M/L}$, respectivamente). Embora não tenha havido diferenças com relação à SOD, a atividade enzimática da GPx nos pacientes (média= 7666,9 U/L) foi significativamente maior ($p = 0,0005$) em comparação aos controles (média= 6386,6 U/L). Não houve correlação significativa entre dano no DNA e SOD, GPx e MDA. Porém, houve correlação negativa ($r = -0,30$, $p = 0,006$) entre o dano no DNA e a apoptose e entre o MDA e a apoptose ($r = -0,34$, $p = 0,001$). Os resultados demonstram que o estresse oxidativo aumenta durante a infecção e que este pode ter efeitos genotóxicos e citotóxicos significativos sobre as células mononucleares dos pacientes.

PALAVRAS CHAVE: Malária, Estresse oxidativo, Dano no DNA.

ABSTRACT

Malaria is one of the major infectious diseases that plague mankind and is considered one of the most important public health problems in the world. Malaria vivax is an endemic disease in Amazon region, corresponding to more than 80% of registered cases. The infection increases the production of reactive oxygen species (ROS), a harmful agent to macromolecules such as DNA, which may lead cells to apoptosis induction. The aim of this study was to evaluate the basal level of DNA damage, as well as apoptosis frequency, antioxidant enzymes activity and the presence of an oxidative stress marker in samples of periphery blood of patients infected with *Plasmodium vivax* and healthy controls. Samples of 80 patients and 76 controls were submitted to the comet assay to evaluate genotoxicity, having tail moment as a parameter. Apoptosis (measured by caspase 3 activity) and the activity of glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) enzymes were performed using commercial kits. Malondialdehyde (MDA) was detected by thiobarbituric acid reaction (TBA). The results showed that mononuclear cells of malaria patients presented higher levels of basal DNA damage (TM=26,71) when compared to controls (TM=10,05) ($p < 0,0001$). The frequency of apoptotic cells also was significantly increased ($p < 0,0001$) in patients (39,3 %) in comparison to controls (21,6%), as well as of MDA levels (2,48 μM e 1,93 μM , respectively). There was no difference between both groups in relationship to SOD activity; however, GPx activity was significantly higher ($p = 0,0005$) in patients (7666,9 U/L) when compared to controls (6386,6 U/L). There was no significant correlation between DNA damage and SOD, GPx and MDA; however, there was a significant negative correlation between DNA damage and apoptosis ($r = -0,30$, $p = 0,006$) and between MDA and apoptosis ($r = -0,34$, $p = 0,001$). The results demonstrate that malaria vivax infection increases the oxidative stress, which has significative genotoxic and cytotoxic effects on mononuclear cells of malaria patients.

KEYWORDS: Malaria, Oxidative stress, DNA damage.

1 Introdução

1.1 Malária

A malária é uma das principais doenças infecciosas que afligem a humanidade, e é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública do mundo (WHO, 2007).

A ocorrência da malária aponta para a persistência da doença, principalmente em países pobres das Regiões Tropicais e Subtropicais, onde está presente em quase 50% da população. Anualmente, registram-se cerca de 300 a 500 milhões de casos novos que acarretam 1,5 a 2,7 milhões de mortes a nível mundial, sendo que 90% ocorrem no Sahara tropical. Cerca de dois terços dos casos restantes ocorrem fora da África em apenas três países: Brasil, Índia e Sri Lanka (WHO, 2007).

No Brasil, em 2009, aproximadamente 99,8% dos casos de malária registrados se concentraram nos estados da região amazônica: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Maranhão e Tocantins. Mato Grosso responde por aproximadamente 1,1% dos mesmos (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

O agente etiológico da malária é um protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo que as quatro espécies mais comuns que causam a malária em seres humanos são: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*, (esta última não é encontrada no Brasil) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Recentemente, uma quinta espécie, *Plasmodium knowlesi*, foi confirmada como agente etiológico de casos graves da doença em humanos (JONGWUTIWES *et al.*, 2004). Enquanto mundialmente o *P. vivax* e *P. falciparum* são responsáveis por 95% das infecções, no Brasil, em 2011, 87,5% dos casos são provocados pelo *P. vivax* (GARCIA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

O ser humano é o único reservatório de importância epidemiológica para a malária. O vetor da malária é o mosquito pertencente à ordem dos dípteros, da família *Culicidae* e do

gênero *Anopheles*, para o qual existem mais de 2500 espécies descritas em todo mundo. As principais espécies dos vetores no Brasil são: *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. bellator*, *A. cruzii* e *A. darlingi*, sendo que esta última espécie se destaca na transmissão da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO, 2007).

A infecção da malária ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles*, através de sua picada, inocula os esporozoítos de suas glândulas salivares na corrente sanguínea do homem. Os esporozoítos migram rapidamente para o fígado, invadindo os hepatócitos, iniciando o ciclo pré-eritrocítico ou tecidual. Nos hepatócitos, os esporozoítos podem permanecer por períodos que variam de uma semana a meses. As formas não latentes sofrem transformação morfológica para a forma haplóide (merozoítos), que então rompem os hepatócitos e são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos, dando o início ao ciclo eritrocítico. Durante a fase tecidual, alguns esporozoítos das espécies, *P. vivax* e *P. ovale*, podem apresentar desenvolvimento lento, formando os hipnozoítos, que são as formas latentes (dormentes) do parasito responsáveis pelas recaídas da doença meses ou anos após a infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; GARCIA, 2010; SADANAND, 2010).

No ciclo eritrocítico, os merozoítos evoluem para trofozoítos e iniciam a fase assexual com a formação do esquizonte que, por sua vez, libera novos merozoítos, os quais invadem novos eritrócitos, iniciando assim outro ciclo eritrocítico. A ruptura e conseqüente liberação de parasitos na corrente sanguínea e a invasão de novas células traduz-se clinicamente pelo início dos sintomas clássico da malária, o paroxismo malárico. Alguns merozoítos também podem se diferenciar em gametócitos (machos e fêmeas). Se ingeridos pelo *Anopheles*, esses gametas sofrem maturação em seu estômago e se fundem, formando o zigoto. Este se transforma na forma móvel (oocineto), que migra para a parede do intestino do inseto formando o oocisto. O oocisto se desenvolve em esporozoítos, que são liberados na hemolinfa e migram para as glândulas salivares dos insetos. A inoculação desses esporozoítos em um

novo hospedeiro humano proporciona a continuidade do ciclo da malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; GARCIA, 2010; SADANAND, 2010).

A resposta do sistema imune do hospedeiro na infecção da malária é estabelecida pela participação do complexo de histocompatibilidade. Na fase pré-eritrocítica, as células efetoras CD8⁺ T (linfócitos T citotóxicos) estabelecem a imunidade protetiva, tanto na resposta celular como na humoral. A função efetora dessa célula está associada à produção de citocinas, como o interferon γ (IFN- γ) ou fator de necrose tumoral α (TNF- α), que medeiam a eliminação do parasita através da via do óxido nítrico (NO) ou produzindo atividade citolítica nos hepatócitos. No estágio eritrocítico, a resposta humoral/celular mediada pelos linfócitos T auxiliares (T helper) e monócitos/macrófagos é essencial para a eliminação do parasita. O envolvimento de subpopulações de células T CD4⁺ (Th1 e Th2) está diretamente envolvido na produção de interferon (IFN)- γ , de citocinas, de radicais de oxigênio e nitrogênio pela ativação dos macrófagos, sendo, assim, de suma importância para o controle da infecção (LANGHORNE, 2005).

Além de desempenhar um importante papel na defesa antiparasitária, as células T também podem contribuir para a sintomatologia associada à malária. As células T podem surgir tanto em resposta aos antígenos plasmodiais quanto por estímulos anteriores à infecção. Modificações esplênicas permitem que essas células se concentrem no baço, facilitando as interações celulares para promover a morte do parasita por fagocitose, pela liberação de radicais do oxigênio e NO e ainda por outros fatores envolvendo os neutrófilos e macrófagos (GOOD & CURRIER, 1992; GOOD *et al.*, 1993; GOOD, 1994). Alguns tecidos podem não ser apropriados para a destruição dos parasitas e a localização de células T nestes tecidos, bem como liberação de citocinas podem contribuir para a imunopatologia e a forma grave da doença (LANGHORNE, 2005).

Na infecção por *Plasmodium vivax* as complicações graves são raras, embora morte súbita e coma ou outros sintomas como: comprometimento cerebral, insuficiência renal, colapso circulatório, anemia grave, hemoglobinúria, sangramento, síndrome do distúrbio respiratório agudo e icterícia têm sido relatadas (GARCIA, 2010).

A imunidade protetora inclui mecanismos inatos inespecíficos. Esta forma de imunidade é de aquisição lenta, requer estímulos antigênicos constantes (picadas sucessivas), é lábil (na medida em que desaparece se cessarem estes estímulos), parcial (dada a persistência de parasitemia e sintomatologia) e vulnerável a mudanças no sistema imune do hospedeiro (grávidas podem perdê-la). Os vários estágios da imunidade conduzem a resistência adquirida à malária cerebral, a imunidade clínica, e, após um longo tempo de exposição em áreas hiper e holoendêmicas, levam ao equilíbrio parasita-hospedeiro, característico da “premunição” (LANGHORNE, 2005).

Em relação à malária por *P. vivax*, à imunidade clínica adquirida pelos indivíduos residentes em áreas endêmicas parece estar relacionada com a inibição da produção do TNF- α por células mononucleares periféricas, em resposta a exoantígenos liberados na ruptura de esquizontes. Um dos prováveis mecanismos de proteção seria a neutralização destes exoantígenos parasitários, já que foi observado que soro de indivíduos semi-imunes convalescentes bloqueia a indução de TNF- α (LANGHORNE, 2005).

1.2 Estresse oxidativo e malária

O estresse oxidativo tem sido definido como um desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes, sendo as espécies reativa do oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) o mais importante pró-oxidante (PABON *et al.*, 2003).

ROS é um termo coletivo para descrever os radicais livres: anion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$), radicais peroxila (RO_2) e radicais alcóxila (RO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), embora este não seja derivado das espécies do oxigênio (CIRCU & AW, 2010). Radical livre é definido como uma espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados (CASTRO & FREEMAN, 2001).

A produção de ROS, entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. A mitocôndria é a maior fonte intracelular dessas moléculas, sendo que 1-2% do oxigênio consumido é desviado para a formação desses radicais livres. Porém, existem várias fontes externas na formação de ROS, tais como raios ultravioletas, radiações ionizantes, quimioterápicos e xenobióticos (VASCONCELOS *et al.*, 2007; CIRCU & AW, 2010).

As ROS têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Os níveis intracelulares das ROS são mantidos baixos por um número de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (MULLER, 2004). Os antioxidantes enzimáticos são representados principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 ; pela catalase (CAT), que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O ; e pela glutathione peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator. O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathione (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina

(transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina) (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A infecção pelo *Plasmodium* é acompanhada por grande aumento do estresse oxidativo, resultado da produção de ROS. Essa produção ocorre por dois mecanismos separados: o primeiro envolve a degradação da hemoglobina do hospedeiro pelo parasita intracelular, com a oxidação do Fe^{+2} na forma Fe^{+3} após a separação da heme da globina, produzindo elétrons que reagem com o oxigênio molecular para a formação das ROS. O segundo mecanismo é resultado da ativação da resposta imune do hospedeiro, pela produção de citocinas ($\text{TNF-}\alpha$ e $\text{INF-}\gamma$) que leva a ativação dos fagócitos e produção ROS. Além disso, a infecção resulta na diminuição das enzimas antioxidantes e de substâncias como a CAT, GPx, SOD, albumina, GSH, ascorbato e tacaferol (PABON *et al.*, 2003).

O aumento na produção de ROS está associado, por sua vez, com uma maior rapidez na eliminação do parasito em pacientes, indicando que este evento exerce um papel essencial na primeira linha de defesa contra o *Plasmodium falciparum* (GREVE & KREMSNER, 2000). Merozoítos de *P. falciparum* e seus antígenos solúveis podem ativar neutrófilos e monócitos *in vitro*, resultando na produção de ROS por essas células (KHARAZMI *et al.*, 1987). A maior fonte de ROS na infecção por *P. falciparum* é proveniente da digestão da hemoglobina da célula do hospedeiro com a formação de anions superóxidos que sofrem a ação da SOD, levando a formação de radicais hidroxil ($\text{OH}^\cdot$). Esses radicais são formados também na presença de ferro livre pela reação de Fenton (MULLER, 2004).

Evidências demonstram que a produção excessiva de ROS leva a um desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes e essa condição favorece a ocorrência de ataques dessas espécies reativas aos componentes celulares, especialmente a macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos (MULLER, 2004). Na infecção malárica, a elevação de ROS pode danificar também os tecidos do hospedeiro e exercer um papel significativo na morbidade da

doença. A alteração do metabolismo redox em nível da célula do hospedeiro (especialmente células endoteliais) pode contribuir para as manifestações da doença, e o aumento do estresse oxidativo sobre os eritrócitos contribui para a hemólise e desenvolvimento da anemia (BECKER *et al.*, 2004). Espécies reativas do oxigênio que não são eliminadas causam a imunopatologia da malária e também levam ao dano no DNA que, quando não reparado ou reparado incorretamente podem induzir a ativação de oncogenes e eventualmente levar ao câncer (EZE *et al.*, 1990).

Indicadores de estresse oxidativo, especificamente da peroxidação de lipídios, como o malondialdeído (MDA), estão aumentados em amostras de sangue de pacientes trombocitopênicos infectados com *P. vivax*, demonstrando que as ROS exercem importante papel nas alterações funcionais e estruturais das plaquetas e no mecanismo da trombocitopenia da malária (ARAUJO *et al.*, 2008).

A interação do TNF- α com outras citocinas e os efeitos da produção de ROS sobre a peroxidases das membranas celulares podem contribuir para a patogenicidade da malária cerebral pelo o aumento da permeabilidade vascular. Níveis elevados de MDA indicando peroxidação lipídica foram confirmados em casos fatais de malária cerebral (PABON *et al.*, 2003). Crianças com malária grave (*P. falciparum*) apresentando altos índices de parasitemia e anemia tem níveis elevados de ROS em comparação com o grupo controle, sugerindo que o estresse oxidativo pode estar envolvido tanto na diseritropoiese quanto no dano dos eritrócitos parasitados e não-parasitados, conduzindo à anemia (GREVE & KREMSNER, 2000). Outras manifestações da doença como distúrbios respiratórios e malária placentária, têm sido relacionadas com as alterações no estado redox (BECKER *et al.*, 2004).

1.3 Dano celular, apoptose e malária

A presença de estresse oxidativo leva a danos nas macromoléculas celulares e promove a morte celular (CIRCU & AW, 2010).

De todos os alvos celulares para o dano oxidativo, o mais vulnerável é o DNA, já que este não pode ser simplesmente repostado, como proteínas e lipídios. A oxidação do DNA em células humanas ocorre em consequência dos ataques das ROS que são produzidos de diversas fontes, entre elas a respiração celular e a defesa realizada pelos leucócitos contra os patógenos (GEDIK *et al.*, 2002). Das ROS o radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$) é o mais reativo, sendo que interage com o DNA por adição da ligação dupla das bases do DNA e por subtração de um átomo de hidrogênio (H^+) do grupo metil da timina (COOKE *et al.*, 2003).

O ataque dos radicais $\text{OH}^\cdot$ ao DNA resulta em quebras em fita simples e dupla (SSBs, *simple strand break* e DSBs, *double strand break*), geração de sítios abásicos, lesões nas bases e açúcar. Dentre as lesões de bases produzidas uma das mais abundantes é a 8-hidroxi guanina (8-OH-G), embora várias outras sejam produzidas (COOKE *et al.*, 2003).

A remoção dessas lesões é certamente importante para limitar o acúmulo de mutações e a ação citostática e citotóxica da célula. As lesões de bases oxidadas no DNA são removidas essencialmente por dois tipos de mecanismo de reparo: o reparo por excisão de bases (BER, *base excision repair*), que envolve a remoção de lesões simples através da ação das glicosilases; e o segundo envolve um processo mais complexo pela remoção de oligonucleotídeos, o reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*) (COOKE *et al.*, 2003).

Os níveis de dano oxidativo no DNA são consequência de um balanço entre a indução e o reparo das lesões, sendo que uma menor eficiência de reparo resultará em quantidade aumentada de dano e risco elevado de doenças (COOKE *et al.*, 2003).

O reparo ineficiente do DNA pode resultar em fixação do dano como mutação, ou eliminação do dano por vários tipos de morte celular como: autofagia, catástrofe mitótica, necrose, anoikis e apoptose, processos estes que envolvem complexas reações enzimáticas (ROOS & KAINA, 2006).

A apoptose é um processo de morte celular programada e controlada em resposta a muitos estímulos fisiológicos e patológicos (ZIMMERMANN *et al.*, 2001).

A apoptose celular é iniciada por sinais intracelulares e extracelulares por duas vias principais: receptores de morte de membrana (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca). A via extrínseca é mediada por receptores de morte através da membrana celular, sendo os mais conhecidos: Fas, TNF receptor 1 (TNFR1) e TNF–ligante relacionado com indução de apoptose (TRAIL-R1). Esses receptores quando ligados aos ligantes específicos TNF- α , Fas-L e TRAIL sinalizam a agregação e formação de um complexo indutor de morte que recruta a caspase-8 e após ativa as caspases efetoras (caspase-3) (CIRCU & AW, 2010).

A via apoptótica intrínseca é estimulada pelas ROS com a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, que leva à translocação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, como: citocromo c, AIF (Apoptosis inducing factor) e Smac/Diablo (Second mitochondrial activator of caspase/IAP-Binding Protein Directly with low PI). Essas proteínas se ligam ao fator apoptótico de protease ativada-1 (Apaf-1) e pro-caspase-9 e formam o complexo apoptossomo. Além disso, o Smac/Diablo antagoniza os efeitos inibidores das IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins), levando ao aumento da ativação da caspase. O AIF medeia a sinalização caspase independente da translocação citosol-nuclear com indução da condensação e fragmentação da cromatina levando a morte celular por apoptose (CIRCU & AW, 2010).

Na infecção malárica, tem sido relatada a presença de apoptose no fígado de ratos em resposta à geração do radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$), com a implicação da via mitocondrial através da inibição da expressão do Bcl-2 e a ativação da expressão de Bax (GUHA *et al.*, 2006).

A infecção com *Plasmodium falciparum* causa apoptose das células mononucleares através da participação dos receptores CD95 (Fas/APO-1) e linfocinas (ARIBOT *et al.*, 1996). A diminuição dos linfócitos do sangue periférico é observada em pacientes portadores da malária aguda causada por *P. falciparum* e *P. vivax*. Os processos que podem estar envolvidos são: o de seqüestro pelos nódulos linfáticos e também pela morte anormal dessas células por apoptose. O aumento dos níveis de apoptose foi observado em linfócitos de pacientes com *P. falciparum* e *P. vivax*, quando estas células foram cultivadas por 24 horas, sendo que as células CD4^+ T foram mais susceptíveis que os linfócitos CD8^+ T (RICCIO, *et al.*, 2003). Esta ocorrência da morte por apoptose das células imunes tem sido mostrada em vários estudos realizados em humanos e modelos animais com vários efeitos sobre a gravidade da doença (KASSA *et al.*, 2006).

Contudo, a contribuição do estresse oxidativo para o dano no DNA e morte celular em pacientes infectados com malária causada pelo *P. vivax* foram pouco investigadas e necessitam ser caracterizadas. Sendo assim, estudos que busquem conhecer as respostas ao dano no DNA nesses pacientes podem contribuir com novos conhecimentos em relação aos aspectos da morbidade da doença.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar o nível de dano no DNA, frequência de apoptose, atividade das enzimas antioxidantes e marcador de estresse oxidativo em amostras de sangue periférico de indivíduos com infecção por malária causada pelo *Plasmodium vivax* e controles normais.

2.2 Objetivo específico:

1. Verificar os efeitos genotóxicos da infecção com *P. vivax* em leucócitos de pacientes com malária;
2. Quantificar marcador bioquímico do estresse oxidativo (malondialdeído (MDA) e das enzimas de defesa antioxidante (superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) em plasma e células sanguíneas de pacientes infectados com *P. vivax*;
3. Verificar a frequência basal ex vivo de apoptose em pacientes infectados com *P. vivax*;
4. Caracterizar as manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes infectados com *P. vivax*;
5. Correlacionar os efeitos genotóxicos com os marcadores do estresse oxidativo, defesa antioxidante e a frequência de apoptose;

3 Material e Métodos

3.1 Amostras de pacientes e controles

Para este estudo foram utilizadas amostras de 80 pacientes portadores da malária causada pelo *P. vivax*, sendo 45 pacientes procedentes do ambulatório de Doenças Infecciosas do Hospital Júlio Muller (HUJM), da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), em Cuiabá-MT, e 35 pacientes procedentes do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), da Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Rondônia, em Porto Velho-RO.

A infecção foi confirmada pelo exame direto da gota espessa e a parasitemia foi relatada usando o método tradicional (Manual de diagnóstico laboratorial da malária – MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVS), 2005) de avaliação semiquantitativa (em cruces (+)).

Os pacientes foram classificados segundo as características clínicas da doença, sendo primoinfectados, aqueles que relataram não ter tido infecção por malária anteriormente; reinfectados, todos que relataram ter tido uma ou mais infecções anteriores, e que esta infecção não tenha sido no período inferior de um ano; recaída, aqueles que apresentaram a doença novamente em até seis meses da infecção anterior e que não tinham frequentado área endêmica. Para alguns pacientes não foi possível realizar a classificação devido à dificuldade de diferenciá-los entre reinfectados e com recaída.

A temperatura axilar dos pacientes foi verificada no momento da coleta da amostra (sangue periférico) e as demais informações foram obtidas por questionário (anexo).

Como controles, foram coletadas amostras de sangue periférico de 76 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro de Cuiabá-MT. A sorologia foi negativa para:

chagas, sífilis, HIV, hepatite B, hepatite C, HTLV e a ausência de história clínica para malária foi confirmada para todos os doadores.

Foram incluídos no estudo todos os indivíduos que não tivessem sido expostos recentemente a agentes químicos e físicos que causem dano ao DNA, sem história clínica de câncer, doenças infecciosas e auto-imunes. As informações foram obtidas a partir de questionário (anexo).

Foram coletados 7 mL de sangue periférico através de venopunção e distribuídos em 2 tubos (tipo Vacutainer) contendo anticoagulante: heparina (4 mL) e E.D.T.A. (3 mL).

O projeto ao qual este estudo está vinculado foi aprovado no Comitê de Ética do HUJM (protocolo N° 993 /CEP-HUJM/2011).

3.2 Determinação dos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos: hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos foram realizados nos analisadores hematológicos automatizados da marca Roche (SYSMEX), modelo XE 2100 no laboratório do Laboratório de Patologia Clínica do HUJM e no Laboratório Pré-Análise (CEMETRON-RO). Do total de 80 pacientes, apenas 76 foram analisados em relação a todos os parâmetros hematológicos, pois quatro amostras foram insuficientes.

3.3 Avaliação de genotoxicidade (Ensaio Cometa)

O método foi baseado no trabalho de Singh *et al.*, (1988) e Tice *et al.*, (2000).

As lâminas foram emersas em etanol PA e limpas antes do uso, e então mergulhadas até a parte da ponta fosca em agarose ponto de fusão normal (Normal Melting Point – NMP) a

1,5%, diluída em tampão fosfato salina (PBS) a temperatura $>60^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as lâminas foram limpas de um lado, colocadas em posição horizontal para secar em temperatura ambiente *overnight*, e, armazenadas em laminários a temperatura ambiente.

A agarose baixo ponto de fusão (Low Melting Point – LMP) foi diluída em PBS a 0,5%, aquecida até a completa dissolução e, após, aliquoteada em microtubos (120 μL). No momento do uso, a agarose LMP foi aquecida em microondas e mantida em banho-maria a 37°C . Todo o procedimento foi realizado sem exposição à luz branca (irradiação) para a prevenção de danos adicionais no DNA. Todas as lâminas foram identificadas com a numeração atribuída às amostras dos pacientes e controles.

Para a preparação das lâminas foram acrescentados 15 μL de sangue total (coletado com anticoagulante E.D.T.A.) ao microtubo de agarose LMP, homogeneizando-se em seguida. 50 μL da suspensão foram transferidos para uma lâmina com agarose NMP, sendo em seguida coberto com lamínula (24X60 mm). Para controle positivo a amostra (sangue total) foi tratada com H_2O_2 10V (10 μL H_2O_2 + 500 μL sangue total) por 15 minutos e, após, seguiu-se conforme descrito acima.

As lâminas foram colocadas em refrigerador durante 5-10 minutos para a gelificação da agarose LMP.

As lamínulas foram retiradas cuidadosamente para que não ocorresse o desprendimento do material. As lâminas foram mergulhadas em cubas de vidro contendo solução de lise gelada (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10-10,5), com adição de Triton X-100 a 1 % e dimetil sulfoxido a 10 % (DMSO) por, no mínimo, uma hora e não mais de quatro semanas, sempre em refrigerador e protegidas da luz.

Posteriormente para a corrida da eletroforese as lâminas foram retiradas da cuba com solução de lise e, em caso de precipitação, lavadas com PBS e mergulhadas em tampão de eletroforese pH 13 (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, preparado a partir de solução estoque de

NaOH 10N e EDTA 200 mM pH 10) por 20 minutos a 4 °C para a desnaturação do DNA. Em seguida, as lâminas foram depositadas na cuba de eletroforese horizontal e os espaços vazios foram preenchidos com lâminas limpas, quando necessário. As lâminas foram cobertas com tampão de eletroforese e a corrida foi iniciada com 25 volts (V) e 300 miliamperes (mA) (0,9 V / cm) no equipamento de eletroforese PowerPac HcTM (BioRad), sendo os parâmetros acertados com a remoção ou adição do tampão. O tempo da corrida foi de 30 minutos.

Após a corrida de eletroforese, as lâminas foram removidas da cuba de eletroforese e colocadas em uma cuba de vidro contendo tampão de neutralização (pH 7,5) (0,4 M Tris-HCl) a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram retiradas da cuba com solução de neutralização e mergulhadas em outra cuba de vidro contendo álcool etílico PA por 3 a 4 minutos, para fixação. Depois de secas, foram armazenadas em laminários na geladeira até a análise.

Para análise dos cometas, as lâminas foram coradas com 50 µL de Gel RedTM (Biotium)10X e cobertas com lamínulas (24X60 mm), cuidando para que o corante ficasse homogêneo e sem bolhas. As lâminas foram observadas em microscópio epifluorescência (mod. Axio Scope A1, Carl Zeiss, Alemanha) em aumento de 400x (λ516-560 nm).

Foram visualizadas e fotografadas 100 células, utilizando o programa AxioVision Release 4.8.1 (Carl Zeiss, Alemanha) para posterior análise em programa específico. Após eletroforese os nucleóides adquirem a forma aparente de um cometa, com cabeça (região nuclear) e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo (células com dano) (Figura 1), e nucleóides com ausência de fragmentos de DNA (células sem dano) (Figura 2) (OSTLING & JOHANSON, 1984; SINGH, *et al.*, 1988).



Figura 1. Nucleóides com ausência de dano no DNA

Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Laboratório de Histologia – FCM/UFMT.

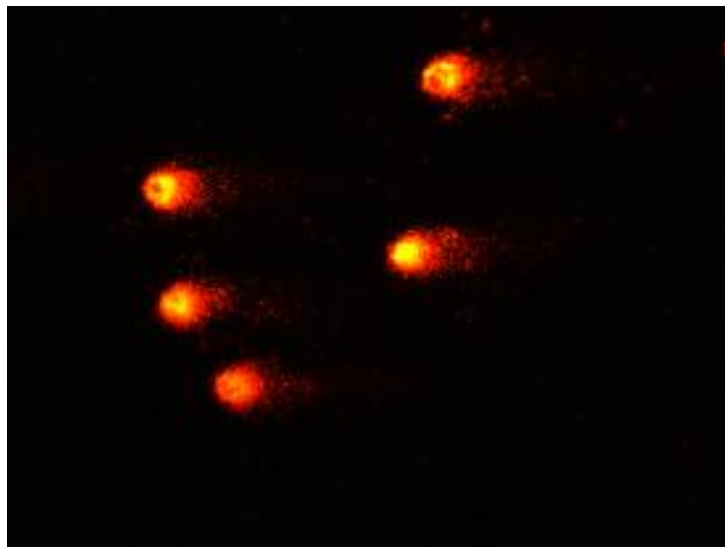


Figura 2. Nucleóides com presença de dano no DNA.

Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Laboratório de Histologia – FCM/UFMT.

As imagens foram analisadas através do software CometScore™ Freeware 1.5 (Tritek, Sumerduck, VA, USA). Medidas como: % DNA na cauda (% DNA Tail), comprimento da cauda do cometa (Tail Length) e momento da cauda (Tail Moment) (% DNA in Tail x Tail Length) entre outras são calculados pelo software. O Tail Moment foi o parâmetro analisado neste trabalho.

3.4 Detecção da Apoptose

Para a avaliação da apoptose, foi utilizado o Kit Nuc View™ 488 Caspase-3 Assay for Live Cells (Biotium, Inc.®).

O teste baseia-se na ação de um substrato de caspase fluorogênico que, ao atravessar a membrana citoplasmática em células vivas, entra em contato com a enzima caspase-3 e sofre quebra, liberando um fluorogênico que possui alta afinidade para se ligar ao DNA e corar o núcleo em verde brilhante. Portanto, o teste possibilita a análise de 2 parâmetros apoptóticos: presença de caspase 3 ativa (meio de apoptose) e morfologia nuclear (dano final).

3.4.1 Obtenção da suspensão de células mononucleares

Em um tubo plástico cônico estéril graduado (15 mL) foram colocados 2 a 3 mL de *Ficoll Paque*® e acrescentados cuidadosamente 2 a 3 mL do sangue total (heparinizado) homogeneizado, de modo a não ocorrer a mistura dos líquidos. O material foi centrifugado a 2100 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após a centrifugação, aspirou-se a camada superior (plasma) com a pipeta de Pasteur até a interface opaca, descartando-se esse material. Com a pipeta de Pasteur, a camada opaca

(células mononucleares) foi transferida para outro tubo plástico cônico estéril graduado (15 mL), cujo volume foi completado até 10 mL com salina estéril, homogeneizando-se suavemente. O material foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Novamente o sobrenadante foi desprezado e repetiu-se mais 1X a lavagem com salina estéril, conforme descrito acima. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi desprezado até obter o concentrado celular (em torno de 0,5 mL).

A suspensão celular foi homogeneizada e, então, transferiu-se 0,1 ml da suspensão para tubo de ensaio (13x75mm) com 0,3 ml de corante azul de tripan 0,2%, obtendo-se assim uma diluição de $\frac{1}{4}$. A mistura foi homogeneizada e uma alíquota de 0,2 ml foi aspirada com a pipeta, e então, encostando-se a extremidade da ponteira na borda da lamínula da câmara de Neubauer, esta foi preenchida cuidadosamente de forma homogênea na área demarcada. Foram aguardados 2 minutos para as células sedimentarem.

As células foram contadas na área demarcada da câmara em objetiva com aumento de 40x. O total das células encontradas na área de $0,1 \text{ mm}^3$ foi multiplicado por 10 e, em seguida, por 1.000 ($1 \text{ ml} = 1 \text{ cc} = 10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$), de maneira a obter-se o número celular/mL. Como a suspensão foi inicialmente diluída a $\frac{1}{4}$, o número de células contadas foi multiplicado pelo fator de diluição 4.

Assim:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{N^{\circ} \text{ total de células} \times 10.000 \times \text{fator de diluição}}{N^{\circ} \text{ de quadrantes contados}}$$

Para a análise da apoptose, o nº de células foi padronizado em $0,5-1 \times 10^6$ células /mL, utilizando-se o cálculo a seguir:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de células/ml da suspensão original}}{\text{Concentração de células desejada/ml}} \times \text{volume original} = \text{volume final}$$

3.4.2 Ensaio Microscópico – Caspase 3

A suspensão celular na concentração entre $0,5-1 \times 10^6$ células/mL (40 μ L) foi colocada em um tubo tipo eppendorf. Em seguida, foi adicionado 1 μ L de substrato Nuc View 488 Caspase-3 0,2 mM diretamente na suspensão celular. Incubou-se a suspensão por 30 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Após, centrifugou-se a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e descartado e a suspensão celular foi ressuspendida com 20 μ L de PBS. Em seguida, adicionou-se 2 μ L de 4'-6' diamidino -2-phenylidole (DAPI - 100 μ M) e a suspensão foi colocada sobre a lâmina e coberta com lamínula para a análise ao microscópio de epifluorescência usando filtro FITC (λ 492/514 nm) em até 2 horas.

Foram analisadas 1000 células em aumento de 400X de acordo com os seguintes critérios: núcleos azuis e íntegros foram considerados células não apoptóticas; e núcleos verdes ou azuis esverdeados (Figura 3) ou núcleos verdes com corpos apoptóticos foram classificados como células apoptóticas (Figura 4).

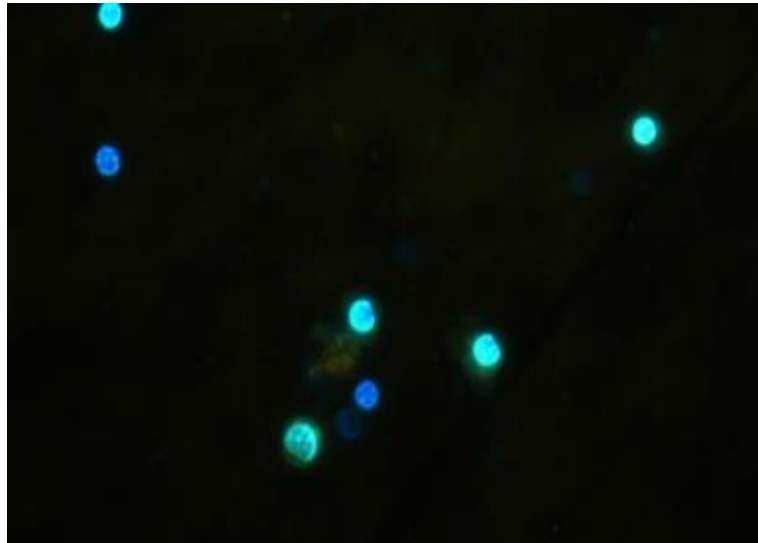


Figura 3. Células não apoptóticas (corada em azul) e células apoptóticas (corada em azul esverdeado).

Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Laboratório de Histologia – FCM/UFMT.



Figura 4. Célula apoptótica (corada em verde) com presença de corpos apoptóticos.

Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Laboratório de Histologia – FCM/UFMT.

3.4.3 Controle negativo e positivo

500 µL da suspensão celular foram cultivadas em um frasco estéril contendo 5 mL de meio completo (meio de cultura RPMI1640® a 78%, soro fetal bovino a 20% e fitohemaglutinina a 2%). Em seguida, os frascos foram, incubados em estufa a 37°C por 24 horas. No final desse período, o controle positivo foi tratado com doxorrubicina na concentração de 1 µM/mL e reincubado por até 5 horas. No final de cada tempo (0, 1, 2, 3, 4 e 5h) o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo cônico de aproximadamente 15 mL centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta de Pasteur, deixando-se o sedimento em torno de 1 mL.

Procedeu-se a contagem celular em câmara de Neubauer a fim de se obter uma suspensão celular de aproximadamente $0,5 - 1,0 \times 10^6$ células/mL, conforme descrito acima. A partir da suspensão celular padronizada realizou-se o procedimento para o ensaio Microscópico – Nuc View™ 488 Caspase-3 assay Kit for live cells (Biotium, Inc®), conforme descrito acima. Foi considerado como parâmetro do controle positivo o valor > 70% de células apoptóticas.

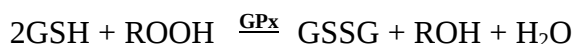
Para o controle negativo foram seguidos todos os passos descritos para o controle positivo, sem adição da solução de doxorrubicina. As células foram coletadas no tempo de incubação de 24h, sendo considerado como parâmetro do controle negativo o valor < 30% de células apoptóticas.

3.5 Avaliação do estresse oxidativo

3.5.1 Dosagem da glutathiona peroxidase (GPx)

O teste foi realizado segundo o kit Ransel® – Glutathiona Peroxidase (Randox).

A GPx catalisa a oxidação da glutathiona (GSH) pelo hidroperóxido de cumeno a glutathiona oxidase (GSSG). Na presença da glutathiona redutase (GR) e NADPH, a glutathiona oxidase (GSSG) é imediatamente convertida na forma reduzida com uma oxidação concomitante da NADPH a NADP^+ (PAGLIA & VALENTINE, 1967). A atividade da GPx foi determinada espectrofotometricamente com base no decréscimo de NADPH a 340 nm, a 37°C, conforme reação abaixo:



(ROOH = cumene hydroperoxide).

A amostra de sangue total heparinizada (50 µL) foi aliquoteada em três criotubos e armazenada a -80°C até a análise.

Os reagentes foram preparados segundo o protocolo do fabricante. A amostra foi retirada do freezer e descongelada a temperatura ambiente. Em seguida, acrescentou-se 1 ml do agente diluente e aguardou-se 5 minutos para conversão da glutathiona à forma reduzida. Adicionou-se, então, 1 ml do reagente de Drabkin, pois a presença de cianeto inibe interferentes na reação (peroxidase). O frasco controle foi reconstituído com 1 ml de água destilada, conforme instruções do fabricante.

O teste foi realizado conforme abaixo:

	Branco	Teste	Controle
H ₂ O Destilada	50 µL	-	-
Amostra (Diluída)	-	20 µL	-
Amostra Controle	-	-	20 µL
Reagente (R1a)	1 mL	1 mL	1 mL
Reagente (R2) de hidroperóxido de cumeno	40 µL	40 µL	40 µL

Os tubos foram homogeneizados e as leituras das absorbâncias iniciais e do reagente branco foram realizadas no espectrofotômetro (Metrolab/Wiener) após 1 minuto, e foram novamente lidas após 1 e 2 minutos.

O valor das absorbâncias dos testes e do controle foram subtraídas do reagente branco. O delta das absorbâncias foi então multiplicado pelo fator 8412 obtendo-se o resultado da atividade de GPx em U/L.

O controle foi realizado em todos os ensaios para garantia das análises, sendo os valores aceitáveis, devendo estar dentro da faixa especificada na bula do kit do fabricante.

3.5.2 Dosagem da superóxido dismutase (SOD)

O teste foi realizado utilizando-se o kit Ransod® – Superóxido Dismutase (Randox).

O método baseia-se na formação de radicais superóxido pela xantina e xantina oxidase (XOD), os quais irão reagir com composto 2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-cloreto de

feniltetrazol (I.N.T.) e formam o composto vermelho de formazan que é determinado espectrofotometricamente (WOOLLIAMS *et al.*, 1983).

A atividade da SOD é determinada mediante o decréscimo do composto I.N.T. avaliado 505 nm, a 37°C. Uma única unidade de SOD causa a inibição de 50% da redução de I.N.T. (WOOLLIAMS *et al.*, 1983).

Um total de 500 µL de sangue total heparinizado foram transferido para três tubos cônicos graduados e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e, após, o sobrenadante (plasma) foi descartado. Às hemácias adicionou-se solução NaCl 0,9% até completar 5 mL, homogeneizou-se e centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais 3X. Ao final da lavagem, o sobrenadante foi descartado e as hemácias separadas foram armazenadas a -80°C até a análise.

Os reagentes foram preparados segundo o protocolo do fabricante. A amostra foi retirada do freezer e descongelada a temperatura ambiente. Em seguida, acrescentou-se 2 ml de água deionizada gelada à amostra, homogeneizou-se e incubou-se a 4°C por 15 minutos (Hemolisado). 10 µL do hemolisado foram transferidos para outro tubo de ensaio (15X75 mm), ao qual foram acrescentados 250 µL de Tampão Fosfato 0,01 mol/L pH 7,0, de modo a obter-se uma diluição 1/25 para que a % de inibição fique em torno de 30 a 60%. A amostra controle foi reconstituída conforme protocolo do fabricante.

O teste foi realizado conforme abaixo:

	Branco	Padrão	Controle	Amostra
H ₂ O Destilada	50 µL	-	-	-
Amostra (Diluída 1/25)	-	-	-	50 µL

Controle	-	-	50 µL	-
Padrão	-	50 µL	-	-
Substrato Misto	1,7 mL	1,7 mL	1,7 mL	1,7 mL
Xantina Oxidase	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL

OBS. Ao adicionar o substrato, homogeneizar bem.

Os tubos foram homogeneizados e as leituras das absorbâncias iniciais (branco, padrão, controle e amostra) foram feitas no espectrofotômetro (Metrolab/Wiener) (505 nm e a 37°C) após 30 segundos (absorbância inicial, A_1 , e novamente ao completar 3 minutos (absorbância final A_2 , sendo em seguida calculado o valor do $\Delta A/\text{min}$ pela fórmula:

$$\Delta A/\text{min} = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

O valor do $\Delta A/\text{min}$ das amostras e do padrão foi corrigido pelo fator da diluição inicial (100X) e a faixa de inibição (%) foi determinada pela fórmula:

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{amostra ou padrão/minuto}}}{\Delta A_{\text{Diluyente da amostra/minuto}}} \times 100 = \% \text{ Inibição}$$

A % inibição foi inserida em um gráfico contra Log10 para obter a atividade de SOD por unidades/mL. Os valores da SOD U/mL, então foram convertidos em U/g Hemoglobina (Hb,) conforme a fórmula:

$$\frac{\text{SOD U/mL}}{\text{g Hb/ mL}} = \text{SOD U/g Hb}$$

3.5.3 Dosagem do Malondialdeído (MDA)

O método foi baseado no trabalho de Yagi, 1976. O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica na região do visível.

A amostra de sangue total heparinizada foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos para a obtenção do plasma, conservando-a -80°C até o momento da análise.

Inicialmente, a amostra (100 µL de plasma) foi hidrolisada através da adição de 200 µL de NaOH 1,5 M para obtenção do MDA livre das proteínas plasmáticas. Esta mistura foi incubada a 60 °C por 30 minutos, condição previamente determinada para hidrólise alcalina, e resfriada em banho de gelo. Após isso, foram adicionados à amostra 200 µL de H₂ClO₄ a 10% (v/v), seguido de homogeneização em agitador tipo vórtex por 1 minuto. A mistura foi centrifugada a 4 °C por 20 minutos a 10.000 rpm para obtenção do sobrenadante (PILZ *et al.*, 2000).

Então, 250 µL do sobrenadante (amostra), do padrão (MDA 400µM) diluído 40X (10 µM), 80X (5 µM) e 160X (2,5 µM) da água foram transferidos para tubos de vidro juntamente com 0,5 mL de solução de tiobarbitúrico (TBA) em tampão fosfato KH₂PO₄ (0,144%). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 90 C° durante 60 minutos. Após esse período, aguardou-se o resfriamento das amostras e, em seguida, adicionou-se 1 mL de álcool n-butílico e agitou-se em vortex por 1 minuto. A mistura foi centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 4000 rpm para a obtenção da fase alcoólica (sobrenadante). A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro (Gene Quant) a 535nm, zerando-se com o branco. Com as absorbâncias obtidas dos padrões foi construída uma curva de calibração e a concentração das amostras foi expressa em µM de MDA.

3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, seguido pelo teste t para comparação das médias ou teste – Mann Whitney para comparação das medianas. Para comparação de mais de 2 grupos, foi utilizada a análise da variância de uma via (comparação das médias) e o teste de Kruskal-Wallis (comparação das medianas), com pós-testes de comparação múltipla, Tukey, Dunn e Bonferroni. Para os dados referentes à idade foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney. O teste exato de Fisher foi usado para avaliar o hábito tabagista e etnia, enquanto que, sexo e o hábito etilista foram usados o teste de qui-quadrado na amostra. Foram calculados a *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança 95% (IC 95%). Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

A correlação entre as variáveis foram avaliadas pelos testes de correlação de Spearman ou Pearson, conforme os dados se mostraram paramétricos ou não, respectivamente.

As análises foram realizadas no software *GraphPad Insat 3 Demo* e no *GraphPad Prism 5 Demo*.

4 Resultados

4.1 Características gerais dos indivíduos

Neste estudo, foram avaliados 80 pacientes com malária causada pelo *P. vivax*, com idade média de 33,3 anos (variando de 14 a 66 anos), sendo 65 (81,3%) homens e 15 (18,7%) mulheres. A etnia predominante foi a parda, representando 53,8% do total dos pacientes. Desse grupo, 21,2% e 42,5% eram fumantes e consumiam álcool, respectivamente.

Dos 76 controles, 62 (81,6%) eram do sexo masculino e 14 (18,4%) eram do sexo feminino, com idade média 32,8 anos (variando de 17 a 66 anos). A etnia predominante foi parda com 56,6% seguida da branca com 35,5%. O tabagismo foi declarado por 3,9% dos controles, enquanto 42,1% afirmaram consumir álcool.

Quando comparado os grupos (pacientes X controles) não houve diferença estatística para os parâmetros: sexo ($p=1,0$); idade ($p=0,692$); etnia ($p>0,05$) e consumo de álcool ($p=1,0$); porém, o hábito tabagista foi mais freqüente no grupo de pacientes em relação aos controles ($p=0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das características gerais dos indivíduos segundo sexo, idade, etnia, hábito tabagista e consumo de álcool

Características		Pacientes		Controles		ODDS Ratio (IC 95%)	P
		n=80	%	n=76	%		
Sexo	Masculino	65	81,30%	62	81,60%	0,9 (0,44 a 2,19)	0,958 ¹
	Feminino	15	18,70%	14	18,40%		
Idade (anos) (Media ±DP)		33,3±11,4		32,8±11,4		-	0,692 ²
Etnia	Branco	31	38,70%	27	35,50%	1,15 (0,6 a 2,2)	0,741 ³
	Pardo	43	53,80%	43	56,60%	0,9 (0,5 a 1,7)	0,749 ³
	Negro	6	7,50%	5	6,60%	1,1 (0,3 a 3,9)	1 ³
	Amarelo	-	-	1	1,30%	0,3 (0,01 a 7,8)	0,487 ³
Hábito tabagista	Sim	17	21,20%	3	3,90%	6,5 (1,4 a 23,4)	0,001 ³
	Não	63	78,80%	73	96,10%		
Consumo de álcool	Sim	34	42,50%	32	42,10%	1,0 (0,54 a 1,92)	1 ¹
	Não	46	57,50%	44	57,90%		

Fonte: Questionários pacientes/controles. ¹Teste do Qui-quadrado; ²Teste – Mann Whitney e

³Teste exato de Fisher.

Com relação aos parâmetros hematológicos, os pacientes apresentaram diminuição significativa do número de hemácias, da hemoglobina, do hematócrito, dos linfócitos, eosinófilos e plaquetas quando comparados aos controles. Os leucócitos também estavam diminuídos neste grupo, embora não tenha havido significância estatística. Por outro lado, os pacientes apresentaram aumento do número dos neutrófilos e monócitos, embora, neste último caso, este não tenha sido estatisticamente significativo (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos dos pacientes com malária causada pelo *P. vivax* e controles

Parâmetros	Pacientes		Controles		p
	n	Média ±DP	n	Média ±DP	
Leucócitos (mm ³)	76	5.595,6 ±1753,2	76	6.155 ±1799,3	0,541 ¹
Hemácias (milhões)	76	4,58 ±0,59	76	5,50 ±5,12	<0,0001 ²
Hemoglobina (g/dL)	80	12,99 ±1,63	76	14,4 ±1,23	<0,0001 ¹
Hematocrito (%)	76	39,2 ±4,43	76	43,3 ±3,17	<0,0001 ²
Neutrófilos (%)	76	66,7 ±12,04	76	54,8 ±8,73	<0,0001 ¹
Linfócitos (%)	76	22,7 ±10,05	76	33,5 ±7,32	<0,0001 ¹
Eosinófilos (%)	76	2,3 ±2,93	76	3,41 ±3,4	0,009 ²
Monócitos (%)	76	7,9 ±3,3	76	7,81 ±1,85	0,896 ²
Plaquetas (mm ³)	76	120.078 ±52.506	76	235.778 ±59.876	<0,0001 ²

¹ Teste t não pareado; ² Teste Mann-Whitney; DP – desvio padrão.

Dos pacientes avaliados, 20 (25%) eram primoinfectados, 19 (23,7%) apresentavam reinfecção, 11 (13,8%) recaída e 30 (37,5%) não foram classificados devido a dificuldade de diferenciar se os pacientes estavam em recaída ou reinfecção. A maioria dos pacientes (43,7%) relatou estar com sintomas da doença entre 3 a 5 dias. Os sintomas: febre, calafrio, dor de cabeça e dor no corpo estavam presentes em 90% ou mais dos pacientes, enquanto que enjôo (47,5%), dor de estômago (40%) e vômito (27,5%) representaram uma menor queixa. A

temperatura axilar em 52,8% dos pacientes no momento do atendimento estava $\leq 37,3^{\circ}\text{C}$, enquanto 47,2% estavam $\geq 37,4^{\circ}\text{C}$. Em relação ao número de ocorrência de infecções anteriores por malária, 37,5% relataram ter tido de 1 a 2 infecções, sendo que 25% não apresentaram episódio da doença anteriormente. A maior parte dos casos apresentou parasitemia (++) (51,3%), enquanto (+++) representou 18,7% e com menor número foram ($\leq 1/2+$) e (+) com apenas 15% (Tabela 3).

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com malária causada pelo *P. vivax*

Características			Pacientes (n=80)	Frequência (%)
Classificação da doença	Primoinfecção		20	25%
	Reinfecção		19	23,7%
	Recaída		11	13,8%
	Não classificada		30	37,5%
Nº dias com sintomas	0 --- 3		21	26,2%
	3 --- 6		35	43,7%
	6 --- 9		13	16,3%
	>9		11	13,8%
Sintomas	Febre	Sim	77	96,2%
		Não	3	3,8%
	Calafrio	Sim	79	98,7%
		Não	1	1,3%
	Dor de cabeça	Sim	72	90%
		Não	8	10%
	Enjôo	Sim	38	47,5%
		Não	42	52,5%
	Dor no corpo	Sim	78	97,5%
		Não	2	2,5%
	Dor de estômago	Sim	32	40%
		Não	48	60%
*Temperatura axilar °C	≤37,3		28	52,8%
	≥37,4		25	47,2%
Número de malária anterior	0		20	25%
	1 --- 3		30	37,5%
	3 --- 6		11	13,8%
	6 --- 9		8	10%
	> 9		11	13,8%
Parasitemia em cruzes	<=1/2 +		12	15%
	+		12	15%
	++		41	51,3%
	+++		15	18,7%

Fonte: Questionários pacientes/controles; *n=53

4.2 Estresse oxidativo

4.2.1 Malondialdeído – MDA

A concentração do MDA ($\mu\text{M/L}$) foi significativamente maior nos pacientes ($2,48 \pm 0,57$) em relação ao controles ($1,93 \pm 0,55$), ($p < 0,0001$) (Figura 5).

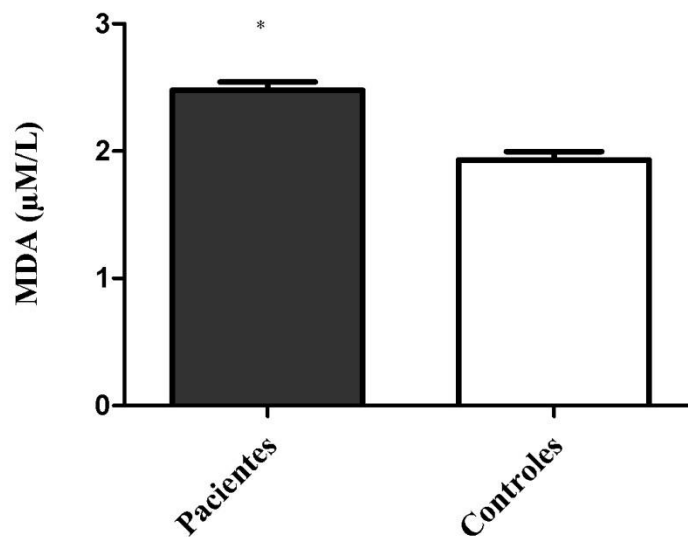


Figura 5 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax* e controles. Os dados referem-se a média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,0001$ - Teste t não pareado.

O sexo, idade, hábito tabagista e consumo alcoólico não influenciaram na concentração do MDA ($\mu\text{M/L}$), tanto no grupo de pacientes como no grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool

Características		Pacientes n=80	MDA ($\mu\text{M/L}$) Média±DP	p	Controles n=76	MDA ($\mu\text{M/L}$) Média±DP	p
Sexo	Masculino	65	2,52±0,57	p=0,177 ¹	62	1,98±0,57	p=0,07 ¹
	Feminino	15	2,29 ±0,58		14	1,69 ±0,41	
Idade	14 -----21	8	2,74 ±0,61	p=0,098 ²	5	2,04 ±0,47	p=0,989 ²
	21 -----28	24	2,32 ±0,41		26	1,92 ±0,60	
	28 -----35	14	2,29 ±0,55		19	1,95±0,58	
	35 -----42	15	2,52 ±0,46		7	1,99 ±0,56	
	42 -----49	11	2,83 ±0,89		11	1,88 ±0,53	
	> 49	8	2,44 ±0,52		8	1,84 ±0,57	
Hábito tabagista	Sim	17	2,66 ±0,61	p=0,827 ³	3	1,90 ±0,28	p=0,989 ³
	Não	63	2,43 ±0,56		63	1,93 ±0,56	
Consumo de álcool	Sim	46	2,43 ±0,48	p=0,571 ³	32	2,05 ±0,50	p=0,131 ³
	Não	34	2,51 ±0,64		44	1,85 ±0,59	

¹Teste t não pareado; ²ANOVA - Tukey; ³Mann-Whitney; DP- desvio padrão.

A concentração do MDA no grupo dos pacientes não foi influenciada significativamente pela parasitemia (p=0,849), número de dias com sintomas (p=0,422), número de malária anteriores (p=0,407) e temperatura axilar (°C) (p=0,08). Entretanto, foi significativamente maior nos pacientes reinfectados (2,88 $\mu\text{M/L}$), em comparação com os primoinfectados (2,32 $\mu\text{M/L}$) e aqueles com recaída (2,21 $\mu\text{M/L}$) (p=0,009) (Figura 6).

Os dados estão representados na Tabela 5.

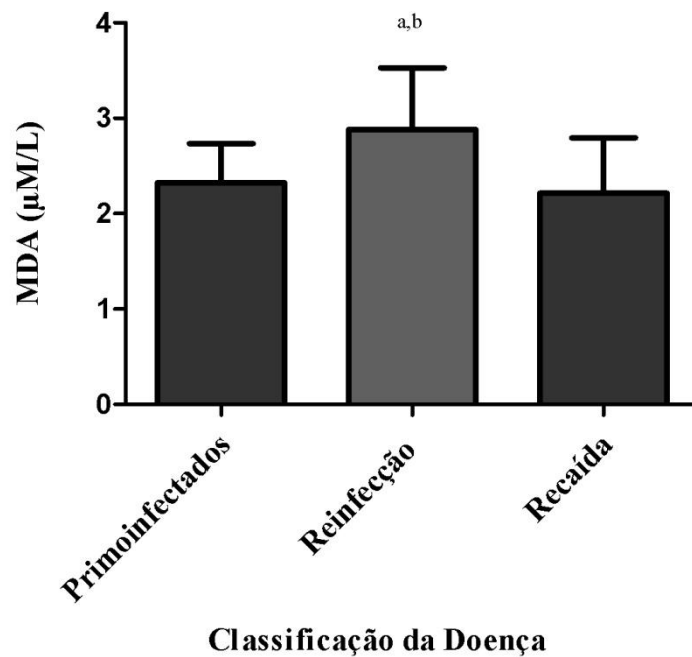


Figura 6 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação à classificação da doença em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem-se à média $\pm$ desvio padrão ($p=0,009$ - Teste Kruskal Wallis); As letras representam a significância estatística entre os grupos. (a) Comparação dos pacientes primoinfectados em relação aos reinfectedados ($p<0,05$) e (b) em relação aos pacientes com reinfecção em relação aos com recaída ($p<0,05$). (Teste de Dunn de comparação múltipla das médias).

Tabela 5 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*

Características		Pacientes (n=80)		MDA	p
		n	%	($\mu\text{M/L}$)	
Parasitemia	$\leq 1/2 +$	12	15	2,57 $\pm$ 0,68	0,849 ¹
	+	12	15	2,37 $\pm$ 0,45	
	++	41	51,3	2,49 $\pm$ 0,52	
	+++	15	18,7	2,44 $\pm$ 0,74	
Classificação da doença	Primoinfecção	20	25	2,32 $\pm$ 0,41	0,009 ¹
	Reinfecção	19	23,7	2,88 $\pm$ 0,65	
	Recaída	11	13,8	2,21 $\pm$ 0,58	
	Não classificado	30	27,5	2,42 $\pm$ 0,51	
Número de malária anterior	0	20	25	2,32 $\pm$ 0,41	0,407 ¹
	1 --- 3	30	37,5	2,62 $\pm$ 0,65	
	3 --- 6	11	13,75	2,36 $\pm$ 0,49	
	6 ---9	7	10	2,31 $\pm$ 0,53	
	≥ 9	12	13,75	2,63 $\pm$ 0,67	
Nº de dias sintomas	0 --- 3	21	26,2	2,50 $\pm$ 0,71	0,422 ¹
	3 --- 6	35	43,8	2,51 $\pm$ 0,59	
	6 --- 9	13	16,3	2,23 $\pm$ 0,34	
	9 --- 12	6	7,5	2,75 $\pm$ 0,34	
	12 --- 15	5	6,2	2,41 $\pm$ 0,38	
*Temperatura axilar °C	$\leq 37,3$	28	52,8	2,26 $\pm$ 0,47	0,078 ²
	$\geq 37,4$	25	47,2	2,54 $\pm$ 0,65	

¹Teste Kruskal-Wallis; ²Teste t não pareado; DP- desvio padrão; * (n=53).

A concentração do MDA foi correlacionada com os parâmetros hematológicos e a atividade GPx, e os dados não demonstraram nenhuma correlação significativa (Anexo 1). Entretanto, houve correlação negativa significativa entre a concentração do MDA e apoptose

(Spearman $r = -0,34$ (IC= $-0,53$ a $-0,13$) ($p=0,002$)) (Figura 7), bem como com a atividade da SOD (Pearson $r = -0,24$ (IC= $-0,44$ a $-0,02$) ($p=0,031$)) (Figura 8).

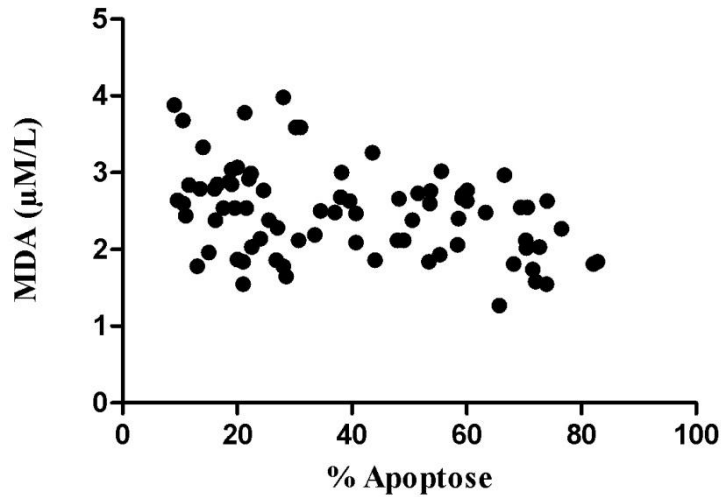


Figura 7 - Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação a apoptose em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,34$ (IC= $-0,53$ a $-0,13$); $p=0,001$ e $n=80$.

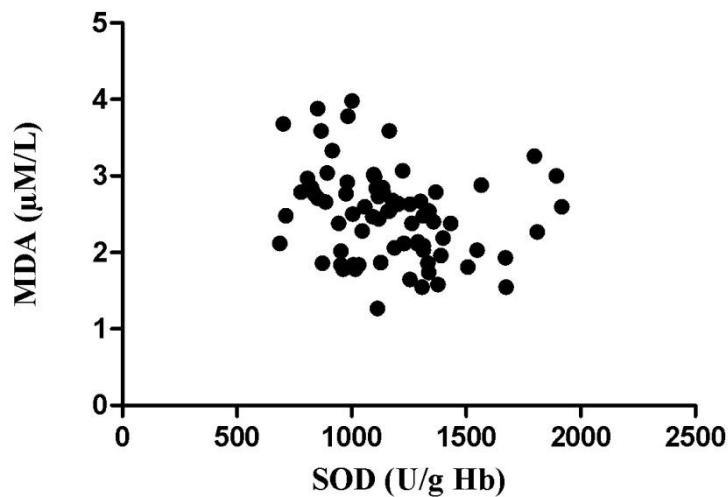


Figura 8 - Concentração do MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação à atividade de SOD (U/g Hb) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,34$ (IC= $-0,53$ a $-0,13$); $p=0,001$ e $n=80$.

4.2.2 Atividade da enzima - Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade enzimática da GPx (média±DP) nos pacientes foi significativamente maior (7.666,9±2.262,6) em relação aos controles (6.386,6±1.537,6), ($p = <0,0005$) (Figura 9).

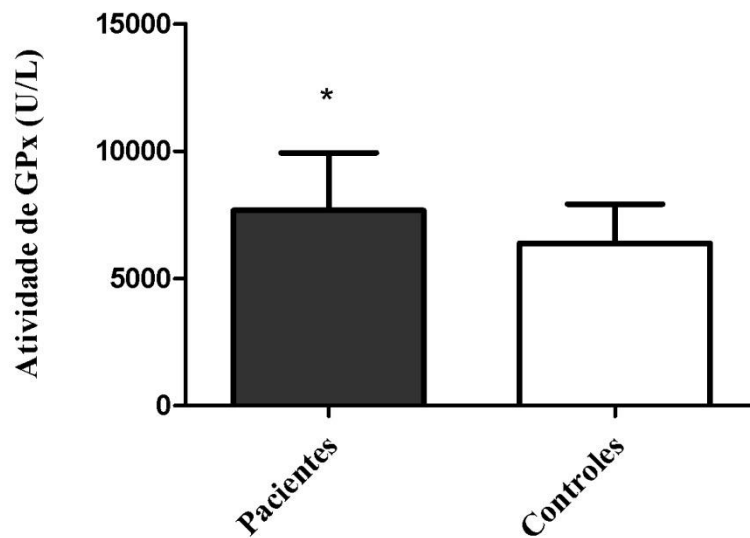


Figura 9 - Atividade da GPx (U/L) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax* e controles. Os dados referem a média±desvio padrão; * $p = <0,0005$ - Teste Mann-Whitney.

O sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool não influenciou na atividade da GPx (U/L), tanto no grupo de pacientes como nos controles (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade da GPx (U/L) segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool

Características		Pacientes		p	Controles		p
		n=80	GPx (U/L) Média±DP		n=76	GPx (U/L) Média±DP	
Sexo	Masculino	65	7.610,8 ±2361	p=0,368 ¹	62	6.347,5 ±1.531	p=0,644 ²
	Feminino	15	7.910 ±1.822		14	6.559,6 ±1.611	
Idade	14 -----21	8	8.711,1 ±2.375	p=0,672 ³	5	5.642 ±1.888	p=0,807 ³
	21 -----28	24	8.314,3 ±2.357		26	6.333,3 ±1.599	
	28 -----35	14	7.602,9 ±1.803		19	6.671,9 ±992	
	35 -----42	15	6.543,3 ±1.835		7	6.395,7 ±1.351	
	42 -----49	11	6.823,1 ±2.078		11	6.580,5 ±1.893	
	> 49	8	8.060 ±2.871		8	2.036,7 ±2.037	
Hábito tabagista	Sim	17	7.828,2 ±2.404	p=0,222 ²	3	6.365,5 ±1.532	p=0,522 ¹
	Não	63	7.069,5 ±1.546		63	6.901 ±1.928	
Consumo de álcool	Sim	46	7.790,7 ±2.611	p=0,941 ¹	32	6.219,5 ±1.526	p=0,269 ²
	Não	34	7.499,5 ±1.705		44	6.616,4 ±1.583	

¹Teste Mann-Whitney; ² Teste t não pareado; ³ANOVA ; DP – desvio padrão.

Em relação aos parâmetros clínicos da doença, não houve diferença com significância estatística da atividade da GPx em relação a parasitemia, classificação da doença, número de malária anteriores, número de dias com sintomas e temperatura axilar. Os dados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Atividade da GPx (U/L) em células de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* segundo as características clínicas da doença

Características	Pacientes (n=80)		GPx (U/L)	p	
	n	%	Média±DP		
Parasitemia	<=1/2 +	12	15	8.110,4 ±1.966,7	0,328 ¹
	+	12	15	8.430,9 ±2.793,1	
	++	41	51,3	7.365,9 ±2.033,7	
	+++	15	18,7	7.523,9 ±2.635,6	
Classificação da doença	Primoinfecção	20	25	7.302,7 ±2.205,4	0,313 ¹
	Reinfecção	19	23,7	7.895,4 ±2.526,6	
	Recaída	11	13,8	8.510,4 ±1.702,7	
	Não classificado	30	27,5	7.455,9 ±2.419,6	
Número de malária anterior	0	20	25	7.302,7 ±2.025,4	0,171 ¹
	1 --- 3	30	37,5	7.013,2 ±1.706,8	
	3 --- 6	11	13,75	9.311,2 ±3.107,3	
	6 ---9	7	10	7.755,8 ±1.749,7	
	≥9	12	13,75	8.349,1 ±2.632,5	
Nº de dias sintomas	0 --- 3	21	26,2	7.635,7 ±2.103,4	0,373 ¹
	3 --- 6	35	43,8	8.172,4 ±2.436,8	
	6 --- 9	13	16,3	6.809,5 ±2.169,2	
	9 --- 12	6	7,5	6.770,3 ±2.364,6	
	12 --- 15	5	6,2	7.565,2 ±1.248,4	
*Temperatura axilar °C	≤37,3	28	52,8	8.098,1 ±2.717	0,265 ²
	≥37,4	25	47,2	7.260 ±2.380	

¹Teste Kruskal Wallis; ²Teste Mann-Whitney; DP – desvio padrão; * n=53.

A atividade da GPx foi correlacionada com os parâmetros hematológicos e apoptose, e os dados não demonstraram nenhuma correlação significativa (Anexo 2).

4.2.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD) (U/g Hb)

A atividade da enzima SOD nos pacientes ($1.172,6 \pm 267,3$) foi muito semelhante às observadas nos controles ($1.169,2 \pm 311,7$), não havendo diferença estatisticamente significativa (Figura 10).

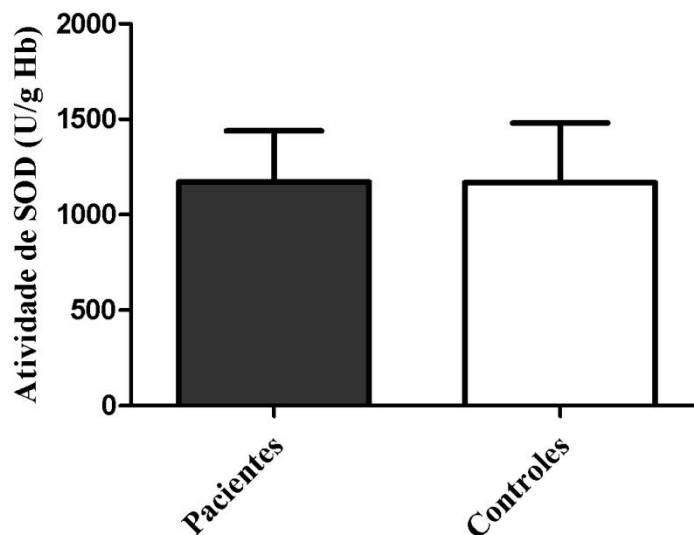


Figura 10 - Atividade da SOD (U/g Hb) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax* e controles. Os dados referem a média $\pm$ desvio padrão; $p = 0,726$ – Teste Mann-Whitney.

O sexo, hábito tabagista e o consumo alcoólico não influenciaram na atividade da SOD, tanto nos pacientes como nos controles. Entretanto, a atividade da SOD foi maior na faixa etária dos 28 – 35 anos, e quando comparados os grupos houve significância estatística ($p=0,02$) (Figura 11). No grupo controle à idade não apresentou nenhuma significância estatística.

Os dados estão representados na Tabela 8.

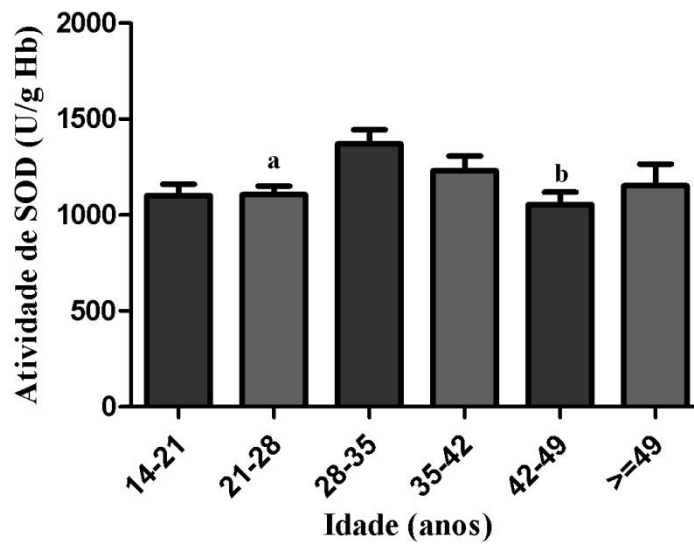


Figura 11 - Atividade da SOD (U/g Hb) em relação à idade dos pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem-se à média±desvio padrão ($p=0,02$ - ANOVA). As letras representam a diferença estatisticamente significativa em comparação com os grupos. (a) 21|----28 X 28|---35 anos ($p<0,05$) e (b) 28|---35 X 42|---49 anos ($p<0,05$). (Teste de Bonferroni de comparação múltipla das médias).

Tabela 8 - Atividade da SOD (U/g Hb) segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool

Características		Pacientes n=80	SOD (U/g Hb) Média±DP	p	Controles n=76	SOD (U/g Hb) Média±DP	p
Sexo	Masculino	65	1.154,9 ±265	p=0,726 ²	62	1.167,2 ±301	p=0,219 ¹
	Feminino	15	1.249,5 ±273		14	1.178,3 ±367	
Idade	14 -----21	8	1.100,7 ±169	p=0,02 ⁴	5	1.209,9 ±279	p=0,192 ³
	21 -----28	24	1.105,2 ±226		26	1.161,8±379	
	28 -----35	14	1.370,4±273		19	1.159,7 ±271	
	35 -----42	15	1.231,4±297		7	998,4±304	
	42 -----49	11	1.054,4 ±213		11	1.143,3 ±209	
	> 49	8	1.153,2 ±317		8	1.375,9 ±266	
Hábito tabagista	Sim	17	1.140,9±289	p=0,584 ²	3	917,9 ±300	p=0,174 ¹
	Não	63	1.181,2 ±263		63	1.179,6 ±310	
Consumo de álcool	Sim	46	1.248,8±285	p=0,051 ¹	32	1.186,1±324	p=0,862 ¹
	Não	34	1.116,4 ±241		44	1.157 ±305	

¹Teste Mann-Whitney; ² Teste t não pareado; ³ Teste Kruskal-Wallis, ⁴ANOVA; DP – desvio padrão.

Em relação aos parâmetros clínicos, a atividade da SOD não foi influenciada pela parasitemia, classificação da doença e número de malárias anteriores. Porém, em relação ao nº de dias com sintomas, os pacientes que se encontravam entre 9-11 dias a SOD foi mais elevada, e quando os grupos foram comparados houve significância estatística ($p=0,046$) (Figura 12). A atividade SOD foi significativamente maior ($p=0,024$) nos pacientes com temperatura axilar ($^{\circ}\text{C}$) de $\leq 37,3^{\circ}\text{C}$ ($1.278,3 \pm 340$) em relação aos com temperatura $\geq 37,4^{\circ}\text{C}$ (1.094 ± 217) e quando comparados os grupos houve significância estatística ($p=0,024$). (Figura 13).

Os dados estão representados na Tabela 9.

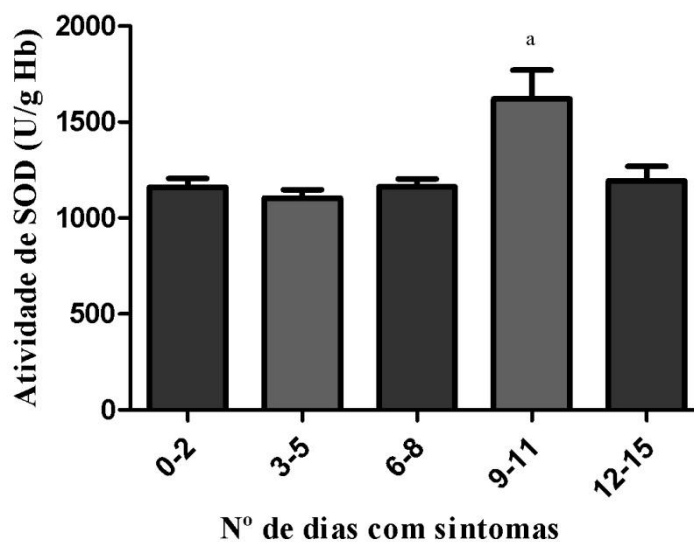


Figura 12 - Atividade da SOD (U/g Hb) em relação ao nº de dias com sintomas em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem-se à média ± desvio padrão ($p=0,046$ - Teste Kruskal Wallis). A letra (a) representa a diferença estatística significativa entre os grupos 3-5 X 9-11. (Teste de Dunn de comparação múltipla das médias - $p < 0,05$).

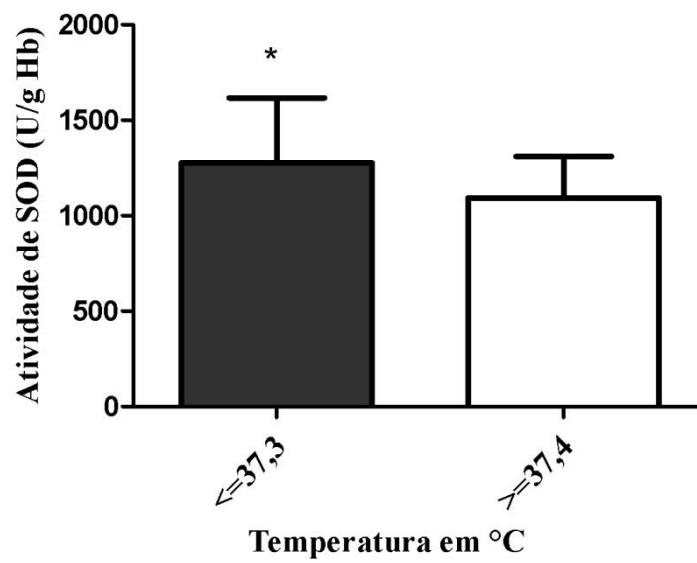


Figura 13. Atividade de SOD (U/g Hb) em relação à temperatura axilar em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem a % média $\pm$ desvio padrão. * $p=0,024$ (Teste t não pareado).

Tabela 9 - Atividade da SOD (U/g Hb) segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*

Características		Pacientes (n=80)		SOD (U/g Hb)	p
		n	%	Média±DP	
Parasitemia	≤1/2 +	12	15	1.116,2 ±205	0,847 ¹
	+	12	15	1.206,1 ±281	
	++	41	51,3	1.183,9 ±272	
	+++	15	18,7	1.160,1 ±303	
Classificação da doença	Primoinfecção	20	25	1.274,6 ±278	0,171 ¹
	Reinfecção	19	23,7	1.115,4 ±193	
	Recaída	11	13,8	1.215,6 ±293	
	Não classificado	30	27,5	1.125,2 ±281	
Número de malária anterior	0	20	25	1.274,6 ±278	0,316 ¹
	1 --- 3	30	37,5	1.155,9 ±285	
	3 --- 6	11	13,75	1.140,4 ±261	
	6 ---9	7	10	1.057 ±204	
	≥9	12	13,75	1.149 ±224	
Nº de dias sintomas	0 --- 3	21	26,2	1.160,7±209	0,046 ²
	3 --- 6	35	43,8	1.103,5 ±263	
	6 --- 9	13	16,3	1.162,9 ±147	
	9 --- 12	6	7,5	1.621,5 ±365	
	12 --- 15	5	6,2	1.193,9±169	
*Temperatura axilar °C	≤37,3	28	52,8	1.278,3 ±340	0,024 ³
	≥37,4	25	47,2	1.094 ±217	

¹ANOVA – Tukey ; ²Teste Kruskall-Wallis ; ³Teste t não pareado; DP- desvio padrão; *n=53.

A atividade da SOD foi correlacionada com os parâmetros hematológicos e com a % de apoptose, mas não houve correlação significativa (Anexo 3).

4.3 Dano no DNA

O dano no DNA, conforme avaliado pelo ensaio cometa, foi significativamente maior nos pacientes ($26,71 \pm 18,1$) em relação aos controles ($10,05 \pm 7,9$) ($p < 0,0001$) (Figura 14).

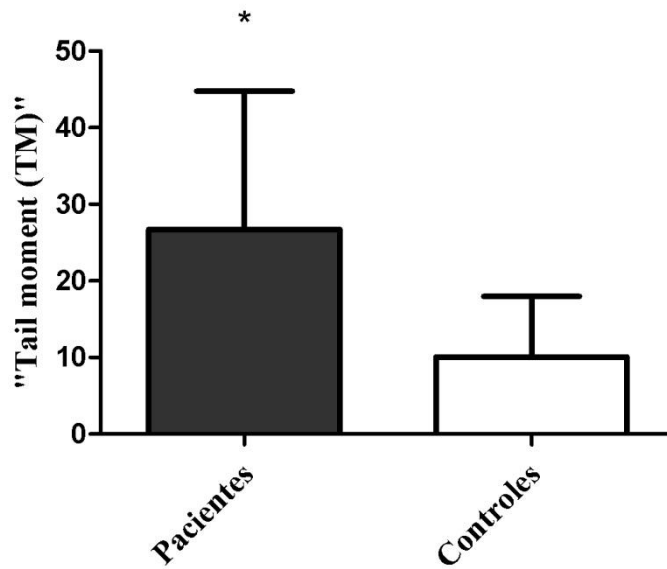


Figura 14 - Dano ao DNA "Tail moment-TM" de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* e controles. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,0001$ – Teste Mann-Whitney.

O sexo, idade, hábito tabagista e consumo alcoólico não influenciaram o nível de dano no DNA, tanto nos pacientes como nos controles (Tabela 10).

Tabela 10 - Dano no DNA dos pacientes com malária causada pelo *P. vivax*, segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo alcoólico

Características		Pacientes n=80	"Tail moment" Média±DP	P	Controles n=76	"Tail moment" Média±DP	P
Sexo	Masculino	65	26,9±18	p=0,702 ¹	62	9,2±7,2	p=0,157 ¹
	Feminino	15	26 ±19,1		14	13,6 ±10	
Idade	14 -----21	8	30,8 ±22,4	p=0,535 ²	5	10,1±6	p=0,690 ²
	21 -----28	24	27,3 ±18,6		26	9 ±8,9	
	28 -----35	14	24,55 ±17,3		19	11±7,8	
	35 -----42	15	24,2 ±20,5		7	12,3 ±11,1	
	42 -----49	11	22 ±12,3		11	9,6±5,3	
	> 49	8	36,1 ±16,2		8	12 ±7	
Hábito tabagista	Sim	17	29,2 ±18,3	p=0,437 ¹	3	8±6,1	p=0,612 ¹
	Não	63	26 ±18,1		63	10,1 ±8	
Consumo de álcool	Sim	46	29,7 ±20,2	p=0,300 ¹	32	8,8±6,9	p=0,290 ¹
	Não	34	24,5 ±16,1		44	10,9 ±8,5	

¹ Teste Mann-Whitney; ² Teste Kruskal Wallis; DP- desvio padrão.

A parasitemia (p=0,228), nº dias com sintomas (p=0,745), número de malária anterior e temperatura axilar (°C) (p=0,551) não influenciaram o dano genotóxico. Por outro lado, o dano no DNA foi significativamente maior nos pacientes primoinfectados (31,1±18,5) e reinfectados (29,9±12,6) em comparação aos pacientes com recaída (16,8±21,1 (p=0,01) (Figura 15).

Os dados estão representados na Tabela 11.

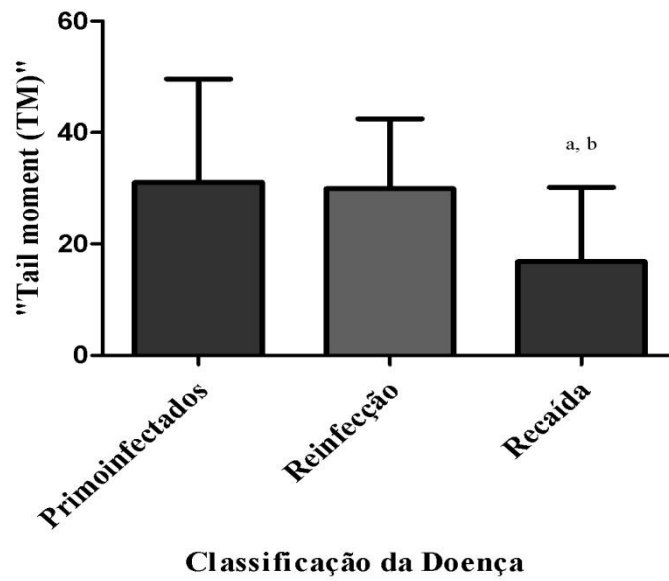


Figura 15 - Dano no DNA (TM) em relação à classificação da doença em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem-se à média±desvio padrão ($p=0,01$ - Teste Kruskal Wallis); As letras representam a significância estatística entre os grupos. (a) Comparação dos pacientes primoinfectados em relação aos com recaída ($p<0,05$) e (b) comparação dos pacientes com reinfecção em relação aos com recaída ($p<0,05$). (Teste de Dunn de comparação múltipla das médias).

Tabela 11 - Dano no DNA (TM) segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*

Características		Pacientes (n=80)		“Tail moment”	p
		n	%	($\mu\text{M/L}$)	
Parasitemia	$\leq 1/2 +$	12	15	30,2 $\pm$ 13,2	0,228 ¹
	+	12	15	30,4 $\pm$ 14,4	
	++	41	51,3	25,5 $\pm$ 20,3	
	+++	15	18,7	24,3 $\pm$ 18,1	
Classificação da doença	Primoinfecção	20	25	31,1 $\pm$ 18,5	0,01 ¹
	Reinfecção	19	23,7	29,9 $\pm$ 12,6	
	Recaída	11	13,8	16,8 $\pm$ 13,4	
	Não classificado	30	27,5	25,4 $\pm$ 21,1	
Número de malária anterior	0	20	25	31 $\pm$ 18,5	0,084 ¹
	1 --- 3	30	37,5	21,9 $\pm$ 16,6	
	3 --- 6	11	13,75	23,9 $\pm$ 20,5	
	6 --- 9	8	10	37,5 $\pm$ 18,9	
	>9	11	13,75	26,8 $\pm$ 15,5	
Nº de dias sintomas	0 --- 3	21	26,2	29,6 $\pm$ 20	0,745 ¹
	3 --- 6	35	43,8	25,5 $\pm$ 16,8	
	6 --- 9	13	16,3	27,5 $\pm$ 15,5	
	9 --- 12	6	7,5	24,7 $\pm$ 24,5	
	12 --- 15	5	6,2	23,2 $\pm$ 22,1	
*Temperatura axilar °C	$\leq 37,3$	28	52,8	22,3 $\pm$ 17,4	0,551 ²
	$\geq 37,4$	25	47,2	25,4 $\pm$ 20,5	

¹Teste Kruskall-Wallis; ²Teste Mann-Whitney; DP- desvio padrão; * (n=53).

Os dados referente ao dano no DNA foram correlacionados com os parâmetros hematológicos, atividade da GPx, atividade da SOD e concentração de MDA, mas não houve correlação significativa (Anexo 4). Houve correlação negativa significativa entre a frequência de apoptose e dano no DNA nos pacientes ((Spearman $r = -0,30$ (IC= -0,49 a -0,08) ($p=0,007$)) (Figura 16).

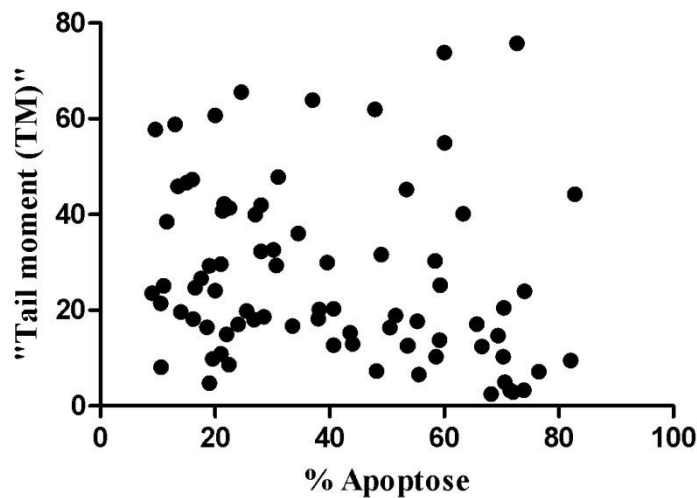


Figura 16 - Dano ao DNA (TM) em relação a apoptose em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,30$ (IC= -0,49 a -0,08); $p=0,007$ e $n=80$.

4.4 Apoptose

Os resultados obtidos demonstram que os pacientes com malária apresentam uma frequência média de células mononucleares em apoptose ($39,3 \pm 2,43$) significativamente maior do que observado no grupo controle ($21,6 \pm 1,95$) (Figura 17).

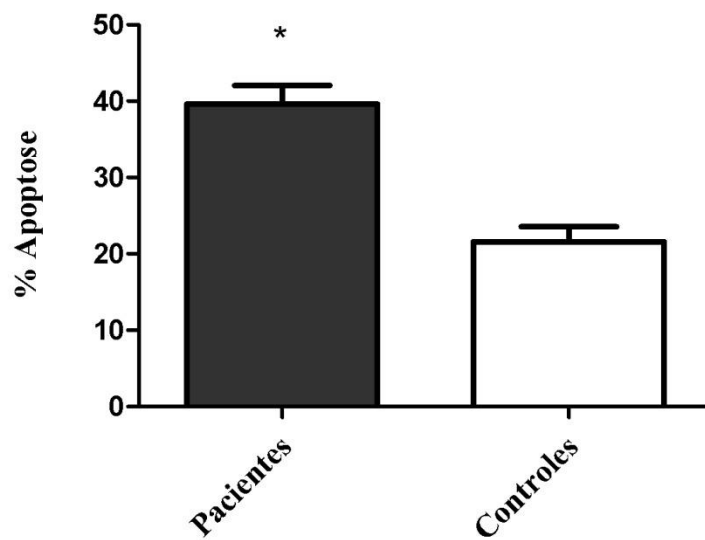


Figura 17 - Frequência de apoptose em pacientes com malária causada pelo *P. vivax* e controles. Os dados referem-se % média $\pm$ erro padrão (EP); * $p = <0,0001$ – Teste Mann-Whitney.

O sexo e idade, bem como o hábito tabagista e o consumo de alcoólico não influenciaram na frequência da apoptose, tanto nos pacientes como no grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência de apoptose segundo sexo, idade, hábito tabagista e consumo de álcool.

		Pacientes n=80	Apoptose Média±DP	P	Controles n=76	Apoptose Média±DP	P
Sexo	Masculino	65	39,3 ±21,7	p=0,730 ¹	62	21,1 ±16,9	p=0,639 ¹
	Feminino	15	41,04 ±24,7		14	23,7 ±17,7	
Idade	14 -----21	8	37,6 ±22,8	p=0,925 ²	5	9,4 ±7,9	p=0,238 ²
	21 -----28	24	41 ±18,8		26	24,7 ±18,6	
	28 -----35	14	42,5 ±24,8		19	15,9 ±12,7	
	35 -----42	15	41,4 ±22,8		7	26,6 ±22,7	
	42 -----49	11	35,7 ±22,7		11	23 ±16,8	
	> 49	8	34,5 ±25,2		8	25,2 ±17,6	
Fumo	Sim	17	41,3 ±23,7	p=0,827 ¹	3	19 ±18,8	p=0,743 ¹
	Não	63	39,2 ±21,3		63	21,7 ±17,1	
Consumo de álcool	Sim	46	37,8 ±21,7	p=0,522 ¹	32	23 ±17,2	p=0,535 ¹
	Não	34	40,9 ±21,9		44	20,6 ±17	

¹Teste Mann-Whitney; ²Teste Kruskal-Wallis; DP- desvio padrão.

Para verificar se os níveis de apoptose estão sendo influenciada pelas características clínicas da doença, a frequência das células apoptóticas foi avaliada segundo a parasitemia, classificação da doença, número de infecções anteriores e número de dias do início dos sintomas e a presença de febre.

Os resultados obtidos demonstram que a parasitemia influencia a frequência de apoptose nos pacientes, havendo um aumento de células apoptóticas conforme aumenta a parasitemia. Assim, a frequência de células apoptóticas em indivíduos com parasitemia ($\leq 1/2$ +) foi 27,7±22,9, (+) 31,5±19,8, (++) 41,3±19,7 e (+++) 51,1±22,5. Houve significância estatística quando comparados os grupos ($\leq 1/2$ +) com (+++) ($p < 0,05$) (Figura 18).

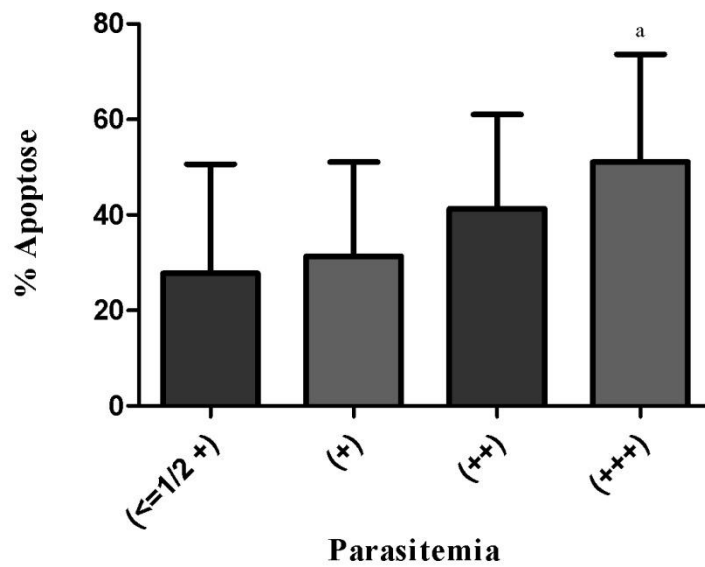


Figura 18 - Frequência de apoptose em relação a parasitemia em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem-se à média±desvio padrão ($p=0,01$ – Teste Kruskal Wallis). A letra (a) representa a diferença estatisticamente significativa em comparação com os grupos, $\leq 1/2 +$) com (+++) ($p<0,05$) (Teste de Dunn de comparação múltipla de médias).

Quanto à classificação da doença, a frequência de células apoptóticas foi significativamente maior em pacientes primoinfectados e em recaída em comparação aos reinfectados (Figura 19).

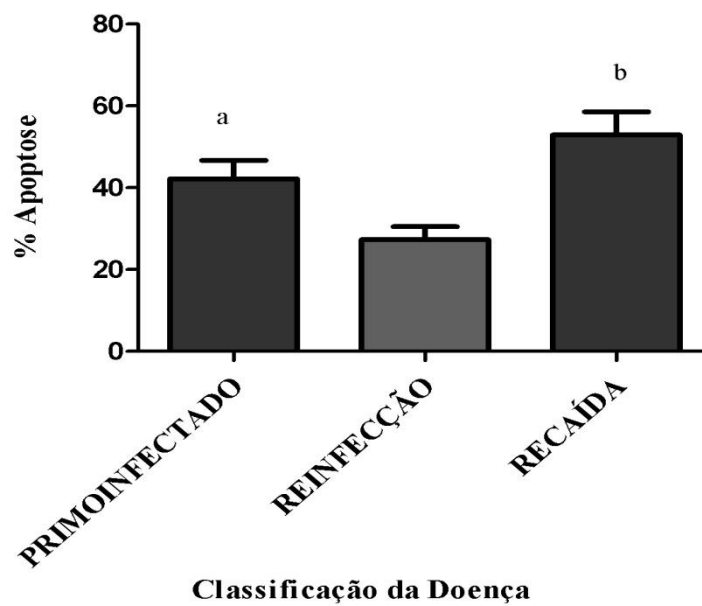


Figura 19 - Frequência de apoptose em relação à classificação da doença em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem-se à média±desvio padrão ($p=0,001$ - ANOVA). As letras representam a diferença estatística significativa em comparação aos grupos. (a) Primoinfectados X reinfectedos ($p<0,05$); (b) Reinfectedos X recaída ($p<0,05$). (Teste de Tukey de comparação múltipla das médias).

A temperatura axilar também influenciou os níveis de apoptose, uma vez que pacientes com temperatura axilar $\leq 37,3^{\circ}\text{C}$ ($57 \pm 16,3$) apresentaram % maior de células apoptóticas do que pacientes com temperatura $\geq 37,4^{\circ}\text{C}$ ($39,4 \pm 21,8$) (Figura 20).

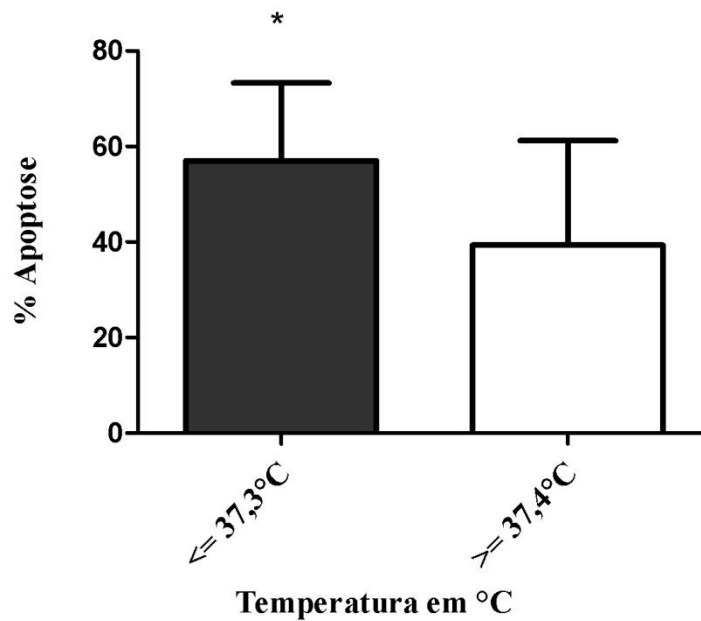


Figura 20 - Frequência de apoptose em relação à temperatura axilar em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Os dados referem-se a (% média $\pm$ desvio padrão); * $p = 0,004$ - Teste Mann-Whitney.

O número de malárias anteriores e o número de dias dos sintomas não influenciaram significativamente na frequência de células apoptóticas neste estudo.

Todos os dados em relação às características clínicas da doença e apoptose estão representados na Tabela 13.

Uma possível correlação entre os parâmetros hematológicos e a frequência da apoptose também foram investigadas, mas não houve qualquer correlação significativa (Anexo 5).

Tabela 13 - Apoptose segundo as características clínicas da doença em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*.

Características		Pacientes (n= 80)		Apoptose	p
		n	%	% Média±DP	
Parasitemia	<=1/2 +	12	15	27,7 ±22,9	p=0,01 ¹
	+	12	15	31,5 ±19,8	
	++	41	51,3	41,3 ±19,7	
	+++	15	18,7	51,1 ±22,5	
Classificação da doença	Primoinfecção	20	25	42,1 ±20,5	p=0,02 ¹
	Reinfecção	19	23,7	27,3 ±13,9	
	Recaída	11	13,8	52,9 ±18,6	
	Não classificado	30	27,5	40,9 ±24,5	
Número de malária anterior	0	20	25	42,1 ±20,5	p=0,19 ¹
	1 --- 3	30	37,5	37,7 ±22,4	
	3 --- 6	11	13,75	51,3 ±20,5	
	6 ---9	7	10	29 ±19,1	
	≥9	12	13,75	35,7 ±22,7	
Nº de dias sintomas	0 --- 3	21	26,2	38,6 ±23,6	p=0,09 ¹
	3 --- 6	35	43,8	34 ±20,5	
	6 --- 9	13	16,3	44,2 ±22	
	9 --- 12	6	7,5	53,9 ±13,5	
	12 --- 15	5	6,2	53,7 ±19,8	
*Temperatura axilar °C	≤37,3	28	52,8	57±16,3	p=0,004 ²
	≥37,4	25	47,2	39,4±21,8	

¹Teste Kruskal Wallis; ²Teste Mann-Whitney; DP – desvio padrão; * n=53.

5 Discussão

O *Plasmodium vivax* é a principal espécie que acomete o Brasil, sendo responsável por 83,7% dos casos registrados. Hoje, no país a incidência da malária está exclusivamente (99,8% dos casos) restrita à Região Amazônica, incluindo o estado do Mato Grosso – MT (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Durante a infecção da malária ocorre a produção das ROS, tanto pela ativação do sistema imune em resposta aos estímulos antigênicos, como pela própria degradação da hemoglobina pelo parasita (KHARAZMI *et al.*, 1987).

Em estudos recentes, o estresse oxidativo foi considerado uma perspectiva toxicológica devido as ROS reagir e modificar a estrutura e funções de várias biomoléculas, incluindo proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucleicos (CASTRO & FREEMAN, 2001). Por outro lado, é também reconhecido que as ROS desempenham papéis fisiológicos importantes, como na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, entre outros (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O reconhecimento de marcadores de dano oxidativo e a análise do balanço redox podem ser úteis para o reconhecimento dos processos patológicos da infecção malárica, bem como na fisiopatologia da doença e na resposta farmacológica terapêutica.

Neste trabalho, um dos objetivos foi avaliar a influência do estresse oxidativo e dano no DNA em pacientes infectados com malária causada pelo *P. vivax*.

Em relação às características dos indivíduos, houve maior frequência de fumantes entre os pacientes em relação aos controles ($p=0,001$), o que não é inesperado, já que os

indivíduos controles são doadores de sangue e apresentam hábitos mais saudáveis. Embora o fumo aumente significativamente o dano oxidativo no DNA (BALLINGER *et al.*, 1996), no presente estudo o hábito tabagista não influenciou os resultados (Tabela 10).

Os parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina e hematócrito), dos pacientes foram significativamente menores em relação ao grupo controle. No entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre os leucócitos totais e a frequência de monócitos (Tabela 2). A diminuição dos parâmetros (hemácias, hemoglobina e hematócrito) está de acordo com outros estudos (ANSTEY *et al.*, 2009; BASHAWRI *et al.*, 2002). A diminuição desses parâmetros é devido a própria patobiologia do parasita, que invade as células eritrocíticas e aí realiza parte do seu ciclo biológico. Além disso, a resposta imune do hospedeiro, que é mediada pela liberação de citocinas e pelo aumento do estresse oxidativo, contribui para o processo anêmico (HANDAYANI *et al.*, 2009; WICKRAMASINGHE *et al.*, 1989).

A média dos leucócitos totais e das frequências (%) dos neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos dos pacientes obtidos neste estudo encontram-se dentro dos valores de referência dos indivíduos normais (HIDEMI *et al.*, 1989). No entanto, em comparação com os controles, a frequência (%) dos neutrófilos apresentou-se maior em relação aos controles e as frequências dos linfócitos e eosinófilos estavam menores. Esses dados são semelhantes aos descritos por BASHAWRI *et al.*, (2002), que demonstraram em 78,3% dos pacientes os leucócitos totais estavam dentro dos valores normais de referência; da mesma forma, apresentavam frequência normal de neutrófilos, eosinófilos e monócitos (67,9%, 57,2% e 66,6% respectivamente), enquanto 47,1% apresentaram o número dos linfócitos dentro dos parâmetros normais.

Com relação às plaquetas, observou-se uma diminuição significativa no grupo dos pacientes. O valor normal considerado foi igual ou maior a $140.000/\text{mm}^3$ (FAROGH *et al.*,

2009). HIDEIMI *et al.*, (1989) inclui como alteração hematológica a diminuição das plaquetas nos pacientes maláricos e este fato foi observado por alguns autores como BASHAWRI *et al.*, (2002) e SINGH *et al.*, (2011). A trombocitopenia na malária tem sido atribuída ao sequestro esplênico, redução da sobrevivência das plaquetas e diminuição na sua produção (SINGH, H. *et al.*, 2011), bem como às reações imunológicas (YAMAGUCHI *et al.*, 1997) e ao aumento do estresse oxidativo (EREL *et al.*, 2001).

A avaliação do estresse oxidativo no presente estudo foi realizado através das atividades das enzimas antioxidantes (GPx e SOD), bem como pela concentração do MDA.

A GPx apresentou-se aumentada significativamente quando comparada aos controles, enquanto a SOD não sofreu alteração no grupo de pacientes em relação ao grupo controle. Embora a atividade da SOD esteja aumentada significativamente no grupo de pacientes com faixa etária entre 28-35 anos em relação aos grupos com faixa etária entre 21-28 anos e 42-49 anos (Figura 11), e também no grupo de pacientes que estavam com 9-11 dias de sintomas em relação ao grupo com 3-5 dias de sintomas (Figura 12), isso provavelmente reflete diferenças fisiológicas individuais, mas do que um efeito da doença, uma vez que é bem conhecido que cada célula pode determinar suas próprias atividades, bem como seu desenvolvimento bioquímico, de acordo com as influências internas e externas (NAOUM & DOMINGOS, 1997).

Houve também uma diminuição significativa da atividade da SOD em pacientes com temperatura $\geq 37,3^{\circ}\text{C}$ em comparação com temperatura $\leq 37,3^{\circ}\text{C}$. O aumento da temperatura nos pacientes maláricos está relacionado ao paroxismo da doença, que por sua vez aumenta a resposta imune celular com maior produção das ROS (LANGHORNE, 2005) e, conseqüentemente, com diminuição do sistema antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Portanto, a menor atividade dessa enzima detectada nesse grupo provavelmente se deve ao consumo da mesma pelo aumento das ROS.

Segundo CLARK & HUNT, (1983), a presença do estresse oxidativo seria indicada pela diminuição das enzimas antioxidantes, e não pelo seu aumento, como demonstrado pela GPx.

No entanto, no presente estudo observou-se um aumento significativo do MDA no grupo dos pacientes. Essa é uma forte evidência de que realmente houve estresse oxidativo no grupo dos pacientes. ANTUNES *et al.*, (2008), demonstraram que o aumento da concentração de MDA nos sistemas biológicos é um importante biomarcador na avaliação do estresse oxidativo. A presença do estresse oxidativo pelo aumento dos níveis de MDA e a não redução das enzimas antioxidantes em nosso estudo, contraria o que tem sido relatado anteriormente por KULKARNI *et al.*, (2003), os quais encontraram diminuição dos níveis de antioxidantes durante a infecção malárica, sendo essa redução responsável pelo aumento do estresse oxidativo. Por outro lado, foi observada uma correlação negativa (Figura 8), entre o MDA e SOD demonstrando que o aumento do MDA (estresse oxidativo) leva a diminuição da atividade da enzima antioxidante (SOD), mas quando avaliamos a atividade média da SOD dos pacientes em relação aos controles não houve significância.

Na infecção malárica, uma das fontes das ROS é a degradação da hemoglobina do hospedeiro pelo parasita, com a formação do composto ferroprotoporfirina (FP), que é tóxica para o parasita. Para manter o equilíbrio redox nas células, os parasitas possuem mecanismos de defesas antioxidantes, principalmente compostos pelas enzimas glutatona e superóxido dismutase (BECKER *et al.*, 2004). Outro ponto a ser considerado é que o *Plasmodium* produz GPx em resposta a ROS geradas durante a degradação da hemoglobina (GAMAIN *et al.*, 1996; ATAMNA & GINSBURG, 1997). Uma vez que não é possível diferenciar a atividade enzimática das células dos hospedeiros e do parasita pela técnica utilizada, pode-se sugerir que a ausência da diminuição da atividade da mesma seja devida

ao aumento da produção pelos parasitas. De fato, PABON *et al.*, (2003), encontraram resultados elevados do MDA e GPx em pacientes com malária.

Assim, a avaliação do estresse oxidativo no presente estudo sugere o seu envolvimento nas diversas condições fisiológicas e patológicas hospedeiro-parasita na infecção malárica. Desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes pode levar a alterações em macromoléculas (DNA, proteínas, açúcares e lipídeos) com efeitos genotóxico, citostático e citotóxico sobre as células.

O dano no DNA, mensurado pelo “Tail moment”, nos pacientes foi significativamente maior em relação ao grupo controle. Uma vez que também foi demonstrado um aumento do estresse oxidativo, é possível que este possa estar influenciando esses achados.

O dano no DNA pode ocorrer em consequência dos ataques dos radicais livres decorrentes das fontes exógenas ou endógenas, sendo as ROS a principal fonte interna, liberada principalmente durante a respiração ou pelos leucócitos, durante a defesa contra microorganismos (GEDIK *et al.*, 2002). Na infecção malárica, como já descrita, as principais fontes das ROS são provenientes principalmente da resposta imune do hospedeiro e pela degradação da hemoglobina pelo parasita. Dentre as espécies reativas produzidas nesses processos, o radical $\text{OH}^\cdot$ é o mais reativo e o mais lesivo ao DNA, causando modificação de bases e quebra de fitas duplas (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A presença simultânea de ROS e dano no DNA com frequência não tem sido investigada na infecção pelo *Plasmodium*, embora EZE *et al.*, (1990) tenha hipotetizado que as ROS, quando não são eliminadas adequadamente, podem causar dano no DNA na células dos pacientes com malária. Somente MEDANA *et al.*, (2001), demonstraram a presença de estresse oxidativo e dano no DNA em cérebros de pacientes com *P.*

falciparum. O presente estudo é o primeiro a demonstrar que o dano no DNA pode ser uma consequência também da infecção não grave por *P. vivax*.

Em resposta ao dano no DNA, as células induzem várias respostas, incluindo o reparo livre de erros; o reparo com erros, morte celular por citotoxicidade e apoptose, modulação da expressão de genes e controle do ciclo celular (MOUSTACCHI, 2000).

Para avaliar a resposta ao dano no DNA no presente estudo, mensuramos a apoptose. Os resultados demonstraram que houve um aumento significativo da apoptose, em células mononucleares em tempo real (ex-vivo) dos pacientes, em relação aos controles ($p < 0,0001$).

A apoptose celular é iniciada por sinais extracelulares ou intracelulares e é desencadeada por duas vias, a receptor de morte na membrana celular e pela via mitocondrial. O aumento da ROS intracelular desencadeia sinais para a morte celular através da via mitocondrial (CIRCU & AW, 2010).

Uma vez que, o aumento das ROS leva ao dano no DNA, com consequência a apoptose, neste estudo o aumento das células apoptóticas dos pacientes devem estar ocorrendo pela via mitocondrial. Por outro lado, a resposta imune do hospedeiro, ativando a via extrínseca, também pode ter influenciado o aumento de apoptose, uma vez que a ativação da caspase-3 ocorre nas duas vias, à intrínseca e extrínseca (CIRCU & AW, 2010).

Considerando o exposto, a diminuição dos linfócitos circulantes no sangue periférico dos pacientes observada no presente estudo, pode estar relacionada com a apoptose dessas células. Vários estudos relatam a apoptose induzida via por receptores de membrana (Fas) como sendo uma importante causa de linfopenia na infecção malárica (KERN *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2000), embora, ELHASSAN *et al.*, (1994) sugerem que a linfopenia possa ser resultado da realocação das células T para o sítio de

infecção. Mediante esses relatos, os mecanismos que levam a linfopenia na infecção malárica ainda precisam ser esclarecidos. Então com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se sugerir que o aumento das ROS implica em dano no DNA, que pode estar induzindo a apoptose dessas células (linfócitos) pela via intrínseca.

Além disso, a apoptose foi influenciada pela parasitemia, pois à medida que a parasitemia aumenta houve o aumento da apoptose. Durante o ciclo eritrocítico do parasita ocorre um grande envolvimento das células T, com grande produção de citocinas e ROS em resposta aos antígenos plasmodiais e pela fagocitose dos parasitas (LANGHORNE, 2005). KERN *et al.*, observaram que os níveis do TNF em pacientes com malária está diretamente correlacionada com a carga parasitária. O aumento das citocinas como o TNF devem estar influenciando a apoptose dessas células principalmente pela via extrínseca. Segundo CIRCU & AW, (2010), o receptor de morte TNF Receptor 1 (TNFR1) media a maior função biológica do TNF- α na sinalização da célula para a apoptose.

BIENVENU *et al.*, (2010), demonstraram que, na infecção por *Plasmodium*, a apoptose das células do sistema de defesa pode ser benéfica para o hospedeiro, pois a eliminação dessas células evitaria os efeitos excessivos da resposta inflamatória sobre os tecidos pelas ROS e pelas citocinas pró-inflamatórias; por outro lado, esse processo também acarretaria em benefício para o parasita, pela limitação do potencial do hospedeiro para o desenvolvimento da resposta imune protetiva. RICCIO *et al.*, (2003), observaram que as infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* podem resultar na apoptose das células mononucleares, referindo esse fenômeno a regulação da resposta imune. O estudo revelou ainda que as células T dos pacientes, quando cultivadas *in vitro* com estímulos antigênicos, aumentam o nível de antígeno Fas, sendo as células mais susceptíveis a apoptose com mediação do sistema Fas/Fas L. TOURE-BALDE, (1996) e KERN *et al.*, (2000), observaram que a exposição das células mononucleares a extratos de *P. falciparum*

aumentam a expressão na membrana celular do antígeno CD95 e dos níveis do solúvel ligante Fas (sFasL). Os níveis elevados do sFasL está correlacionado significativamente com a diminuição dos linfócitos, sugerindo que a apoptose induzida pelo Fas tem um importante papel na diminuição dessas células.

Apesar de essas evidências apontarem a implicação da via extrínseca na apoptose dos linfócitos na malária, não podemos deixar de relatar que o aumento da parasitemia também está associado ao aumento da degradação da hemoglobina pelos parasitas, com conseqüente aumento das ROS (BECKER *et al.*, 2004), sugerindo uma maior produção dos radicais $\text{OH}^\cdot$. Como anteriormente descrito, isso pode levar ao dano no DNA nessas células, tendo como resposta a sinalização para a apoptose pela via mitocondrial.

A apoptose foi significativamente maior nos pacientes com temperatura axilar $\leq 37,3^\circ\text{C}$ em relação aos pacientes com temperatura $\geq 37,4^\circ\text{C}$. Durante o percurso clínico da malária ocorre o paroxismo, que é o episódio de febre acompanhado por calafrio e tremor. Este evento ocorre em média uma vez a cada 48 horas e coincide com o ciclo eritrocítico na ruptura dos esquizontes, bem como com a elevação das citocinas, como o TNF (MENDIS & CARTER, 1992). Conforme descrito acima a elevação da citocina, TNF está envolvida no mecanismo que desencadeia a apoptose pela via receptores de membrana (TNFR1). Os resultados obtidos mostraram que apoptose nos pacientes foi maior no momento em que temperatura estava $\leq 37,3^\circ\text{C}$; isso implica que os efeitos citotóxicos e citostáticos precisam de um período de tempo para apresentar essa resposta celular. Além disso, ainda é possível sugerir que as ROS possam estar influenciando no processo apoptótico, já que as mesmas aumentam durante o processo de resposta imune celular. De fato, o dano no DNA (TM), SOD, GPx estavam maiores nos pacientes com temperatura $\leq 37,3^\circ\text{C}$, enquanto o MDA estava menor. Isso sugere que, no curso clínico da malária a temperatura exerce um papel importante para os efeitos citotóxicos e citotásticos nas células, pois podemos concluir que

a diminuição das enzimas antioxidantes com a elevação da temperatura poderia implicar no aumento do estresse oxidativo pelas ROS, consequentemente, seus efeitos estão sendo observados tardiamente como encontrados em nosso estudo pelo aumento do dano no DNA (TM) nos pacientes com a temperatura $\leq 37,3^{\circ}\text{C}$.

A apoptose e o dano no DNA (TM)/MDA apresentaram uma correlação negativa ($r = -0,30$ e $r = -0,34$). Neste estudo, evidenciamos que a apoptose das células mononucleares dos pacientes com malária causada pelo *P. vivax*, só aumentaram quando o dano no DNA e MDA estavam diminuídos, ou seja, essas células necessitam de um período para responderem ao aumento do estresse oxidativo, que consequentemente induziu o dano no DNA, e direcionou a célula a apoptose. LIU *et al.*, (2008) evidenciaram que a resposta celular em relação ao dano no DNA, quando não reparado, orchestra a sinalização de numerosos genes direcionando a célula para estender o ciclo celular, senescência ou apoptose. Além disso, associou a geração das ROS em relação à sinalização celular, através da proteína de supressão tumoral p53, que mantém integridade genômica e previne a propagação do dano no DNA.

6 Conclusão

A infecção por *P. vivax* diminuiu os parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, linfócitos e eosinófilos). Além disso, a infecção é acompanhada pelo aumento do estresse oxidativo, conforme demonstrado pelo aumento do MDA, pela elevação da defesa antioxidante da enzima GPx, e também pelo aumento do dano no DNA e da apoptose em células mononucleares nesses pacientes.

As características clínicas da doença, classificação, parasitemia e temperatura axilar contribuíram para o processo apoptótico. Houve correlação negativa entre o dano no DNA/MDA e apoptose.

Por fim, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o aumento do estresse oxidativo que ocorre na infecção por *P. vivax* pode ter como consequência o aumento do dano no DNA das células do hospedeiro. Considerando que a apoptose é um dos mecanismos de resposta ao dano no DNA, este pode ter contribuído para a elevação da apoptose nas células desses pacientes, somando-se a ativação da via extrínseca demonstrada anteriormente.

7 Referências

ANSTEY, N. M.; RUSSELL, B.; YEO, T. W.; PRICE, R. N. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 220-227, 2009.

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

ARAÚJO, C. F.; LACERDA, M. V. G.; ABDALLA, D. S. P.; LIMA, E. S. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 517-521, 2008.

ARIBOT, G.; ROGIER, C.; SARTHOU, J. L. *et al.* Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 5, p. 449-57, 1996.

ATAMNA, H.; GINSBURG, H. The malaria parasite supplies glutathione to its host cell - Investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. **European Journal of Biochemistry**, v. 250, p. 670-679, 1997.

BALLINGER, S. W.; BOUDER, T. G.; DAVIS, G. S. Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking. **Cancer Research**, v. 56, p. 5692-5697, 1996.

BASHAWRI, L. A. M.; MANDIL, A. A.; BAHNASSY, A. A.; AHMED, M. A. Malaria: hematological aspects. **Annals of Saudi medicine**, v. 22, n. 5-6, p. 372-6, 2002.

BECKER, K.; TILLEY, L.; VENNERSTROM, J. L. *et al.* Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 163-189, 2004.

BIENVENU, A.-L.; GONZALEZ-REY, E.; PICOT, S. Apoptosis induced by parasitic diseases. **Parasites & Vectors**, v. 3, 2010.

CASTRO, L.; FREEMAN, B. Reactive oxygen species in human health and disease. **Nutrition**, v. 17, p. 161-165, 2001.

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

CLARK, I. A.; HUNT, N. H. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 1-6, 1983.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **Faseb Journal**, v. 17, p. 1195-1214, 2003.

ELHASSAN, I. M.; HVIID, L.; SATTI, G. *et al.* Evidence of endothelial inflammation, t-cell activation, and t-cell reallocation in uncomplicated plasmodium-falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 372-379, 1994.

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

EZE, M. O.; HUNTING, D. J.; OGAN, A. U. Reactive oxygen production against malaria--a potential cancer risk factor. **Medical Hypotheses**, v. 32, p. 121-3, 1990.

FAROGH, A.; QAYYUM, A.; HALEEM, A.; A, G. Haematological abnormalities in malaria. **Biomedica**, v. 25, p. 4, 2009

GAMAIN, B.; ARNAUD, J.; FAVIER, A. *et al.* Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, p. 559-565, 1996.

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

GEDIK, C. M.; BOYLE, S. P.; WOOD, S. G.; VAUGHAN, N. J.; COLLINS, A. R. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1441-1446, 2002.

GOOD, M. F. Immunological responses from non-exposed donors to malaria antigens - implications for immunity and pathology. **Immunology Letters**, v. 41, p. 123-125, 1994.

GOOD, M. F.; CURRIER, J. The importance of t-cell homing and the spleen in reaching a balance between malaria immunity and immunopathology - the molding of immunity by early exposure to cross-reactive organisms. **Immunology and Cell Biology**, v. 70, p. 405-410, 1992.

GOOD, M. F.; ZEVERTING, Y.; CURRIER, J.; BILSBOROUGH, J. Original antigenic sin, t-cell memory, and malaria sporozoite immunity - an hypothesis for immune evasion. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 187-193, 1993.

GREVE, B.; KREMSNER, P. G. Malarial anemia in African children associated with high oxygen-radical production (vol 355, pg 40, 2000). **Lancet**, v. 355, p. 758-758, 2000.

GUHA, M.; KUMAR, S.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; BANDYOPADHYAY, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. **Faseb Journal**, v. 20, p. 1224-1226, 2006.

HANDAYANI, S.; CHIU, D. T.; TJITRA, E. *et al.* High Deformability of Plasmodium vivax-Infected Red Blood Cells under Microfluidic Conditions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 445-450, 2009.

HIDEMI, E.; KARAZAWA, I.; JAMRA, M. NORMAL HEMATOLOGICAL PARAMETERS. **Revista De Saude Publica**, v. 23, p. 58-66, 1989.

JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; IWASAKI, T.; SATA, T.; KANBARA, H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 2211-2213, 2004.

KASSA, D.; PETROS, B.; MESELE, T.; HAILU, E.; WOLDAY, D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 376-379, 2006.

KERN, P.; DIETRICH, M.; HEMMER, C.; WELLINGHAUSEN, N. Increased levels of soluble Fas ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3061-3063, 2000.

KHARAZMI, A.; JEPSEN, S.; ANDERSEN, B. J. Generation of reactive oxygen radicals by human phagocytic-cells activated by *plasmodium-falciparum*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 25, p. 335-341, 1987.

KULKARNI, A. G.; SURYAKAR, A. N.; SARDESHMUKH, A. S.; RATHI, D. B. Studies on biochemical changes with special reference to oxidant and antioxidants in malaria patients. **Indian Journal Clinic Biochemical**, v. 18, p. 136-149, 2003.

LANGHORNE, J. **Immunology And Immunopathogenesis of Malaria**. [S.l.]: Springer, 2005.

LIU, B.; CHEN, Y.; CLAIR, D. K. S. ROS and p53: A versatile partnership. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 1529-1535, 2008.

MATSUMOTO, J.; KAWAI, S.; TERAOKA, K. *et al.* Malaria infection induces rapid elevation of the soluble fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: Possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to Plasmodium coatneyi infection. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1183-1188, 2000.

MENDIS, K. N.; CARTER, R. The role of cytokines in Plasmodium vivax malaria. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 51-55, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. (S. de V. em Saúde, Ed.). Brasília: Ministério da Saúde. , 2005

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Guia de vigilância epidemiológica**. [S.l.]: Ministério da Saúde, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **datasus - sivep-malaria**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_conf_malaria_seg_mes_not_bra_gr_e_ufs_09.pdf > Acesso em: 20 maio. 2012.

MOUSTACCHI, E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. **Mutation Research**, v.464(1), p. 35-40, 2000.

MULLER, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 1291-1305, 2004.

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B. Avaliação laboratorial dos produtos e sub-produtos indicativos da elevação de radicais livres e espéciesativadas de oxigênio. **UNICIências**, v. 1 (1), p. 121-126, 1997.

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

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced dna damages in individual mammalian-cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

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

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of chromatography B: Biomedical sciences and applications**, v. 742, n. 2, p. 315-25, 2000.

RICCIO, E. K. P.; NEVES, I.; RICCIO, L. R. P. *et al.* Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. **Parasitology Research**, v. 90, p. 9-18, 2003.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, p. 440-450, 2006.

SADANAND, S. C.-3002152. Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs. **Yale Journal Biology and Medicine**, v. 83, p. 185-91, 2010.

SINGH, H.; PARAKH, A.; BASU, S.; RATH, B. Plasmodium vivax malaria: is it actually benign? **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, p. 91-5, 2011.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A SIMPLE TECHNIQUE FOR QUANTITATION OF LOW-LEVELS OF DNA DAMAGE IN INDIVIDUAL CELLS. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TOURE-BALDE, A.; SARTHOU, J. L.; ARIBOT, G. *et al.* Plasmodium falciparum induces apoptosis in human mononuclear cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 744-750, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. DE F. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

WHO, W. H. O. **Malaria | What is Malaria?** Disponível em:

<<http://www.searo.who.int/en/Section10/Section21/Section334.htm>>. Acesso em: 20 maio. 2012a.

WHO, W. H. O. **Malaria-Historical Background.** Disponível em:

<http://www.searo.who.int/en/Section10/Section21/Section334_4008.htm>. Acesso em: 20 maio, 2012.

WICKRAMASINGHE, S. N.; LOOAREESUWAN, S.; NAGACHINTA, B.; WHITE, N. J. Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in plasmodium-vivax malaria. **British journal of haematology**, v. 72, p. 91-99, 1989.

WOOLLIAMS, J. A.; WIENER, G.; ANDERSON, P. H.; MCMURRAY, C. H. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. **Research in veterinary science**, v. 34, n. 3, p. 253-6, maio 1983.

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

YAMAGUCHI, S.; KUBOTA, T.; YAMAGISHI, T. *et al.* Severe thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms in two cases of vivax malaria. **American Journal of Hematology**, v. 56, p. 183-186, 1997.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

8 Anexos

Anexo 1

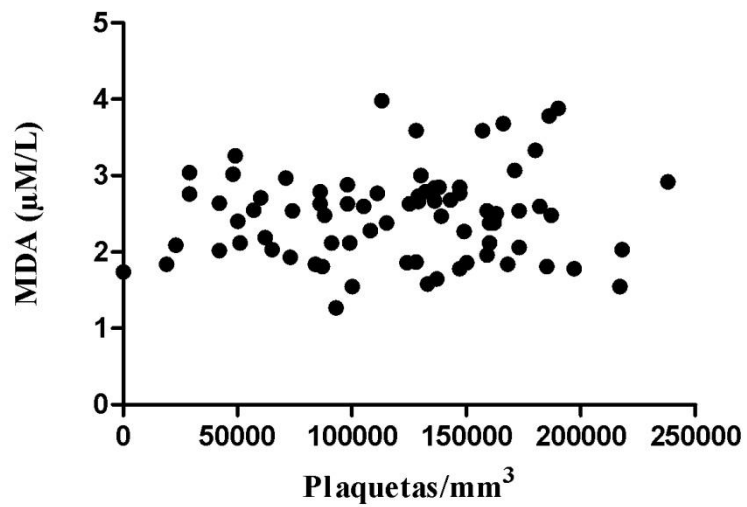


Figura 1a. Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação a plaquetas/ mm^3 em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Pearson $r = 0,11$ (IC: -0,12 a 0,32); $p=0,348$ e $n=77$.

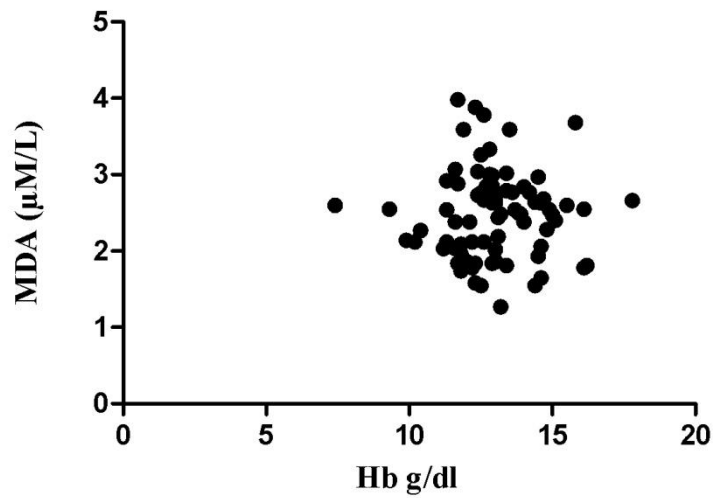


Figura 1b. Concentração de MDA($\mu\text{M/L}$) em relação a concentração de Hb g/dl em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Pearson $r = 0,0006$ (IC: -0,22 a 0,22); $p=0,995$ e $n=80$.

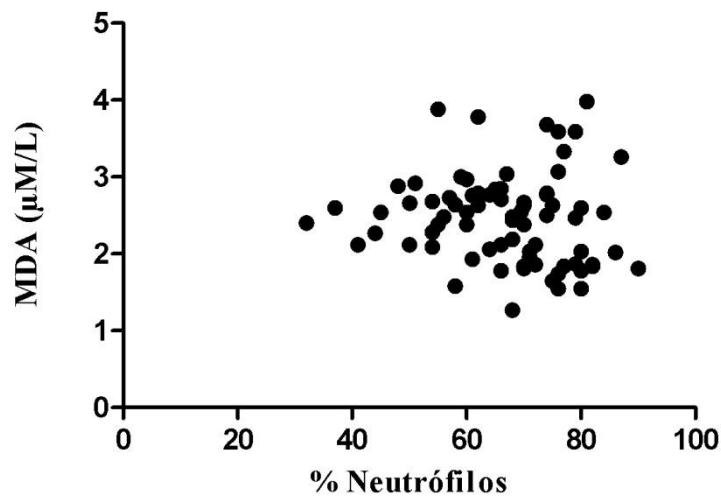


Figura 1c. Concentração de MDA ($\mu\text{M/L}$) em relação ao valor relativo de neutrófilos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Pearson $r = -0,09$ (IC: -0,31 a 0,13); $p=0,419$ e $n= 76$.

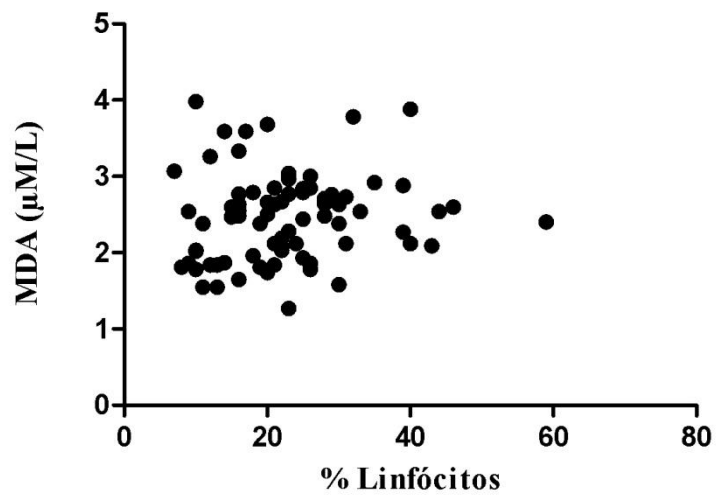


Figura 1d. Concentração de MDA em relação ao valor relativo de linfócitos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Pearson $r = 0,12$ (IC= -0,11 a 0,33); $p = 0,305$ e $n = 76$)

Anexo 2

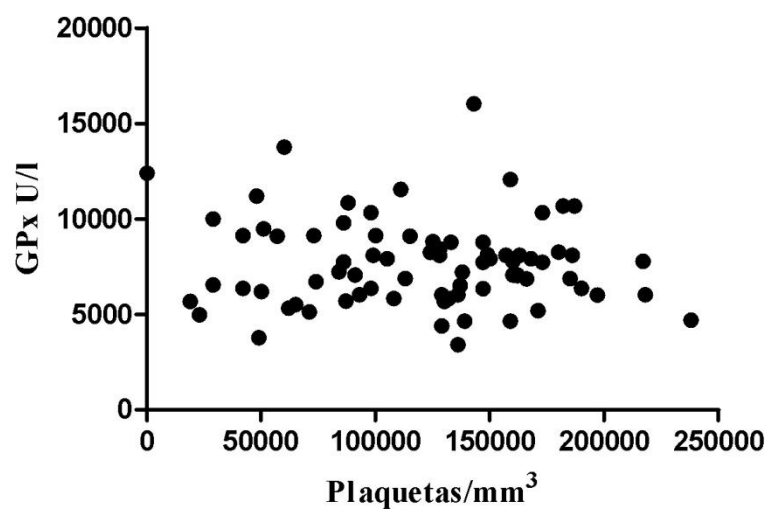


Figura 2a. Atividade da GPx (U/l) em relação a plaquetas/mm³ em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,04$ (IC: -0,27 a 0,19); $p=0,719$ e $n=77$.

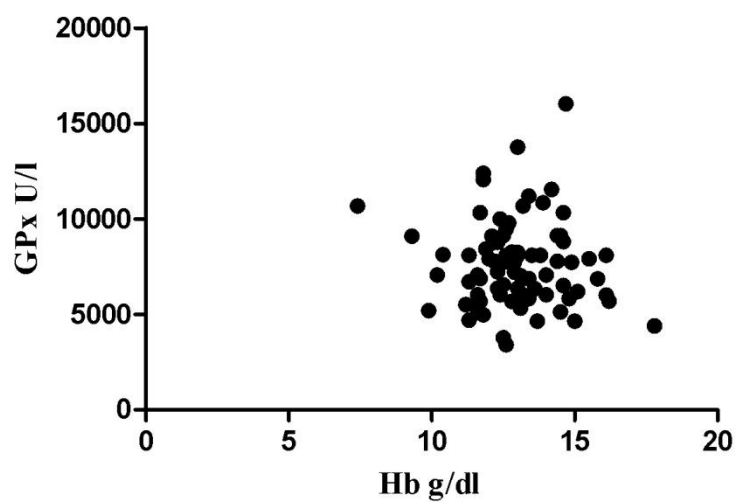


Figura 2b. Atividade de GPx (U/l) em relação a concentração de Hb g/dl em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,05$ (IC: $-0,27$ a $-0,17$); $p=0,636$ e $n=80$.

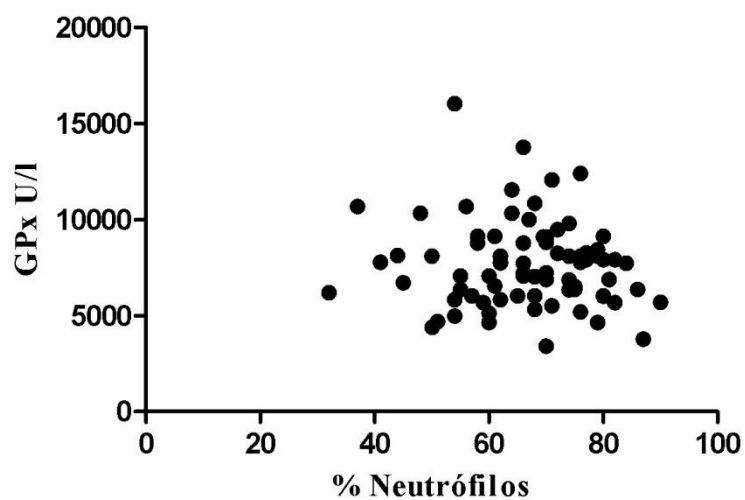


Figura 2c. Atividade da GPx (U/l) em relação ao valor relativo de neutrófilos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,06$ (IC: $-0,29$ a $0,17$); $p=0,593$ e $n= 76$

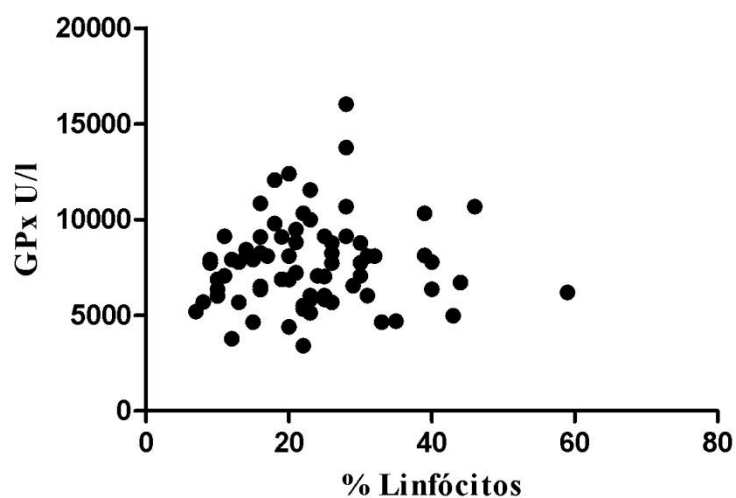


Figura 2d. Atividade da GPx (U/l) em relação ao valor relativo de linfócitos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = 0,09$ (IC= -0,14 a 0,31); $p = 0,435$ e $n=76$)

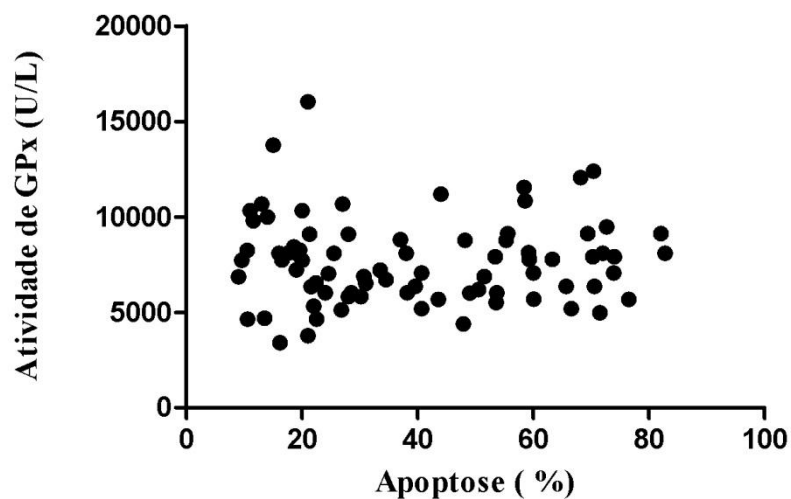


Figura 2e. Atividade da GPx (U/L) em relação a apoptose em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,008$ (IC= -0,23 a 0,21); $p=0,939$ e $n=80$

Anexo 3

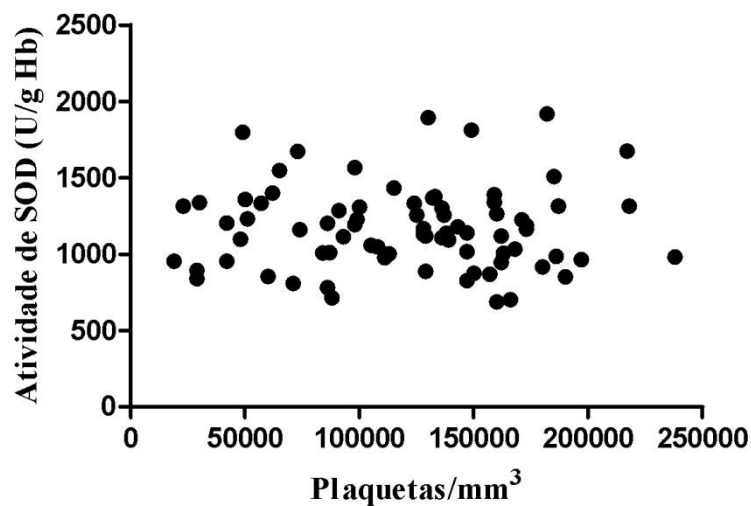


Figura 3a. Atividade da SOD (U/g Hb) em relação a plaquetas/mm³ em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,035$ (IC: -0,26 a 0,19); $p=0,757$ e $n=77$.

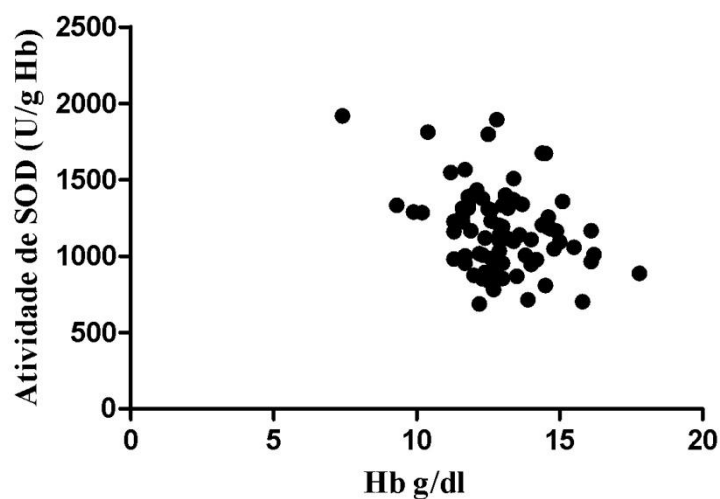


Figura 3b. Atividade de SOD (U/g Hb) em relação a concentração de Hb g/dl em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,23$ (IC: -0,44 a -0,01); $p=0,034$ e $n=80$.

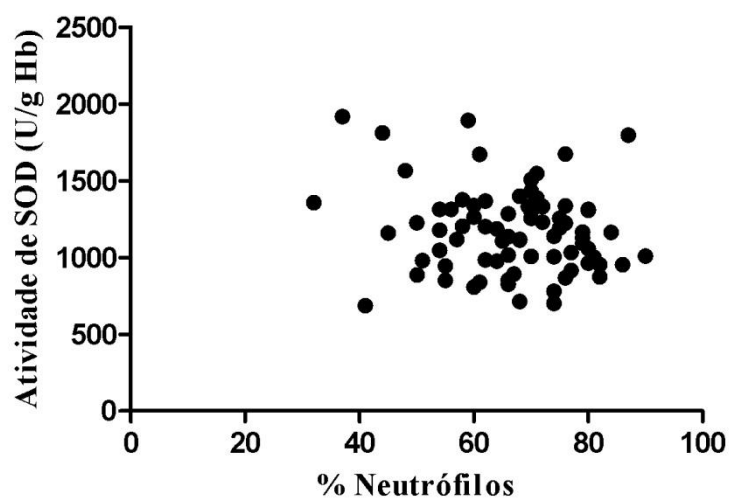


Figura 3c. Atividade da SOD (U/g Hb) em relação ao valor relativo de neutrófilos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Pearson $r = 0,12$ (IC: -0,34 a 0,11); $p=0,297$ e $n=76$.

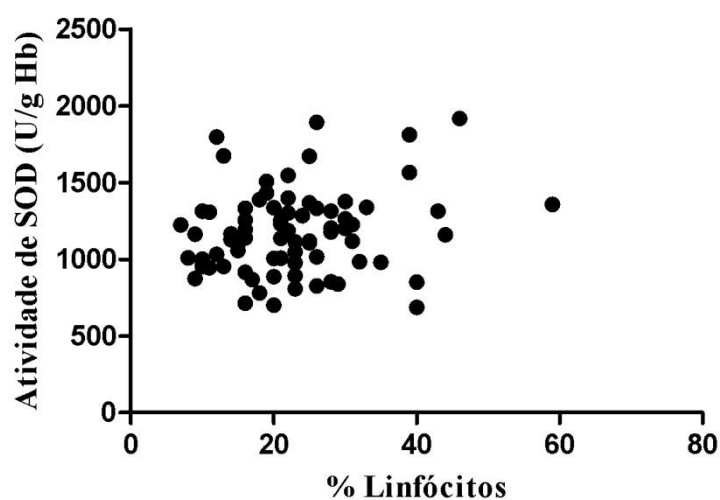


Figura 3d. Atividade da SOD (U/g Hb) em relação ao valor relativo de neutrófilos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Pearson $r = 0,16$ (IC: -0,07 a 0,38); $p=0,156$ e $n=76$.

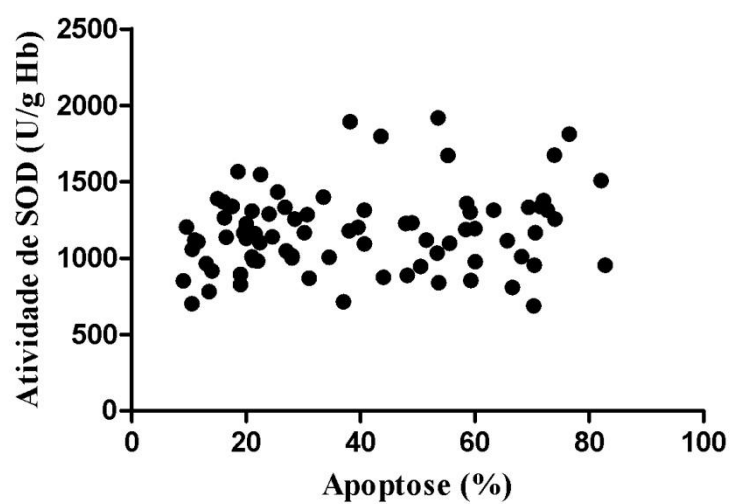


Figura 3e. Atividade da SOD (U/g Hb) em relação a apoptose em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = 0,16$ (IC= -0,06 a 0,38); $p=0,138$ e $n=80$.

Anexo 4

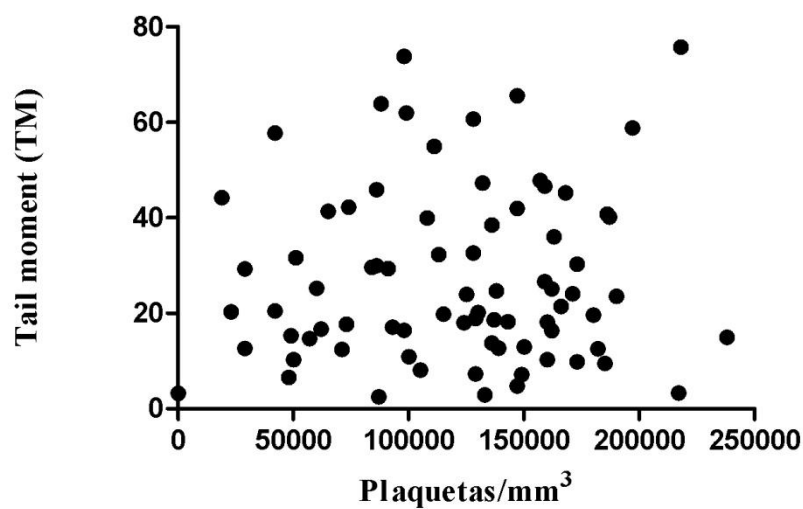


Figura 4a. Dano ao DNA (Tail moment) em relação a plaquetas/mm³ em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = 0,03$ (IC: -0,20 a 0,25); $p=0,791$ e $n=77$.

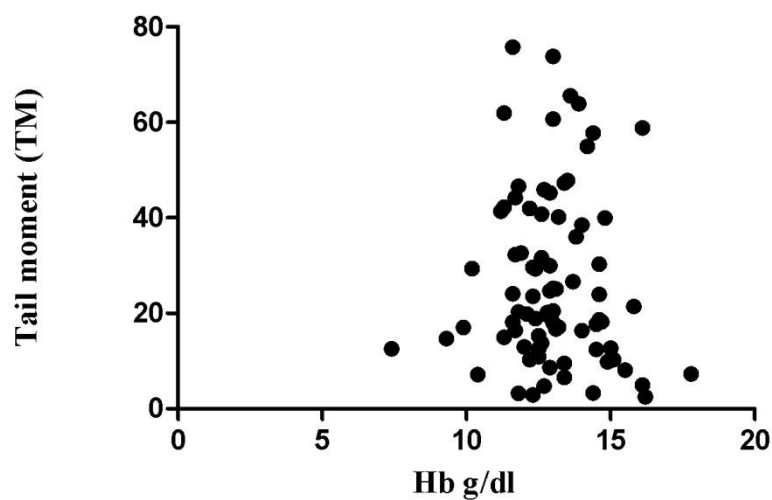


Figura 4b. Dano ao DNA (Tail moment) em relação a concentração de Hb g/dl em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,08$ (IC: -0,30 a 0,14); $p=0,470$ e $n=80$.

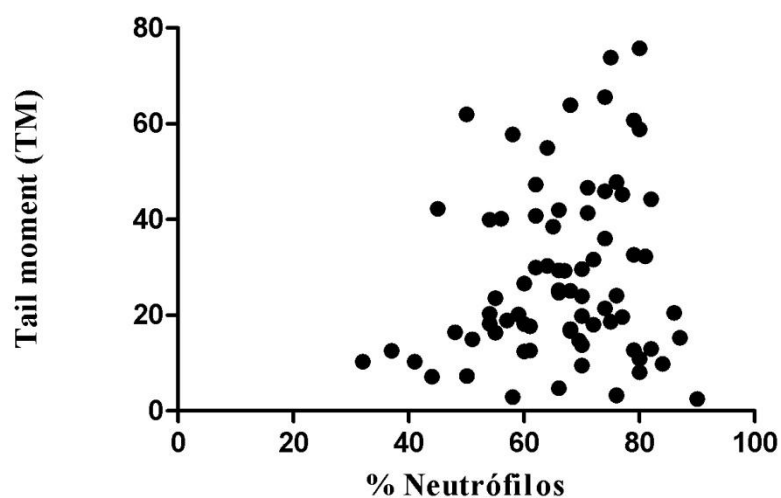


Figura 4c. Dano ao DNA (Tail moment) em relação ao valor relativo de neutrófilos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = 0,10$ (IC: $-0,13$ a $0,32$); $p=0,378$ e $n= 76$.

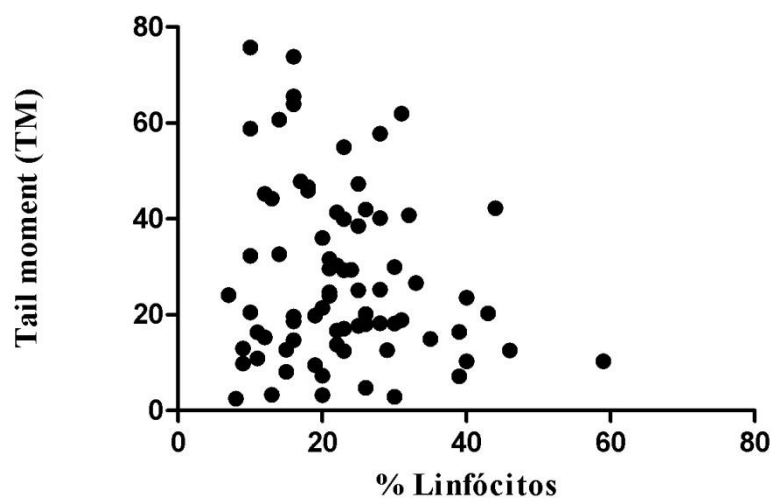


Figura 4d . Dano ao DNA (Tail moment) em relação ao valor relativo de linfócitos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,08$ (IC= $-0,30$ a $0,15$); $p= 0,504$ e $n=76$)

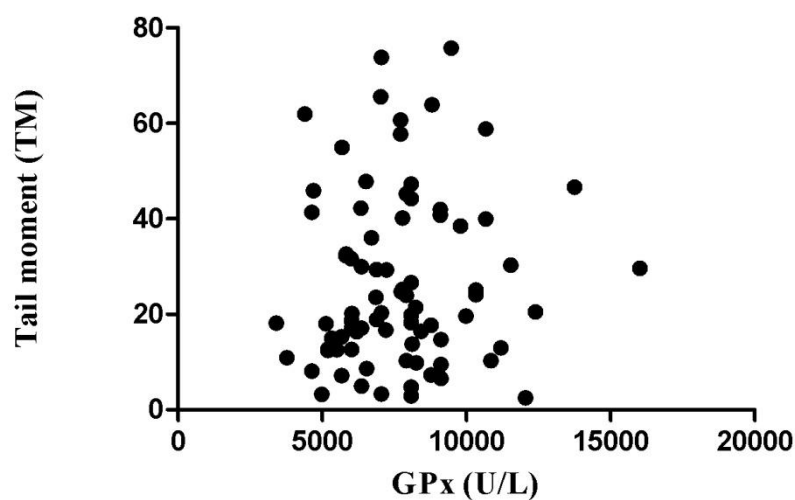


Figura 4e. Dano ao DNA (TM) em relação a atividade de GPx (U/L) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = 0,08$ (IC= -0,31 a 0,31); $p = 0,434$ e $n = 80$.

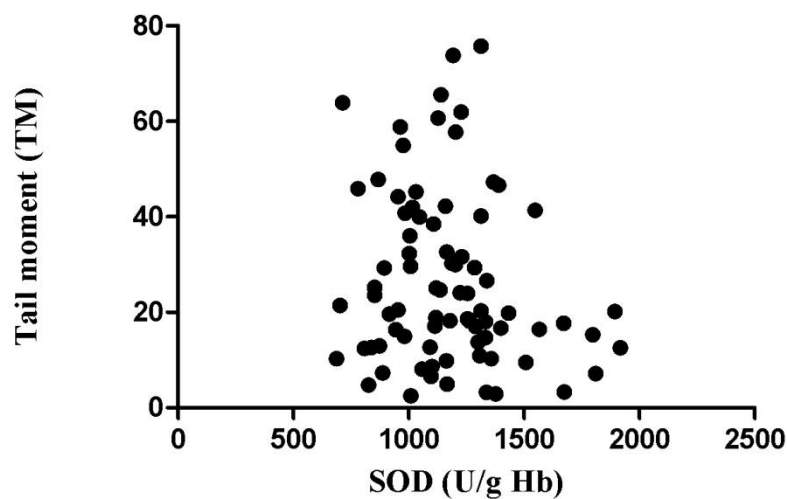


Figura 4f. Dano ao DNA (TM) em relação a atividade de SOD (U/gHb) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,14$ (IC= -0,35 a 0,86); $p = 0,207$ e $n = 80$.

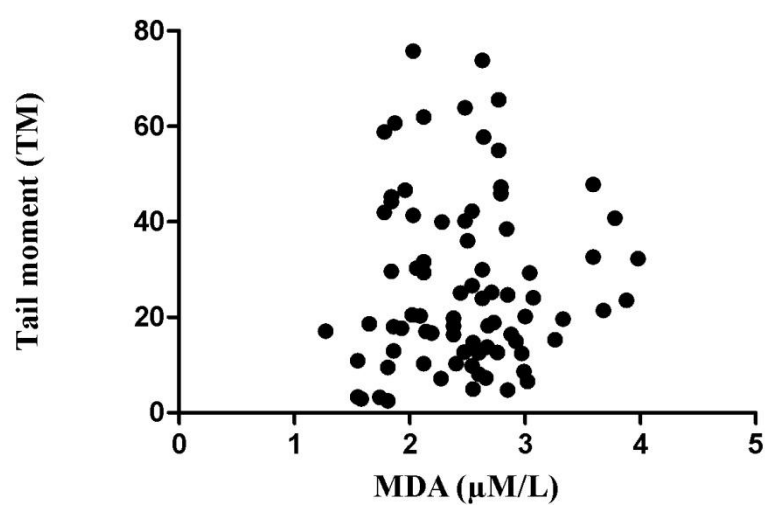


Figura 4g. Dano ao DNA (TM) em relação a concentração de MDA (μM/L) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = 0,08$ (IC= -0,15 a 0,30); $p = 0,484$ e $n = 80$.

Anexo 5

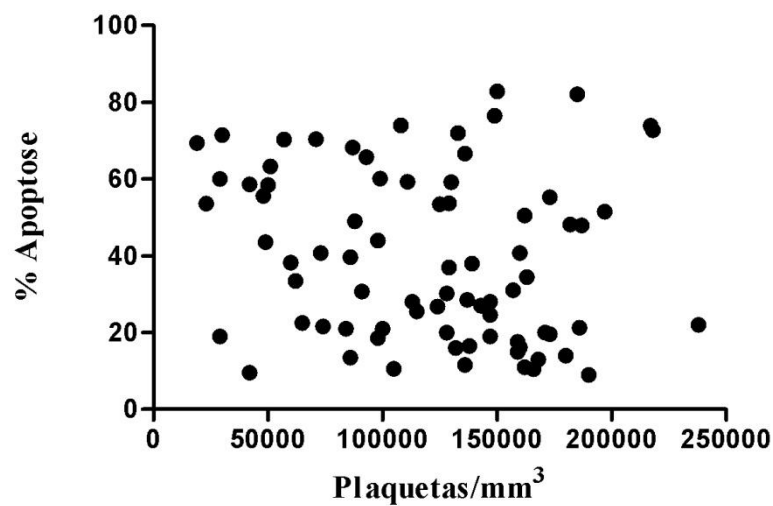


Figura 5a. Frequência da apoptose em relação ao número de plaquetas/mm³ em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,19$ (IC: -0,40 a 0,03); $p=0,09$ e $n=77$.

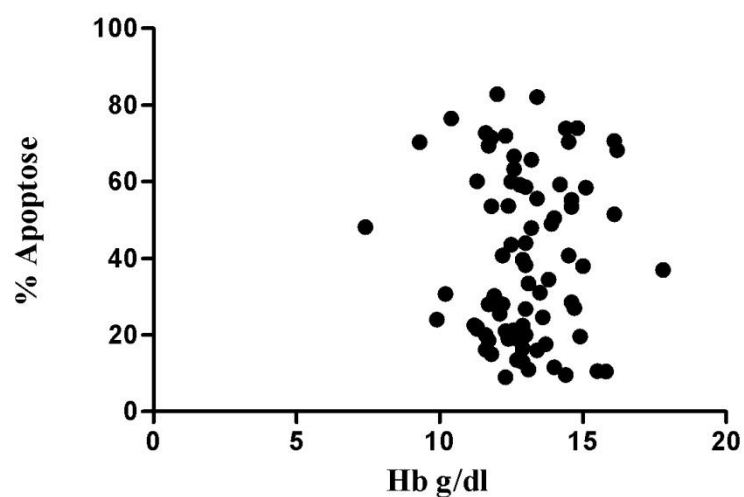


Figura 5b. Frequência da apoptose em relação a concentração de Hb g/dl em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = 0,02$ (IC: -0,20 a 0,24); $p=0,839$ e $n=80$. "

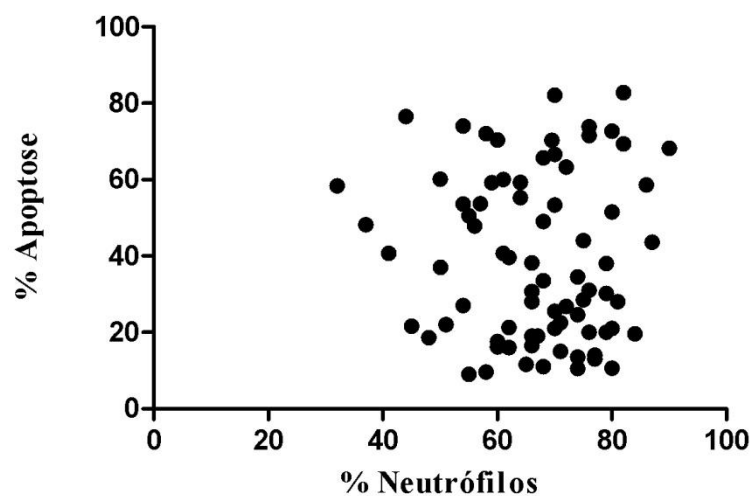


Figura 5c. Frequência de apoptose em relação ao valor relativo de neutrófilos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,03$ (IC= -0,26 a 0,20); $p=0,784$ e $n=76$.

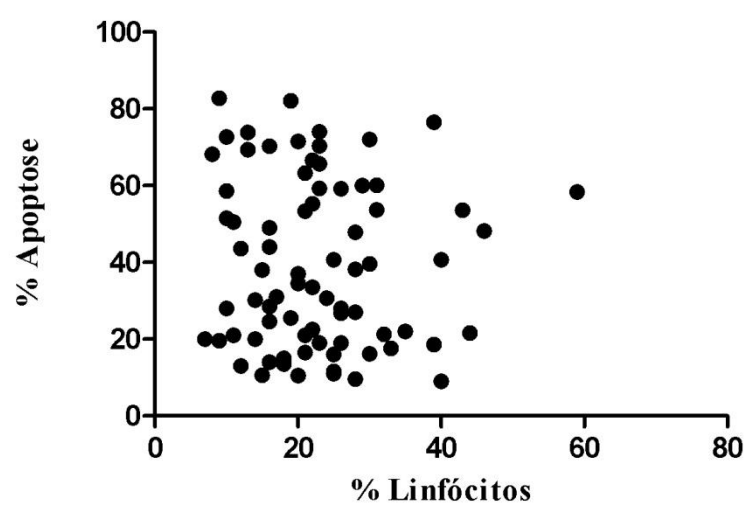


Figura 5d. Frequência de apoptose em relação ao valor relativo de linfócitos (%) em pacientes com malária causada pelo *P. vivax*. Spearman $r = -0,07$ (IC: -0,29 a 0,16); $p=0,542$; $n=76$.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(CONTROLES)

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa que pretende entender melhor as diferentes formas de apresentação da malária causada pelo *Plasmodium vivax* em nosso meio e também identificar em seu sangue, alterações que possam ser provocado pelo parasito ou pela resposta aos remédios que usamos para combater a sua doença. A participação de pessoas sem malária é importante para que nós possamos comparar os resultados com aqueles das pessoas com a doença, por isso você está sendo convidado a colaborar. Para isto, precisamos conversar com você durante alguns minutos, fazer um pequeno exame médico e tirar um pouco de sangue de sua veia, para a realização dos seguintes exames: hemograma, pesquisa de DNA do parasito, exame do DNA de suas células sanguíneas, exame de anticorpos do seu sangue contra o parasito da malária e outros, sempre relacionados à infecção malárica. Não há risco para você nesta pesquisa. Apenas o desconforto do exame médico e da retirada de sangue com agulha, que pode causar um pouco de dor.

Vários exames não serão realizados hoje. Portanto, um pouco do seu sangue ficará devidamente identificado e congelado até o momento da realização do exame. Os resultados, quando estiverem prontos, estarão disponíveis e você poderá consultá-los entrando em contato conosco no endereço abaixo.

Todas as informações obtidas nesta pesquisa serão utilizadas exclusivamente para atender aos objetivos da mesma. As informações e resultados dos exames serão confidenciais, ficando sob o poder dos médicos responsáveis pela pesquisa, os quais garantirão o sigilo dos nomes das pessoas envolvidas.

Os organizadores do projeto serão responsáveis por fornecer orientação e atendimento médico, sempre que necessário.

Você tem o direito de recusar a participação e de retirar-se desse projeto assim que desejar, sem que isso acarrete em impedimento de qualquer natureza para seu seguimento no serviço médico envolvido na pesquisa.

Eu, _____, entendi o que me foi explicado sobre o estudo e concordo com minha participação (ou com a participação de meu dependente acima).

Assinatura do participante (ou do responsável, se menor) _____

Assinatura do pesquisador principal _____

Testemunha* _____

* Testemunha só é exigido caso o participante não possa por algum motivo, assinar o termo.

Data (Cidade/dia mês e ano) _____, ____ de _____ de 20____

Contato: Prof. Dra. Carmen Lucia Bassi
 Av. Fernando Correa da Costa, s/n
 Universidade Federal de Mato Grosso
 Laboratório de Investigação da Faculdade de Ciências Médicas
 Bloco do CCBS 3, fone (65) 3615-8856

Para esclarecimentos sobre questões éticas do projeto, entrar em contato com :
 Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller
 Av. Fernando Correa da Costa, 2367
 Bairro Boa Esperança - Coxipó, Cuiabá (MT)
 CCBS I – 1º Piso – Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)
 Telefone : (65) 3615-8254
 E-mail: cepahujm@cpd.ufmt.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PACIENTES)

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa que pretende entender melhor as diferentes formas de apresentação da malária causada pelo *Plasmodium vivax* em nosso meio e também identificar em seu sangue, alterações que possam ser provocado pelo parasito ou pela resposta aos remédios que usamos para combater a sua doença. Para isto, precisamos conversar com você durante alguns minutos, fazer um pequeno exame médico e tirar um pouco de sangue de sua veia, para a realização dos seguintes exames: hemograma, pesquisa de DNA do parasito, exame do DNA de suas células sanguíneas, exame de anticorpos do seu sangue contra o parasito da malária e outros, sempre relacionados à infecção malárica. Não há risco para você nesta pesquisa. Apenas o desconforto do exame médico e da retirada de sangue com agulha, que pode causar um pouco de dor. Você poderá ser solicitado a comparecer ao Ambulatório alguns dias após a sua melhora, para a revisão médica e também para alguns exames de convalescença.

Vários exames não serão realizados hoje. Portanto, um pouco do seu sangue ficará devidamente identificado e congelado até o momento da realização do exame. Os resultados, quando estiverem prontos, estarão disponíveis em sua pasta, que ficará guardada conosco. Em qualquer momento que você desejar consultar os seus dados, basta telefonar para nós ou nos procurar aqui no Ambulatório.

Todas as informações obtidas nesta pesquisa serão utilizadas exclusivamente para atender aos objetivos da mesma. As informações e resultados dos exames serão confidenciais, ficando sob o poder dos médicos responsáveis pela pesquisa, os quais garantirão o sigilo dos nomes das pessoas envolvidas.

Os organizadores do projeto serão responsáveis por fornecer orientação e atendimento médico, sempre que necessário.

Você tem o direito de recusar a participação e de retirar-se desse projeto assim que desejar, sem que isso acarrete em impedimento de qualquer natureza para seu seguimento no serviço médico envolvido na pesquisa.

Eu, _____, entendi o que me foi explicado sobre o estudo e concordo com minha participação (ou com a participação de meu dependente acima

Assinatura do participante (ou do responsável, se menor): _____

Assinatura do pesquisador principal: _____

Testemunha*: _____

* Testemunha só é exigido caso o participante não possa por algum motivo, assinar o termo.

Cuiabá _____ de _____ de 20__

Contato: Prof. Dra Carmen Lucia Bassi
 Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)
 Av. Fernando Correa da Costa, s/n
 Bairro Coxipó, Cuiabá (MT)
 Laboratório de Investigação (CCBS III, primeiro piso)
 Telefone: (65) 3615-8856

Para esclarecimentos sobre questões éticas do projeto, entrar em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller
 Av. Fernando Correa da Costa, 2367
 Bairro Boa Esperança - Coxipó, Cuiabá (MT)
 CCBS I – 1º Piso – Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)
 Telefone : (65) 3615-8254
 E-mail: cepahujm@cpd.ufmt.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
QUESTIONÁRIO - PACIENTES

NÚMERO:	Data: __/__/____	Nome:
		Idade: Sexo ()M ()F
Endereço completo (incluir bairro e ponto de referência):		
Fone para Contato:	Fone Familiar:	Cor da Pele: ()B ()Preta ()Parda ()Amarela
Se feminino, está gestante ()S ()N		Principal Ocupação no último mês:
Quantas malária na vida, antes da atual?		Viajou para área endêmica depois do ultimo tratamento de malária?
		() Sim ()Não
Está tomando algum remédio nos últimos 7 dias?		Se sim, qual ou quais?
Há tempo você freqüenta a área endêmica de malária?		
Há quantos dias está com os sintomas desta malária?		Em que município você acha que pegou esta malária?
Teve Febre hoje? () Sim () Não		Qual foi a ultima temperatura nas ultimas 24 horas? _____°C
Nos últimos 3 dias você esta tendo: Febre? ()S ()N Calafrio? ()S ()N Dor de Cabeça ()S ()N Enjôo? ()S ()N Vômitos? ()S ()N Dor no Corpo? ()S ()N Dor no Estômago? ()S ()N		
Já teve câncer? ()S ()N Qual?		Alguém na família já teve câncer? ()S ()N Qual?
Já fez quimioterapia? ()S ()N		
Tem ou teve alguma doença infecciosa?		Tem ou teve alguma doença auto-imune (Lúpus, Artrite Reumatóide, Diabetes, etc.? ()S ()N
()S ()N Qual?		Qual?
Fuma? ()S ()N Há quanto tempo?		Já Fumou? ()S ()N Por quanto tempo?
Convive com pessoas que fumam? ()S ()N		Há quanto tempo parou de fumar?
É etilista? ()S ()N Há quanto tempo?		Fez alguma radiografia nos últimos 6 meses? ()S ()N
Quanto bebe por dia?		Há quanto tempo?

Exame Físico (Não esquecer de medir a temperatura e anotar): Quantos Kilos você pesa? (Preferível pesar o paciente)Kg Temperatura Axilar:°C				
Verificar existência: Palidez acentuada ()S ()N Icterícia ()S ()N Alterações da consciência ()S ()N Sinais de Sangramento ()S ()N Visceromegalias ()S ()N Outros:				
Resultado da gota espessa: ()PF ()PV ()PF +PV ()NEG			Parasitemia em cruzes:	
Parasitemia em 200 campos:			Resultado do teste rápido: ()PF ()Não PF ()NEG	
Hemácias:	Hemoglobina:	Hematócrito:	Leucócitos:	Plaquetas:
Tratamento Recebido: () Cloroquina + Primaquina – dose e tempo de uso () Artemeter + Lumefantrina – dose e tempo de uso () Artesunato + Mefloquina – dose e tempo de uso () Outro:				
Resultado da PCR: ()PF ()PV ()PM ()PF + PV ()PV + PM ()NEG				
Classificação da Doença: () Primoinfecção () Recrudescência () Reinfecção () Reaída				

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
QUESTIONÁRIO - CONTROLES

NÚMERO:	Data: __/__/____	Nome:
		Idade: Sexo ()M ()F
Endereço completo (incluir bairro e ponto de referência):		
Fone para Contato:	Fone Familiar:	Cor da Pele: ()B ()Preta ()Parda ()Amarela
Já teve malária?		Viajou para área endêmica?
Principal Ocupação no último mês:		
Está tomando algum remédio nos últimos 7 dias?		Se sim, qual ou quais?
Já teve câncer? ()S ()N Qual?		Alguém na família já teve câncer? ()S ()N Qual?
Já fez quimioterapia? ()S ()N		
Tem ou teve alguma doença infecciosa?		Tem ou teve alguma doença auto-imune (Lúpus, Artrite Reumatóide, Diabetes, etc.? ()S ()N
()S ()N Qual?		Qual?
Fuma? ()S ()N Há quanto tempo?		Já Fumou? ()S ()N Por quanto tempo?
Convive com pessoas que fumam? ()S ()N		Há quanto tempo parou de fumar?
É etilista? ()S ()N Há quanto tempo?		Fez alguma radiografia nos últimos 6 meses? ()S ()N
Quanto bebe por dia?		Há quanto tempo?

Ministério da Educação
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller

Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

**TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA
DE PROJETO DE PESQUISA**

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 993/CEP- HUJM/2011

"COM PENDÊNCIAS" ☐

APROVADO "ad referendum" ☐

APROVAÇÃO FINAL ☒

NÃO APROVADO ☐

O projeto de pesquisa intitulado: "**Estresse oxidativo e respostas ao dano no DNA em pacientes com malária,**" encaminhada pelo (a) pesquisador (a) **Carmen Lúcia Bassi** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 13/04/2011 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 13 de Abril de 2011.



Prof. Dra. Shirley Ferreira Pereira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM

Hospital Universitário Júlio Müller
Avenida Fernando Corrêa da Costa, Nº 2367 Bairro Boa Esperança - Cuiabá - MT, Brasil
CCBS I - 1º Piso - Universidade Federal de Mato Grosso
Fonc: 65-3615-8254. e-mail: cap@uim.ufmt.br
<http://www.ufmt.br/cep>